

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAŞ VE BOYUN KANSER HÜCRELERİNİN
HİPOKSİK MİKROÇEVRESİNDE HIF-1 α İLE
İLİŞKİLİ MİTOKONDRIYAL GLUKOZ
METABOLİZMASININ ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

ŞENİZ İNANÇ SÜRER

**BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970005

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAŞ VE BOYUN KANSER HÜCRELERİNİN
HİPOKSİK MİKROÇEVRESİNDE HIF-1 α İLE
İLİŞKİLİ MİTOKONDRIYAL GLUKOZ
METABOLİZMASININ ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

**BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ**

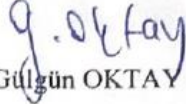
ŞENİZ İNANÇ SÜRER

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Gülgün OKTAY

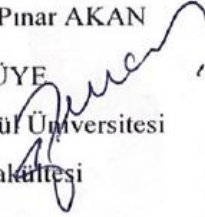
Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2017.KB.SAĞ.001 numarası ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970005

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya
Doktora programı öğrencisi Şeniz İNANÇ SÜRER 'BAŞ ve BOYUN KANSER
HÜCRELERİNİN HİPOKSİK MİKROÇEVRESİNDE HIF-1 α İLE İLİŞKİLİ
MİTOKONDRIYAL GLUKOZ METABOLİZMASININ ROLÜNÜN İNCELENMESİ'
konulu Doktora tezini 27/06/2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

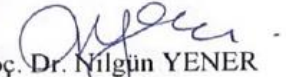

Prof. Dr. Gülgün OKTAY

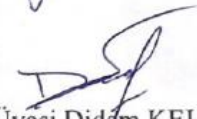
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Pınar AKAN
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Görkem ESKÜZMİR
ÜYE

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Nilgün YENER
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Didem KELEŞ BARTIK
ÜYE

İzmir Ekonomi Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

Prof. Dr. Yasemin AKÇAY
YEDEK ÜYE
Ege Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN
YEDEK ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	5
1.2. Araştırmanın Amacı.....	7
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	7
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom ve Tedavi Yaklaşımları	8
2.2. Tümör Mikroçevresi ve Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1	10
2.3. Metabolik İlaçlar	12
2.3.1. Metformin	12
2.3.2. Dikloroasetat	13
2.3.3. Metformin ve Dikloroasetat Kombinasyonunun Kanserdeki Rolü	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1. Araştırmanın Tipi.....	18
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	18
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	18

3.4.	Çalışma Materyali.....	18
3.5.	Araştırmanın Değişkenleri	18
3.6.	Veri toplama araçları	18
3.6.1.	Hücre Kültürü.....	22
3.6.2.	Gerçek Zamanlı Hücre Canlılığı Testi.....	22
3.6.3.	WST-1 Hücre Canlılık Testi.....	24
3.6.4.	İlaç Kombinasyon Testi.....	24
3.6.5.	Koloni Oluşum Testi.....	25
3.6.6.	Mitokondri İzolasyonu	25
3.6.7.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	26
3.6.8.	Western Blot.....	31
3.6.9.	Metabolik Akış Analizleri.....	32
3.7.	Araştırma Planı ve Takvimi	33
3.8.	Verilerin değerlendirilmesi	35
3.9.	Araştırmanın sınırlılıkları	35
3.10.	Etik Kurul Onayı	35
4.	BULGULAR	36
4.1.	Metformin ve Dikloroasetatın Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	36
4.2.	Metformin ve Dikloroasetat Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri...	40
4.3.	Metformin ve DCA'nın hedef gen ekspresyonları üzerindeki etkileri	42
4.3.1.	HIF-1α Gen Ekspresyonu	44
4.3.2.	Piruvat Dehidrogenaz Kinaz-1 Gen Ekspresyonu.....	47
4.4.	Metformin ve DCA'nın HIF-1 α ve PDK-1 protein ekspresyonları üzerindeki etkileri..	51
4.4.1.	HIF-1α Protein Ekspresyonu.....	51

4.4.2. <i>PDK-1 Protein Ekspresyonu</i>	54
4.4. Metformin ve DCA'nın Metabolik Akış Üzerindeki Etkileri.....	59
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	66
7. KAYNAKLAR.....	67
8. EKLER.....	75



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Projede kullanılan kimyasalların marka ve kod numaraları	18
Tablo 2. Projede kullanılan cihazları marka ve kod numaraları	20
Tablo 3. % 1,2'lik Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler	28
Tablo 4. Master mix hazırlanışı	29
Tablo 5. SimpliAmp Thermal Cycler cihazında uygulanan ısı profili.....	29
Tablo 6. Roche Light Cycler 480 cihazında uygulanan ısı profili	30
Tablo 7. SDS-PAGE poliakrilamid jellerin hazırlanması.....	31
Tablo 8. UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin ve DCA kombinasyonuna ait İnhibitor Etki (Fa), Kombinasyon İndeksi (CI) ve Doz Azalım İndeksi (DRI) değerleri	41
Tablo 9. Projede kullanılan primerlerin sekans ve amplikon boyutları	42
Tablo 10. Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1 α ortalama kat değişim değerleri	46
Tablo 11. Normoksik ve hipoksik koşullarda PDK-1 ortalama kat değişim değerleri.....	49
Tablo 12. Piruvat dehidrogenaz kinaz overekspresyonu ile hasta mortalitesi arasındaki ilişki....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hipoksi indüklenabilir faktör 1- α 'nın oral skuamöz hücreli karsinomdaki rolü. Hipoksi altında, sitokinler ve büyüme faktörleri, aktive c-JUN NH ₂ -terminal protein kinazı (JNK) ve p38 proteinleri, HIF-1 α birikimini uyarır bunun sonucunda vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), BCL2 ile ilişkili X proteini (BAX), GLUT-1 ve PDK-1 de dahil olmak üzere 60'tan fazla genin aktivasyonuna yol açar.	6
Şekil 2. Oral kavite anatomisi [11].....	9
Şekil 3. Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1 α molekülü.....	11
Şekil 4. HIF-1 α protein ekspresyonunun Metformin ile inhibisyonu	12
Şekil 5. Piruvat dehidrogenaz kinaz izoformları ve yer aldıkları süreçler	15
Şekil 6. Dikloroasetat mekanizmasının OSCC'deki rolü	15
Şekil 7. xCELLigence SP hücresel empedans cihazının genel bakışı. A) Hücre proliferasyonunun gerçek zamanlı olarak ölçülmesi, B) Mikroelektrotlar üzerinde hücre yayılması ile değişen akımın ölçülmesi ve zamana bağlı olarak grafiklenmesi	23
Şekil 8. UPCI-SCC-131 hücrelerinin normoksik koşullarda farklı konsantrasyonlardaki Metformin'e karşı gösterdiği hücre indeks grafiği. Hücreler 72 saat boyunca MEM (kırmızı), 1mM (açık yeşil), 2mM (mavi), 4mM (pembe), 8mM (açık mavi), 32mM (yeşil), 64mM (mor) ve 128mM (kahverengi) Metformin ile muamele edildi.	37
Şekil 9. UPCI-SCC-131 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda Metformin ile 72 saat muamele edilmesinin % hücre canlılığı üzerine etkisi (n=4). Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi.	37
Şekil 10. UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin uygulaması sonrası oluşan A) koloni görüntüleri ve B) sağkalım grafiği.....	38
Şekil 11. UPCI-SCC-131 hücrelerinin normoksik koşullarda farklı konsantrasyonlardaki DCA'ya karşı gösterdiği hücre indeks grafiği. Hücreler 72 saat boyunca MEM (kırmızı), 5mM (açık yeşil), 10mM (mavi), 20mM (pembe), 40mM (açık mavi), 80mM (mor), 120mM (kahverengi) ve 160mM (yeşil) DCA ile muamele edildi.	39
Şekil 12. UPCI-SCC-131 hücrelerinde farklı konsantrasyonlardaki DCA'nın % hücre canlılığı üzerine etkisi (n=4). Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi.	39

Şekil 13. UPCI-SCC-131 hücrelerinde DCA uygulaması sonrası oluşan A) koloni görüntüleri ve B) sağkalım grafiği	40
Şekil 14. UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin ve DCA kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi. A) Kombinasyon indeks grafiği (Fa-CI plot) B) Logaritmik kombinasyon indeks grafiği [Log(CI)-Fa] C) Doz azalım indeks grafiği (Fa-DRI plot), D) Logaritmik doz azalım indeks grafiği [Log(DRI)-Fa]. Met; Metformin.....	41
Şekil 15. A) RNA örneklerin formaldehit agaroz jel görüntüleri. N: Normoksi, H: Hipoksi B) Optimizasyon için kullanılan örneklerin agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 16. A) HIF-1 α B) PDK-1 C) β -aktin'e ait erime eğrileri (melting curve)	44
Şekil 18. Normoksik koşullarda HIF-1 α amplifikasyon eğrileri (n=3).....	45
Şekil 19. Hipoksik koşullarda HIF-1 α amplifikasyon eğrileri (n=3).	45
Şekil 20. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda 40mM ve 50mM DCA'nın HIF-1 α mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata) ...	46
Şekil 21. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda 2mM ve 3mM Metformin'in HIF-1 α mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata) ...	47
Şekil 22. Normoksik koşullarda PDK-1 amplifikasyon eğrileri (n=3).	48
Şekil 23. Hipoksik koşullarda PDK-1 amplifikasyon eğrileri (n=3).....	48
Şekil 24. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda 40mM ve 50mM DCA'nın PDK-1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)....	49
Şekil 25. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda 2mM ve 3mM Metformin'in PDK-1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)....	50
Şekil 26. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde 2mM ve 3mM Metformin'in hipoksik koşullarda HIF-1 α protein ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).	52
Şekil 27. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde 40mM ve 50mM DCA'nın hipoksik koşullarda HIF-1 α protein ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).	53
Şekil 28. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde Metformin ve DCA kombinasyon dozlarının hipoksik koşullarda HIF-1 α protein ekspresyon düzeylerine etkisi.	54
Şekil 29. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde 40mM ve 50mM DCA'nın normoksik ve hipoksik koşullarda PDK-1 protein ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)....	56

