Cisplatin-Metformin ilaç kombinasyonu uygulamasının prostat hücre hatlarının proliferasyonu ve apoptoz mekanizmalarında önemli rol oynayan GST ile CYP17A1 ve Hekzokinaz enzimleri üzerine etkilerinin incelenmesi

Program kodu : 1002

Proje no : 115Z695

Proje yürütücüsü

Prof. Dr. Orhan Adalı

Araştırmacı: Doç. Dr. Şevki Arslan

Bursiyer: Özlem Durukan

EYLÜL 2016

ANKARA

ÖNSÖZ

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen kanser olup, yine erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık ölüme neden olan kanserdir. Birçok olgunun tedavisi cerrahi müdahale, radyoterapi, hormon tedavisi ya da kemoterapinin bir kombinasyonunu içerebilir. Ancak bu tedaviler, hastaların yaşam kalitesini düşürecek ciddi yan etkilere veya dirençli prostat kanseri vakalarının oluşumuna neden olmaktadır. Bu durum prostat kanseri tedavisinde yeni ve daha etkil tedavi metodlarının araştırılması ile ilgili çalışmaları önemli kılmaktadır. Son yıllarda prostat kanseri insidansı artarken, ölüm oranı azalmaktadır. Bunun nedeni de, erken tanı olanaklarının artmasının yanısıra yeni bulunan tedavi ajanları ile sağkalımın uzamasıdır. Bu bilgiler doğrultusunda, tasarlanan çalışmada antidiyabetik ilaç metforminin yeni anlaşılan antikanserojen etkisi göz önünde bulundurularak, sıklıkla kullanılan cisplatin kemoterapötik ilacının kombine tedavisinin apoptotik yolaklarda önemli rol oynayan GST enzimleri, androjen sentez yolağında anahtar rol oynayan CYP17A1 enzimi ve kanser hücrelerinin temel enerji kaynağı glikoliz yolağını düzenleyen hız kesici enzim olan Hekzokinaz II enzimlerinin protein ve gen expresyonları üzerine etkileri araştırılmıştır. Yüzyılımızın korkutucu hastalığı olan kanserin tedavisinde, diyabet temelli ilaçların, kemoterapötik ilaçlar ile kombine kullanımı ilaç toksisitesini indirgemek ve kemoterapötik tedavinin maliyetini düşürmek açısında faydalı olacağını düşündürmektedir . Bu çalışma TÜBİTAK Kimya - Biyoloji Araştırma Grubu tarafından 115Z695 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir. Bu çalışmaya desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi iletiriz.

Prof. Dr. Orhan ADALI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ii

ŞEKİL LİSTESİ v

TABLO LİSTESİ vii

ÖZET ix

ABSTRACT xi

1.GİRİŞ ve Literatür Özeti 1

2.GEREÇ VE YÖNTEM 11

2.1 Metformin ve Cisplatinin Prostat Kanseri Hücre Hatları Proliferasyonu ve Hucre Apoptozu Üzerine Etkileri: 11

2.1.1 Hücre hatları ve Büyüme ortamlarının hazırlanması 11

2.1.2 Hücre Proliferasyon Çalışmaları 11

2.2.1 Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonların Eldesi 12

2.2 Metformin ve Cisplatinin GST,CYP17A1 ve HKII enzimlerinin Protein ve mRNA Seviyeleri Üzerine Etkileri 12

2.2.2 Protein Tayini 12

2.2.3 Metformin ve Cisplatinin Protein Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanmas 13

2.2.4 Metformin ve Cisplatinin mRNA Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması 14

2.3. İlaç kombinasyonunun Apoptoz üzerine etkileri 16

2.3.1 Annexin VEGFP İnkübasyonu 16

2.3.2 İndüklenmiş Apoptozun Saptanması 16

3.BULGULAR 17

3.1 Hücre Kültürü: 17

3.1.1 Cisplatin İlacının IC50 değerinin Hesaplanması 17

3.1.2 Cisplatin Metfromin Kombine Etkisinin Tayini 20

3.2 Hücre Lizatlarının Protein Tayini……24

3.3 Metformin Cisplatin İlaç Kombinasyonunun CYP17A1,GSTP ve HKII Enzimlerinin Protein Expresyonlar Üzerine Etkisi.....25

3.3.1 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun CYP17A1 Enzimi Üzerine Etkileri……..25

3.3.2 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun GSTP Enzimi Üzerine Etkileri……...….29

3.4 Metformin Cisplatin İlaç Kombinasyonunun CYP17A1,GSTP ve HKII Enzimlerinin mRNA Expresyonlaı Üzerine Etkisi……33

3.4.1 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun CYP17A1 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkileri…….34

3.4.2 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun GSTP mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkileri……39

3.4.3 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun HKII mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkileri……44

3.5İlaç kombinasyonunun Apoptoz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi…...……53

4.Tartışma ve Sonuç……...55

5.Kaynakça…….....58

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Cisplatin İlacının Kimyasal Formülü 3
Şekil 1. 2 Metformin İlacının Kimyasal Formülü 4
Şekil 1.3 Metforminin AMPK Yolğı Üzerine Etkisi 6
Şekil 1.4 GSTT ve JNK Protein:Protein İnterraksiyonu 8
Şekil 1.5 CYP17 Enziminin Androjen Sentez Yolağındaki Rolü 9
Şekil 3.1 Cisplatin ile Muamele edilen LNCaP Hücre Hatlarının Hücre Proliferasyon Grafiği 19
Şekil 3.2 Cisplatin ile Muamele edilen LNCaP Hücre Hatlarının Hücre Sağ Kalım Grafiği 19
Şekil 3.3 Cisplatin ile Muamele edilen PC3 Hücre Hatlarının Hücre Proliferasyon Grafiği.....20
Şekil 3.4 Cisplatin ile Muamele edilen PC3 Hücre Hatlarının Hücre Sağ Kalım Grafiği.....20
Şekil 3.5 Cisplatin Metformin Kombinasyonunun LNCaP Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi……..23
Şekil 3.6 Cisplatin Metformin Kombinasyonunun LNCaP Hücre Hattıa Proliferasyonu Üzerine Etkisi 23
Şekil 3.7 Cisplatin metformin ilaç kombinasyonunun PNT1A hücre hattında sağ kalım grafiği……..24
Şekil 3.8 Cisplatin Metformin ilaç kombinasyonunun PNT1A hücre hattında proliferasyon yüzdesi grafiği……..25
Şekil 3.9 LNCaP Hücre Hatlarında CYP17A1 Enzim Expresyonunu Gösteren İmmunoreaktif Bantlar.....27
Şekil 3.10 LNCaP Hücre Hatlarında CYP17A1 Enzim Expresyonunun Karşılaştırmalı Analizi. 28
Şekil 3.11 PC3 Hücre Hatlarında CYP17A1 Enzim Expresyonunu Gösteren İmmunoreaktif Bantlar.....29
Şekil 3.12 PC3 Hücre Hatlarında CYP17A1 Enzim Expresyonunun Karşılaştırmalı Analizi 30
Şekil 3.13 LNCaP Hücre Hatlarında GSTP Enzim Expresyonunu Gösteren İmmunoreaktif Bantlar 32
Şekil 3.14 LNCaP Hücre Hatlarında GSTP Enzim Expresyonunun Karşılaştırmalı Analizi.....32

Şekil 3.15 PC3 Hücre Hatlarında GSTP Enzim Expresyonunu Gösteren İmmunoreaktif Bantlar.....33
Şekil 3.16 PC3 Hücre Hatlarında GSTP Enzim Expresyonunun Karşılaştırmalı Analizi. 34
Şekil 3.17 LNCaP Hücre Hattı İçin Standart Kalibrasyon Eğrisi 36
Şekil 3.18 Amplifikasyon Analizi 36
Şekil 3.19 LNCaP Hücre Hattı İçin Erime Eğrisi.....37
Şekil 3.20 CYP17A1 PCR Ürünleri 37
Şekil 3.21 GAPDH PCR Ürinleri 37
Şekil 3.22 LNCaP Hücre Hattında CYP17A1 mRNA Ekspresyonu Grafiği.....38
Şekil 3.23 PC3 Hücre Hattı İçin Standart Kalibrasyon Eğrisi.....39
Şekil 3.24 Amplifikasyon Analizi 39
Şekil 3.25 PC3 Hücre Hattı İçin Erime Eğrisi 39
Şekil 3.26 CYP17A1 PCR Ürünleri 40
Şekil 3.27 LNCaP Hücre Hattında mRNA Ekspresyonu Grafiği 40
Şekil 3.28 LNCaP Hücre Hattı İçin Standart Kalibrasyon Eğrisi 41
Şekil 3.29 Amplifikasyon Analizi 41
Şekil 3 30 LNCaP Hücre Hattı İçin Erime Eğrisi.....42
Şekil 3.31 LNCaP Hücre Hattında GSTP PCR Ürünleri 42
Şekil 3.32 LNCaP Hücre Hattında GSTP mRNA Ekspresyonu Grafiği.....43
Şekil 3.33 PC3 Hücre Hattı İçin Standart Kalibrasyon Eğrisi……44
Şekil 3.34 Amplifikasyon Analizi……44
Şekil 3.35 PC3 Hücre Hattı İçin Erime Eğrisi……..44
Şekil 3.36 PC3 GSTP PCR Ürünleri……45
Şekil 3.37 PC3 Hücre Hattında GSTP mRNA Ekspresyonu Grafiği……45
Şekil 3.38 LNCaP Hücre Hattı için Standart Kalibrasyon Eğrisi……..47
Şekil 3.39 Amplifikasyon Analizi……47
Şekil 3.40 LNCaP Hücre Hattı İçin Erime Eğrisi……47
Şekil 3.41 LNCaP Hücre Hattında HKII PCR Ürünleri……...48
Şekil 3.42 LNCaP Hücre Hattında HKII mRNA Ekspresyonu Grafiği……48
Şekil 3.43 PC3 Hücre Hattı için Standart Kalibrasyon Eğrisi……50
Şekil 3.44 Amplifikasyon Analizi……50
Şekil 3.45 PC3 Hücre Hattı İçin Erime Eğrisi……..50

Şekil 3.46 PC3 Hücre Hattında HKII PCR Ürünleri……50

Şekil 3.47 PC3 Hücre Hattında HKII mRNA Ekspresyonu Grafiği……..51

Şekil 3.48 Apoptotik hücrelerin floresan mikroskobu görüntüsü……53

Şekil 3.49 Apoptotik hücre sayılarının karşılaştırmalı grafiği……54

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin içerikleri.....13

Tablo 2. 2 Seçilen Genlerin Primer Dizileri……..16

Tablo 3. 1 LNCaP hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.....17

Tablo 3.2 PC3 hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.....18

Tablo 3.3 LNCaP hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.....23

Tablo 3.4 PC3 hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.....22

Tablo 3.5 LNCaP hücre halarından elde edilen ortalama protein konsantrasyonları.....24

Tablo 3.6 LNCaP hücre hattında CYP17A1 protein expresyonunun istatistiksel analizli.....27

Tablo 3.7 PC3 hücre hattında CYP17A1 protein expresyonunun istatistiksel analizli.....29

Tablo 3.8 LNCaP hücre hattında GSTP protein expresyonunun istatistiksel analizli.....31

Tablo 3.9 PC3 hücre hattında GSTP protein expresyonunun istatistiksel analizli.....33

Tablo 3.10 LNCaP Hücre Hattında GSTP mRNA expresyonlarının istatistiki karşılaştırılması.....44

Tablo 3.11 LNCaP Hücre Hattında Hekzokinaz II mRNA expresyonlarının istatistiki karşılaştırılması.....47

Tablo 3.12 PC3 Hücre Hattında Hekzokinaz II mRNA expresyonlarının istatistiki karşılaştırılması.....50

ÖZET

Prostat kanseri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen kanser türlerinden biri olup günümüzde prostat kanseri tedavisindeki yaklaşımlar metastaz gelişimine, ilaç direnci oluşmasına ve sağlıklı dokularda toksik etkilere sebep olabilmektedir. Bu nedenle tedavide daha etkili ancak daha az yan etkiye sahip kanser önleyici molekülleri tespit etmek kanser araştırmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

Cisplatin prostat kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan antineoplastik bir ajandır. Ancak, cisplatinin yüksek etki derecesine karşın yan etkileri ilacın kullanımını kısıtlamaktadır. Bu yan etkilerini azaltmak amacıyla başka ajanlar ile kombine terapiler son yıllarda bilim insanlarının ilgi odağı olmuştur. Antidiyabetik ilaç metforminin anti-proliferatif etkisi göz önünde bulundurulduğunda, antineoplastik ajan cisplatin ile tamamlayıcı bir tedavi sunabileceği açıktır.

Tasarlanan çalışmada bu iki ilacın kombine kullanımının hücrede apoptoz ve detoksifikasyon enzimleri olarak bilinen Glutatyon-S Transferaz (GST) izozimleri üzerine etkilerine bakılmıştır. Prostat kanseri tedavisinde birincil amaç hormon (androjen) üretimini durdurmaktır. Bu yüzden cisplatin-metformin kombine kullanımının androjen sentezinde anahtar fonksiyonu olan CYP17A1 enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bilindiği üzere, kanser hücrelerinin hızlı büyüyüp bölünmesinde glikoliz metabolizmasında rol oynayan Hekzokinaz II regülatör bir enzimidir. Bu durum göz önüne alındığında, yapılan çalışmada ilaç kombinasyonunun Hekzokinaz II enzimi üzerine etkileri de incelenmiştir.

Yapılan çalışmada androjen reseptörüne bağımlı LNCaP ve androjen reseptöründen bağımsız PC3 insan prostat kanseri hücre hatları ve burada verilen ilaçların sağlıklı dokular üzerine etkilerini saptamak amacıyla normal prostat hücre hattı olan PNT1A kullanılmıştır. İlaçların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri "alamar blue" analizi ile ölçülmüş olup, ilaç kombinasyonunun belirlenen enzimlerin protein ve mRNA ekspresyonlarına olan etkisi sırasıyla Western-blot ve qRT-PCR teknikleriyle tespit edilmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda, ilaç kombinasyonunun hücre proliferasyonunu durdurucu özelliği olduğu her iki hücre hattında da ortaya konulmuştur. Ancak bu antiproliferatif etki GSTP1 enzimleri ile ilişkilendirilememişdir. Androjen sentezinde rol oynayan CYP17A1 enzim expresyonunun PC3 hücre hattında anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Hexokinase II gen expresyonu her iki hücre hattında da azalmıştır. Sonuç olarak hücre proliferasyonunun azalması, HKII geninin ekspresyonundaki düşüş ile ilişkilendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Metformin, cisplatin, apoptoz, GST, sitokrom P450, CYP17A1, Hekzokinaz II, prostat kanseri

ABSTRACT

Prostate cancer is the most commonly seen cancer type both in developed and developing countries. Current therapeutic approaches for prostate cancer generally have variable side effects. Hence, the searching for more effective strategies remains one of the important issues in cancer research.

Cisplatin, an antineoplastic agent, is widely used in the treatment of prostate cancer. Despite the high efficiency of cisplatin on prostate cancer treatment side effects restricts the use of cisplatin. In order to reduce the side effects of cisplatin, combination therapy with other agents has been the focus of scientists in recent years. Considering the inducer effect of antidiabetic drug metformin with antineoplastic agent cisplatin can provide a complementary treatment.

In the present study, the effects of metformin-cisplatin combined therapy on GST isozymes, known as detoxification and apoptotic enzymes, were determined. In addition, to determine the effect of this combination on the role of androgen synthesis, expression of CYP17A1 enzyme was examined. Furthermore, the effect of treatment on hexokinase II enzyme which plays an important role in the glycolysis pathway was investigated.

Two types of human prostate cell lines; androgen receptor dependent PC3 and androgen receptor independent LNCAP prostate cell lines, and also to determine the effect of those drugs on healthy cells PNT1A cells were used. Dose response and cytotoxic effect of combination treatment were measured by Alamar Blue assay. Also, effects of drugs on CYP17A1, GST's and Hexokinase II were investigated by protein and mRNA expressions using Western-Blot and qRT-PCR, respectively.

The cell proliferation results showed that, metformin potentiates the antiproliferative effect of cisplatin both in LNCaP and PC3 cell lines. But, this effect could not be attirubuted to GSTP enzymes. On the other hand, cisplatin-metformin drug combination significantly decreased the CYP17A1 protein expressions in PC3 cell lines. Furthermore, Hexokinase II mRNA expressions are significantly decrease in a dose dependent manner in both cells.

Keywords: Metformin, cisplatin, apoptosis, GST, Cytochrome P450, CYP17A1, Hexokinase II, prostate cancer

1. GİRİŞ ve LİTERATÜR ÖZETİ

Giriş

Prostat kanseri dünya çapında 2. En yaygın kanser türü olmakla birlikte kanser temelli ölüm vakalarının nedeni olarak 6. Sırada yer almaktadır. Sadece Avrupa'da değil Türkiyede de akciğer kanserinden sonra 2. En yaygın tür olarak bilinmektedir. Prostat kanseri tedavi yöntemleri çeşitlilik göstermekle birlikte bu tedavilerin yeterliliği ve güvenilirliği hala tartışılmaktadır. Uygulanan tedavilerin kısa zamanda tümörü dirençli hale geirmesi ve tedavi gören hastaların yaşam standartlarını düşürmesi, bu tip kanserlerin tedavisinde yeni ve daha yararlı yöntemlerin geliştirilmesi yolunda araştırmacıları cesaretlendirmektedir. Prostat kanserinin bahsedilen yan etkilerini en aza iindirgemek amacıyla birçok tedavi seçeneği ve ilaç kombinasyonu tasarlanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada Tip2 diyabet ilacı olarak sıklıkla kullanılan Metformin ilacını, yüksek antikarsinojenik potansiyeli bilinen Cisplatin ile kombinasyonu üzerine yoğunlaşılmış olup bu iki ilacın birbirinden farklı yolaklarda kilit rol oynayan ve herbiri kanser hücresinin metabolizması ve proliferasyonu üzerine vital etki yapan enzimlerin ekspresyonları üzerine etkileri incelenmiştir. Seçilen enzimler, androjen metabolizmasının regülasyonunda önemli rol oynayan CYP17A1 enzimi, apoptotik yolakların regülasyonunda anahtar rol oynayan GST enzimleri ve glikoliz yolağında hız kesici enzim olarak bilinen ve çoğu kanser türünde hücresel proliferasyonu ve tümör büyümesini destekleyen HekzokinazII enzimi üzerine çalışılmıştır.

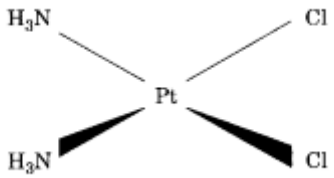
Literatür Özeti

Prostat kanseri erkekler arasında en sık görülen kötü huylu tümör olup gelişmiş ülkelerde ölümle sonuçlanan hastalıklar arasında 3. sırada yer almaktadır (Waltering ve ark., 2009). Normal bir prostat dokusunda sinyal yolağı androjen tarafından düzenlenmekte olup salgı bezindeki hücrelerde büyüme ve apoptoz arasında bir denge bulunmaktadır (Heinlein ve Chang, 2004). Kanserli dokuda ise bu denge kaybolmuş olup androjen ekspresyonundaki artıştan dolayı salgı bezlerindeki hücrelerde hızlı bir artış meydana gelmekte ve prostatta büyüme meydana gelerek sonuçta prostat kanserine neden olmaktadır (Rittmaster, 2008). Prostat kanserinin ilk dönemlerinde tedavi amacıyla uygulanan androjen çıkartma işlemleri androjen bağımlı kanser türlerinde etkili olmakla beraber büyümek ve yayılmak için androjene ihtiyaç duymayan kanser türlerinde herhangi bir etki gösterememektedir (Eisenberger ve ark., 1998). Bundan dolayı prostat kanseri tedavisinde androjene bağımlılıklarına bakılmaksızın etkili ilaçların üretilmesi ve kullanılması gerekmektedir (Shankar ve ark., 2005). Bundan dolayı prostat hücre hatlarından androjen reseptörüne bağımlı olan LnCaP ve androjen reseptöründen bağımsız olarak çoğalabilen PC3 hücre hatları prostat kanseri üzerine olan yapılması tasarlanan çalışma için iyi bir model oluşturmaktadırlar. Ayrıca kullanılacak olan sağlıklı prostat hücre hattı olan PNT1A ile ilaçların sağlıklı prostat dokusu üzerindeki etkileri karşılaştırılabilmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO); obeziteyi; “sağlığı bozacak ölçüde yağ dokularında anormal (hiperplazik) ve aşırı miktarda (hipertrofik) yağ birikmesidir” şeklinde tanımlamaktadır. Dünyada 1.1 milyar insanın aşırı kilolu veya obez olduğu bildirilmiştir. Vücut ağırlığı ve vücut yağ oranının artması, endokrin ve metabolik değişikliklerle karakterize olup çok sayıda kronik hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmektedir ve çeşitli kanser türleri de bu hastalıklardandır (WHO Technical Report series). Erkeklerde abdominal obezite ve bel/kalça oranı artışının prostat kanseri için bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir. Özellikle yayılmaya (metastaz) meyilli prostat tümörlerinde obezite daha da risk taşımaktadır. Vücut kitle endeksi ve prostat kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sonuçları farklı olsa da leptin hormonunun yüksekliği, insülin ve IGF-1 (İnsülin Büyüme Faktörü-1)’in yüksek olması hastalık riskini arttırmaktadır (Schernhammer, E.S., ve ark, 2005).

Bu konuda yapılan son çalışmalar; IGF’lere etki eden mekanizmalar üzerine yoğunlaşmıştır. IGF’lerin vücutta insülin hormonu gibi görev yaptığı bilinmektedir. Örneğin bazı yağ asitlerinin IGF üzerine etkileri bulunmaktadır. Bunlardan palmitat (doymuş yağ asidi) ve oleat (doymamış yağ asidi) kanda, serbest halde dolaşan yağ asitlerinden çok bilinen iki tanesidir. Bu iki yağ asidi IGF’lerin üretimi ve aktivitesini etkilerler. IGF’ler ise vücutta apoptosis olayının

gerçekleşmemesinde hücrelere en güçlü sinyalleri gönderirler. Eğer vücutta IGF'lerin sinyalleri normalden daha fazla ise hasar görmüş hücreler ölecekleri yerde, kontrolsüz bir şekilde büyür ve kanser hücrelerini oluştururlar. Kanda yüksek olan serbest yağ asidi düzeyi insüline karşı direncin gelişmesine neden olur. Obezite; vücutta depolanan yağ miktarının artmasına, uzun süreli enerji dengesizliğine (alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması) ve kanda dolaşan serbest yağ asidi miktarının artmasına neden olmaktadır. Bu da insülin rezistansının gelişmesine neden olur. İnsülin resistansı ise diyabet, kalp hastalıkları ve çeşitli kanser türleri ile yakından ilişkilidir. Kandaki insulin seviyesinin çeşitli kanser türleri ile bir bağlantısının olduğu bilinmektedir (Schernhammer, E.S., ve ark, 2005). Bu çalışmalar, anti-diabetik ilaçların kanser tedavilerinde kullanılabilmesini mümkün kılmaktadır. Cisplatin hücresel bölünmeyi ve gelişmeyi engelleyen (antineoplastik) bir ilaçtır. Cisplatin gibi kemoterapötik ajanlar kanser hücrelerinin çoğalmasına engel olarak, vücuttaki gelişimlerini ve yayılımlarını yavaşlatarak çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Özetle, cisplatin (cis-diamindikloroplatinum, CDDP) DNA çift zincirlerine zincir arası ve zincir içi çapraz bağlanır. Bu nedenle etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlara benzer. Cisplatin özellikler Guanin ve Adenin bazlarının 7. Pozisyonundaki azota bağlanarak DNA'nın yapısını bozarak replikasyon ve transkripsiyonunu engeller (Şekil1.1).