Şekil 30. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde 2mM ve 3mM Metformin'in normoksik ve hipoksik koşullarda PDK-1 protein ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).	57
Şekil 31. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde Metformin ve DCA kombinasyon dozlarının hipoksik koşullarda PDK-1 protein ekspresyon düzeylerine etkisi.	58
Şekil 32. UPCI-SCC-131 hücrelerinde 1mM Metformin'in A) hücrel enerji fenotipi, B) OCR ve ECAR üzerindeki etkileri (n=3).....	59
Şekil 33. UPCI-SCC-131 hücrelerinde 10mM DCA'nın A) hücrel enerji fenotipi, B) OCR ve ECAR üzerindeki etkileri (n=3).	60

KISALTMALAR

OSCC: Oral skuamöz hücreli karsinom

ATP: Adenozin trifosfat

HIF-1 α : Hipoksi indüklenabilir faktör 1- α

JNK: Aktive c-JUN NH₂-terminal protein kinaz

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

BAX: BCL2 ile ilişkili X proteini

DCA: Dikloroasetat

PK: Piruvat dehidrogenaz kinaz-1

IC₅₀: %50 inhibe eden konsantrasyon

HNSCC: Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom

HPV: Human papilloma virüs

PHD: Prolil hidroksilaz

VHL: von Hippel-Lindau

Metformin: 1,1-dimetilbiguanidin hidroklorür

LKB-1: Karaciğer kinaz B-1

AMPK: AMP-aktive protein kinaz

PDH: Piruvat dehidrogenaz

5-FU: 5-fluoro urasil

TCA: Trikarboksilik asit

LDH: Laktat dehidrogenaz

ROS: Reaktif oksijen türleri

GBM: Glioblastoma multiforme

siRNA: small interfering RNA

FBS: Fötal dana serumu

PBS: Fosfat tampon tuzu

NEA: Non-esansiyel aminoasit

DMSO: Dimetilsülfoksit

RTCA: Gerçek zamanlı hücre analizörü

WST-1: 4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat

CI: Kombinasyon indeksi
Fa: İnhibitör etki
DRI: Doz azalım indeksi
CFE: Koloni oluşum verimi
SF: Sağkalım fraksiyonu
BCA: Biçinkoninik asit
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA: Ribonükleik asit
mRNA: Mesajcı RNA
cDNA: Komplementer DNA
Ct: Threshold cycle
SDS: Sodyum dodesil sülfat
PAGE: Poliakrilamid jel elektroforezi
APS: Amonyumpersülfat
TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletildiamid
PVDF: Poliviniliden florür
TBS-T: Tris tampon tuzu - Tween
HRP: Yabanturba Peroksidazı
OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon
OCR: Oksijen tüketim hızı
ECAR: Ekstrasellüler asidifikasyon hızı
GLUT: Glukoz taşıyıcısı

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılması aşamalarında beni daima destekleyen, deneyim ve bilgisinden yararlanmaktan mutluluk duyduğum, eğitimimin her döneminde benden ilgi, sevgi ve yardımlarını esirgemeyen ve anne şefkatiyle yaklaşan değerli danışmanım Prof. Dr. Gülgün OKTAY'a,

Bilimsel ve akademik hayatla ilgili bilgi ve görüşlerini, desteğini ve deneyimlerini her daim hissettiğim, beraber çalışmaktan gurur duyduğum ikinci değerli danışmanım Prof. Dr. Yasemin BAŞBINAR'a,

Tez gelişimine olan bilimsel katkılarından dolayı doktora tez izleme komitesi üyeleri Sayın Hocalarım Prof. Dr. Kemal BAYSAL ve Prof. Dr. Pınar AKAN'a,

Beraber bir çok bilimsel çalışmada yer aldığım, bana hep yol gösteren ve çözüm üreten, doktora tez izleme jürisi olma nezakini gösteren değerli Doç. Dr. Görkem ESKİİZMİR'e,

Laboratuvar çalışmalarına kazandırdığı büyük katkılarından dolayı, değerli bilgi ve deneyimleriyle bana her konuda yol gösteren sevgili arkadaşlarım Doktor Öğretim Üyesi Didem KELEŞ BARTIK ve Murat SİPAHİ'ye,

Bu zor yolda her zaman bana destek olan ve dostluğunu esirgemeyen sevgili arkadaşlarım, başta Araştırma Görevlisi Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL, Feriha TOKSÖZ ve Belgin SERT SERDAR olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Tez ve diğer tüm evraklarımın takibinde büyük duyarlılık gösteren, güleryüzlü anabilim dalı sekreterimiz sevgili Eda Nesrin OLUM ve her türlü laboratuvar imkanı sağlayan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na,

Laboratuvardaki her türlü sorunlarımızla ilgilenen sevgili Emin ÇAVUŞLU'ya,

Bu zor yolda bana her zaman destek olan, motivasyonumu artıran ve hayatımda olmasından mutluluk duyduğum değerli eşim Emin Cem SÜRER'e,

Beni hayatım boyunca yalnız bırakmayan ve hayatımın her döneminde destekleyen canım annem Şennur İNANÇ, babam Tekin İNANÇ ve kardeşim Hakan İNANÇ başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim



BAŞ ve BOYUN KANSER HÜCRELERİNİN HİPOKSİK MİKROÇEVRESİNDE HIF-1 α ile İLİŞKİLİ MİTOKONDRIYAL GLUKOZ METABOLİZMASININ ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Şeniz İnanç Sürer

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı

35340 İnciraltı /İzmir

ÖZET

Giriş: Son derece agresif bir malign tümör olan oral skuamöz hücreli karsinom, baş ve boyun kanserlerinin bir alt türüdür ve dünya çapında 6.sırada yer almaktadır. Oral kanserlerin tedavisinde kullanılan temel tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve/veya kemoterapidir. İlaçların yeniden konumlandırılması FDA-onaylı mevcut ilaçların, başta kanser olmak üzere farklı hastalıkların tedavisindeki potansiyel etkilerini belirlemek amacıyla kullanılan bir ilaç tasarım yöntemidir. Bu kapsamda Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan Metformin ve laktik asidoz tedavisinde kullanılan Dikloroasetat, FDA onaylı metabolik ajanlardır ve tümör metabolizması üzerindeki etkileri nedeniyle kanser tedavisinde kullanılabilecek potansiyele sahiplerdir.

Amaç: Bu çalışmanın amacı; oral skuamöz hücreli karsinom hücre hattında (UPCI-SCC-131) Metformin ve Dikloroasetat'ın hücre canlılığı, HIF-1 α and PDK-1 ekspresyonları ve mitokondiyal metabolizma üzerindeki etkilerinin incelenmesidir.

Yöntem: İlk olarak, UPCI-SCC-131 hücreleri normoksik (%20 O₂, 37°) ve hipoksik koşullar (%1 O₂, 37°) altında 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Metformin ve Dikloroasetat ile muamele edildi ve IC₅₀ değerleri belirlendi. Metformin ve DCA kombinasyonlarının sinerji gösterip göstermediği CompuSyn software ile incelendi. Belirlenen ilaç dozları 48 saat boyunca hücrelere uygulandıktan sonra HIF-1 α ve PDK-1 mRNA ekspresyon düzeyleri Real-Time PCR; protein ekspresyon düzeyleri ise Western Blot yöntemi ile incelendi. Bunun yanı sıra ilaçların metabolizma üzerindeki etkileri Seahorse XF Analyzer ile değerlendirildi.

Bulgular: Metformin ve Dikloroasetatın normoksik koşullardaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 4mM ve 30mM iken; hipoksik koşullarda 14mM ve 40mM bulundu. Tüm kombinasyon gruplarındaki CI değerlerinin (0,46-0,80) 1'in altında olması, UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin ve DCA'nın hücre canlılığı üzerinde sinerjistik bir etkiye sahip olduğunu gösterdi. Metformin uygulaması sonucunda UPCI-SCC-131 hücrelerinde HIF-1 α ve PDK-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin değişmediği, protein ekspresyon düzeylerinin ise anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Dikloroasetat uygulanan hücrelerde ise PDK-1 mRNA ve protein ekspresyonlarının anlamlı olarak azaldığı, HIF-1 α protein ekspresyon düzeylerinin ise doza bağlı olarak azaldığı belirlendi. Ek olarak, metabolik akış deneyleri uygulandığında ise UPCI-SCC-131 hücrelerinin hücresel fenotipinin Metformin kullanımı ile glikolitik yöne kaydığı, Dikloroasetat kullanımı ile enerjistik yöne kaydığı gösterildi.