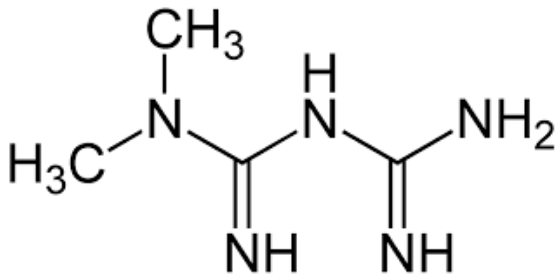


Şekil 1.1 Cisplatin ilacının kimyasal formülü (The chemical book database, 2014).

Cisplatinin toksisitesi ve taşıdığı minör riskler tedavide gösterdikleri potansiyel yararlılık düşünüldüğünde sıklıkla göz ardı edilir (Esra A. ve ark., 1999). Cisplatin testis, over, mesane karsinomaları gibi karsinomaların tedavilerinde kullanılan bir kemoterapötiktir. Yüksek seviyede antitümörik özelliğine karşın nefrotoksisite, nörotoksisite ve gastrointestinal irritabilite gibi etkilerinin yanında cisplatin tedavisi alan üreme çağındaki erkeklerde oligospermi, azospermi ve infertilite gelişmesi önemli bir yan etkidir (Pogach L.M. ve ark., 1989). Cisplatinin yan etkileri göz önünde bulundurulduğunda hastanın sosyolojik ve psikolojik olarak tedaviden minimum seviyede zarar görmesini sağlayacak yeni yöntemlerin keşfedilmesi önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Bu proje kapsamında tasarlanan çalışmada Tip2 diyabet ilacı olan metformin ve kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılan cisplatin ilacının kombine tedavisinin, hücre proliferasyonunu azaltarak aynı zamanda programlanmış hücre ölümlerini indüklemesi

planlanmıştır. Böylece daha az miktarda kemoterapötik ilaç kullanımı sağlanarak cisplatinin tahrip edici yan etkileri minimuma indirgenmeye çalışılmıştır.

Biguanid grubu ilaç olan Metformin, Orta Doğu bölgesine özgü *Galega officinalis* adındaki bitki ekstresinden sentezlenmiştir ve 35 yıl boyunca araştırma amaçlı kullanılmıştır (Şekil 1.2; Witters LA. Ve ark., 2001). 1950 yılında Filipinlerde Eusebio Y. Garcia tarafından influenza tedavisi için kullanılırken ilacın kan şekeri düşürücü etkisi tanımlanmış, Garcia ilacın antiviral, antimalaryal, antipiretik etkisi ile ilgili makaleler yayınlamıştır. Sonrasında Fransa'da Dr.Jean Sterne, 1957 yılında Aron loboratuvarındaki çalışmalarında şeker düşürücü etkisini araştırmış ve sonrasında ilk defa diyabet tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Metforminin çeşitli hastalıklarda gösterdiği bu tedavi edici özellikler, bu ilacın geniş spektrumlu tedavi edici özelliğini ortaya koymaktadır ve kanser tedavisi için de kullanılabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 1.2 Metformin ilacının kimyasal formülü.

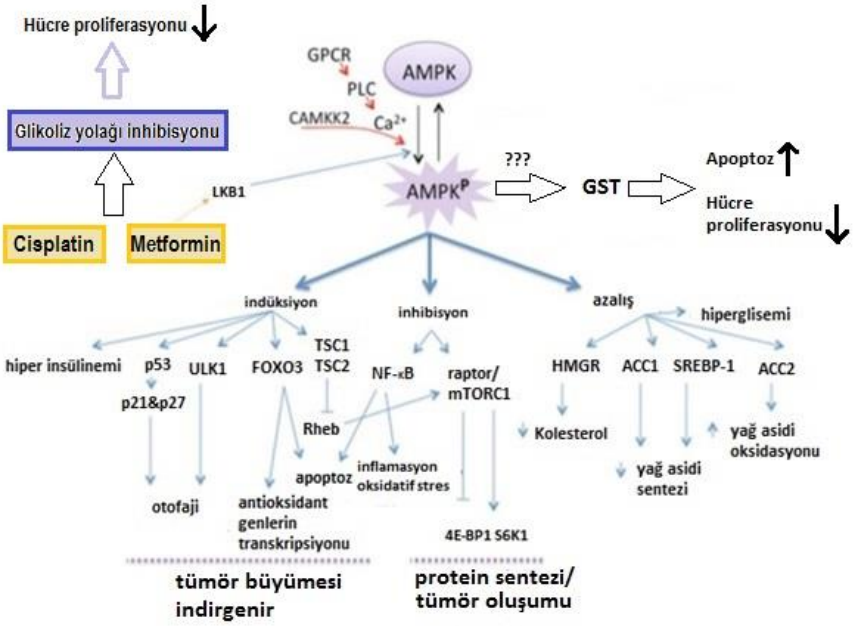
Metformin, gastrointestinal lümenden absorbe edilir ve monoamin plazma membranı taşıyıcıları tarafından taşınır. Hepatositlerin bazolateral membranında bulunan organik katyon taşıyıcısından (OCT1) geçerken hepatik glukoz sentezini azaltır. Bu durum OCT1 geni inaktive edilmiş fare deneyleri ile ispatlanmış, sonuç olarak metforminin asıl absorbe edildiği yerler olan hepatik ve intestinal dokularda kontrol (OCT1 geni aktif-normal fareler) grubuna kıyasla absorbansının düştüğü gözlemlenmiştir (Shu Y. ve ark., 2007). Bu gibi çalışmalar göstermiştir ki OCT1 geni intraselüler metformin konsantrasyonunun düzenlenmesinde hayati rol oynamaktadır. Diğer yandan metformin, böbrek proksimal tübüler hücrelerinin apikal membranında bulunan MATE1 ve MATE2 enzimleri ile metabolize edilmeden idrar ile birlikte vücuttan atılır (Stocker SL. Ve ark., 2013). Glikozun intestinal sistemden absorbsiyonunun indirgenmesine bağlı olarak, metformin periferal glukoz absorbsiyonunu arttırarak ve iskelet kaslarının ve yağ dokusunun glikozdan maksimum seviyede faydalanmasını sağlayarak insülin duyarlılığını arttırmaktadır (Ashokkumar N. ve ark., 2006). İnsülin reseptörünün afinitesini arttırarak hiperinsülinemi ve insülin direncinin azaltılmasına yardımcı olur. Bunlara ek olarak metformin dislipideminin göz ardı edilmesine kandaki total kolesterol, düşük densiteli kolesterol

(LDL) ve trigliserit miktarını arttırarak yardımcı olur (Bailey CJ. Ve ark., 1996). Aynı zamanda metformin kullanımı vücut ağırlığını düşürerek vücut ağırlığını dengelemekte böylece obez hastalara da yardım etmektedir (Harborne LR. Ve ark., 2005; Rojas LB. ve ark., 2013). Metformin bu özelliklerin yanı sıra piyasadaki diğer ilaçlara kıyasla çok düşük maliyetli bir ilaçtır. Metforminin iyi karakterize edilmiş ve güvenilir bir profil çizen anti diyabetik ve antikanserojen bir ilaç olması kullanılabilme potansiyelini arttırmaktadır.

Metformin AMPK yolağını kullanarak metabolik programlama ve kanser oluşumunda anahtar model oluşturduğu bilinen lipid enzimlerinin aktivitesi ve gen expresyonları üzerinde etki gösterir. Fosforile olan AMPK, lipojenik transkripsiyon faktörü sterol regülatör-element bağlanma proteinini (SRBP-1) ve bu proteinin hedef genleri olan FAS, HMGR gibi hücre proliferasyonu ve kanser formasyonunda önemli rol oynayan genlerin mRNA ve protein ekspresyonlarını düşürür (Zhou G. ve ark., 2001; Ouyang J. ve ark., 2011). HMGR'nin (HMG-CoA'nın mevalonata dönüşmesinden sorumlu enzim) birçok kanser formunda expresyonunun normal hücrelere göre daha fazla olduğu saptanmıştır ve AMPK direkt olarak bu geni inaktive edebilir (Endo A. ve ark., 1976). Bir başka lipojenik enzim olan Astetil Co-A karboksilaz (ACC) aktivitesi de AMPK ile baskılanabilir. Astetil Co-A karboksilaz enziminin; ACC1 ve ACC2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. ACC1'in fosforilasyonu yağ asidi sentezini bloke ederken, ACC2 yağ asidi oksidasyonunu kontrol eder (Hardie DG. Ve ark., 2002). LNCaP hücre hattı (prostat hücre hattı) ile yapılan bir çalışmada ACC1 geni siRNA ile susturulmuş ve bu hücrelerde hücre bölünmesinin durduğu aynı zamanda kaspaz bağımlı apoptozun indüklendiği gözlemlenmiştir (Brusselmans K. ve ark., 2005). Metforminin hücre sinyal yolağındaki aktive ve/veya inhibe edici etkileri göz önünde bulundurulduğunda kanser hücresi proliferasyonu inhibisyonu ve apoptotik yolakların aktivasyonu üzerinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir ve bu veriler yapılan çalışmayı daha güvenilir kılmaktadır.

Metformin, hücresel büyüme üzerine etkilerini LKB1/AMPK yolağını aktive ederek, p53 transkripsiyon faktörünü stabilize ederek ve mTOR inhibisyonu ile gösterir. Transkripsiyon faktörü p53, p21 geninin transkripsiyonu ile ilişkilidir ve apoptotik genler olan Bax, kaspaz 3,6,9'un ekspresyonlarını arttırır (Miyashita T. ve ark., 1995). Moleküler sinyal yolağında oluşan bu durum hücrelerin latent fazda durmasını ve G_0/G_1 fazında hücre birikimine neden olmaktadır. Bu durum tümörün büyümesin snırlanması ve sonuç olarak otofaji ve/veya apoptoza neden olmaktadır (Liang J. ve ark., 2007). AMPK'in antiproliferatif etkisi metformin ile aktive edilir. Bu aktivasyon sonucunda insan/rat aortik hücrelerinin büyümesi baskılanır ve bu yolla tümör angiogenezinin engellenmesi sağlanır. Böylece tümör hücresi gerekli besin maddelerini alamaz ve büyüyemez. Hücre kültürü (Xiang X. ve ark., 2004; Zakikhani M. ve ark., 2008), hayvan deneyleri (Hosono K. ve ark., 2010) ve epidemiyolojik çalışmalar göstermektedir ki metformin hastaların yasam kalitesini arttırmakla beraber kolon (Lee JH. Ve

ark., 2012) ve prostat (Noto H. ve ark., 2012) kanserlerinde ölüm riskini de minimuma indirgemektedir. Multi-etnik epidemiyolojik çalışmalara göre prostat kanseri etnik gruplar ve erkeklerin diyabet ve/veya diğer tedaviler (metformin) almış olamalarına göre değişiklik göstermektedir (Noto H. ve ark., 2012). Metforminin populasyon temelli etkinliği üzerinde etkili olan OCT1-2 polimorfizmleri ile ilgili literatürler mevcuttur (Takane H. ve ark., 2008). Metforminin hücre büyümesinde etkili yolaklar üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda, yapılan çalışma ile ilgili bir literatür bulunmamaktadır. Bu da çalışmamızı özgün kılmaktadır.



Şekil 1.3 metforminin AMPK yolağı ve hücre proliferasyonu, apoptoz mekanizmalarında vital rol oynayan genler üzerine etkilerinin şematik gösterimi.

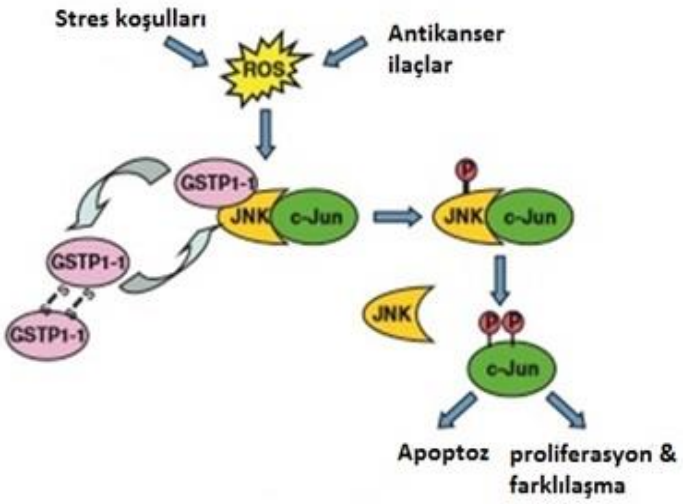
Yukarıda da belirtildiği gibi metformin hücre bölünmesinde kilit rol oynayan yolakları regüle ederek, tumor formasyonunu, büyümesini ve apoptozu kontrol etmektedir. Yapılan çalışmada literatürde bilinen yolaklara bir yenisini daha eklemek, hücre detoksifikasyonunda rol oynayan GST enzimlerine etkileri saptanarak yeni bir bakış açısı getirilmiştir.

Bilindiği gibi serbest oksijen radikalleri hücre için toksik etki oluşturmaktadır. Bu ajanların tahrip edici etkilerini elimine etmek hücre detoksifikasyonu için önemli bir basamak oluşturmaktadır. Katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler antioksidant mekanizmanın ilk basamağını oluşturmaktadırlar. Ancak son yıllarda araştırmacılar GST enzimleri üzerine yoğunlaşmaktadırlar. Glutatyon (GSH) enzimatik olmayan reaksiyonlarla glutatyon disülfata (GSSG) okside olurlar. Hücrede reaktif oksijen türleri (ROS), serbest radikaller ya da nitrikoksit türleri (NO) varlığında GSH/GSSG oranındaki dengesizlik, redoks

tepkimesinin oksidasyonun olduğu yere doğru kaymasına neden olur. Bu kayma bazı sinyal yolaklarını aktive ederek (AMPK gibi) hücre proliferasyonunu azaltır ve apoptozu indükler. Glutatyon homeostazını etkileyen en önemli faktör Glutatyon S-transferazların (GST) kullanımı ile konjugasyon reaksiyonlarıdır. Birçok kanser ilacı antikanser özelliklerini hücre içerisinde ROS oluşturarak gösterirler. Ne yazıkki sıklıkla kullanılan kanser ilaçlarının çoğu GST enzim ailesinin substratıdır. Yani bu ilaçlar hücre içerisine alındıklarında GST enzimleri tarafından kemoterapötik etkilerini göstermeden detoxifike edilirler. Sonuç olarak bu enzimlerin expresyonlarının tümör dokularında artması direk antikanser ilaç direncinin ortaya çıkmasıyla doğru orantılıdır. Ancak cisplatinin de içinde bulundurğu birçok ilaç grubu GST enzimlerinin substratı olarak bilinmemektedirler ancak, yine de artan GST expresyonundan etkilenmektedirler. Bu durum araştırmacıları bu enzim ailesinin sıkça bilinen detoksifikasyon özelliğinin yanısıra hücre proliferasyonu, stres durumu ve hücre içi ölüm sinyal yolaklarında etkili olabileceği yönünde şüphelendirmiştir. Nitakim, son yapılan çalışmalar bu enzimlerin apoptotik yolaklarda kilit rol oynayan MAPK yoğlağı üzerinde regüle edici rolü ortaya konmuştur.

Hücrede ROS miktarı arttığında stres kinazları aktive olur ve hücre apoptoza uğrar. GST enzimleri AMPK yolağını regüle ederek stres durumunu kontrol eder, dolayısıyla hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerinde etkilidirler (E Laborde, 2010). GSTμ ve GSTπ enzimlerinin MAPK yolağında regüle edici rolleri vardır. cJUN N-terminal kinaz1 (JNK1) ve apoptoz sinyal regülatör kinazlar (ASK1) ile protein-protein interaksiyonları yaparak bu yolakta hücrenin apoptoz ve proliferasyon sinyalleri üzerine etkilidirler(Danyelle ve Kenneth, 2003).GSTπ, stres varlığında hücre proliferasyonu ve apoptozu regüle eden JNK1 kinazların potansiyel inhibitörü olarak bilinmektedir (Adler ve ark., 1999; Yin ve ark., 2000). Dışardan bir strese (ilaç, ROS, NOS) maruz kalmamış hücrelerde düşük JNK aktivitesi gözlemlenmektedir.(Şekil 1.4). JNK aktivitesi stres koşullarında artar böylece GSTπ:JNK kompleksinde ayrılmalara neden olur. Protein-protein interaksiyonundaki bu çözünme ile apoptoz indüklenir (Adler ve ark., 1999). Tümör hücre hatları ve hayvan deneyleri ile yapılan çalışmalar göstermektedir ki, etakrinik asit ve alkilleyici ajanlar ile yapılan kombine terapiler terapötik avantajlar sağlamaktadır (Tew ve ark., 1998; Clapper ve ark., 1990).

Normal hücre koşullarında, GSTπ ve JNK protein-protein interaksiyonları ile bağlıdırlar ve JNK inaktiftir. Ancak, hücrede stres koşulları oluştuğunda bu interaksiyonlar zayıflar. Böylece JNK aktive olur hücre proliferasyonu azalır ve apoptoz indüklenir (Laborde E., 2010).

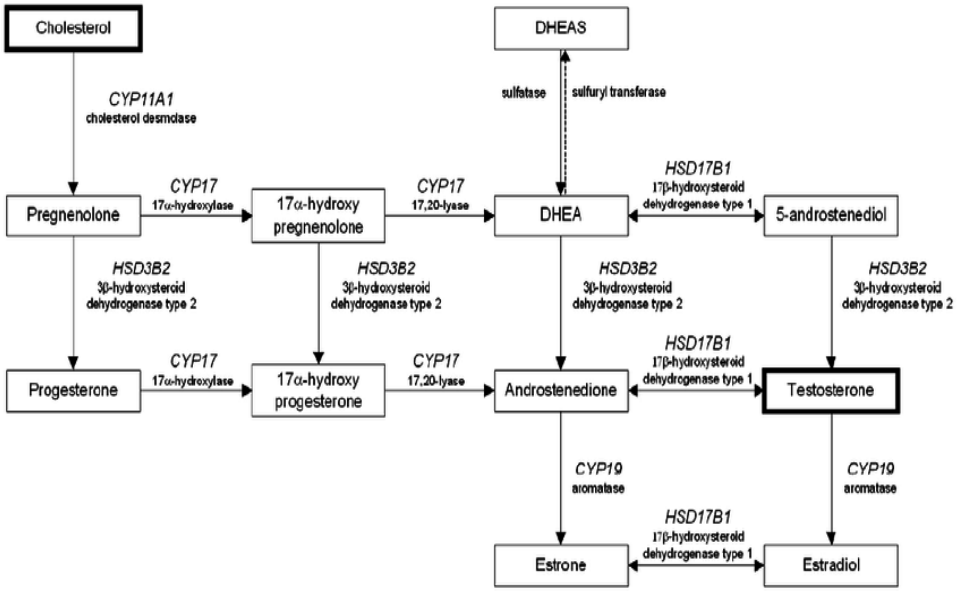


Şekil 1.4. GST ve JNK protein-protein interaksiyonları (Laborde E., 2010)

ASK1 (apoptoz sinyali regülatör kinazlar) strese maruz olmayan hücrelerde expresyonları düşük seviyelerdedir (JNK kinazlar ile benzer). Oksidatif stres varlığında JNK ve p38 yolaklarını aktive ederek sitokin ve stres tarafından indüklenen apoptoza neden olmaktadır (Ichio ve ark., 1997). Aktivasyonu JNK gibi protein-protein interaksiyonları sayesinde olmaktadır ancak ASK1 GSTμ ile interaksiyona girmektedir (Cho ve ark., 2001; Saitoh ve ark., 1998). GSTμ expresyonunun hücre içinde artması ASK1 oligomerizasyonunu bloke etmekte ve ASK1 temelli apoptotik hücre ölümünü baskılamaktadır (Cho ve ark., 2001). Yapılan bu çalışmalar göz önüne alındığında GST inhibitörleri, toksik etkisi indirgenmiş modülatör ajanlar olarak kullanılabilirler. GST'lerin (özellikle GSTπ'nin) bazı solid tümörler ve lemfomalarda yüksek expresyon göstermesi ve özellikle alkilleyici ajanlara karşı direnç oluşumuna sebep olması bu enzimleri daha önemli bir ilaç hedefi olarak göstermektedir.

Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmada, cisplatin-metformin ilaç kombinasyonunun androjen biyosentezinde önemli rol oynayan CYP17A1 enzimi üzerine etkilerine de bakılacaktır. Çünkü, CYP17 böbreküstü bezlerde, testislerde, plasentada ve yumurtalıkların endoplazmik redikulumda yer almakta olup temel olarak seks hormonları ve glukokortikoid sentezinde rol almaktadır (Picado-Leonard ve Miller, 1987). Şekil 1.5'te belirtildiği gibi, androjen biyosentezinde CYP17 pregnenolonun hidroksipregnenolona dönüşümünü ve progesteronun 17α-hidroksiprogesterona dönüşümünü katalizleyerek oluşan hidroksipregnenolon ve 17α-hidroksiprogesterona daha sonraki reaksiyonlar sonucu androjene dönüşümünü sağlar (Luu-The ve ark., 2008). Her ne kadar kimyasal yollarla üretilmiş olan androjen inhibitörleri bulunsa da bu ilaçların ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Bu androjen inhibitörü ilaçların yaşam standartlarını ciddi bir şekilde etkileyen yan etkileri bulunmakta ve yaşa bağlı olarak hayati

tehlikelere yol açmaktadır. Bunların yanı sıra bu ilaçların ereksiyon bozukluğu, cinsel isteksizlik gibi cinsel yan etkileri de bulunmaktadır (Higano, 2003). Bu yan etkiler göz önünde bulundurulduğunda tasarlanan cisplatin-metformin ilaç kombinasyonunun androjen biyosentezi üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak analiz edilerek prostat kanseri hastalarına daha az yan etkili bir tedavi olanağı sunabileceğini düşünüldü.



Şekil 1.5. CYP17 enziminin androjen sentez yolağındaki rolü.

Glikoliz seviyesi yüksek olmakla karakterize olan kanser hücrelerinde olduğu gibi, apoptoza giren hücreler ile yapılan çalışmalar hekzokinaz enzimin apoptoz durumunda ekspresyonunun arttığını göstermektedir (Bomba A. ve ark., 2014). 3-BrPA (3-bromopirüvat) alkilleyici bir ajandır ve hücresel apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonunu azatmaktadır (SHU-LIN XIAN ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki hekzokinazlar glikozun işlenmesinde en önemli role sahip enzimlerdir. (Floridi A., 1989), Ayrıca, 3-BrPA'nın glikolizi hekzokinazın aktif merkezi ile interaksiyona girerek inhibe ettiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada Cisplatin alkilleyici ajanı ile birlikte metformin (Tip2 diyabet ilacı) kullanılmıştır. Yani kanser hücrelerinin büyümesi diyabet ilacı ile glikozun hepatik dokulardan geçişini engellenerek, aynı zamanda alkilleyici ajan olan cisplatinin hekzokinazlara bağlanması ile glikoliz yolağı inhibe edilerek durdurulmak istenmiştir. Son 1 yıldır glikoliz yolağı inhibe edilerek kanser hücrelerinin durdurulması fikri yaygınlaşmaya başlamıştır. Özellikle alkilleyici ajanların hekzokinazlara olan afinitesi bu ilaç grubunu daha kullanılabilir kılmaktadır. Tasarladığımız çalışmada diyabet ilacı da kullanarak hücre ölümünü maksimum seviyeye çıkarmak hedeflenmektedir. Bu bağlamda yapılan olan çalışma özgün ve literatüre yeni veriler kazandırması açısından yararlı olacaktır.

Yukarda belirtilen literatür göz önünde bulundurulduğunda metforminin hücre bölünmesi ve ölümü üzerindeki pozitif etkisi aşikardır. Günümüzde prostat ve birçok kanser türünün tedavisinde sıklıkla ve başarıyla kullanılan cisplatin ilacının tedavide daha etkili ancak daha az yan etkiye sahip, kanser önleyici moleküller ile kombine tedavi olanaklarını tespit etmek kanser araştırmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Sunulan çalışma birçok açıdan prostat kanseri tedavisi için ışık tutabilecek, aynı zamanda literatüre değişik bir bakış açısı sağlayabilecek potansiyeldedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan çalışmada Cisplatin-metformin ilaç kombinasyonunun hücre proliferasyonuna etkilerini gözlemlemek ve ilaçların etkin dozlarını tayin etmek amacıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmış, daha sonra bu kombinasyonun belirtilen enzimler üzerindeki etkilerinin hem protein hemde gen expresyonu düzeyinde araştırılması için sırasıyla Western-Blot ve qRT-PCR teknikleri kullanılmıştır.

2.1 Metformin ve Cisplatin'in prostat kanseri hücre hatları proliferasyonu ve hücre apoptozu üzerine etkileri

2.1.1 Hücre hatları ve Büyüme ortamlarının hazırlanması

Prostat kanser hücrelerinden androjen reseptörüne bağımlı LNCaP ve androjen reseptöründen bağımsız PC3 hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) firmasından satın alınmıştır. PC-3 hücre hattı 10% FBS (fetal sığır serumu) ve 1% glutamin içeren Ham's F-32 büyüme ortamında, LnCaP ve PNT1A hücre hatları ise 10 % FBS ve 1% glutamin içeren RPMI-1640 büyüme ortamları içersinde 37 °C ve 5 % CO_2 büyütülmüştür. Büyüme ortamları aynı zamanda bu ilaçların seyreltilmesinde de kullanılmıştır. T-75 büyüme kaplarında çoğalan hücreler 10 mM fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra hücreler tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak büyüme kaplarından ayrılıp ilaç muamelesi için 6 veya 24 kuyucuklu büyüme plakalarına aktarılmıştır.

2.1.2 Hücre Proliferasyon çalışmaları

Hücre hatları uygun büyüme ortamları içersinde büyütüldükten sonra hücre proliferasyonunu gözlemlemek amacı ile tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla T-75 büyüme kaplarından alınarak 24 kuyucuklu büyüme plaklarına her kuyucukta 3 x 10^4 hücre olacak şekilde aktarılımış olup 24 saatlik bir inkübasyondan sonra hücrelerin bulunduğu kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda cisplatin eklenmiş ve bu ilacın hücre büyümesi üzerine olan etkisi saplanarak % 50 hücre büyümesini engelleyen ilaç konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplanmıştır. Cisplatin'in IC_{50} değerleri belirlendikten sonra hücrelere farklı konsantrasyonlarda metformin uygulaması yapılıp, ilaçların birlikte ve ayrı ayrı hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi Alamar Blue kiti kullanılarak saptanmıştır.

2.2 Metformin ve Cisplatin'in GST, CYP17A1 ve Hekzokinaz Enzimlerinin Protein ve mRNA Seviyeleri Üzerine Etkileri

2.2.1 Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonların Eldesi

6 kuyucuklu büyüme plakaları içersinde büyüyen hücreler cisplatin ve/veya metformin ile muamele edildikten sonra 37 °C ve 5 % CO_2'de 3 gün inkübe edilmikten sonra büyüme ortamları aspire edilerek hücreler soğuk fosfat tamponu ile 3 defa yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 1 ml soğuk fosfat tamponu eklenerek kazıyıcı yardımıyla hücreler büyüme plakasından mekanik olarak kazınmıştır. Daha sonra fosfat tamponu içine süspanse edilerek steril bir pipet yardımıyla alınarak 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 400 x g 'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Bundan sonraki bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiş olup, elde edilen hücre miktarının 3 katı kadar 3 mM EDTA pH 7,8; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM PMSF; 0,3 mM ε-ACA; 0,15 mM BHT; %10 gliserol ve %0,15 Triton X-100 içeren homojenizasyon çözeltisi eklenerek tüpler vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 12000 x g de 25 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Elde edilen fraksiyonda pelet atılarak süpernatant hacminin 0.5 katı soğuk 0.16 M $CaCl_2$ eklenmesi ile 32000 x g de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı sitozol kısmı eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak -80 ºC derin dondurucuda saklanmıştır. Kalan mikrozomal pelet, soğuk homojenizasyon çözeltisi ile yıkanarak 32000 x g de 20 dakika tekrar santrifüj edilerek yıkanmış olup çıkan süpernatant dökülerek pelete başlangıç hücre miktarının 0.5 katı soğuk süspansiyon tamponu (2 mM EDTA pH 7,5; %10 gliserin) eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılarak eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak -80 ºC derin dondurucuda saklanmıştır.

2.2.2 Protein Tayini

Elde edilen mikrozomal ve sitozolik fraksiyonların protein miktarı tayini, BSA (sığır serum albümin) standart olarak kullanılarak Lowry ve ark. (1951)'nin metoduyla ölçülmüştür. 1:200 oranında seyreltilmiş olan protein fraksiyonları test tüplerine 0.1 ml'den 0.5 ml'ye değişen hacimlerde alınarak son hacim deiyonize distile su ile 0.5 ml'ye tamamlanmıştır. Sonra %2'lik bakır sülfat, %2'lik sodyum potasyum tartarat ve %2'lik sodyum karbonat içeren 0.1 N NaOH'in karıştırılmasıyla oluşturulan alkali bakır reaktifi ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, deiyonize distile su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin reaktifinden her bir tüpe ilave edilir ve 50 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra oluşan rengin şiddeti her bir tüp için 660 nm'de köre karşı ölçülerek protein miktarları elde edilen eğim değeri kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.3 Metformin ve Cisplatin'in Protein Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

İlaçların ayrı ayrı ve kombine kullanımının prostat kanseri hücre hatlarından elde edilen sitozolik (GST, hekzokinaz), ve mikrozomal (CYP17A1) proteinlerin ekspresyonları üzerine olan etkileri Laemmli (1970) tarafından belirlenen metoda göre dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi ile ayrıştırılmış ve protein profilleri elde edilmiştir. Her bir protein ekspresyonun tayini için spesifik antikorlar kullanılarak Western Blot tekniği ile her bir enzimin protein düzeyleri immunolojik olarak tayin edilmiştir.

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmış olup ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 1'de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır.

Tablo 2. 1. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.

Stok Çözeltiler	Ayrıştırıcı Jel (%8,5)	Sıkıştırıcı Jel (%4)
Jel Çözeltisi(ml)	**8.5**	**1.5**
Distile Su (ml)	**13.55**	**5.88**
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (ml)	**7.5**	**-**
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	**-**	**2.5**
%10 SDS (ml)	**0.4**	**0.16**
%10 APS (ml)	**0.15**	**0.065**
TEMED (ml)	**0.015**	**0.012**

Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile **Mini-PROTEAN tetra cell mini trans blot module (Bio-Rad, Richmond, CA)** elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforetik ayrıştırma sistemi güç kaynağına bağlandıktan sonra yol gösterici boya tabana ulaştığı zaman (ayrıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7 cm) güç kaynağı kapatılmıştır ve elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alınmış ve oda sıcaklığında 45 dakika süreyle % 0.2 Coomassie Pırlanta Mavisi R 250, % 50 metanol ve % 12 glasial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak boyanmış, aynı zamanda sabitlenmiştir. Uygun bir süre bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için % 7'lik asetik asit içeren % 30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edilmiştir.

Aynı koşullar altında yürütülen diğer bir jel ise boyama işlemine tabi tutulmadan Western blot analizi [Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi] için elektroforezi takiben transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve % 10 metanol) içerisinde

10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Elektroforetik transfer Panther Semidry Electroblotter Model HEP-3 kullanılarak Yarı-kuru transfer yöntemi uygulanarak yapılmış olup panther Semidry Electroblotter'ın platinyum tabanına önceden nemlendirilmiş Whatman # 1 filtre kağıdı yerleştirilir ve olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney tüpü üzerinde yuvarlanmıştır. Whatman # 1 üzerine dikkatlice yerleştirilen jelin üzerine nitroselüloz membran da dikkatlice yerleştirilerek üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman # 1 konarak sandviç tamamlanmıştır. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü nazikçe üzerinde yuvarlanarak sandviç etrafına taşan fazla transfer tamponları temizlenmiş alan kurulanmıştır. Sandviç hazırlandıktan sonra üst aparat dikkatlice yerleştirilerek ve sistemin vidaları sıkılmış, takiben elektroforetik transfer sistemi Thermo EC1000-90 model güç kaynağına bağlanmış voltaj ve maksimum akım limiti 10 V ve 1,5 saat süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edilmiştir. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'Blot', elde edilmiştir. Blot, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirilmek koşuluyla 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız % 5'lik süt tozu) ile çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Süre sonunda blot önce bloke çözeltisi içinde hazırlanan primer antikorlar ve daha sonra işaretleyici enzim-alkali fosfataz (anti-rabbit IgG-ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla inkübe edilmiştir. Daha sonra blot TBST solüsyonunda her biri 5 dakika olmak üzere 3 defa yıkandıktan sonra son olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan substrat çözeltisi (Tris-HCl, pH 8, NaCl, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, Dietanolamin, Nitroblue tetrazolyum, fenazin metasülfat ve bromokloroindoylfosfat) ile inkübe edilmiştir. Görüntü elde edildikten sonra blot havada kurutulduktan sonra, streç film ile kaplanarak karanlıkta saklanmıştır. Protein ekspresyon seviyelerini normalize etmek, jelden jele oluşabilecek farklıları minimum düzeye indirebilmek için GAPDH kontrol olarak kullanılmıştır. Spesifik bant görüntüleri jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat B.P. 66 Torcy ZL SVD) aracılığıyla fotoğraflanmış ve Image J yazılım programı kullanılarak elde edilen protein bantlarının densitometrik tarama metodu ile ölçümü yapılmış olup deneysel çalışmalar sonucu elde edilen bütün ölçümlerde grup ortalamalarının ± standart hataları hesaplanmıştır. Verilerin istatistik değerlendirmeleri GraphPad Prism version 6 istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır.

2.2.4 Metformin ve Cisplatin'in mRNA Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

Cisplatin ve metforminin ayrı ayrı ve kombine kullanımının PC-3, LnCaP, PNT1A hücre hatlarında androjen metabolizmasında rol alan CYP17A1, apoptotik yolaklarda etkisini gözlemlemek istediğimiz GST enzimleri ve glikolitik yolakta rol oynayan hekzokinaz enzimlerinin gen ifadeleri düzeylerine etkilerini saptamak için, mRNA ekspresyonları qRT-PCR

(quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile kantite edilmştir. Bu amaçla, 6 kuyucuklu büyüme plakalarında bulunan prostat kanseri hücreleri ilaçlarla muamele edildikten 48 saat sonra Trizol metodu ile total RNA izole edilerek konsantrasyon ve saflık seviyeleri nano drop yardımıyla belirlenmiş olup % 2'lik agaroz elektroforezinde yürütülen RNA'ların saflığı kantite edilmiştir.

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi 18 nükleotid uzunluğunda oligo d(T) primeri ve Moloney-Murine Leukemia Virus Revers Transkriptazı kullanılarak sentezlenmiştir. cDNA sentezi için 2 µg toplam RNA ve 1 µl oligo (dT) primeri karıştırıldıktan sonra son hacim 11 µl olacak şekilde RNAaz içermeyen su ile tamamlanıp karışım 70 ºC'de 5 dakika inkübe edildikten sonra, üzerine 4 µl 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$ ve 50 mM DDT) ve 2 µl dNTP karışımı eklenmiştir. 5 dakika, 37°C'de inkübasyondan sonra 50 ünite Moloney-Murine Leukemia Virus Revers Transkriptazı eklenerek son hacim 20 µl tamamlanmıştır. Enzim eklendikten sonra, son karışım cDNA sentezi için ilk önce 42 °C'de 1 saat inkübe edilmiş olup bu süre sonunda enzim inhibe edilmek üzere 70°C'de 10 dakika bekletilecektir. Sentezlenen cDNA'lar, kantatif RT-PCR yapmak üzere -20ºC'de muhafaza edilmiştir. Kantitatif Real Time PCR Corbett Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, PO Box 435, Concorde, NSW 2137) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup reaksiyon 1X Maxima® SYBR Green qPCR Master karışımı ile yapılmıştır. Reaksiyon tüpüne 2 µl cDNA, 9,5 µl RNase içermeyen su, 0,25 µl gen spesifik primer, 12,5 µl SYBR green qRT-PCR karışımı eklenmiş ve iç standart gen olarak GAPDH kullanılmıştır. qRT-PCR' da kullanılacak olan primerler Primer 3 yazılımı kullanılarak dizayn edilmiştir (Tablo 2) ve NCBI blast yazılımı ile gene özgünlüğü kontrol edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımı (tüpü) PCR işlemi için önce 95 ºC' de 10 dakika denatürasyona tabi tutulup amplikasyon işlemi 95 ºC' de 20 saniye, 54-60 ºC' de 30 saniye, ve 72 ºC' de 30 saniye olmak üzere toplam 45 döngüden sonra, 49 ºC' de 30 saniye son uzatma ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra gen ekspresyonlarındaki değişim spesifik gel mRNA ekspresyonlarının GAPDH mRNA ekspresyonuna oranı hesaplanarak bulunmuştur.

Tablo 2. 2 . Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.

GST-Mu	F-AGGACTTCATCTCCCGCTTT R-GCTGAGTATGGGCTCCTCAC
GST-Pİ	F -CCTACACCGTGGTCTATTTCC R-CAGGAGGCTTTGAGTGAGC
CYP17A1	F-CTAGACATCGCGTCCAACAA R-GGCCAGCATATCACACAATG
Hekzokinaz	F-GAGCCACCACTCACCCTACT R-CCAGGCATTCGGCAATGTG
GAPDH	F-GCCAAAAGGGTCATCATCTC R-TGAGTCCTTCCACGATACCA

2.3 Cisplatin Metformin İlaç Kombinasyonunun Apoptoz Üzerine Etkilerinin Saptanması

2.3.1 Hücrelerin Annexin V-EGFP ile İnkübasyonu

Önceden 6 kuyucuklu plakalara aktardığımız hücreler istenilen konsantrasyonlarda cisplatin ve/veya metformin ile muamele edilmiş olup takiben 48 saat sonra hücrelerin büyüme ortamları uzaklaştırılmıştır. Plakalar PBS tamponu ile yıkandıktan sonra Tripsin yardımı ile hücreler kaldırılmış ve besiyeri içerisinde çözünen hücreler santriüj edilmiştir. Daha sonra Annexin V-EGFP Apoptoz saptama kiti (BioVision Incorporated CA., USA) protokolündeki basamaklar takip edilmiştir.

2.3.2 İndüklenmiş Apoptozun Saptanması

Hücreler 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra floresan mikroskobu veya akış sitometrisi tekniği kullanılarak ilaçların apoptoz üzerine etkileri tayin edilmiştir.

İnkübe edilen hücre süspansiyonundan bir miktarı lamın üzerine alınarak, üzeri lamel ile kapatılmış ve **floresan mikroskop** ile incelenmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Hücre Kültürü

3.1.1 Cisplatin İlacının IC50 Değerinin Hesaplanması

Cisplatin-Metformin kombinasyonunun prostat kanseri hücre hatlarının proliferasyonu üzerine etkilerinin incelenebilmesi için öncelikle Cisplatin ilacının PC3 ve LNCaP hücre hatlarında ayrı ayrı IC50 değerleri hasaplanmıştır. Bu doğrultuda hücreler gereç ve yöntem kısmında detaylı olarak anlatıldığı gibi 24 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 5μM ile 40μM aralığında cisplatin muamelesi sonucunda IC50 değerleri Alamar Blue kiti kullanılarak hesaplanmıştır. Tablo 3.1 ve Tablo 3.2 LNCaP ve PC3 hücre hatlarında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri sırasıyla gösterilmiştir.

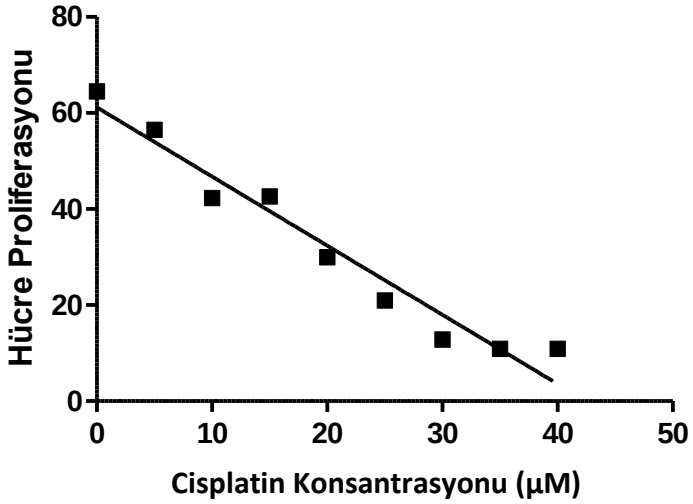
Tablo 3.1 LNCaP hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.

Cisplatin Konsantrasyonu (μM)	% İndirgenme	% Sağ kalım
0	57,0	100
5	47,5	83,3918
10	33,8	59,3465
15	36,2	63,40082
20	26,2	45,94568
25	14,3	25,15786
30	6,9	12,20808
35	5,03	8,820287
40	4,45	7,81297

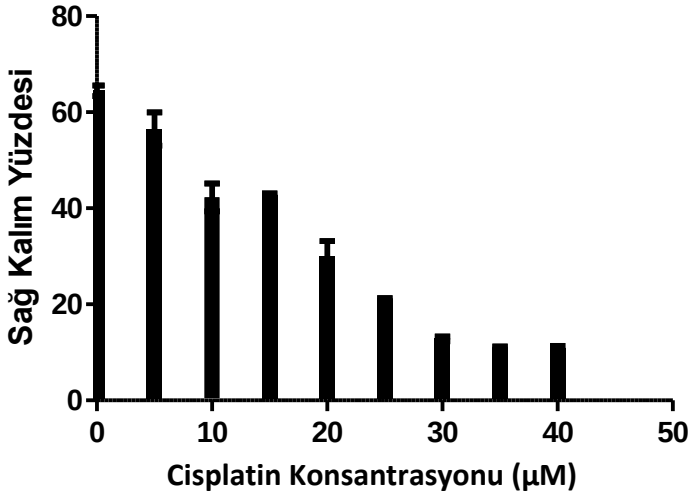
Tablo 3.2 PC3 hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.

Cisplatin Konsantrasyonu (µM)	% Indirgenme	% Sağ Kalım
0	69,20491	100
10	68,94814	99,62897
20	62,76469	90,69398
30	37,72169	54,50725
40	14,0595	20,31575

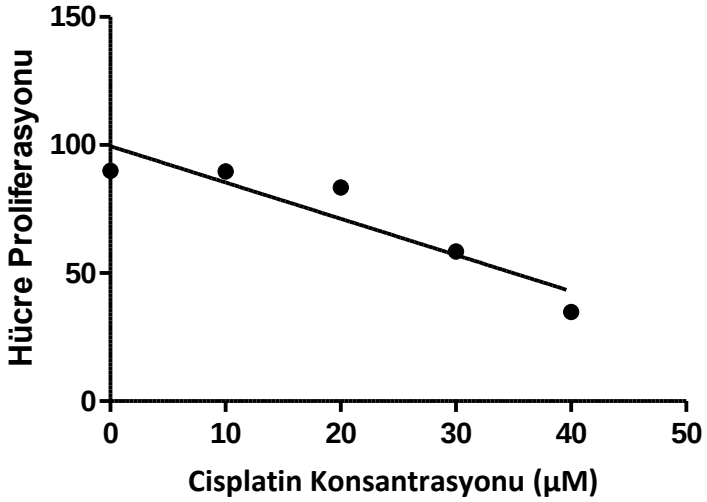
Yukarıda belirtilen değerler kullanılarak hücre proliferasyon grafikleri oluşturulmuş, grafiklerden elde edilen eğim formülü IC50 değerinin hesaplanmasında kullanımıştır. Sonuç olarak IC50 değerileri LNCaP hücre hattı için17µM olarak hesaplanırken PC3 hücre hattı için 30 µM olarak hesaplanmıştır. Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 LNCaP hücre hattında, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4 PC3 hücre hattında cisplatin muamelesinden sonra gözlemlenen hücre proliferasyonu ve sağ kalım yüzdelerini göstermektedir.