Sonuç: Sonuç olarak elde ettiğimiz verilerin gelecekte oral skuamöz hücreli karsinom metabolizmasını hedef alan ve anti-tümörijenik özelliklere sahip yeni terapötik kombinasyonların geliştirilmesine katkıda bulunacağını öngörmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Oral kavite kanser hücre hattı, Metformin, Dikloroasetat, HIF-1 alfa

INVESTIGATION OF THE ROLE OF MITOCHONDRIAL GLUCOSE METABOLISM RELATED WITH HIF-1 α IN THE HYPOXIC MICROENVIRONMENT OF HEAD AND NECK CANCER CELLS

ABSTRACT

Introduction: Oral squamous cell carcinoma, highly aggressive malignant tumor, is sixth cancer worldwide and a subtype of head and neck cancers. The basic treatment methods of oral cavity cancer are surgery, radiotherapy and/or chemotherapy. Drug repositioning is a drug designing method in which available FDA-approved drugs are determined for their potent effects in different diseases especially cancer. In this context, Metformin, used in type 2 diabetes, and Dichloroacetate (DCA), used in lactic acidosis, are FDA approved drugs and have potential in cancer therapy for the effects on tumor metabolism.

Objective: The aim of this study is to investigate the effects of Metformin and Dichloroacetate on cell viability, HIF-1 α and PDK-1 expressions, and mitochondrial metabolism in the oral squamous cell carcinoma cell line (UPCI-SCC-131).

Method: At first, UPCI-SCC-131 cells were treated with Metformin and Dichloroacetate at different concentrations for 72 hours under normoxic (20% O₂, 37°C) and hypoxic conditions (1% O₂, 37°C) and IC₅₀ values were determined. The synergism of Metformin and DCA were analyzed with CompuSyn software. Gene and protein expression levels of HIF-1 α and PDK-1 were examined by Real-Time PCR and Western Blot, respectively. In addition, the effects of drugs on metabolism were evaluated by Seahorse XF Analyzer.

Results: The IC₅₀ values of Metformin and Dichloroacetate under normoxic conditions were 4mM and 30mM; under hypoxic conditions were 14mM and 40mM, respectively. Combination index values in all combination groups (0.46-0.80) below 1 showed that Metformin and DCA in UPCI-SCC-131 cells had a synergistic effect on cell viability. After Metformin treatment, HIF-1 α and PDK-1 mRNA expression levels did not change and protein expression levels decreased significantly in UPCI-SCC-131 cells. PDK-1 mRNA and protein expressions were significantly decreased in Dichloroacetate-treated cells. In addition, metabolic flow experiments showed that

Metformin shifted cellular phenotype into glycolytic pathway and Dichloroacetate into the energetic pathway.

Conclusion: We conclude that the data we have obtained will contribute to the development of new therapeutic combinations with anti-tumorigenic properties which targeted the oral squamous cell carcinoma metabolism in the future.

Key Words: Oral cavity cancer cell line, Metformin, Dichloroacetate, HIF-1 alpha

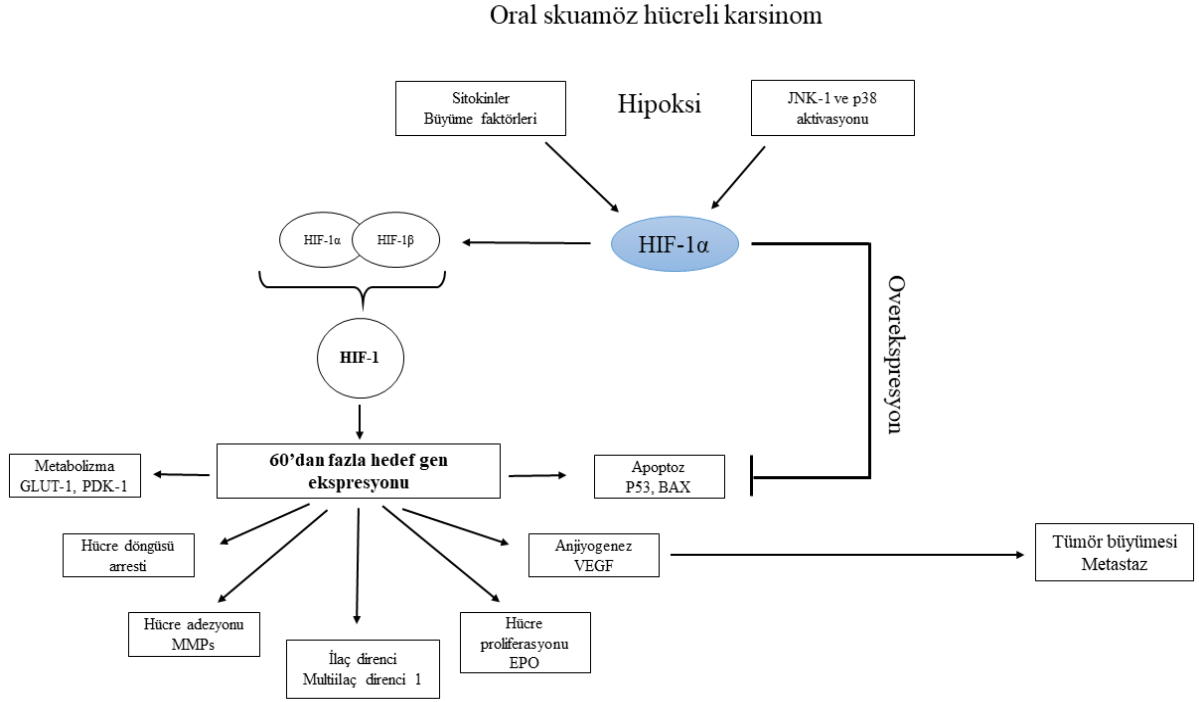


1. GİRİŞ ve AMAC

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Oral kanserler, ağız yapısını veya dokusunu etkileyen malign neoplazmalardır ve %90'dan fazlası ağız ve orofarinks mukozalarında ortaya çıkan skuamöz hücreli karsinomlardır [1]. Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) agresif bir tümör olup kanser tanı ve tedavisinde kaydedilen ilerlemelere rağmen 5 yıllık sağkalım oranı oldukça düşüktür. Solid ve malign olan bu tümörlerde hipoksik doku alanları oldukça yaygındır ve bu durum da lokal ve sistemik kanser progresyonuna ve kemo/radyoterapiye direnç oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Aerobik koşullar altında sağlıklı hücreler enerjiyi mitokondride glukozdan adenosin trifosfat (ATP) olarak üretirken; anaerobik koşullar altında laktik asit üreten glikoliz yoluyla elde eder [2]. Kanser hücreleri oksijen varlığında “*Warburg etkisi*” denilen aerobik glikoliz yoluyla enerji üretebilirler [3]. Oral skuamöz hücreli karsinom gibi çoğu kanser hücresi, normal hücrelere kıyasla enerji metabolizmalarını yeniden programlayarak spesifik enerji ihtiyaçlarını karşılarlar. Hücresel enerji açısından önemli olan faktörlerden biri de, hipoksik koşullar altında eksprese olan “Hipoksi indüklenebilir faktör-1 alfa” (HIF-1 α) molekülüdür [4]. HIF-1 α ekspresyonu OSCC progresyonu, anjiyogenez, lenfanjiyogenez, radyo/kemoterapiye direnç ve zayıf prognoz ile ilişkilidir [5] (Şekil 1).



Şekil 1. Hipoksi indüklenebilir faktör 1- α 'nın oral skuamöz hücreli karsinomdaki rolü. Hipoksi altında, sitokinler ve büyüme faktörleri, aktive c-JUN NH₂-terminal protein kinazı (JNK) ve p38 proteinleri, HIF-1 α birikimini uyarır bunun sonucunda vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), BCL2 ile ilişkili X proteini (BAX), GLUT-1 ve PDK-1 de dahil olmak üzere 60'tan fazla genin aktivasyonuna yol açar.

Metformin en çok reçete edilen oral anti-diyabetik ilaçlardan biri olup Tip 2 diabetes mellitus için ilk basamak tedavidir [6]. Metformin, glikoneogenezin inhibisyonuna, ince bağırsaktan glukoz emiliminin azaltılmasına, hücrelerde glikoz alımının artırılmasına ve plazmadaki serbest yağ asidi konsantrasyonunun azaltılmasına aracılık eden anti-hiperglisemik bir etkiye sahiptir [7]. Çok sayıda retrospektif çalışma, metforminin kanser gelişim riski ve kansere bağlı ölümlerde azalma ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle Warburg etkisi gösteren tümör hücrelerinde metforminin bu etkiyi azalttığı ve sonuç olarak kanser kök hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [8].