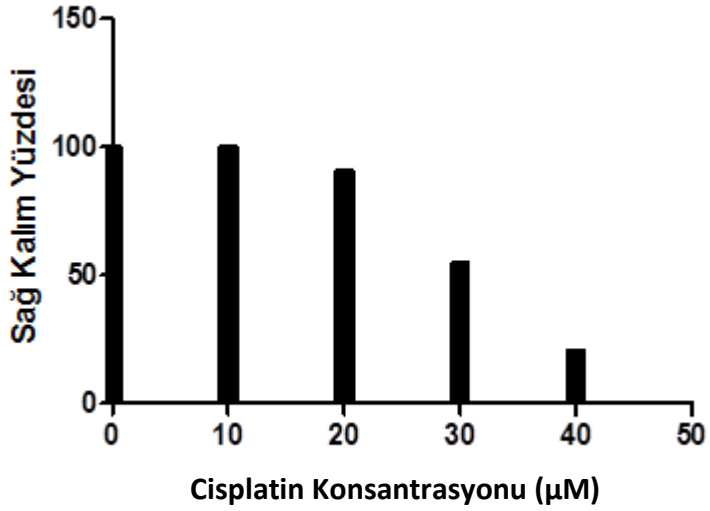
Şekil 3.1 Cisplatin ile muamele edilen LNCaP hücre hatlarının proliferasyon grafiği.



Şekil 3.2 Cisplatin ile muamele edilen LNCaP hücre hatlarının sağ kalım grafiği.



Şekil 3.3 Cisplatin ile muamele edilen PC3 hücre hatlarının proliferasyon grafiği.



Şekil 3.4 Cisplatin ile muamele edilen PC3 hücre hatlarının sağ kalım grafiği.

3.1.2 Cisplatin-Metformin Kombine Etkisinin Tayini

Cisplatin ilacının IC50 değeri belirlendikten sonra, metformin ile kombinasyonunun prostat hücre hatlarının proliferasyonu üzerine etkilerini saptamak amacıyla hücreler Cisplatin IC50 değerlerinin yanısıra konsantrasyonları 1mM ile 10mM arasında değişen metformin ilacı ile muamele edilmişlerdir. İlaçların ayrı ayrı etkilerinin incelenebilmesi için deneyler; 1. Kontrol grubu 2. Cisplatin grubu (IC50 değeri) 3. Metformin grubu 4. Cisplatin+Metformin grubu olmak

üzere 4 grup şeklinde düzenlenmiştir. İlaçların LNCaP ve PC3 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri yukarıda bahsedildiği gibi Alamar Blue kiti kullanılarak gözlemlenmiş olup, Alamar Blue indirgenmesi ve sağ kalım yüzdeleri Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te sırasıyla gösterilmiştir.

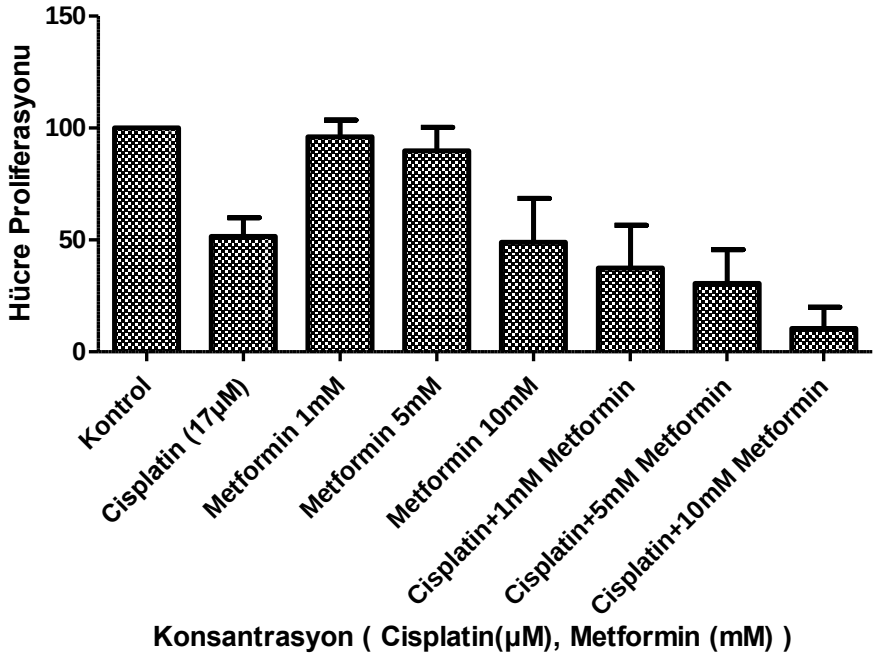
Tablo 3.3 LNCaP hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.

Cisplatin (µM) Metformin (mM)	**Indirgenme**	**Sağ Kalım**
Kontrol	55,14221	100
Cisplatin (17µM)	23,78605	43,13583
1mM Metformin	57,08405	103,5215
5mM Metformin	55,30249	100,2907
10mM Metformin	37,77657	68,50755
Cisplatin (17µM) + 1mM Metformin	31,21129	56,60145
Cisplatin (17µM) + 5mM Metformin	25,2039	45,7071
Cisplatin (17µM) + 10mM Metformin)	11,01611	19,97764

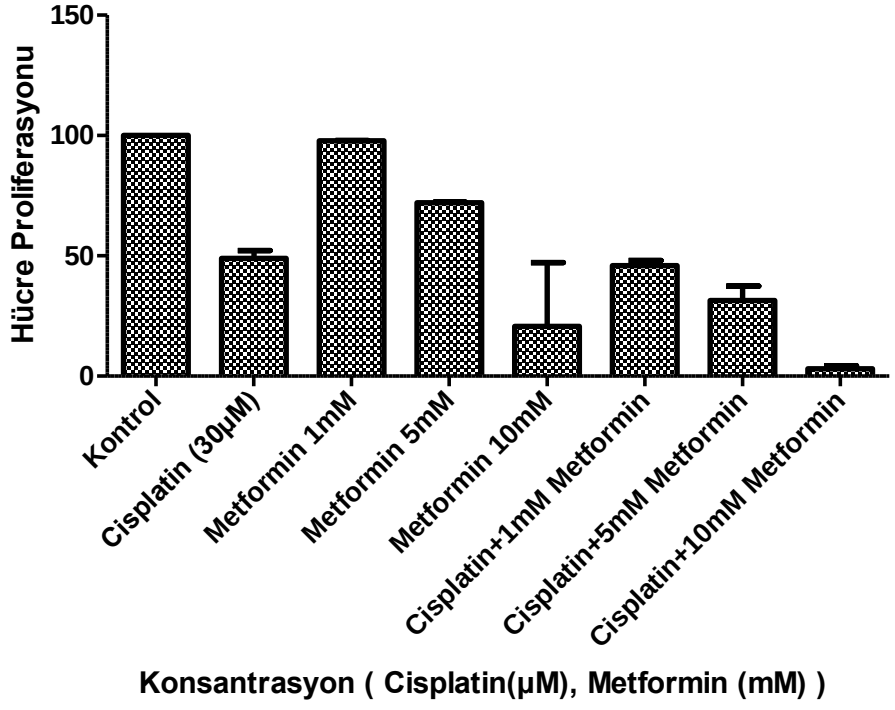
Tablo 3.4 PC3 hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.

Cisplatin (µM) Metformin (mM)	**Indirgenme**	**Sağ Kalım**
Kontrol	48,47224	100
Cisplatin (30 µM)	25,29033	52,17487
1mM Metformin	47,39134	97,77007
5mM Metformin	34,8476	71,89186
10mM Metformin	22,88033	47,20295
Cisplatin (30µM) + 1mM Metformin	23,286	48,03986
Cisplatin (30µM) + 5mM Metformin	18,17242	37,49036
Cisplatin (30µM) + 10mM Metformin)	2,116424	4,366259

Tablo 3.3 ve Tablo 3.4' te belirtilen analizler göz önüne alındığında, kullanılan ilaç kombinasyonu her iki hücre hattında da hücrelerin proliferasyonunu ilaçların tek başına kullanımına kıyasla daha fazla düşürdüğü gözlemlenmiştir. Grafiklerde belirtilen değerler kullanılarak oluşturulan ilaçların LNCaP ve PC3 hücre hatlarının proliferasyonu üzerine etkilerinin karşılaştırıldığı sağ kalım yüzdesi grafikleri sırasıyla Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

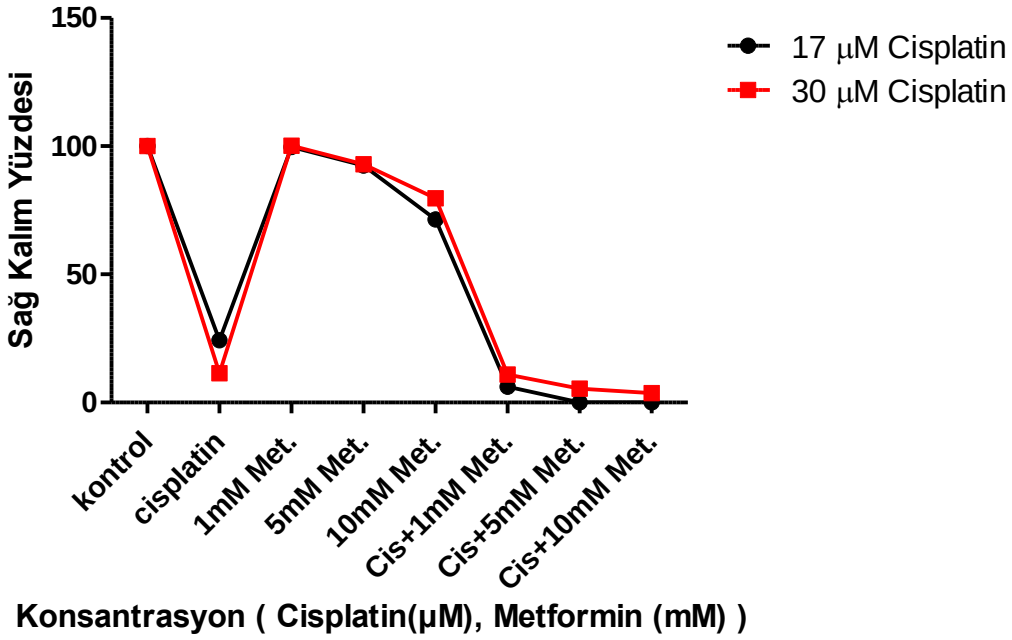


Şekil 3.5 Cisplatin metformin kombinasyonunun LNCaP hücre hattı proliferasyonu üzerine etkisi.

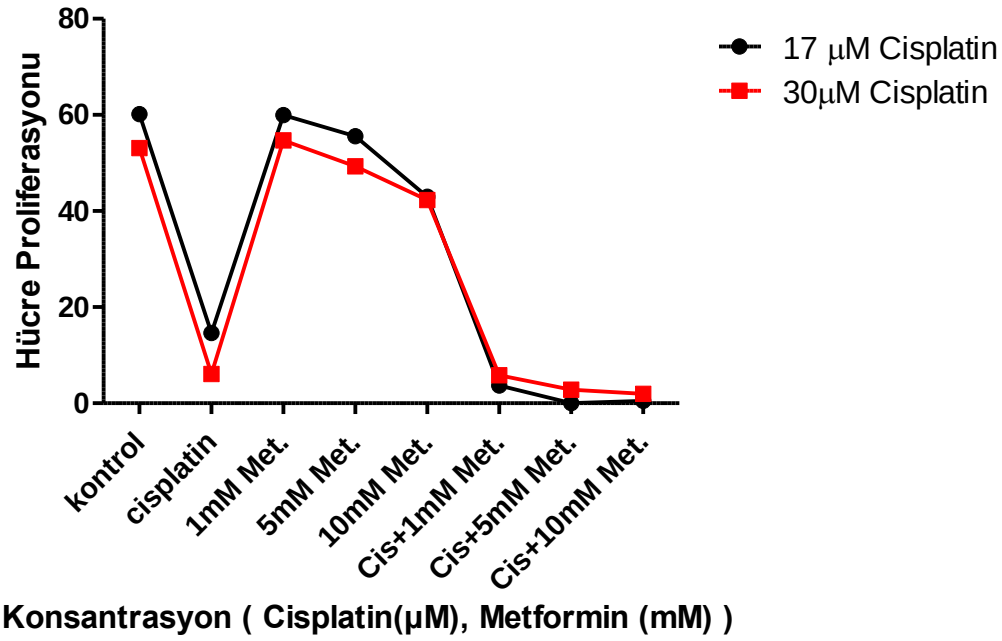


Şekil 3.6 Cisplatin metformin kombinasyonunun LNCaP hücre hattı proliferasyonu üzerine etkisi.

Alamar Blue tekniği kullanılarak LncAP hücre hattı (17μM) ve PC3 hücre hattı (30μM) olarak hesaplanan değerler sağlıklı prostat hücre hattı olan PNT1A hücre hattında da denenmiş olup, sonuçları aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. Hesaplanmış olan değerler birbiriyle paralel olup, beklenildiği gibi hücrelerin nerdeyse hepsini öldürmüştür. Şekil 3.7 ve Şekil 3.8 sırasıyla sağkalım yüzdesi hücresel proliferasyon grafiklerinin hesaplanan değerler doğrultusunda değişimini göstermektedir.



Şekil 3.7 Cisplatin ve Metformin ile muamele edilen PNT1A hücre hatlarının sağ kalım yüzdesi grafiği.



Şekil 3.8 Cisplatin ve Metformin ile muamele edilen PNT1A hücre hatlarının hücre proliferasyon grafiği.

3.2 Hücre Lizatlarının Protein Konsantrasyonu Tayini

Yapılan çalışmada cisplatin-metformin ilaç kombinasyonunun CYP17A1, GSTP, GSTmu ve Hekzokinaz II enzimleri üzerine etkileri incelenmiştir. İlaçların etkilerini gözlemleyebilmek için LNCaP ve PC3 hücre hatları kullanılmış olup, proteinler her grup için 3 biyolojik replika dan izole edilmişlerdir. Hücreler petri kaplarında büyütülmüş olup metod kısmında detaylı anlatıldığı gibi %80 yoğunluğa ulaşıldığında protein extraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreleri yapışık oldukları petri yüzeyinden kaldırmak için RIPA tamponu kullanılmış olup, protein konsantrasyonunun tayini BCA protokolü uygulanarak saptanmıştır. Tablo 3.5 LNCaP ve PC3 hücre hatlarından elde edilen ortalama protein konsantrasyonlarını göstermektedir.

Tablo 3.5 LNCaP hücre halarından elde edilen ortalama protein konsantrasyonları.

	LNCaP Hücre hattından elde edilen Protein Miktarı (mg/mL)	**PC3 Hücre hattından elde edilen Protein Miktarı (mg/mL)**
Kontrol	6,22	6,9
Cisplatin*	5,13	1,99
1mM Metformin	6,40	6,74
5mM Metformin	5,17	4,05
10mM Metformin	1,76	1,2
Cisplatin* + 1mM Metformin	5,6	2,05
Cisplatin* + 5mM Metformin	3,12	3,46
Cisplatin* + 10mM Metformin	1,18	1,34

***Cisplatin değerleri hücre kültürü kısmında hesaplandığı gibi, LNCaP hücre hattı için 17μM, PC3 hücre hattı için 30 μM olarak kullanılmıştır.

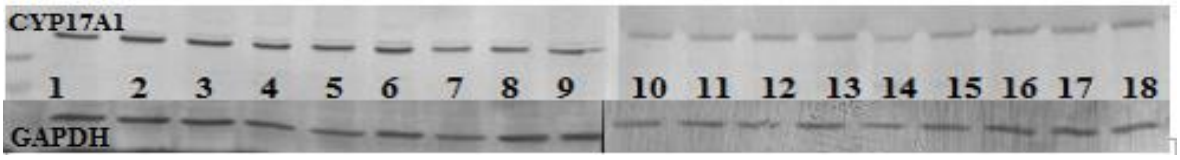
Ortalama protein konsantrasyonları ve hücre proliferasyon grafikleri göz önüne alındığında, 10mM Metforminin petrilerdeki hücrelerin hemen hemen hepsini öldürdüğü gözlemlenmiş olup, deneylerin 1mM ve 5mM konsantrasyonları ile devam edilmesine karar verilmiştir.

3.3 Metformin Cisplatin İlaç Kombinasyonunun CYP17A1, GSTP ve Hekzokinaz II enzimlerinin Protein Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

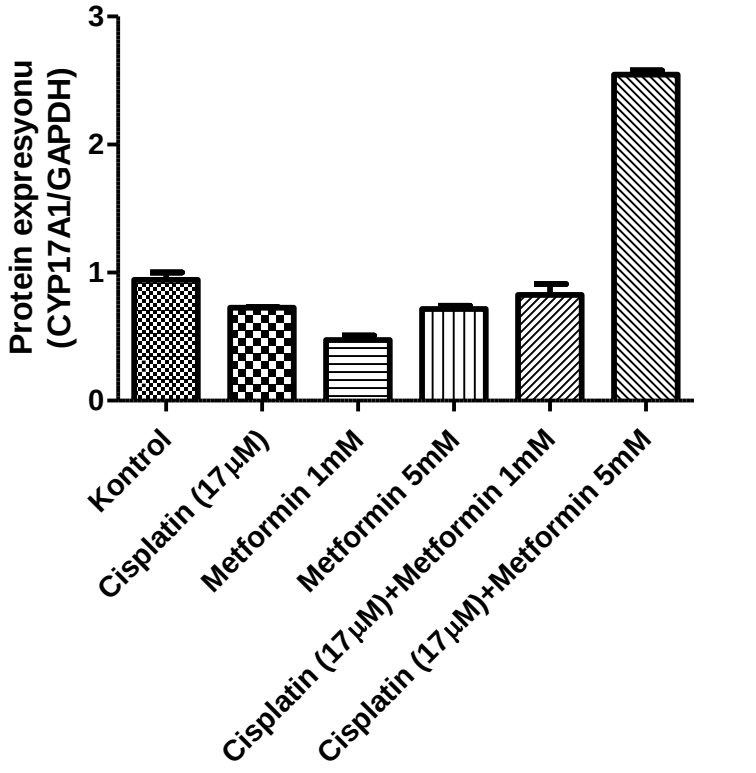
Belirlenen enzimlerin protein expresyonlarının tayininde Western Blot tekniği kullanılmıştır. Hücresel ekstraktlar petri kaplarında, 3 lü biyolojik replika olacak şekilde izole edilmiştir. İmmünokimyasal taspit için verilen genlere spesifik antikorlar optimize edilen konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Standart gen olarak GAPDH (37kDa) kullanılmıştır.

3.3.1 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun CYP17A1 Enzimi Üzerine Etkileri

İlaç kombinasyonunun CYP17A1 enzimi üzerine etkilerinin incelenmesi için primer antikor olarak, poliklonal-tavşan antikor (1/500 yoğunlukta) kullanılmış olup daha sonra işaretleyici enzim-alkali fosfataz (anti-rabbit IgG-ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlar (1/2000 yağunlukta) ile inkübasyon yapılmıştır. LNCaP hücre hattı için Immünoreaktif protein bant fotoğrafları Şekil 3.9'de, gösterilmiştir. Bant hassasiyetleri Image J programı kullanılarak ölçülmüş olup, protein expresyonu karşılaştırmalı analizleri için One-way ANOVA metodu kullanılmıştır. CYP17A1 protein expresyonlarının karşılaştırmalı analizleri Şekil 3.10'de belirtilmiştir. Ayrıca, protein expresyonları karşılaştırılırken anlamlılık seviyesi $P<0.05$ olarak seçilmiş olup, istatistiksel analiz sonuçları Tablo 3.6'da gösterilmiştir. Aynı şekilde PC3 hücre hatlarında immünoreaktif protein bantları Şekil 3.11, bant hassasiyetleri grafiği Şekil 3.12 ve expresyon farklarının istatistiki analizi Tablo 3.7'de belirtilmiştir.



Şekil 3.9 Kontrol ve ilaç kombinasyonu kullanılmış LNCaP hücre hattında CYP17A1 protein expresyonunu gösteren immünoreaktif protein bant fotoğrafları. CYP17A1 (57 kDa), GAPDH (37 kDa) protein büyüklüğünde gözlemlenmiştir. Şerit 1-3: Kontrol, Şerit 4-6: Cisplatin (17μM), Şerit 7-9: Metformin 1Mm, Şerit 10-12: Metformin 5 mM, Şerit 13-15: Cisplatin+1mM Metformin, Şerit 16-18: Cisplatin+5mM Metformin. Her kuyucuk için 30 μg protein yüklenmiştir.



.

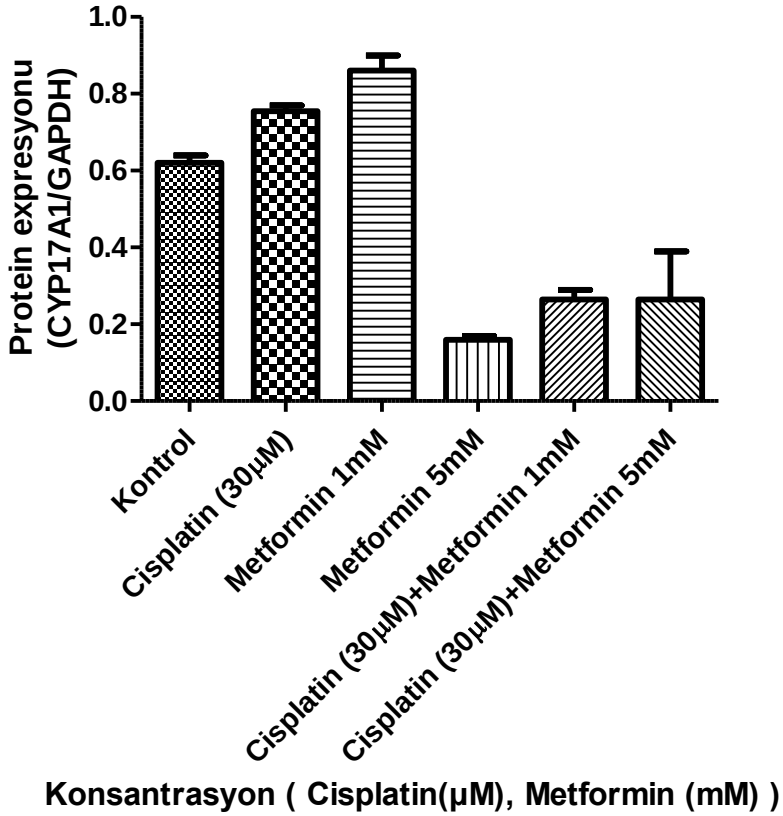
Şekil 3.10 LNCaP hücre hattında CYP17A1 protein expresyonunun karşılartırmalı analizli. Her grup için 3 biyolojik replika kullanılmış olup, standart sapma oranları grafik üzerinde belirtilmiştir.

Tablo 3.6 LNCaP hücre hattında CYP17A1 protein expresyonunun istatistiksel analizli. Expresyon farkları karşılaştırılırken one-way ANOVA metodu kullanılmıştır.

	Cisplatin (17μM)	**Metformin 1mM**	**Metformin 5mM**	**Cisplatin (17μM) + Metformin 1Mm**	**Cisplatin (17μM) + Metformin 5mM**
Kontrol	AD	*	AD	AD	****
Cisplatin (17μM)		AD	AD	AD	****
Metformin 1mM			AD	*	****
Metformin 5mM				AD	****
Cisplatin (17μM)+ Metformin 1mM					****

* P≤0.05; ** P≤0.01; *** P≤0.001; **** P≤0.0001; AD, Anlamlı Değil

Şekil 3.11 Kontrol ve ilaç kombinasyonu kullanılmış PC3 hücre hattında CYP17A1 protein expresyonunu gösteren immünoreaktif protein bant fotoğrafları. CYP17A1 (57 kDa), GAPDH (37 kDa) protein büyüklüğünde gözlemlenmiştir. Şerit 1-3: Kontrol, Şerit 4-6: Cisplatin (30μM), Şerit 7-9: Metformin 1Mm, Şerit 10-12: Metformin 5 mM, Şerit 13-15: Cisplatin+1mM Metformin, Şerit 16-18: Cisplatin+5mM Metformin. Her kuyucuk için 30 μg protein yüklenmiştir.



Şekil 3.12 PC3 hücre hattında CYP17A1 protein expresyonunun karşılartırmalı analizli. Her grup için 3 biyolojik replika kullanılmış olup, standart sapma oranları grafik üzerinde belirtilmiştir.

Tablo 3. 7 PC3 hücre hattında CYP17A1 protein expresyonunun istatistiksel analizli. Expresyon farkları karşılaştırılırken one-way ANOVA metodu kullanılmıştır.

	Cisplatin (30µM)	**Metformin 1mM**	**Metformin 5mM**	**Cisplatin (30µM) + Metformin 1Mm**	**Cisplatin (30µM) + Metformin 5mM**
Kontrol	AD	AD	**	**	*
Cisplatin (30µM)		AD	***	**	**
Metformin 1mM			***	***	***
Metformin 5mM				AD	AD
Cisplatin (30µM) + Metformin 1mM					AD

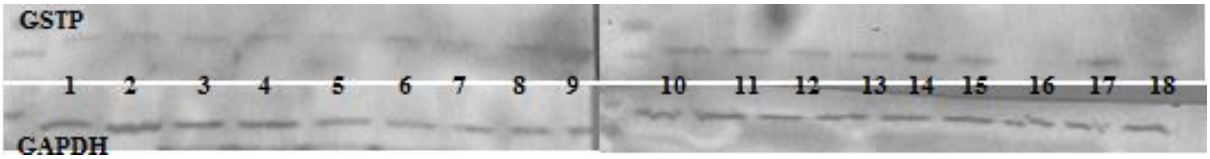
* P≤0.05; ** P≤0.01; *** P≤0.001; **** P≤0.0001; AD, Anlamlı Değil

3.3.2 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun GSTP Enzimi Üzerine Etkileri

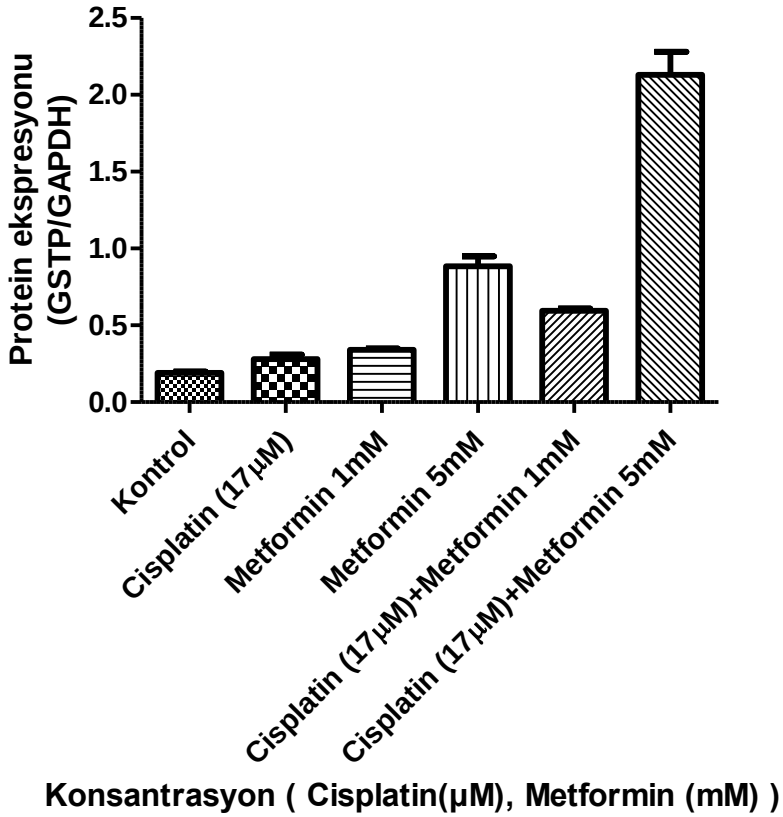
Literatür öztinde de belirtildiği üzere, GSTP enzim ailesinin hücre proliferasyonu ve apoptotik yolaklarda regüle edici rolü, bu enzimlerin dimerleşmesi esasına dayanmaktadır. Yapılan çalışmada, hücrelerde apoptozun indüklenmesi GSTP enzimlerinin dimerleşerek 46 kDa büyüklüğünde bant oluşumu ile doğru orantılı olarak gözlemlenmek istenmiştir.

Bu bilgi doğrultusunda, ilaç kombinasyonunun GSTP enzimi üzerine etkilerinin incelenmesi için primer antikor olarak, poliklonal-keçi antikoru (1/1000 yoğunlukta) kullanılmış olup daha sonra, HRP ikincil antikoru (1/1000 yağunlukta) ile inkübasyon yapılmıştır. PC3 hücre hattı için Immünoreaktif protein bant fotoğrafları Şekil 3.13'de, gösterilmiştir. Bant hassasiyetleri Image J programı kullanılarak ölçülmüş olup, protein expresyonu karşılaştırmalı analizleri için One-way ANOVA metodu kullanılmıştır. PC3 protein expresyonlarının karşılaştırmalı analizleri Şekil 3.14'de belirtilmiştir. Ayrıca, protein expresyonları karşılaştırılırken anlamlılık seviyesi $P<0.05$ olarak seçilmiş olup, istatistiksel analiz sonuçları Tablo 3.8'de gösterilmiştir. Aynı şekilde PC3

hücre hatlarında immünoreaktif protein bantları Şekil 3.15, bant hassasiyetleri grafiği Şekil 3.16 ve expresyon farklarının istatistiki analizi Tablo 3.9'da belirtilmiştir.



Şekil 3.13 Kontrol ve ilaç kombinasyonu kullanılmış hücre hattında GSTP protein expresyonunu gösteren immünoreaktif protein bant fotoğrafları. GSTP (23 kDa), GAPDH (37 kDa) protein büyüklüğünde gözlemlenmiştir. Şerit 1-3: Kontrol, Şerit 4-6: Cisplatin (17μM), Şerit 7-9: Metformin 1Mm, Şerit 10-12: Metformin 5 mM, Şerit 13-15: Cisplatin+1mM Metformin, Şerit 16-18: Cisplatin+5mM Metformin. Her kuyucuk için 30 μg protein yüklenmiştir.

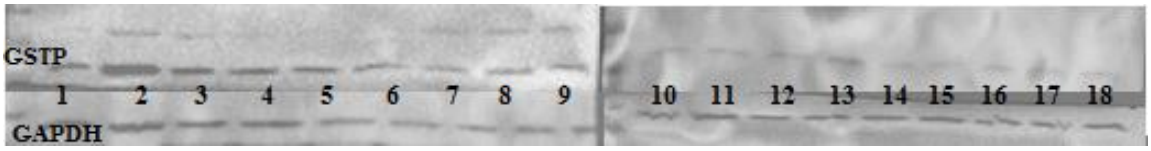


Şekil 3.14 LNCaP hücre hattında GSTP protein expresyonunun karşılartırmalı analizli. Her grup için 3 biyolojik replika kullanılmış olup, standart sapma oranları grafik üzerinde belirtilmiştir.

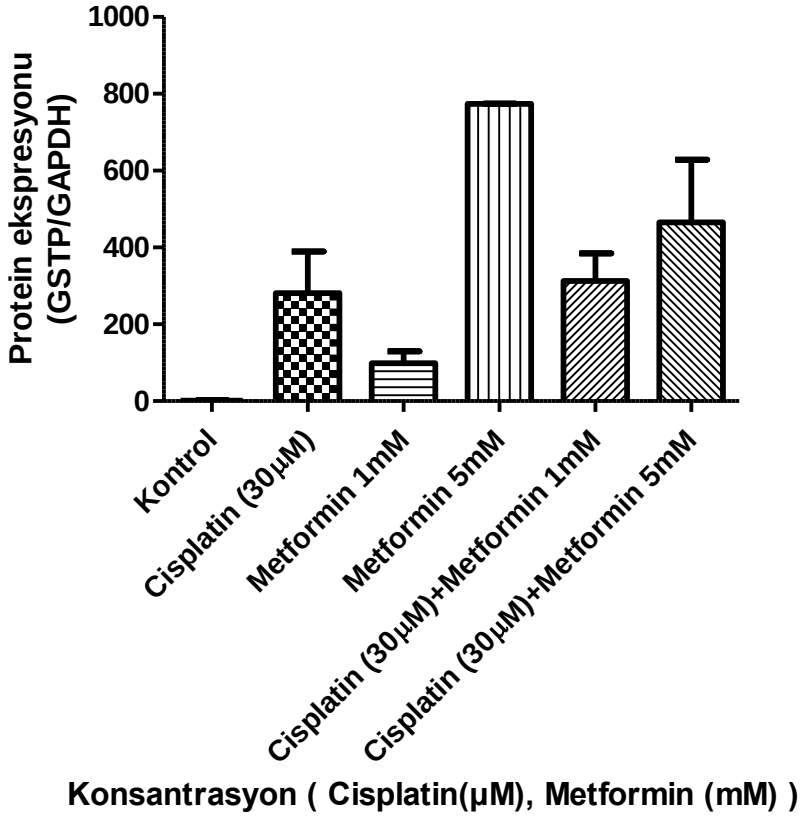
Tablo 3. 8 LNCaP hücre hattında GSTP protein expresyonunun istatistiksel analizli. Expresyon farkları karşılaştırılırken one-way ANOVA metodu kullanılmıştır.

	Cisplatin (17µM)	**Metformin 1mM**	**Metformin 5mM**	**Cisplatin (17µM) + Metformin 1mM**	**Cisplatin (17µM) + Metformin 5mM**
Kontrol	AD	AD	***	*	****
Cisplatin (17µM)		AD	**	AD	****
Metformin 1Mm			**	AD	****
Metformin 5mM				AD	****
Cisplatin (17µM) + Metformin 1mM					****

* P≤0.05; ** P≤0.01; *** P≤0.001; **** P≤0.0001; AD, Anlamlı Değil



Şekl 3.15 Kontrol ve ilaç kombinasyonu kullanılmış hücre hattında GSTP protein expresyonunu gösteren immünoreaktif protein bant fotoğrafları. GSTP (23 kDa), GAPDH (37 kDa) protein büyüklüğünde gözlemlenmiştir. Şerit 1-3: Kontrol, Şerit 4-6: Cisplatin (30µM), Şerit 7-9: Metformin 1Mm, Şerit 10-12: Metformin 5 mM, Şerit 13-15: Cisplatin+1mM Metformin, Şerit 16-18: Cisplatin+5mM Metformin. Her kuyucuk için 30 µg protein yüklenmiştir.



Şekil 3.16 PC3 hücre hattında GSTP protein expresyonunun karşılartırmalı analizli. Her grup için 3 biyolojik replika kullanılmış olup, standart sapma oranları grafik üzerinde belirtilmiştir.

Tablo 3. 9 PC3 hücre hattında GSTP protein expresyonunun istatistiksel analizli. Expresyon farkları karşılaştırılırken one-way ANOVA metodu kullanılmıştır.

	Cisplatin (30µM)	**Metformin 1mM**	**Metformin 5mM**	**Cisplatin (30µM) + Metformin 1mM**	**Cisplatin (30µM) + Metformin 5mM**
Kontrol	AD	**	***	AD	****
Cisplatin (30µM)		*	***	AD	****
Metformin 1mM			*	AD	***
Metformin 5mM				**	*
Cisplatin (30µM) + Metformin 1Mm					***

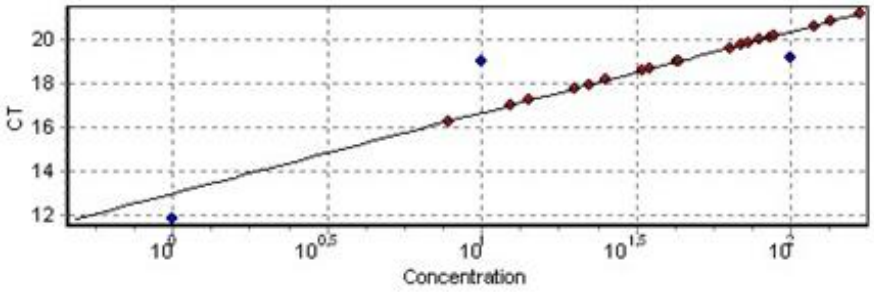
* P≤0.05; ** P≤0.01; *** P≤0.001; **** P≤0.0001; AD, Anlamlı Değil

3.4 Metformin Cisplatin İlaç Kombinasyonunun CYP17A1,GSTP ve Hekzokinaz II enzimlerinin mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

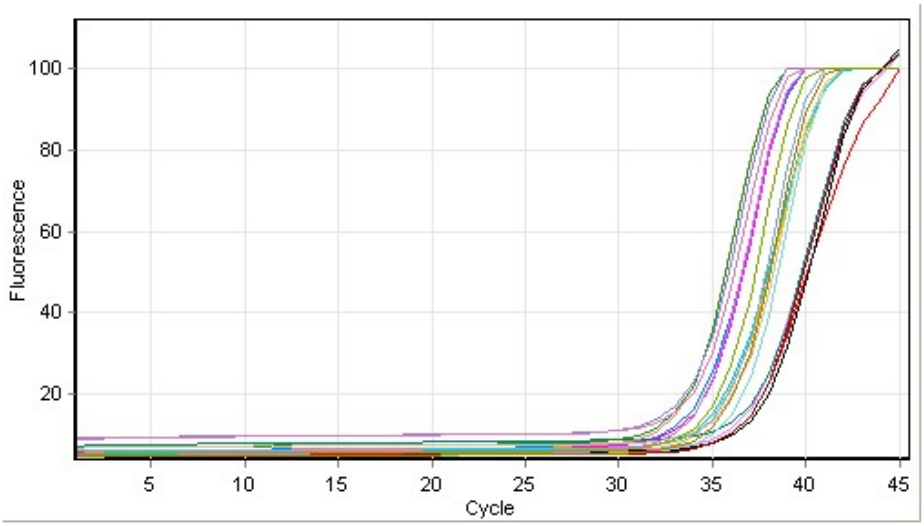
Tasarlanan çalışmada, ilaç kombinasyonunun gen ekspresyonu düzeyinde etkisini gözlemlemek amacıyla qRT-PCR tekniği kullanılmıştır. RNA izolasyonu metod kısmında detaylı bir biçimde anlatılmış olup TRİzol metodu kullanılarak izole dilmiştir. RNA ların saflığı NanoDrop ile ölçülmüş, oligo dT primer kullanılarak mRNA sentezi yapılmıştır. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmış olup mRNA ekspresyonları arasındaki fark bu gen baz alınarak hesaplanmıştır.

3.4.1 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun CYP17A1 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkileri

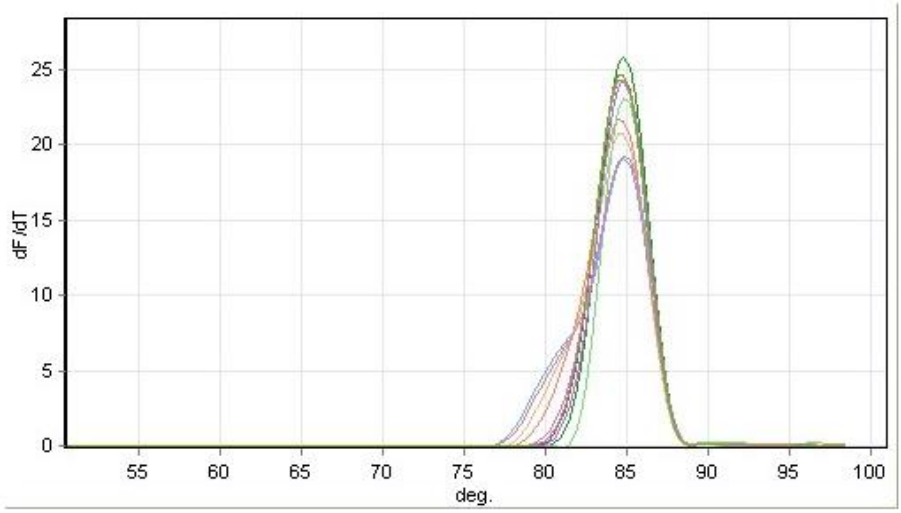
Sentezlenen cDNA'ların 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 ve 1:1500 oranında seyreltilmesi ile spesifik bir standart kalibrasyon eğrisi oluşturularak mRNA'ların expresyonlarındaki değişim bu eğriye göre hesaplanmıştır. Her gen için ayrı ayrı kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş, amplifikasyon analizi ve erime eğrisi analizleri yapılmıştır. LNCaP hücre hattı için analizler sırasıyla Şekil 3.17, Şekil 3.18 ve Şekil 3.19'de gösterilmiş ve PCR sonucu olşan amplifikasyon ürünleri agaroz jellerde yürütülerek deneyin doğruluğu kontrol edilmiştir (Şekil 3.20, Şekil 3.21). LNCaP hücre hattında CYP17A1 mRNA ekspresyonu değişimi Şekil 3.22'de verilmiş olup ekspresyonlar arasındaki farklar one-way ANOVA metodu kullanılarak istatistiki olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.17 LNCaP hücre hattı için standart kalibrasyon eğrisi

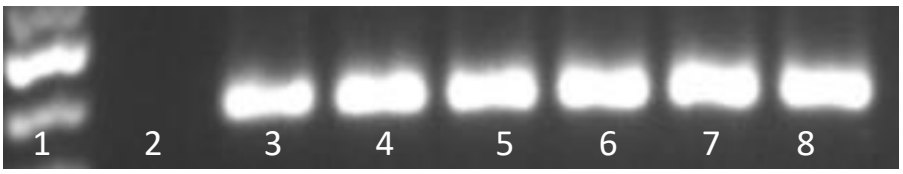


Şekil 3.18 LNCaP hücre hattı için amplifikasyon analizi

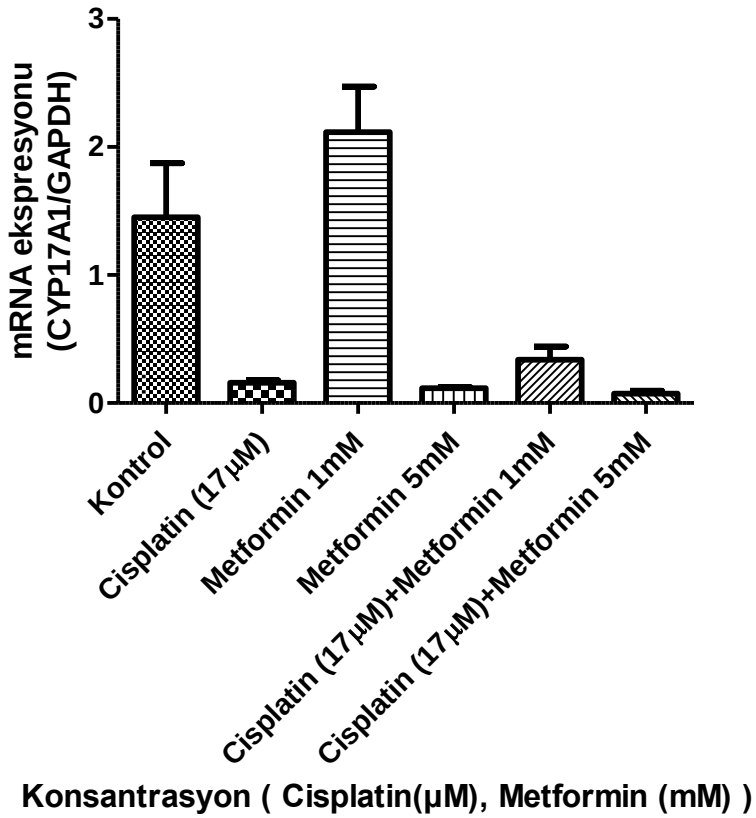


Şekil 3.19 LNCaP hücre hattı için erime eğrisi

Şekil 3.20 CYP17A1 cDNA qRT-PCR sonucu oluşan ürünler (152bp). 1. Marker, 2. Negatif Kontrol, 3. Kontrol, 4. Cisplatin (17µM), 5. Metformin 1mM, 6. Metformin 5mM, 7. Cisplatin + 1mM Metformin, 8. Cisplatin + 5mM. Her bir kuyucuğa 5µl örnek yüklenmiştir.



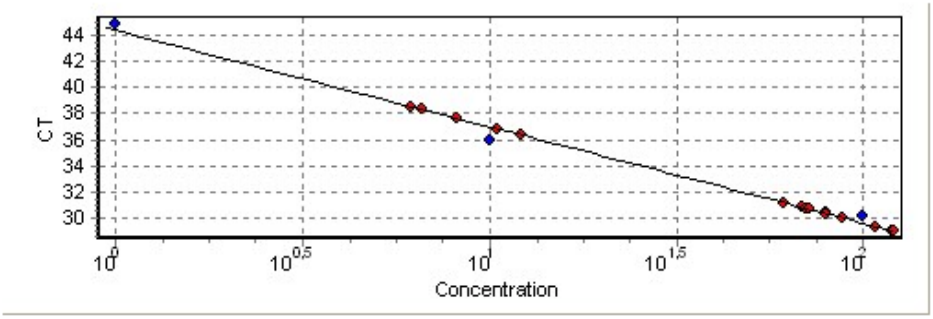
Şekil 3.21 GAPDH cDNA qRT-PCR sonucu oluşan ürünler (197bp). 1. Marker, 2. Negatif Kontrol, 3. Kontrol, 4. Cisplatin (17µM), 5. Metformin 1mM, 6. Metformin 5mM, 7. Cisplatin + 1mM Metformin, 8. Cisplatin + 5mM. Her bir kuyucuğa 5µl örnek yüklenmiştir.