Günümüzde laktik asidoz tedavisinde kullanılan Dikloroasetat (DCA), piruvat dehidrogenazı (PDH) fosforilleyerek inaktif hale getiren piruvat dehidrogenaz kinazı (PDK) inhibe eder ve hücre

metabolizmasını glikolizden mitokondriyal glukoz oksidasyonuna çevirir. Glukoz metabolizması, OSCC'nin ilerlemesinde çok önemli bir faktör olup glikolitik fenotip OSCC hastalarında prognoz ve genel sağkalım açısından önemli bir belirteçtir [9]. Dolayısıyla kanser hücrelerinde yaygın olan Warburg etkisinin DCA ile farmakolojik inhibisyonu sonucu hipoksinin tetiklediği PDK-1 ekspresyonunun azalması, OSCC tedavisi için geliştirilecek olan yeni stratejiler açısından oldukça önemli bir hedefdir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu projenin amaçları: oral skumöz hücreli karsinom hücre hattında (UPCI-SCC-131) Metformin ve Dikloroasetatin (DCA) hipoksik ve normoksik koşullarda hücre canlılığını, HIF-1 α ve PDK-1 gen/protein ekspresyonlarını ve mitokondriyal enerji metabolizması üzerindeki fonksiyonel etkilerini incelemek; böylelikle oral kavite kanseri tedavisinde bu ilaçları yeniden konumlandırarak OSCC tedavisine katkı sağlamaktır. Bu amaca ulaşmak için belirlenen hedefler aşağıda maddeler halinde sunulmuştur:

1. Metformin ve DCA'nın hipoksik ve normoksik koşullardaki UPCI-SCC-131 hücrelerinde hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyonlarının (IC_{50}) ve sinerjistik etki gösteren kombinasyon dozlarının belirlenmesi.
2. Metformin ve DCA'nın ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanması sonucunda hipoksik ve normoksik koşullardaki HIF-1 α ve PDK-1 gen ve protein ekspresyonlarının RT-PCR ve Western Blot yöntemleri ile incelenmesi
3. Metformin ve DCA'nın uygulanması sonucunda normoksik koşullardaki UPCI-SCC-131 hücrelerinde aşağıda belirtilen mitokondriyal enerji metabolizmasındaki değişimlere bağlı etki mekanizmalarının belirlenmesi (Glikolitik hız ve mitokondriyal respirasyon)

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Projenin hipotezi; "Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde Metformin ve DCA ayrı ayrı ve kombine olarak, Piruvat Dehidrogenaz Kinaz-1 ve HIF-1 α gen/protein ekspresyonlarını azaltarak hücre metabolizmasını yeniden programlamaktadır" olarak kurulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom ve Tedavi Yaklaşımları

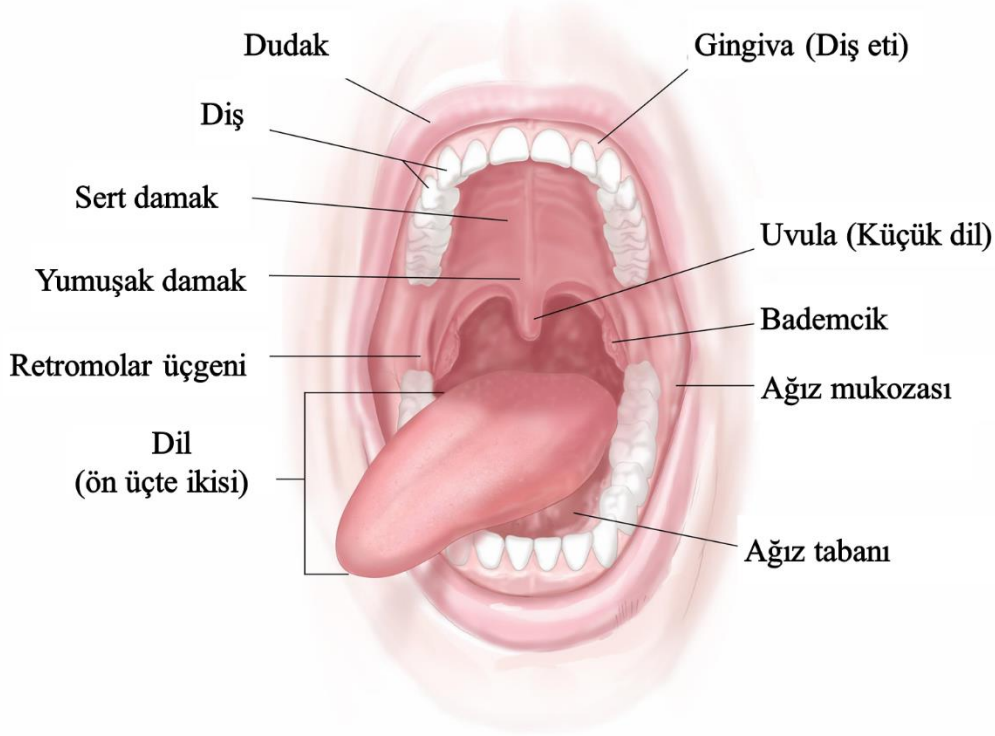
Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC) yılda yaklaşık 500.000 yeni vakanın bildirildiği, dünyada en sık görülen 6. kanser türü olup baş ve boyun kanserlerinin %90'ından fazlasını oluşturur. Oral kavite, farinks, larinks, sinonazal alt birimlerini kapsayan üst sindirim sisteminin mukozal yüzeylerinden meydana gelmektedir. Tütün ve benzeri ürünler, alkol kullanımı onkojenik virüslere (Human Papilloma Virüs, HPV) maruz kalma, beslenme yetersizliği ve genetik yatkınlık HNSCC gelişim riskini arttırmaktadır [10].

Çoğu oral kavite ve dudak kanseri skuamöz hücrelerde başlar ve skuamöz hücreli (yassı hücreli) karsinom olarak adlandırılırlar. Kanser büyüdükçe, kanser hücreleri daha derin dokulara yayılabilir. Skuamöz hücreli karsinom genellikle lökoplazi bölgelerinde gelişir.

Oral kavite aşağıdaki bölgeleri içerir (Şekil 2):

- Dudaklar,
- Sert damak (ağzın çatısının kemikli ön kısmı),
- Yumuşak damak (ağzın çatısının kaslı arka kısmı),
- Retromolar trigon (bilgelik dişlerinin arkasındaki alan),
- Dilin ön üçte ikisi, gingiva (diş eti),
- Bukkal mukoza (dudakların ve yanakların iç astarı),
- Dilin altındaki ağız tabanı.

Oral kavite anatomisi



Şekil 2. Oral kavite anatomisi [11]

Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC), baş ve boyun kanser türleri içerisinde predominant bir kanser türüdür ve genellikle hastalara ileri evrede teşhis konması nedeniyle morbidite ve mortalite oranı yüksektir (Kamangar vd., 2006; Marur vd., 2008). Sağkalım oranı, karsinom evresi ilerledikçe azalmaktadır ve metastaz olmayan OSCC'ler için 5 yıllık sağkalım oranı % 80 iken, bölgesel ve yayılmış OSCC'lerde sırasıyla % 59 ve % 36'ya düşmektedir [12]. Günümüzde oral kanserlerin tedavisinde TNM evrelemesi (T, tümör penetrasyonunun derinliği; N, lenf nodunun varlığı veya yokluğu; M, uzak metastazın varlığını veya yokluğu) ve primer bölgeye bağlı olarak çeşitli kombinasyonlarda cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır [13], [14]. Sınırlı veya erken evre (evre I ve II) hastalarının yaklaşık %40'ında genellikle tek başına cerrahi veya radyoterapi uygulanır. Lokal olarak ilerlemiş hastalığı olan (evre III ve IVA/B), rezekte edilebilen veya edilemeyen hastaların çoğunda tedavi platin bazlı (sisplatin gibi) kemoradyoterapi gerektirir. Metastatik tedavi iyi performans sergileyen hastalar için kombinasyon

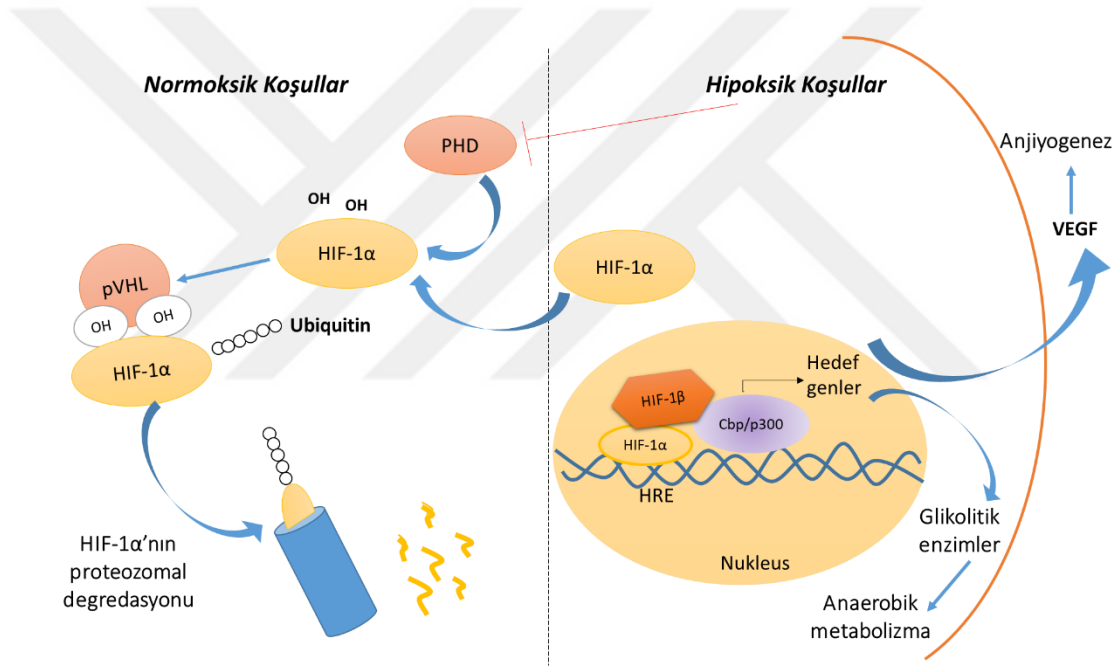
kemoterapi, düşük performans gösteren hastalar için ise tek ajanlı kemoterapi veya destekleyici bakım ile sağlanır. Lokal veya bölgesel nüksün tedavisi nüks bölgesine, tümör yüküne ve önceki tedaviye bağlıdır [13], [14]. Bu yöntemlerin avantajları olduğu kadar dezavantajları da bulunmaktadır. Kemoterapötik ajanların spesifik olmayan dağılımları normal dokularda istenmeyen yan etkilere neden olmakta ve tedavi açısından yetersiz kalmaktadır. Bu durumda tümör mikroçevresinde oluşan hipoksik ortam tedaviye olan direnci artırmaktadır.