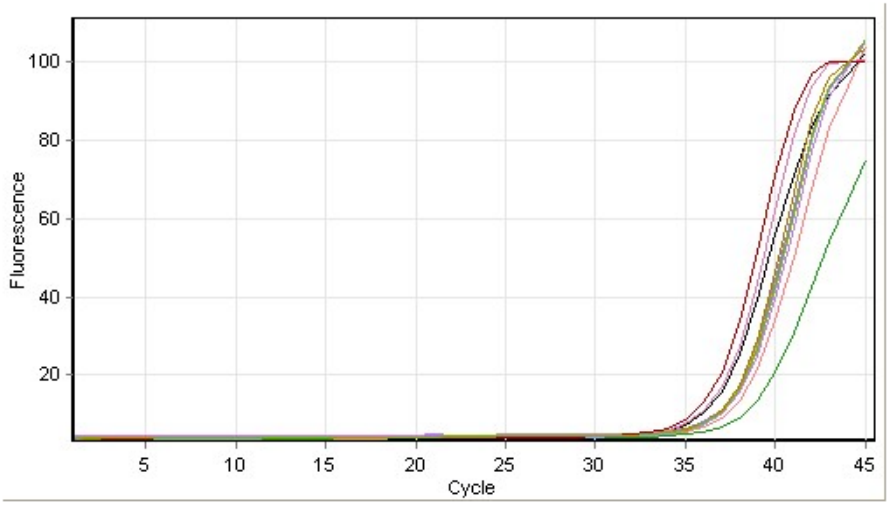
Şekil 3.22 LNCaP hücre hattında CYP17A1 mRNA ekspresyonu değişimi grafiği.

Şekil 3.22'de belirtilen Cyp17A1 mRNA expreyonları one-way ANOVA metoduyla karşılaştırılmış ve gruplar arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

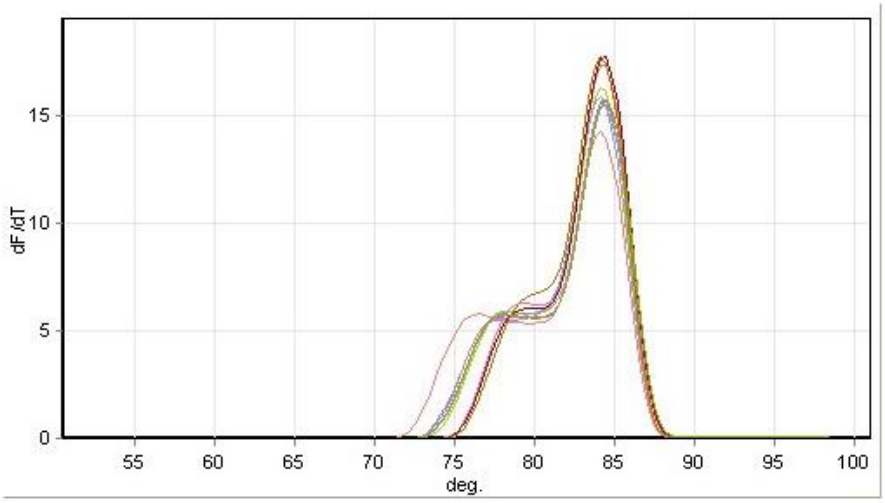
Aynı şekilde PC3 hücre hattı için sentezlenen kontrol grubu cDNA'lerinin aynı oranlarda seyreltilmesiyle standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş (Şekil 3.23) amplifikasyon analizi (Şekil 3.24) ve erime eğrisi (Şekil 3.25) analizleri yapılmıştır. PCR sonucu oluşan amplifikasyon ürünleri agaroz jellerde yürütülerek deneyin doğruluğu kontrol edilmiştir (Şekil 3.26). PC3 hücre hattında CYP17A1 mRNA ekspresyonu değişimi Şekil 3.27'de verilmiş olup ekspresyonlar arasındaki farklar one-way ANOVA metodu kullanılarak istatistiki olarak karşılaştırılmıştır.



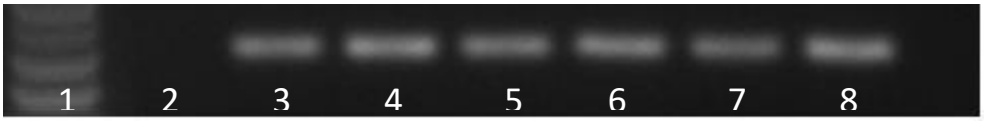
Şekil 3.23 PC3 hücre hattı için standart kalibrasyon eğrisi.



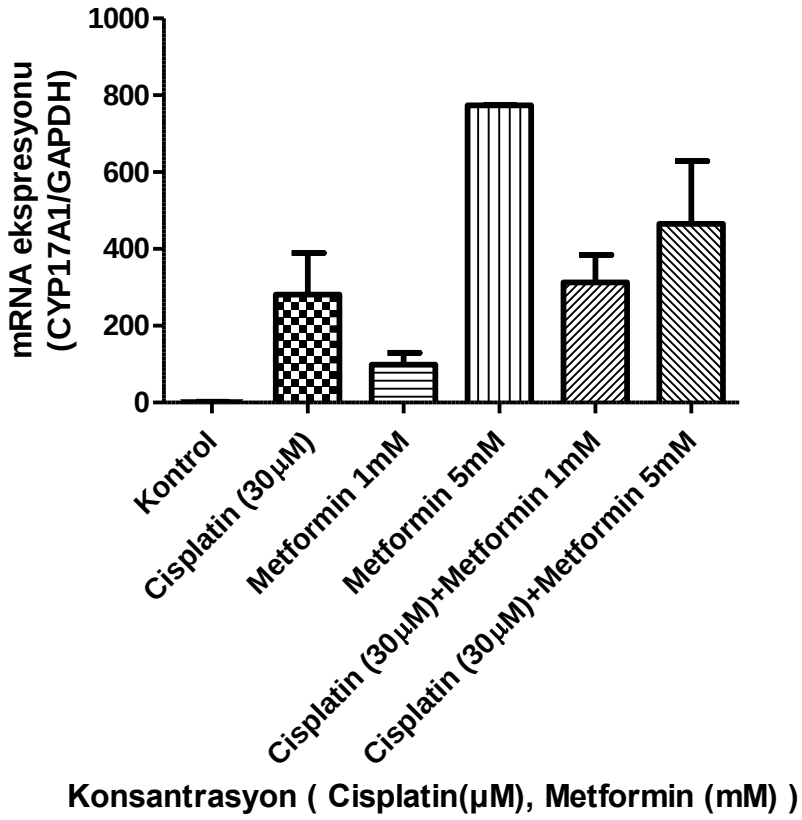
Şekil 3.24 PC3 hücre hattı için amplifikasyon analizi



Şekil 3.25 PC3 hücre hattı için erime eğrisi



Şekil 3.26 CYP17A1 cDNA qRT-PCR sonucu oluşan ürünler (152bp). 1. Marker, 2. Negatif Kontrol, 3. Kontrol, 4. Cisplatin (30µM), 5. Metformin 1mM, 6. Metformin 5mM, 7. Cisplatin + 1mM Metformin, 8. Cisplatin + 5mM. Her bir kuyucuğa 5µl örnek yüklenmiştir.

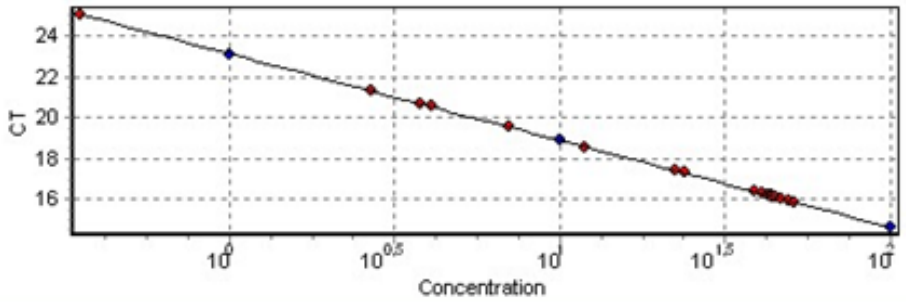


Şekil 3.27 PC3 hücre hattında CYP17A1 mRNA ekspresyonu değişimi grafiği.

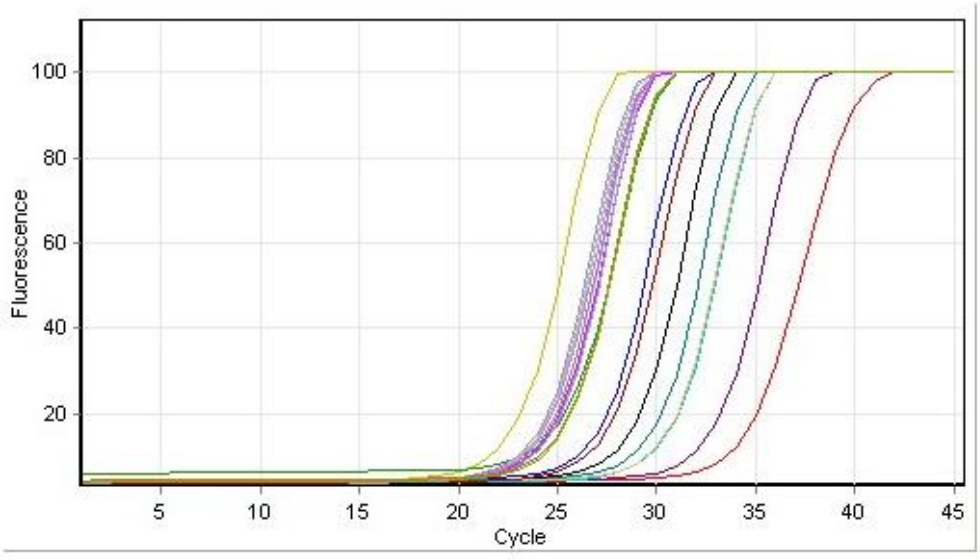
Şekil 3.27'de belirtilen Cyp17A1 mRNA expreyonları one-way ANOVA metoduyla karşılaştırılmış ve gruplar arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

3.4.2 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun GSTP mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkileri

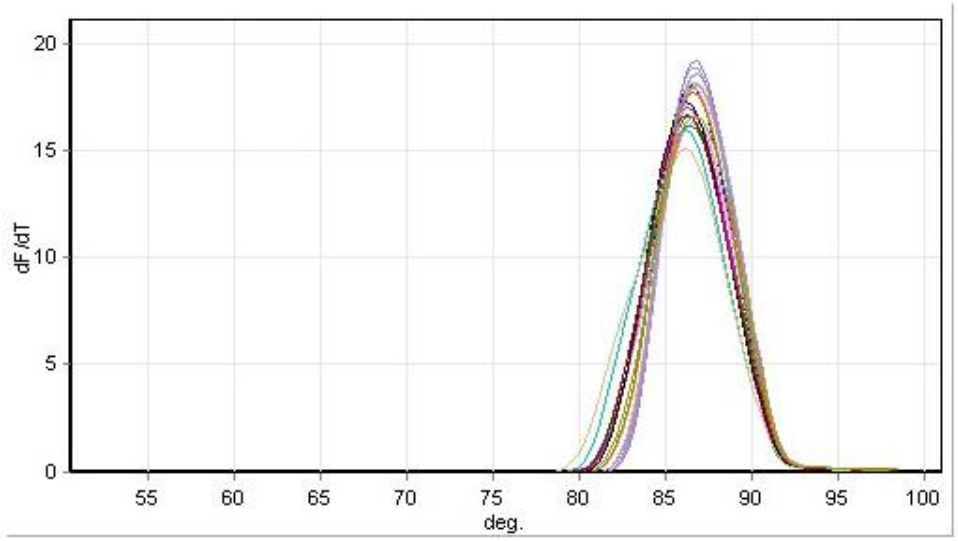
Sentezlenen cDNA'ların 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 ve 1:1500 oranında seyreltilmesi ile spesifik bir standart kalibrasyon eğrisi oluşturularak mRNA'ların expresyonlarındaki değişim bu eğriye göre hesaplanmıştır. Her gen için ayrı ayrı kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş, amplifikasyon analizi ve erime eğrisi analizleri yapılmıştır. LNCaP hücre hattı için analizler sırasıyla Şekil 3.28, Şekil 3.29 ve Şekil 3.30'de gösterilmiş ve PCR sonucu olşan amplifikasyon ürünleri agaroz jellerde yürütülerek deneyin doğruluğu kontrol edilmiştir (Şekil 3.31). LNCaP hücre hattında GSTP mRNA ekspresyonu değişimi Şekil 3.32'de verilmiş olup ekspresyonlar arasındaki farklar one-way ANOVA metodu kullanılarak istatistiki olarak karşılaştırılmıştır.



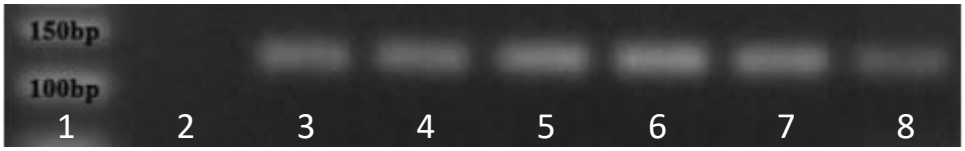
Şekil 3.28 LNCaP hücre hattı için standart kalibrasyon eğrisi.



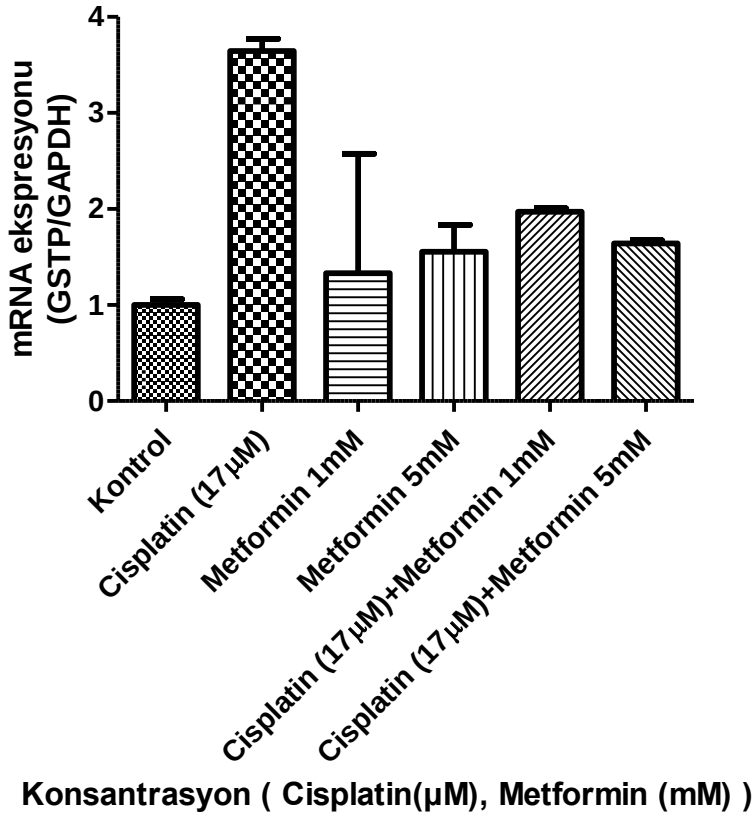
Şekil 3.29 LNCaP hücre hattı için amplifikasyon analizi



Şekil 3.30 LNCaP hücre hattı için erime eğrisi



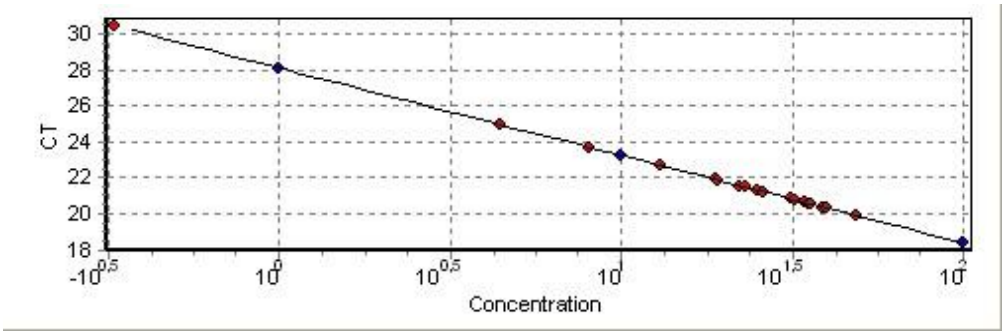
Şekil 3.31 GSTP cDNA qRT-PCR sonucu oluşan ürünler (137bp). 1. Marker, 2. Negatif Kontrol, 3. Kontrol, 4. Cisplatin (17µM), 5. Metformin 1mM, 6. Metformin 5mM, 7. Cisplatin + 1mM Metformin, 8. Cisplatin + 5mM. Her bir kuyucuğa 5µl örnek yüklenmiştir.



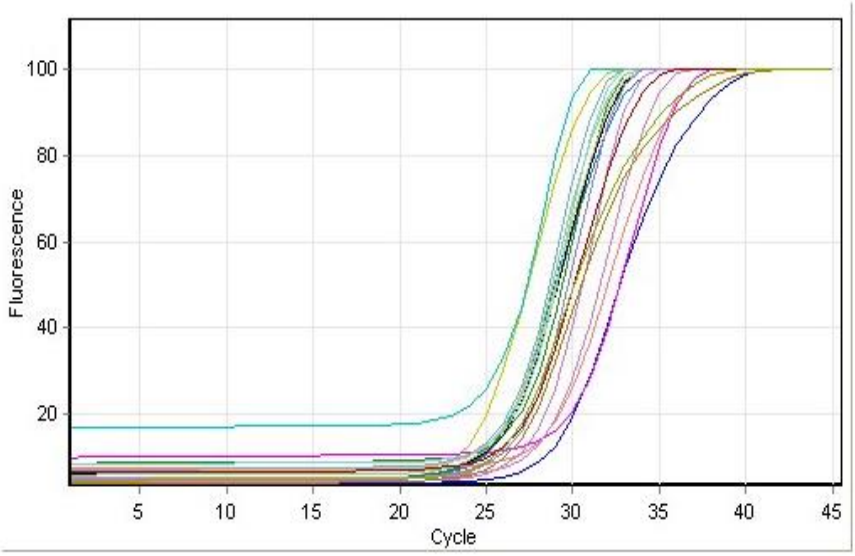
Şekil 3.32 LNCaP hücre hattında GSTP mRNA ekspresyonu değişimi grafiği.

Şekil 3.32'de belirtilen GSTP mRNA expreyonları one-way ANOVA metoduyla karşılaştırılmış ve gruplar arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

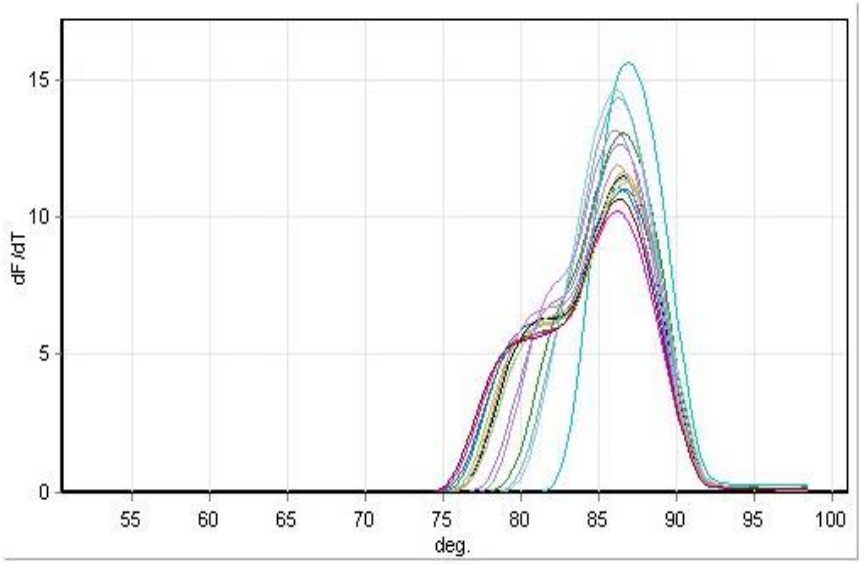
Aynı şekilde PC3 hücre hattı için sentezlenen kontrol grubu cDNA'lerinin aynı oranlarda seyreltilmesiyle standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş (Şekil 3.33) amplifikasyon analizi (Şekil 3.34) ve erime eğrisi (Şekil 3.35) analizleri yapılmıştır. PCR sonucu olşan amplifikasyon ürünleri agaroz jellerde yürütülerek deneyin doğruluğu kontrol edilmiştir (Şekil 3.36). PC3 hücre hattında GSTP mRNA ekspresyonu değişimi Şekil 3.37'de verilmiş olup ekspresyonlar arasındaki farklar one-way ANOVA metodu kullanılarak istatistiki olarak Tablo 3.10'da karşılaştırılmıştır.



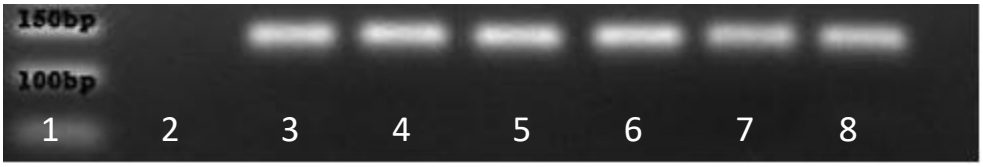
Şekil 3.33 PC3 hücre hattı için standart kalibrasyon eğrisi.



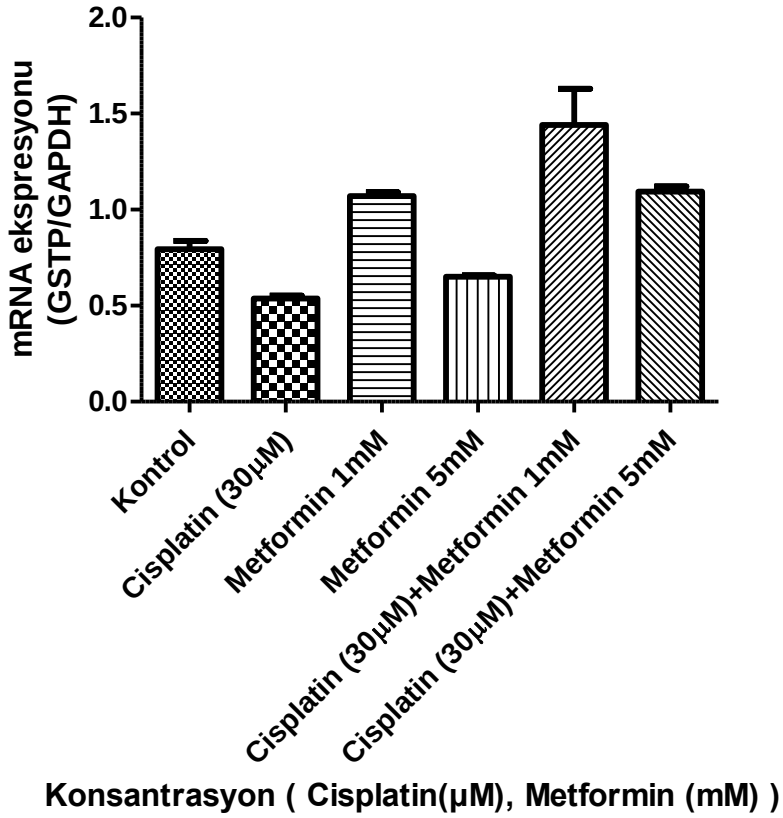
Şekil 3.34 PC3 hücre hattı için amplifikasyon analizi



Şekil 3.35 PC3 hücre hattı için erime eğrisi



Şekil 3.36 GSTP cDNA qRT-PCR sonucu oluşan ürünler (137bp). 1. Marker, 2. Negatif Kontrol, 3. Kontrol, 4. Cisplatin (30µM), 5. Metformin 1mM, 6. Metformin 5mM, 7. Cisplatin + 1mM Metformin, 8. Cisplatin + 5mM. Her bir kuyucuğa 5µl örnek yüklenmiştir.



Şekil 3.37 PC3 hücre hattında GSTP mRNA ekspresyonu değişimi grafiği.

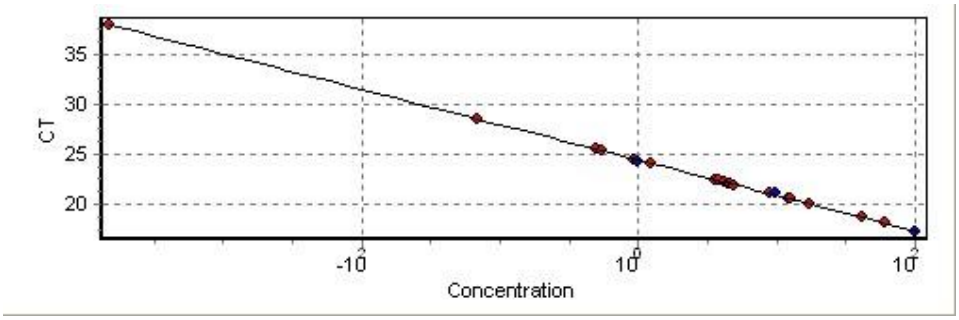
Tablo 3.10 GSTP mRNA expresyonlarının istatistiki karşılaştırılması.

	Cisplatin (30µM)	**Metformin 1mM**	**Metformin 5mM**	**Cisplatin (30µM) + Metformin 1mM**	**Cisplatin (30µM) + Metformin 5mM**
Kontrol	AD	AD	AD	*	AD
Cisplatin (30µM)		*	AD	**	*
Metformin 1mM			AD	AD	AD
Metformin 5mM				**	AD
Cisplatin (30µM) + Metformin 1mM					AD

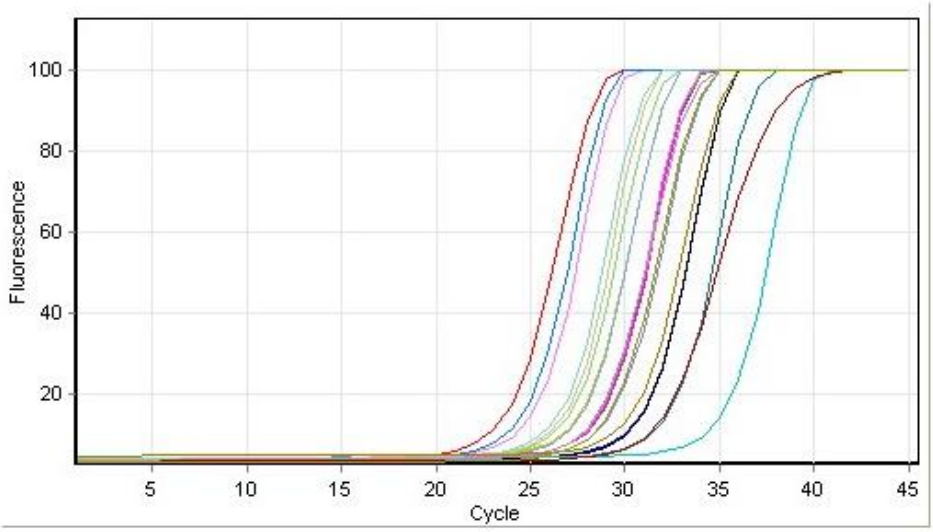
* P≤0.05; ** P≤0.01; *** P≤0.001; **** P≤0.0001; AD, Anlamlı Değil

3.4.3 LNCaP ve PC3 Hücre Hatlarında, Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonunun Hekzokinazll mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkileri

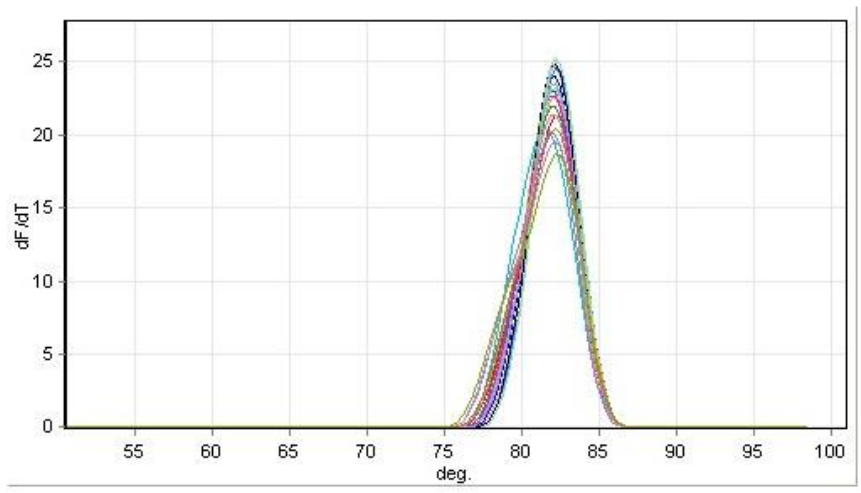
LNCaP hücre hattında mRNA ekspresyonu tayini için oluşturulan standrat kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.38), amplifikasyon analizi (Şekil 3.39) ve erime eğrisi analizi (Şekil 3.40) hesaplanmış olup, PCR sonucu olşan amplifikasyon ürünleri agaroz jellerde yürütülerek deneyin doğruluğu kontrol edilmiştir (Şekil 3.41). LNCaP hücre hattında Hekzokinaz II mRNA ekspresyonu değişimi Şekil 3.42'de verilmiş olup ekspresyonlar arasındaki farklar one-way ANOVA metodu kullanılarak istatistiki olarak Tablo 3.11'de karşılaştırılmıştır.



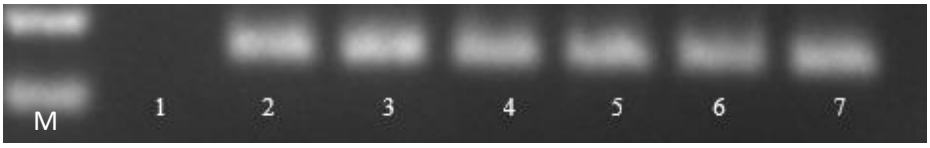
Şekil 3.38 LNCaP hücre hattı için standart kalibrasyon eğrisi.



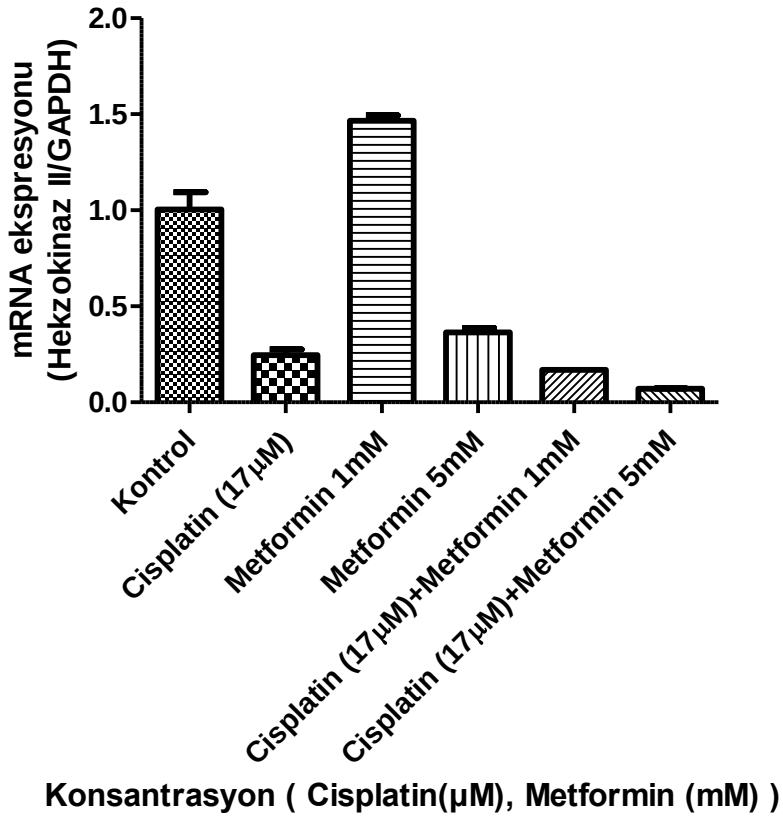
Şekil 3.39 LNCaP hücre hattı için amplifikasyon analizi



Şekil 3.40 LNCaP hücre hattı için erime eğrisi



Şekil 3.41 Hekzokinaz II cDNA qRT-PCR sonucu oluşan ürünler (131bp). M; Marker, 1. Negatif Kontrol, 2. Kontrol, 3. Cisplatin (17µM), 4. Metformin 1mM, 5. Metformin 5mM, 6. Cisplatin + 1mM Metformin, 7. Cisplatin + 5mM. Her bir kuyucuğa 5µl örnek yüklenmiştir.



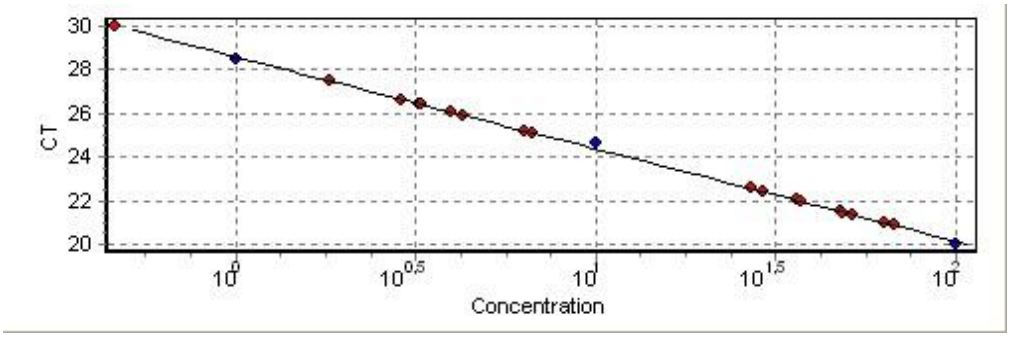
Şekil 3.42 LNCaP hücre hattında Hekzokinaz II mRNA ekspresyonu değişimi grafiği.

Tablo 3.11 Hekzokinaz II mRNA expresyonlarının istatistiki karşılaştırılması.

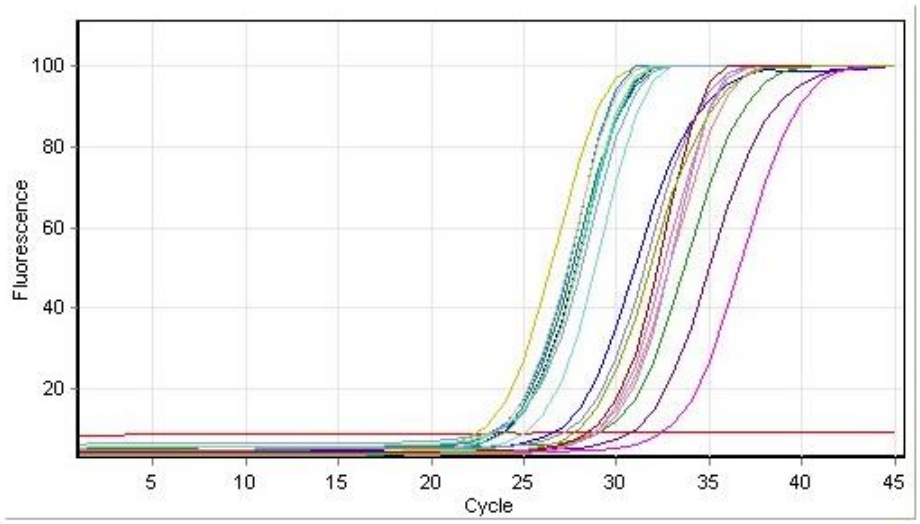
	Cisplatin (17µM)	**Metformin 1mM**	**Metformin 5mM**	**Cisplatin (17µM) + Metformin 1mM**	**Cisplatin (17µM) + Metformin 5mM**
Kontrol	**	**	*	**	**
Cisplatin (17µM)		AD	AD	AD	AD
Metformin 1mM			AD	AD	AD
Metformin 5mM				AD	AD
Cisplatin (17µM) + Metformin 1mM					AD

* P≤0.05; ** P≤0.01; *** P≤0.001; **** P≤0.0001; AD, Anlamlı Değil

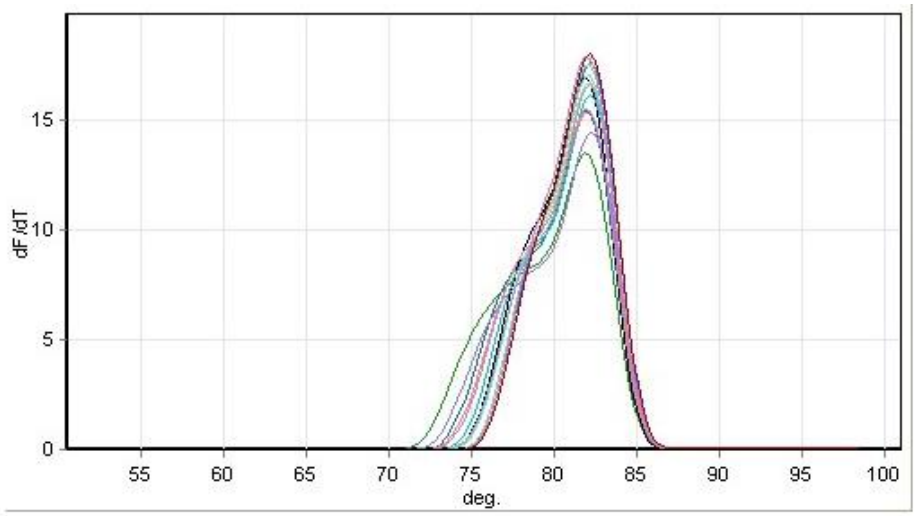
Aynı şekilde PC3 hücre hattı için oluşturulan standart kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.43), amplifikasyon analizi (Şekil 3.44) ve erime eğrisi (3.45) hasaplanmış olup, PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri (Şekil 3. 46) ve mRNA analizleri Şekil 3.47'te gösterilmiştir. Yapılan analizlerin istatistiki değerleri Tablo 3.12'te karşılaştırılmıştır.



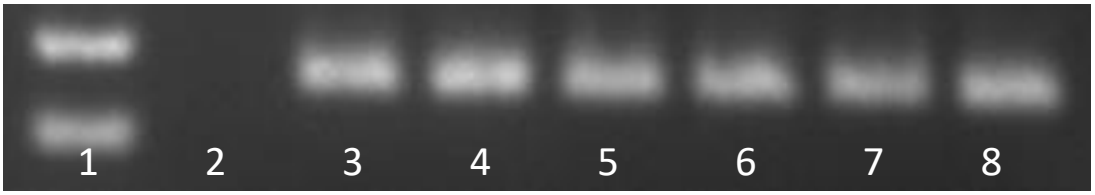
Şekil 3.43 PC3 hücre hattı için standart kalibrasyon eğrisi.



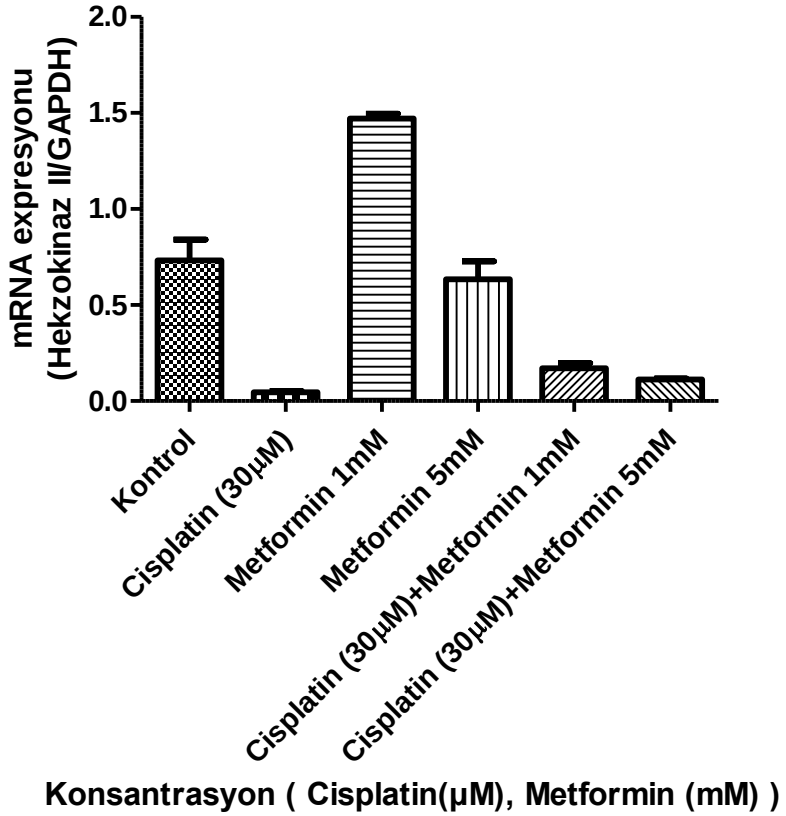
Şekil 3.44 PC3 hücre hattı için amplifikasyon analizi



Şekil 3.45 PC3 hücre hattı için erime eğrisi



Şekil 3.46 Hekzokinaz II cDNA qRT-PCR sonucu oluşan ürünler (131bp). 1. Marker, 2. Negatif Kontrol, 3. Kontrol, 4. Cisplatin (30µM), 5. Metformin 1mM, 6. Metformin 5mM, 7. Cisplatin + 1mM Metformin, 8. Cisplatin + 5mM. Her bir kuyucuğa 5µl örnek yüklenmiştir.



Şekil 3.47 PC3 hücre hattında Hekzokinaz II mRNA ekspresyonu değişimi grafiği

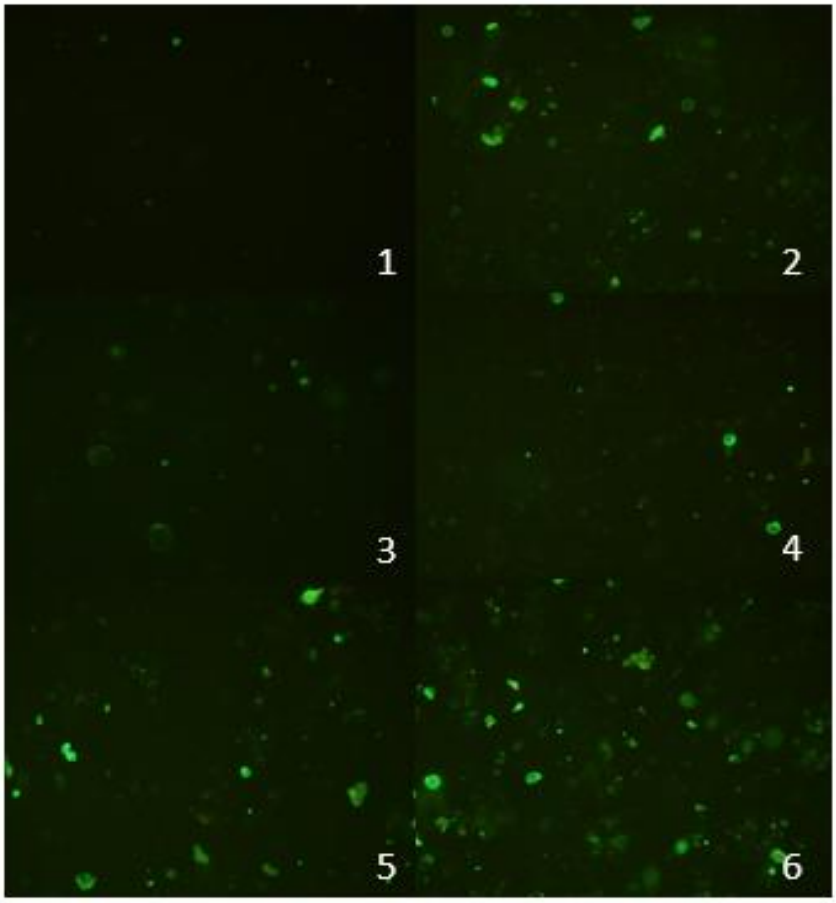
Tablo 3.12 Hekzokinaz II mRNA expresyonlarının istatistiki karşılaştırılması.

	Cisplatin (30µM)	**Metformin 1mM**	**Metformin 5mM**	**Cisplatin (30µM) + Metformin 1mM**	**Cisplatin (30µM) + Metformin 5mM**
Kontrol	**	**	AD	**	**
Cisplatin (30µM)		****	**	AD	AD
Metformin 1mM			***	****	****
Metformin 5mM				*	*
Cisplatin (30µM) + Metformin 1mM					AD

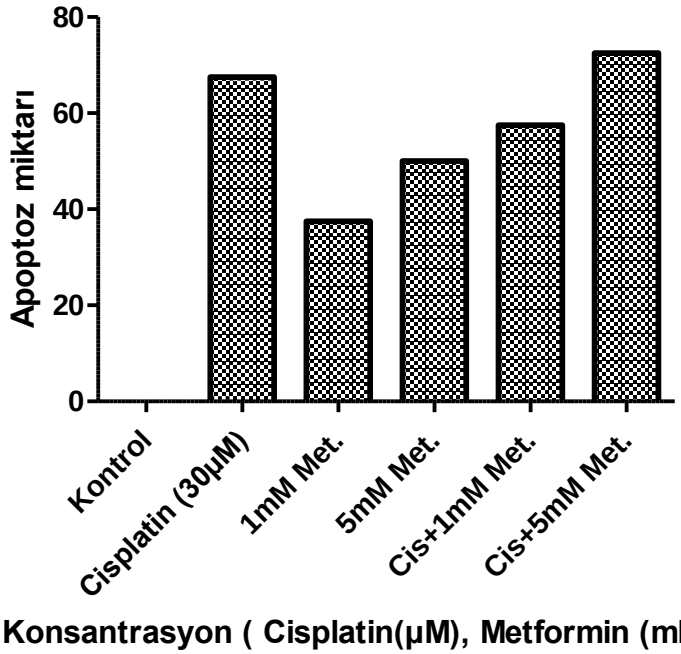
* P≤0.05; ** P≤0.01; *** P≤0.001; **** P≤0.0001; AD, Anlamlı Değil

3.5 Cisplatin Metformin ilaç kombinasyonunun Apoptoz Üzerine Etkilerinin Saptanması

Metot kısmında belirtildiği gibi, hücreler 6 kuyucuklu büyüme kaplarında büyütülmüş olup cisplatin ve metforminin hesaplanan konsantrasyonlarında muamele edilmiştir. Daha sonra Annexin V-EGFP Apoptoz saptama kiti (BioVision Incorporated CA., USA) protokolündeki basamaklar takip edilerek ilaçların hücre apoptozu üzerine etkileri floresan mikroskobu ile tespit edilmiştir (Şekil 3.48, 3.49).