2.2. Tümör Mikroçevresi ve Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1

Oral skuamöz hücreli karsinom genetik olarak heterojen olmasına rağmen bu kanser türünde tümör mikroçevresinde meydana gelen anormallikler yaygın olarak tespit edilmiştir. Tümör mikroçevresi, proliferatif sinyalizasyona sahip, tümör supresörlerden kaçan, hücre ölümüne direnç gösteren, replikatif ölümsüzlüğü olan, invazyon ve metastazın aktive olduğu, enerji metabolizmasının yeniden programlandığı, ilaç direncinin induklendiği ve anjiyogenezin tetiklendiği potansiyel bir tümör destekleyicisidir [15], [16]. Tümör mikroçevresi vasküler anormallikler, oksijenlenme, perfüzyon, pH ve metabolik durumları içeren çeşitli terapötik stratejilerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır [17], [18]. Birçok kanser çeşidinde oksijen konsantrasyonu, anormal kan damarları ve zayıf kan akışına bağlı olarak normal dokuya kıyasla belirgin olarak azalma gösterir [19]. Hipoksinin tetiklediği bu durum kanser hücrelerinin hayatta kalmalarına ve hipoksik çevrede bile proliferolmalarına izin veren genetik ve adaptif değişimler geçirmesine neden olur. Bu prosesler malign fenotip ve agresif tümör davranışlarına katkıda bulunur [20], [21]. İntratümöral hipoksi OSCC'nin önemli bir özelliği olup kemoterapi ve radyoterapi direncini artırmaktadır. Günümüzde kanserin yönetiminde olası ilaç direncini önlemek için kombine ilaç tedavileri kullanılmaktadır. Bu doğrultuda OSCC gibi hipoksinin etkin olduğu tümörlerde hipoksiyi hedef alan spesifik/non-spesifik inhibitörlerin kanser tedavisinde kullanılan terapötik ilaçlarla kombine olarak kullanımına yönelik araştırmalar üzerine odaklanılmaktadır.

Hipoksi induklenebilir faktör-1 (HIF-1), hem oksijen iletimini (anjiyogenez) hem de oksijen tüketimini (glikolitik metabolizma) regüle ederek hipoksik yanıtı oluşturur [21]-[23]. Bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1, heterodimerize olan HIF-1 α ve HIF-1 β alt birimlerinden oluşmaktadır. Oksijenlenmenin olduğu normoksik koşullarda HIF-1 α , prolin hidroksilaz (PHD) enzimi tarafından spesifik prolin rezidülerinden (Pro-402 ve Pro-564) hidroksillenir [25]. Bu

hidroksillenme, bir tümör supresörü olan von Hippel-Lindau (VHL) proteinin HIF-1 α ile bağlanması için bir tanıma bölgesi oluşturur. VHL, HIF-1 α 'yı hedef alan ubiquitin ligaz aktivasyonunu artırarak HIF-1 α 'nın proteozomal degradasyonuna neden olur [26]. HIF-1 α 'nın PHD tarafından hidroksillenmesi için oksijen, 2-oksoglutarat ve demir gereklidir. Oksijen ya da demir eksikliğinde PHD aktivitesi inhibe olur ve HIF-1 α stabil hale gelir. Stabil olan HIF-1 α nükleusa transloke olarak HIF-1 β ile heterodimer bir yapı oluşturur ve hipoksi yanıt elementlerine bağlanarak fizyolojik ve patolojik proseslerde yer alan alt akım genlerin ekspresyonunu aktive eder [27] (Şekil 3).



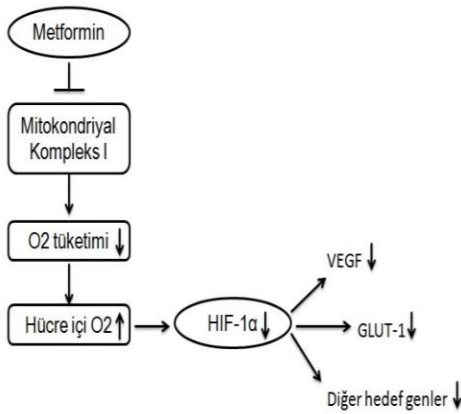
Şekil 3. Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1 α molekülü.

Hipoksidede artan HIF-1 aktivitesi genetik instabilite [28], anjiyogenez [29], metabolizma [30], pH regülasyonu [31], invazyon, metastaz, epitelyal-mezenşimal dönüşüm [32] ve radyasyon direncinde [33] yer alan çeşitli gen transkripsiyonlarındaki artış ile ilişkilidir. Ayrıca yapılan son araştırmalarda HIF-1 α ekspresyonu ve kemoterapi direnci arasında güçlü bir bağlantı olduğu ileri sürülmüştür [34]–[37].

2.3. Metabolik İlaçlar

2.3.1. Metformin

Metformin (1,1-dimetilbiguanidin hidroklorür), Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan bir ajan olup mitokondriyal elektron transport zincirinde yer alan kompleks I aktivitesinin direkt olarak inhibisyonundan sorumludur [38]. Böylece mitokondriyal solunum engellenerek proton-aracılı ATP sentezinde düşüş gerçekleşir. Metformin, LKB-1 (Karaciğer Kinaz B-1) bağımlı stres yanıtını tetikleyerek enerji sensörü olan AMP-aktif protein kinaz (AMPK) aktivasyonuna neden olur ve glikoliz indüklenirken karaciğer glukoneogenezi inhibe olur [39]. Elde edilen epidemiyolojik veriler, Metformin kullanan diyabetik hastalarda, Metformin dışında bir anti-diyabetik kullanan hastalara göre tümör progresyonunun azaldığını göstermiştir [21]. Ayrıca meme, prostat, kolorektal veya baş ve boyun kanseri olan diyabetik hastalarda Metformin'in gelişmiş sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur [40]–[42]. Bununla birlikte Metformin'in birçok insan kanserinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, kanser modeli oluşturulan deney hayvanlarında da tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir. Wheaton ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada Metformin'in HIF-1 α stabilizasyonunu ve tümör hücrelerinde HIF-hedef genlerin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [43]. Bu da hipoksik ortamda hayatta kalmak için HIF-1 sinyalizasyonuna bağımlı olan kanser türlerinde Metformin'in terapötik rolü olabileceğini düşündürmektedir [39] (Şekil 4).



Şekil 4. HIF-1 α protein ekspresyonunun Metformin ile inhibisyonu

Guimarões ve ark. yaptığı bir çalışmada hipoksik koşullar altında OSCC hücrelerinde (HaCat ve SCC9 hücre hatları) Metformin'in HIF-1 α düzeylerini düşürdüğü ve piruvat dehidrogenaz (PDH) düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte Metformin'in OSCC hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu baskılamak, apoptotik hücre sayısını ve kaspaz-3 düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir [44].

Metformin'in kemoterapi etkinliği üzerinde sinerjistik etki gösterdiği, terapötik ilaç dozlarının düşürülmesinde etkili olduğu yapılan bir çok araştırmada vurgulanmıştır [45]–[49]. Bu bağlamda Metformin, geleneksel kemoterapötik ilaçlar ile kombine edilerek anti-kanserojenik ajan olarak kullanımda büyük potansiyele sahiptir. Qi ve ark.'nın yaptığı bir araştırmada, *in vitro* (HSC3, SCC3 ve TCA8113 hücre hatları) ve *in vivo* OSCC'de Metformin'in NF-K β /HIF-1 α eksen ve HIF-1 regüle eden gen ürünlerini baskılayarak sinerjistik olarak sisplatin sitotoksitesini arttırdığını ve kemoterapi direncini tersine çevirdiğini ileri sürmüşlerdir [50]. Ancak bu çalışmada tek başına Metformin kullanıldığında hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda belirgin anti-kanser etki göstermediği, bunun sebebinin ise düşük doz Metformin kullanımından kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Benzer şekilde OSCC hücrelerinde hem *in vitro* (HSC2, HSC3 ve HSC4) hem de *in vivo* koşullarda Metformin ve 5-fluoro urasil (5-FU) ile kombine edildiğinde apoptozun daha da arttığı gösterilmiştir [51]. Griss ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada Metformin'in hangi metabolik yolak üzerinden hücre proliferasyonu/ölümüne etkisi olduğunu incelemişlerdir. Buna göre, küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücreleri (H1299) ve kolon kanser hücrelerinde (HCT116), Metformin'in trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne glukoz ve glutamin bağımlı-anaplerotik akışı azalttığı ve bunun sonucunda de novo lipid biyosentezi için gerekli olan sitrat türevli Asetil-CoA eksikliğine neden olduğunu göstermişlerdir. Membran biyosentezi için gerekli olan lipid sentezinin azalması nedeniyle Metformin'in proliferasyonu azalttığını vurgulamışlardır. Buna karşılık, hipoksik koşullar altında veya elektron transport zinciri aktivitesi bozulduğunda, mitokondriden bağımsız sitrat üreterek Metformin'in anti-proliferatif etkilerine karşı hücrelerin direnç gösterdiklerini ileri sürmüşlerdir [52].

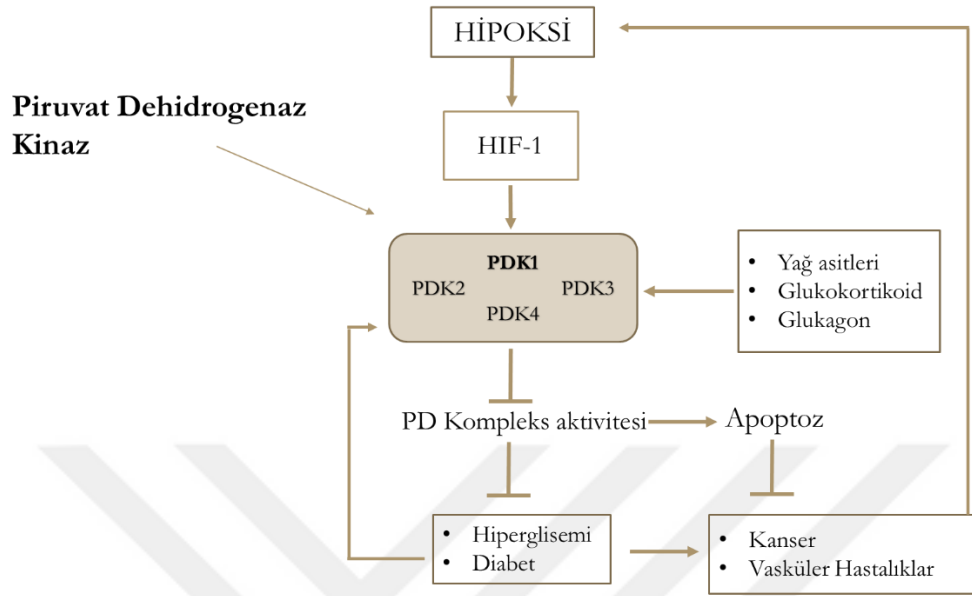
2.3.2. Dikloroasetat

Dikloroasetat (DCA), hücre zarına ve çoğu dokuya nüfuz edebilen 150 Da ağırlığında küçük bir moleküldür. Laktik asidoz (Metformin'in potansiyel yan etkisi) ve mitokondriyal eksikliklerin

tedavisi için kullanılan DCA, piruvat dehidrogenaz (PDH) enzimini fosforilleyerek inaktif hale getiren piruvat dehidrogenaz kinaz (PDK) inhibitörüdür. Piruvat dehidrogenaz, mitokondriyal trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne giren ve oksidatif fosforilasyon için piruvatın asetil-CoA'ya dönüşümünü katalizlemekten sorumlu olan enzimdir. Kansere hücrelerinde artan PDK aktivitesi, piruvatın sitoplazmadan mitokondriye geçişinin azalmasına etkilidir ve bu durum glikoz oksidasyonunun azalmasına ve laktat üretimine yol açmaktadır.

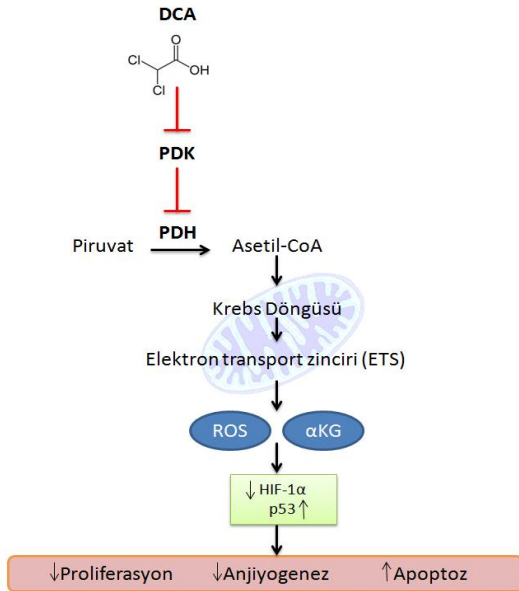
Warburg etkisi olarak adlandırılan glikolitik fenotip, çoğu kanser hücresinde oksijen varlığına rağmen yüksek oranda glikoliz ve laktik asit üretiminin gerçekleştiği yaygın bir fenomendir [3], [53], [54]. Bu metabolik özellik, kanser hücrelerinde apoptoz direnci ve metastatik potansiyelde artış ile ilişkili olan genlerin ekspresyonel değişikliklerine neden olmakta ve bu sayede kanser metabolizması yeniden programlanmaktadır. Bu nedenle tümör hücrelerinde artmış glikolitik kapasitenin engellenmesi, önemli bir kanser tedavi stratejisi sağlayabilmektedir. Elde edilen veriler, serum laktat dehidrogenaz (LDH) düzeylerinin kötü sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermektedir [55].

Gatenby ve ark., neoplastik tümörler genellikle hipoksik mikroçevrede meydana geldiği için, bu hücrelerin anaerobik glikolizi primer enerji kaynağı olarak kullandığını ileri sürmüştür [56]. Bu adaptasyon, hipoksi ya da hipoksiyi taklit eden durumlarda HIF aktivasyonu ile başlar. Aktive olan HIF birçok glikolitik enzim, glukoz taşıyıcılar ve mitokondriyal enzimlerin ekspresyonlarını regüle edebilir [57]. HIF tarafından indüklenen ve mitokondriyal aktivitenin regülasyonunda önemli olan enzimlerden biri de piruvat dehidrogenaz kinaz (PDK) enzimidir [58]. Piruvat dehidrogenaz kinaz enziminin PDK-1, 2, 3 ve 4 olmak üzere dört izomerik formu memelilerde dokuya özgü bir şekilde eksprese edilmektedir [59] (Şekil 4).



Şekil 5. Piruvat dehidrogenaz kinaz izoformları ve yer aldıkları süreçler

Onkoloji alanındaki güncel ilaç denemeleri, hücre sağkalımında esansiyel olan yollar üzerine odaklanmasına rağmen seçici değildir. Son yapılan çalışmalar, kansere özgü metabolik ve mitokondriyal yolların hedeflenmesinin kanser tedavisinde seçicilik sağlayabileceğini göstermiştir. PDK'nın siRNA ya da sentetik inhibitörü olan dikloroasetat (DCA) ile inhibisyonu



Şekil 6. Dikloroasetat mekanizmasının OSCC'deki rolü

kanser hücrelerinin enerji metabolizmasını glikolizden oksidatif fosforilasyona çevirerek mitokondri-bağımlı apoptozun indüklenmesini sağlayabilir (Şekil 6).

Alkarakooly ve ark., DCA'nın agresif MCF-7 meme kanseri ve MC3T3 fare osteoblastik hücrelerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında, düşük doz DCA'nın meme kanseri hücrelerinde osteoblast hücrelerine göre apoptotik etkisinin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Ayrıca DCA'nın MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini anlamlı ölçüde azaltırken, doza bağımlı olarak reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde bir artışa neden olduğunu saptamışlardır. Benzer bulgulara MC3T3 hücrelerinde ulaşamaması DCA'nın hücre ölümü üzerindeki etkileri ile mitokondriyal fonksiyonlarda meydana getirdiği değişimlerin agresif kanser hücrelerinde daha etkili olması şeklinde açıklamışlardır [60]. Benzer şekilde, Madhok ve ark. DCA'nın Lovo gibi metastatik ve agresif kolon kanser hücrelerinde, agresifliği düşük olan HT29 ve SW480 hücrelerine göre mitokondriyal fonksiyon ve hücre ölümü üzerine daha etkili olduğunu göstermişlerdir [61]. DCA'nın hipoksik koşullardaki etkisi incelendiğinde, glioblastoma multiforme (GBM) hücrelerinde (U251, GBM28, GBM37) DCA'nın normoksik koşullarda hücre canlılığını azalttığı buna karşılık hipokside etki göstermediği belirtilmiştir. Ayrıca hipokside HIF-1 α 'nın farmakolojik inhibisyonu sonucu DCA'nın hücre canlılığını azaltması, hücre ölümüne yönelik direncin gelişmesinde hipoksinin önemli bir etken olduğu vurgulanmıştır [62]. DCA'nın OSCC'deki etkilerinin incelendiği bir çalışmada; DCA'nın antiproliferatif etkilerinin enerji metabolizmasının glikolize bağımlı olduğu HSC-2 ve HSC-3 hücrelerinde, enerji metabolizmasının oksidatif fosforilasyona bağımlı olduğu PE15 hücrelerine göre daha fazla olduğu gösterilerek DCA'nın antitümörojenik etkisi ile kanser hücrelerinin metabolik fenotipi arasındaki ilişkiye dikkat çekilmiştir [63].

2.3.3. Metformin ve Dikloroasetat Kombinasyonunun Kanserdeki Rolü

Son yıllarda, DCA'nın mitokondriyal fonksiyonu yeniden programlaması ve tümör hücre ölümü üzerindeki belirgin etkisi nedenleriyle, bu ajanın mevcut kemoterapi stratejileri ile kombinasyon çalışmaları dikkat çekmeye başlamıştır. Wang ve ark. tarafından meme kanseri üzerine gerçekleştirilen benzer bir çalışmada, *in vitro* ve *in vivo*'da DCA'nın otofaji inhibisyonu üzerinden paklitaksele olan duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir [64]. Aynı zamanda Stander ve ark., DCA ve C9 (17 β -estradiol türevi) kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinde apoptozu arttırdığını; bu sinerjistik etkinin kanser hücresi için spesifik olduğunu göstermişlerdir [65]. Roh ve ark., sisplatin dirençli HNSCC hücre hatlarında glikoliz hızındaki artış ile sisplatin direnci arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir. DCA uygulamasının bu hücrelerde enerji metabolizmasını glikolizden oksidatif fosforilasyona kaydırarak ROS birikimine neden olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra, *in*

vivo ve *in vitro* 'da DCA'nın sisplatin dirençli HNSCC hücrelerinde sisplatin duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir [66].

Metformin ve DCA, meme kanseri hücrelerine (MCF-7 ve T47D) kombine olarak uygulandığında, artan oksidatif hasar üzerinden apoptozun daha etkili bir şekilde uyarıldığı bildirilmiştir. Ayrıca kombine terapi sonrası DCA'nın Metformin-indüklü laktat üretimini azalttığı saptanmıştır [67]. Li ve ark.'nın over kanseri hücreleri ile yaptığı *in vitro* çalışmada, Metformin ve DCA kombine terapisi sonucunda, Metformin'in DCA-indüklü koruyucu otofajiyi baskılayarak DCA-indüklü apoptozu arttırdığı gösterilmiştir. Ek olarak DCA'nın Metformin-indüklü glukoz tüketimini ve laktat üretimini azalttığı belirtilmiştir. Nude farelerde ise Metformin ve DCA'nın sinerjistik olarak tümör büyümesini baskıladığını saptamışlardır [68].

Potansiyel etkileri göz önüne alındığında, oral skuamöz kanser hücrelerinde sitotoksiteyi arttırmak ve DCA/Metformin kombinasyonunun sinerjistik etki gösterip göstermediğini incelemek bu çalışmanın özgün taraflarından biridir. Elde edilen sonuçlar terapötik stratejinin gelecekte metabolizma hedefli kanser tedavisi için umut verici bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir.

3. GEREC ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmanın tipi; deneysel (*in vitro*) bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma literatür taraması ile Haziran 2016'da başlamış, Haziran 2019'da tez savunması ile sonlanmıştır. Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Bu çalışmanın evreni ve örneklemi, *in vitro* hücre kültürü deneyleri içerdiği için bulunmamaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

Oral skuamöz hücreli kanser hastasından elde edilen UPCI-SCC-131 ticari hücre hattı, Ocak 2017 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi olan Prof. Dr. Yasemin BAŞBINAR tarafından hediye edilmiştir. Hücreler DMSO içerisinde dondurulmuş olarak kuru buz içerisinde laboratuvar ortamına taşınmış ve deneyler başlayana kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişkenler hücre canlılığı, mRNA ve protein ekspresyonu (HIF-1 α ve PDK-1), metabolik aktivite değişimleri; bağımsız değişkenler ise metabolik ilaçlardır (Metformin ve DCA).

3.6. Veri toplama araçları

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 1'de, cihazlar ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Projede kullanılan kimyasalların marka ve kod numaraları

<i>Malzeme adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
UPCI-SCC-131 hücre hattı	DSMZ	AC668
MEM ortam	Biochrom	F0325
FBS (Fetal bowine serum)	Biochrom	S0415
L-glutamin	Lonza	BE17-605E

Penisilin/Streptomisin	Lonza	DE17-602E
Non-esansiyel aminoasit (NEA)	Lonza	BE13-114E
Tripsin/EDTA	Lonza	CC-5012
Tripan mavi boyası	Biochrom	L6323
PBS (Phosphate buffered saline)	Cegrogen	H0500-550
DMSO	Thermo Scientific	EC-200-664-3
Metformin	Cayman Chemicals	1115-70-4
Dikloroasetik Asit (DCA)	Sigma	347795
Kobalt Klorür	Sigma	C8661
Mitokondri-Sitozol İzolasyon Kiti	Abcam	89874
WST-1	Roche	11 664 807 001
Total RNA izolasyon kiti	Macherey-Nagel	1506/004
cDNA sentez kiti	Applied Biosystem	00501331
SYBR Green Master mix	Thermo Scientific	K0251
HIF-1 α primer	Invitrogen	-
PDK-1 primer	Invitrogen	-
β -Aktin primer	Invitrogen	-
RIPA tamponu	Cell Signalling	9806S
Akrilamid	Sigma	A9099
N,N'metilen bisakrilamid	Sigma	M7279
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma	L-4390
TEMED	Sigma	T7024
Amonyumpersülfat (APS)	Sigma	A9164
İzopropanol	Riedel de Haen	24137
Tris-Baz	Sigma	T6066
Tris-HCl	Sigma	T5941

Sodyum Klorür	Riedel de Haen	13423
Kalsiyum Klorür	Riedel de Haen	12022
HIF-1 α primer antikor	Cell Signalling	14179
PDK-1 primer antikor	Abcam	ab207450
α -Aktinin primer antikor	Cell Signalling	3134
Sekonder antikor	Santa Cruz	sc-2005
Biçinkoninik asit (BCA) total protein tayin kiti	Thermo Scientific	23225
Gliserol	AppliChem	A1123
Glisin	Sigma	G8898
Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific	22619
DNA ladder-100bp	NEB	N3231S
Tween-20	AppliChem	A4974
Yağsız süt tozu	Applchem	A0830
Metanol	Sigma	27,047-4
PVDF Membran	Millipore	IPVH00010
Whatmann kağıdı	Bio-Rad	1703932
ECL Dura	Thermo Scientific	35075
Triton X-100	AppliChem	A4975
Brij 35	Sigma	430AG-6
Coomassie Blue R-250	Sigma	B0149
Asetik Asit	Riedel de Haen	27225

Tablo 2. Projede kullanılan cihazları marka ve kod numaraları

<i>Cihaz adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
Class II Laminar Flow	Esco	EQR / GL-64
CO ₂ İnkübatörü	Thermo Scientific	Model: 311
Inverted Mikroskop	Nikon	ECLIPSE TS100

Santrifüj Cihazı	Heraeus	Biofuge Stratos
Salınımlı santrifüj	Hettich	320R
pHmetre	Selecta	4120500
LabRoller II	Labnet	H5000
xCELLigence	Acea Biosciences	-
Seahorse XF Analyzer	Agilent	-
Nanodrop	Thermo	NanoDrop 3300
SimpliAmp Thermal Cyclers	Thermo	A24811
RT-PCR Cihazı	Roche Lightcycler® 480	Versiyon 2.0
RT-PCR Yazılımı	Roche Lightcycler® 480 Software	Versiyon 1.5.0
Vertikal Elektroforez Sistemi	Biorad	-
Güç Kaynağı	Biorad	PowerPac Basic
Wet Transfer Sistemi	Biorad	Mini Trans Blot
Güç Kaynağı	Biorad	Power Pac Hc
Jel Görüntüleme Cihazı	Kodak/Carestream	4000MM IS
Jel Görüntüleme Cihazı	UVP	EC3 Chemi HR 410
Plak Okuyucu	BioTek	ELX 50
Termal Isıtıcı Blok	Stuart	SBH130D
Hassas Terazı	Precisa	XB 220A
Manyetik Karıştırıcı	VELP Scientifica	F20520162
Soğutmalı Etüv	VELP Scientifica	FOC 225E
Otoklav	Hirayama	HICLAVE HV-50
Spinner	WISD	Wisepin CF-45
Vorteks	Heidolph	REAX Top
Derin Dondurucu -80°C	Thermo Scientific	Forma Model 705
Derin Dondurucu -20°C	Ariston	Hotpoint
Buzdolabı +4°C	Ariston	Hotpoint

3.6.1. Hücre Kültürü

Oral kavite kanseri hücre hattı (UPCI-SCC-131), 2 mM Glutamin + %1 Esansiyel olmayan Amino Asit + %1 Penisilin/Streptomisin + %10 FBS içeren MEM ortamında, normoksik koşullarda 37°C’de %5 CO₂ içeren nemli inkübatör içerisinde inkübe edilmiştir. Hipoksik koşullar için ise hücreler anaerobik inkübatör içerisinde %1 O₂, %5 CO₂ ve dengeli N₂ içeren gaz karışımı ile 37°C’de kültür edilmiştir.

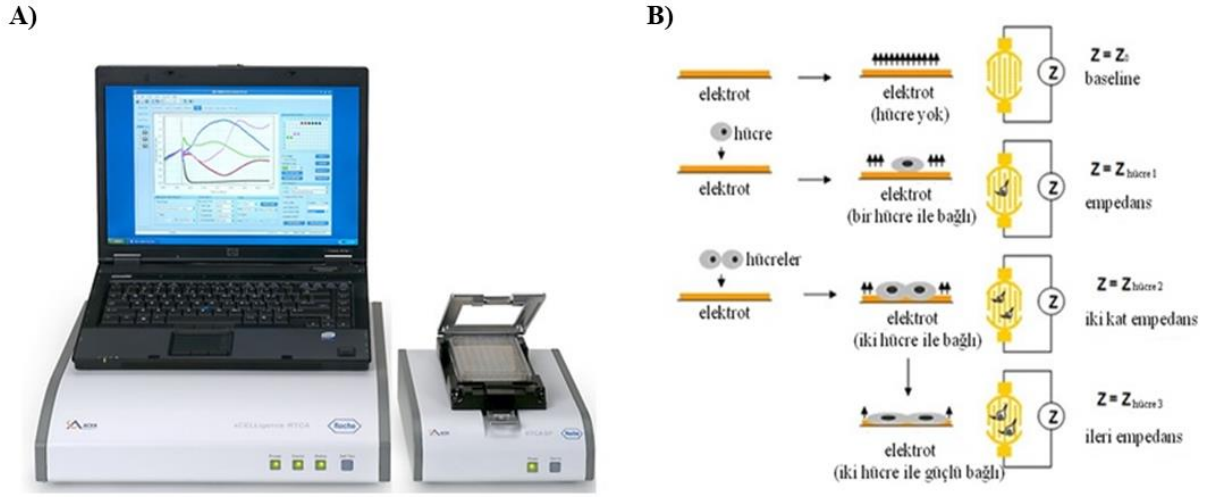
Hücre sayımı ve canlılığı, %0,4’lük Trypan Blue çözeltisi kullanılarak Neubauer lamında mikroskopik olarak gerçekleştirilmiştir. Membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin boyanmaması, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin Trypan Blue ile mavi boyanması temeline dayalı olarak canlı hücre sayımı yapılmıştır [69].

Hücre sayısı (hücre sayısı/ml) = Ortalama hücre sayısı x Seyreltme faktörü x 10⁴

Hücre canlılığı (%) = (Tripan mavisi (-) hücre sayısı / Tripan mavisi (-) hücre sayısı + Trypan blue (+) hücre sayısı) x 100

3.6.2. Gerçek Zamanlı Hücre Canlılığı Testi

Oral skuamöz hücreli karsinom hücre hattında Metformin ve Dikloroasetat ilaçlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri gerçek zamanlı hücre analiz sistemi olan xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Single Plate (SP) (ACEA, Biosciences, San Diego, CA) ile incelendi. Bu cihazın çalışma prensibine göre; elektrik akımı hücre yokluğunda elektrotlar arasındaki devreyi tamamlayan kültür ortamı üzerinden serbestçe akar. Hücreler elektrotlar üzerine yapışıp prolifer ederken ise elektrik akımı engellenir. Böylece hücre sayısı, hücre boyutu/morfolojisi ve hücre-substrat bağlanma kalitesi, son derece hassas bir okuma ile sağlanır (Şekil 7).



Şekil 7. xCELLigence SP hücresel empedans cihazının genel bakışı. **A)** Hücre proliferasyonunun gerçek zamanlı olarak ölçülmesi, **B)** Mikroelektrotlar üzerinde hücre yayılması ile değişen akımın ölçülmesi ve zamana bağlı olarak grafiklenmesi

Metformin ve Dikloroasetatın hücre canlılığı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla aşağıdaki deney grupları oluşturulmuştur:

1. Hücre kültürü + Medium (Negatif Kontrol)
2. Hücre kültürü + Metformin
3. Hücre kültürü + Dikloroasetat
4. Hücre kültürü + Metformin + Dikloroasetat

İlk aşamada 96 E-plate içerisine 100 µl hücre kültürü mediumu pipetlendi ve plate sisteme yerleştirilerek arka fon ölçümü yapıldı. Sonraki tüm okumalardan bu değer çıkarıldı. Daha sonra hücreler tripsine edildikten sonra kuyucuk başına 1×10^4 hücre olacak şekilde 96 E-plate'e ekildi. Deney boyunca kuyucukların son hacmi 200 µl olacak şekilde çalışıldı. Hücre kültürlerinin 24. saatinde yukarıda belirtilen deney grupları oluşturuldu ve uygulama sonrası hücreler 48-72 saat boyunca farklı dozlarda ilaçlarla inkübe edilerek her 15 dakikada bir empedans ölçümleri alındı. Hücre indeks ve sayısındaki değişimler, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi

kullanılarak ölçüldü [70]. Hücre canlılığı grafiği, hücrelerin kullanılan bileşiğe verdiği cevaba dayalı olarak yüzde büyüme oranı kullanılarak hazırlandı. Yüzde büyüme oranı, ilaç ilave edilmemiş kontrol ve deneyin sıfır noktasındaki hücre indeks değerlerinin oranı kullanılarak tespit edildi.

3.6.3. WST-1 Hücre Canlılık Testi

Metformin ve DCA'nın UPCI-SCC-131 hücre canlılığına olan etkisi WST-1 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) reaktifi kullanılarak incelendi [71]. Yöntemin prensibi; canlı hücrelerde, tetrazolyum tuzu olan WST-1'nin mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından suda çözünebilir formazan kristalleri oluşturmaya dayanmaktadır. Bunun için, 96 kuyulu plağın kuyularına her grup dört tekrarlı olacak şekilde 100 µl MEM ortamı içerisinde 1×10^4 hücre ekildi ve hücreler yüzeye tutunmaları için 24 saat CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Süre sonunda Metformin için; 0,5-1-2-4-8-16-32 ve 64 mM ve DCA için; 10-20-40-80-100-120-160 mM dozları 100 µl MEM içerisinde verildi. Kontrol ve kör grupları da ayrıca oluşturuldu. 96 kuyulu plaklar CO₂ inkübatöründe 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda karanlık ortamda her kuyuya 10 µl WST-1 reaktifi eklendi ve CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. WST-1 reaktifinin konulmasından 2 ve 3 saat sonra plak okuyucuda 450 nm dalga boyunda (Referans dalga boyu: 632 nm) absorbansları kaydedildikten sonra aşağıdaki eşitlik kullanılarak % canlılık ve % sitotoksosite hesaplandı. Her ajana ait, hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyonları (IC₅₀), GraphPad 8.0 software kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Ortalama Örnek ABS} / \text{Ortalama Kontrol ABS}) \times 100$$

$$\% \text{ Sitotoksosite} = [1 - (\text{Ortalama Örnek ABS} / \text{Ortalama Kontrol ABS})] \times 100$$

3.6.4. İlaç Kombinasyon Testi

UPCI-SCC-131 hücre hattında Metformin/DCA kombinasyonu ve olası sinerjistik etkilerini incelemek için Talalay-Chou kombinasyon indeks metodu kullanıldı [72]. Kombinasyon indeksi (CI), inhibitor etki (Fa) ve doz azalım indeksi (DRI) CompuSyn 1.0 software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA) ile değerlendirildi. CI <1 sinerjizm, CI=1 katkı etkisini ve CI > 1 antagonizmi göstermektedir.

3.6.5. Koloni Oluşum Testi

UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin ve DCA'nın klonojenik sağkalım üzerindeki uzun süreli etkisi, hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi ile belirlenmektedir. Koloni oluşturma deneyi, Mosmann T'nin [73] yöntemine göre yapıldı. Öncelikle hücreler sayılarak 24 kuyulu plağın her kuyusu kuyu başına 5×10^2 hücre ekildi. Hücreler kuyuların yüzeyine tutunduktan sonra farklı dozlarda ilaçlar ile muamele edildi ve koloni oluşurması için 10-21 gün arası 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe bekletildi. Koloni oluşumu gözlemlendikten sonra hücreler %4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında 20 dakika fiks edildi ve %1 Kristal viyole ile kolonilerin boyanması sağlandı. UVP Jel Dökümantasyon cihazında kuyuların görüntüleri alınarak koloni sayımı yapıldı ve aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak koloni oluşum verimi (CFE) ve sağkalım fraksiyonu (SF) hesaplandı. Her bir koloni oluşumu için minimum 50 hücre kabul edildi.

Koloni oluşum verimi (CFE) = Oluşan koloni sayısı / Ekilen hücre sayısı * 100

Sağkalım fraksiyonu (SF) = İlaç uygulaması sonrası oluşan koloni sayısı / Ekilen hücre sayısı * CFE

3.6.6. Mitokondri İzolasyonu

Mitokondriyal bir protein olan piruvat dehidrogenaz kinaz-1 (PDK-1) molekülünün protein ekspresyonunu Western Blot çalışmalarında incelemek için UPCI-SCC-131 hücrelerinden "Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells" (Thermo Scientific) kullanılarak mitokondri izolasyonu aşağıdaki basamaklarda gösterildiği gibi gerçekleştirildi:

- 1) Yaklaşık 2×10^7 hücre içeren pellet üzerine 800 µl kitin içeriğinde yer alan Reagent A eklenerek yüksek hızda 5 sn vorteksle karıştırıldı ve buz üzerinde 2 dk inkübe edildi.
- 2) Daha sonra karışıma 10 µl Reagent B eklendi ve yüksek hızda 5 