Şekil 3.48 Sırasıyla 1. Kontrol, 2. Cisplatin (30μM), 3. 1mM Metformin, 4. 5mM Metformin, 5. Cisplatin+1mM Metformin, 6. Cisplatin+5mM Metformin ile muamele edilen hücrelerin floresan mikroskobu görüntileri gösterilmiştir.



Şekil 3.49 Apoptotik hücre sayısının değişen ilaç konsantrasyonlarına göre değişim grafiği.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Proje kapsamında yürütülen moleküler ve biyokimyasal çalışmalar, metformin cisplatin ilaç kombinasyonunun kanser hastalarında kullanılabilecek potansiyeli olduğunu göstermektedir. Tasarlanan ilaç kombinasyonunun prostat kanseri hastalığı için düşük maliyetli olması avantaj gibi gözükse de yan etkilerinin tam olarak bilinmemesi akıllarda soru işaretleri bırakabilir. Bu ilaçların kullanılması için daha spesifik deneylerin yapılması gerekmektedir.

PC3 hücre hatları kullanılarak cisplatin-metformin ilaç kombinasyonunun bu hücrelerin proliferasyonu ve kanser hücrelerinin metabolizmasında rol oynayan enzimler üzerine etkilerinin protein ve gen ekspresyonu bazında araştırıldığı bir çalışmadır. Projemizin ilk basamağını oluşturan hücre kültürü çalışmaları sonuçlarına göre, her iki ilacın da ayrı ayrı prostat kanseri hücre hatlarında proliferasyonu durdurucu etkisi olduğu saptanmıştır. Belirlenen hücre hatlarında antiproliferatif etkileri kanıtlanan ilaçların kombinasyon şeklinde hücre hatlarına uygulanması projenin asıl amacını oluşturmaktadır. Yapılan çalışmada ilaçların ayrı ayrı ve birlikte etkilerinin detaylı bir biçimde incelenebilmesi için deney düzeneği olarak 6 grup kurulmuştur. Bu gruplar; 1. Kontrol grubu, 2.Cisplatin grubu (Alamar Blue protokolü uygulanarak hesaplanan IC50 değerleri ile muamele edilmiştir; bu değerler LNCaP hücre hattı için 17μM, PC3 hücre hattı için 30 μM olarak hesaplanmıştır) 3. Metformin 1mM 4. Metformin 5mM, 5. Cisplatin + 1mM 6. Cisplatin + 5mM olarak tasarlanmıştır. Böylelikle ilaçların etkileri kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Yapılan uygulamalar sonucunda cisplatin metformin ilaç kombinasyonunun prostat kanser hücrelerinin büyümesini büyük ölçüde durdurduğu saptanmıştır. Ayrıca ilacın dozundaki artışla doğru orantılı olarak hücrelerin proliferasyonu azalmıştır. İlaçların hücreler üzerindeki antiproliferatif rolü tespit edildikten sonra aynı oranlarda ilaç dozları kullanılarak protein ve mRNA izolasyonları yapılmıştır.

Protein izolasyonunun ardından, ilaçların belirlenen enzimlerin protein ekspresyonları üzerine etkilerini saptamak amacıyla Western Blot tekniği uygulanmıştır. Aynı zamanda bu etkinin gen expresyonu düzeyinde etkisinin saptanabilmesi için q-RT PCR tekniği kullanılmıştır. Yapılan çalışmada öncelikle ilaçların androjen sentez yolağında önemli rol oynayan CYP17A1 enziminin protein expresyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Western analizleri göz önüne alındığında, LNCaP hücre hattında CYP17A1 enziminin expresyonunun ilaç muameleleri sonucunda genel olarak düştüğü gözlenmiş olup, ancak bunlar istatistiki olarak Anlamlı

Değildir. Sadece cisplatin ile birlikte metforminin 5mM uygulandığı konsantrasyonlarda CYP17A1 protein expresyonu anlamlı derecede yükselmektedir($P \leq 0.0001$). PC3 hücre hattında ise aynı ilaç kombinasyonları kullanılmış metformin-cisplatin kombinasyonunun her değerinde (1mM ve 5mM) CYP17A1 protein expresyonu anlamlı derecede düşmüştür ($P \leq 0.001$). CYP17A1 enzim expresyonunun hücre hatları arasında bu denli farklılık göstermesi ve LNCaP hücre hattı daha agresif ve metastatik bir yapıya sahip olduğu bilgisiyle birlikte Cisplatin-metformin kombinasyonunun agresif ve metastatik prostat kanseri vakalarında kullanımının kısıtlı olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Çalışmayı daha spesifik bir seviyeye indirgeyebilmek için ilaçların CYP17A1 enziminin gen expresyonu üzerine etkileri incelenmiştir ancak her iki hücre hattında da istatistiki açıdan anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Yapılan bu çalışmada cisplatin-metformin ilaç kombinasyonunun apoptotik yolaklarda adete regüle edici bir ajan olarak görev yapan GST enzimleri üzerine etkilerine de bakılmıştır. GSTP'nin hücre proliferasyonu ve apoptoz durumunu regüle eden c-JUNK yolağı üzerindeki düzenleyici etkisi göz önünde bulunduğunda bu enzimin olası bir ilaç hedefi olması şaşırtıcı değildir. Özetle hücreler stres durumunda değilken c-junk GSTPenzimi ile protein:protein interraksiyonları ile bağlıdır. Bu durum c-junk'in olası hedefleri ile interraksiyona girmesini engelleyerek apoptotik yolakların inaktif durumda olmasını sağlamaktadır. Ancak stres durumunda (birçok antikanser lacı antitümörojenik etkilerini hücre içinde oksidatif stres oluşurarak gösterirler) bu protein:protein interraksiyonları kopar ve hücreler apoptotik yolakların aktive olmasıyla ölürler. Bu durum western görüntülerinde GSTP enziminin dimerik formunun oluşmasıyla paralellik göstermektedir. Yapılan çalışmada sözü geçen ilaçlarla muamele edilen hücre hatlarında GSTP enziminin expresyonunda azalma, aynı zamanda dimerik formunun oluşumu beklenmiştir. Ancak LNCaP hücre hattında bu GSTP enziminin dimerik formu gözlemlenemediği gibi aksine bu enzimin expresyonu anlamlı derecede artmıştır. PC3 hücre hattına bakıldığında metformin konsantrasyonunun artışıyla doğru orantılı olarak dimerik formdaki bantların azaldığı, aynı zamanda yine konsantrasyon artışına paralel bir biçinde GSTP enziminin expresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum metforminin PC tedavisinde apoptozu indüklemek yerine hücrelerde daha çok 'detoksifiye edici' etki gösterdiğini düşünmemize neden olmuştur. Bu düşünceye paralel olarak, literatür taraması yapıldığında, hücre hatlarının yetiştirilme ortamlarındaki glikoz seviyesi metforminin karakterini belirlediğini ortaya koyan çalışmalarla karşılaşılmıştır. Menendez JA ve ekibinin 2012'de yapmış olduğu çalışmada, düşük veya normal glikoz seviyesinde, metformin antitümör etki yerine daha çok detoksifiye edici etki ortaya koyduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, yüksek glukoz konsantrasyonuna sahip medium ile büyütülen hücre hatlarında metforminin bilinen antitümör etkisini gösterebildiği belirtilmiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; düşük glukoz durumunda hücreler koruma makanizması olarak proliferasyon düzeylerini düşürürler. Bu

durumda antikanser ilaçların verdiği hücresel hasar DNA tamir mekanizmaları tarafından farkedilir ve ilaç antikarsinojen etkisini göstermeden direk hücreden uzaklatırılabilir. Bu durum bulmuş olduğumuz sonuçlara mantıklı bir açıklama getirmektedir.

Son olarak yürütülen bu çalışmamızda glikoliz yolağının ilk basamağı olan glukozun fosforilasyonunu katalizleyen Hekzokinaz II enzimi üzerine yoğunlaşılmıştır. Hekzokinaz II enzimi kanser hücrelerinin yüksek malignant ve proliferatif düzeyde olmasından sorumludur. Hücresel lokalizasyonu ve glukozu hızlıca fosforile edebilme özelliği bu enzimleri önemli ilaç hedefleri haline getirmektedir. Yapılan çalışmada bu enzimin gen expresyonu üzerine etkileri incelenmiş olup, beklendiği gibi ilaç kombinasyonu her iki hücre hattında da anlamlı derecede Hekzokinaz II enzimi gen expresyonunu düşürmektedir ($P \leq 0.0001$).

Tasarlanan çalışmada Cisplatin- metformin ilaç kombinasyonunun apoptoz üzerine etkileri de incelenmiştir. Apoptotik hücrelerin Floresan mikroskobu ile tayininde Annexin V-EGFP Apoptoz saptama kiti (BioVision Incorporated CA., USA) kullanılmış olup sonuçlar hücrelerin proliferasyonundaki düşüş ile doğru orantılı olarak saptanmıştır. Bu durum hücre proliferasyounun ve apoptozun ilaç kombinasyonu ile doğru orantılı olarak düştüğünü kanıtlamaktadır. Ancak hücre ölümündeki bu artış, proje kapsamında araştırılan enzimler ile ilişkilendirilememiştir. Yapmış olduğumuz çalışma metformin cisplatin ilaç kombinasyonunun hücre proliferasyonu ve hücre ölümü ile doğrudan ilgili olduğunu göstermekle birlikte bu konu ile ilgili yapılacak diğer çalışmalara da olanak sunmuştur. Bu çalışmada apoptotik yolakların ve dolayısıyla hücre proliferasyonunun ilaç kombinasyonu ile indüklenmesi ardındaki moleküler mekanizmalar aydınlatılamamış olup, bu konu ile ilgili yapılacak yeni çalışmaların önü açılmıştır.

Sonuç olarak, tasarlanan çalışma ortaya koymuştur ki, cisplatin metformin kombinasyonu PC hücre hatlarının proliferasyonunu anlamlı derecede düşürmüştür. Hücrelerin proliferasyonundaki düşüşün nedeni moleküler olarak mevcut çalışmamız ile tam olarak açıklanamasa da, Hekzokinaz II enzimi yüksek olasılıkla bu durumla ilişkilendirilebilir. Tam ve kesin bir sonuca ulaşmak için bu konu ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir. İlaç kombinasyonunun GSTP enziminin expresyonu üzerine etkilerinin sağlıklı bir biçimde incelenebilmesi için yüksek glukoz konsantrasyonuna sahip büyüme ortamları kullanılarak deneyler tekrarlanabilir. Aynı zamanda belirlenen ilaçlar, CYP17A1 enzimi ve androjen reseptörü arasında bir korelasyon kurulabilmesi için deneyler hücrelere dışardan sentetik androjen verilerek incelenebilir. Bunların dışında, mevcut çalışma bu ilaç kombinasyonunun prostat kanseri için umut vadeden bir tedavi olanağı sunabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak, mevcut çalışmalarla kesin bir kanıya varılamamaktadır.

4. KAYNAKÇA

Adler, V., Yin,Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K.D., Pincus, M.R., Sardana, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Davis, R.J., Ronai, Z. 1999. "Regulation of JNK Signaling by GSTp", EMBO J, 18,1321–1334.

Ashokkumar, N., Pari, L., Rao, Ch.A. 2006. "Effect of N-benzoyl-D-phenylalanine and Metformin on Insulin Receptors in Neonatal Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Studies on Insulin Binding to Erythrocytes", Arch. Physiol. Biochem, 112(3),174-81.

Bailey, C.J., Turner, R.C. 1996. "Metformin", N. Engl. J. Med, 334(9),574-9.

Bobba, A., Amadoro, G., Piana G.La., Petragallo V.A., Calissano P., Atlante, A. 2015. "Glucose 6-Phosphate Tips The Balance In Modulating Apoptosis Cerebellar Granule Cells", FEBBS Letters, 589(5),651-658.

Brusselmans, K., Schrijver, E.De., Verhoeven, G., Swinnen, J.V. 2005. "RNA Interference-Mediated Silencing of the Acetyl-CoA-Carboxylase-Alpha Gene Induces Growth Inhibition and Apoptosis of Prostate Cancer Cells", Cancer Res, 65(15),6719-25.

Cho, S.G., Lee, Y.H., Park, H.S., Ryoo, K., Kang, K.W., Park, J., Eom S.J., Kim, M.J., Chang, T.S., Choi, S.Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M.S., Lee, M.J., Kim, S.G., Ichijo, H., Choi, E.J. 2001. "Glutathione S-Transferase mu Modulates the Stress-Activated Signals by Suppressing Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1", J. Biol. Chem, 276,12749–12755.

Danyelle, M.T., Kenneth, D.T. 2003. "The Role of Glutatione S-Transferase in Anti-Cancer Drug Resistance", Oncogene, 22,7369-7375.

Endo, A., Kuroda, M., Tanzawa. K. 1976. "Competitive Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase by ML-236A and ML-236B Fungal Metabolites, having Hypocholesterolemic Activity", FEBS Lett, 72(2),323-6.

Esra, A., Deniz, E., Şafak, A., Levent, I. 1999. “Cisplatinin Sıçan Böbrek ve Testisleri Üzerine Etkileri” , Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 52(3), 139-145.
Floridi, A., Paggi, M.G., Fanciulli, M. 1989. “Modulation of Glycolysis in Neuroepithelial tumors”, J. Neurosurg. Sci, 33:55-64.

Harborne, L.R., Sattar, N., Norman, J.E., Fleming, R. 2005. “Metformin and Weight Loss in Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome: Comparison of Doses”, J. Clin. Endocrinol. Metab, 90(8),4593-8.

Hardie, D.G., Pan, D.A. 2002. “Regulation of Fatty Acid Synthesis and Oxidation by the AMP-Activated Protein Kinase”, Biochem. Soc. Trans, 30(6),1064-70.

Higano C. 2003. “Side Effects of Androgen Deprivation Therapy: Monitoring and Minimizing Toxicity”, Urology, 61(2), 32-38.

Hosono, K., Endo, H., Takahashi, H., Sugiyama, M., Sakai, E., Uchiyama, T., Suzuki, K., Iida, H., Sakamoto, Y., Yoneda, K., Koide, T., Tokoro, C., Abe, Y., Inamori, M., Nakagama H., Nakajima A. 2010. “Metformin Suppresses Colorectal Aberrant Crypt Foci in a Short-Term Clinical Trial”, Cancer Prev. Res. (Phila), 3(9),1077-83.

Laborode E., “Glutathione Transferases as Mediators of Signaling Pathways Involved in Cell Proliferation and Cell Death”, Nature Rev, 17,1373–1380.

Lee, J.H., Kim, T.I., Jeon, S.M., Hong, S.P., Cheon, J.H., Kim, W.H. 2012. “The Effects of Metformin on the Survival of Colorectal Cancer Patients with Diabetes Mellitus”, Int. J. Cancer, 131(3),752-9.

Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., Slingerland, J.M., Mills, G.B. 2007. “The Energy Sensing LKB1-AMPK Pathway Regulates p27(kip1) Phosphorylation Mediating the Decision to Enter Autophagy or Apoptosis”, Nat. Cell Biol, 9(2),218-24.

Luu-The, V., Bélanger, A., Labrie, F., 2008. “Androgen Biosynthetic Pathways in the Human Prostate”, Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab, 22(2),207-221.

Menendez JA, Oliveras-Ferraros C, Cufí S, Corominas-Faja B, Joven J, Martin-Castillo B, Vazquez-Martin, Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. , A Cell Cycle. 2012 Aug 1; 11(15):2782-92.

Miyashita, T., Reed, J.C. 1995. “Tumor Suppressor p53 is a Direct Transcriptional Activator of the Human Bax Gene”, Cell, 80(2),293-9.

Noto, H., Goto, A., Tsujimoto, T., Noda, M. 2012. “Cancer Risk in Diabetic Patients Treated with Metformin: A Systematic Review and Meta-Analysis”, PLoS One 7(3),e33411.

Ouyang, J., Parakhia, R.A., Ochs, R.S. 2011. “Metformin Activates AMP Kinase Through Inhibition of AMP Deaminase”, J. Biol. Chem, 286(1),1-11.

Picado-Leonard J., Miller W.L., 1987. “Cloning and Sequence of the Human Gene for P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): Similarity with the Gene for P450c21”, DNA, 6(5),439–448.

Pogach, L.M., Lee, Y., Gould, S., Giglio, W., Meyenhofer, M., Huang, H.F.S. 1989. “Characterization of Cis-Platinum-Induced Sertoli Celi Dysfunction in Rodents”, Tox App Pharm, 98,350-361.

Rojas, L.B., Gomes, M.B. 2013. “Metformin: An Old but Still the Best Treatment for Type 2 Diabetes”, Diabetol. Metab. Syndr, 5(1),6.

Schernhammer, E.S., Holly, J.M., Pollak, M.N., Hankinson, S.E. 2005. “Circulating Levels of Insulin-Like Growth Factors, Their Binding Proteins and Breast Cancer Risk”, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 14 (3),699-704.

Shu, Y., Sheardown, S.A., Brown, C., Owen, R.P., Zhang, S., Castro, R.A., Ianculescu, A.G., Yue, L., Lo, J.C., Burchard, E.G., Brett, C.M., Giacomini, K.M. 2007. “Effect of Genetic Variation in the Organic Cation Transporter 1 (OCT1) on Metformin Action”, J. Clin. Invest. 117(5),1422-31.

Stocker, S.L., Morrissey, K.M., Yee, S.W., Castro, R.A., Xu, L., Dahlin, A., Ramirez, A.H., Roden, D.M., Wilke, R.A., McCarty, C.A., Davis, R.L., Brett, C.M., Giacomini, K.M. 2013. “The Effect of Novel Promoter Variants in MATE1 and MATE2 on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Metformin”, Clin. Pharmacol. Ther, 93(2),186-94.

Takane, H., Shikata, E., Otsubo, K., Higuchi, S., Ieiri, I. 2008. “Polymorphism in Human Organic Cation Transporters and Metformin Action”, Pharmacogenomics, 9(4),415-22.
Tew K.D. “Glutathione-Associated Enzymes Anticancer Drug Resistance”, Cancer Res, 54,4313–4320.

WHO Technical Report series 916. Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases, Geneva, 2003.

Witters, L.A. 2001. “The Blooming of the French Lilac”, J. Clin. Invest, 108(8),1105-7.
Xian S.L., Cao, W., Zhang X.D. Lu, Y.U. “3-Bromopyruvate inhibits human gastric cancer tumor growth in nude mice via the inhibition of glycolysis”, Oncology letters, 9(2), 739-744.

Xiang, X., Saha, A.K., Wen, R., Ruderman, N.B., Luo, Z. 2004. “AMP-Activated Protein Kinase Activators Can Inhibit the Growth of Prostate Cancer Cells by Multiple Mechanisms”, Biochem. Biophys. Res. Commun, 321(1),161-7.

Yin, Z., Ivanov, V.N., Habelhah, H., Tew, K., Ronai, Z. 2000. “Glutathione S-Transferase p Elicits Protection Against H2O2-Induced Cell Death via Coordinated Regulation of Stress Kinases”, Cancer Res, 60,4053–4057.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E. 2001. “Role of AMP-Activated Protein Kinase in Mechanism of Metformin Action”, J. Clin. Invest, 108(8),1167-74.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ORHAN ADALI
Proje No:	115Z695
Proje Başlığı:	Cisplatin-Metformin İlaç Kombinasyonu Uygulamasının Prostat Hücre Hatlarının Proliferasyonu ve Apoptoz Mekanizmalarında Önemli Rol Oynayan Gst ile Cyp17a1 ve Hekzokinaz Enzimleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	ŞEVKİ ARSLAN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN EDEBİYAT F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/08/2015 - 01/08/2016
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29924.37
Öz:	Prostat kanseri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen kanser türlerinden biri olup günümüzde prostat kanseri tedavisindeki yaklaşımlar metastaz gelişimine, ilaç direnci oluşmasına ve sağlıklı dokularda toksik etkilere sebep olabilmektedir. Bu nedenle tedavide daha etkili ancak daha az yan etkiye sahip kanser önleyici molekülleri tespit etmek kanser araştırmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Cisplatin prostat kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan antineoplastik bir ajandır. Ancak, cisplatinin yüksek etki derecesine karşın yan etkileri ilacın kullanımını kısıtlamaktadır. Bu yan etkilerini azaltmak amacıyla başka ajanlar ile kombine terapiler son yıllarda bilim insanlarının ilgi odağı olmuştur. Antidiyabetik ilaç metforminin anti-proliferatif etkisi göz önünde bulundurulduğunda, antineoplastik ajan cisplatin ile tamamlayıcı bir tedavi sunabileceği açıktır. Tasarlanan çalışmada bu iki ilacın kombine kullanımının hücrede apoptoz ve detoksifikasyon enzimleri olarak bilinen Glutatyon-S Transferaz (GST) izozimleri üzerine etkilerine bakılmıştır. Prostat kanseri tedavisinde birincil amaç hormon (androjen) üretimini durdurmaktır. Bu yüzden cisplatin-metformin kombine kullanımının androjen sentezinde anahtar fonksiyonu olan CYP17A1 enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bilindiği üzere, kanser hücrelerinin hızlı büyüyüp bölünmesinde glikoliz metabolizmasında rol oynayan Hekzokinaz II regülatör bir enzimidir. Bu durum göz önüne alındığında, yapılan çalışmada ilaç kombinasyonunun Hekzokinaz II enzimi üzerine etkileri de incelenmiştir. Yapılan çalışmada androjen reseptörüne bağımlı LNCaP ve androjen reseptöründen bağımsız PC3 insan prostat kanseri hücre hatları ve burada verilen ilaçların sağlıklı dokular üzerine etkilerini saptamak amacıyla normal prostat hücre hattı olan PNT1A kullanılmıştır. İlaçların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri alamar blue analizi ile ölçülmüş olup, ilaç kombinasyonunun belirlenen enzimlerin protein ve mRNA ekspresyonlarına olan etkisi sırasıyla Western-blot ve qRT-PCR teknikleriyle tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, ilaç kombinasyonunun hücre proliferasyonunu durdurucu özelliği olduğu her iki hücre hattında da ortaya konulmuştur. Ancak bu antiproliferatif etki GSTP1 enzimleri ile ilişkilendirilememişdir. Androjen sentezinde rol oynayan CYP17A1 enzim expresyonunun PC3 hücre hattında anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Hexokinase II gen expresyonu her iki hücre hattında da azalmıştır. Sonuç olarak hücre proliferasyonunun azalması, HKII geninin ekspresyonundaki düşüş ile ilişkilendirilebilir.
Anahtar Kelimeler:	Metformin, cisplatin, apoptoz, GST, sitokrom P450, CYP17A1, Hekzokinaz II, prostat kanseri
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK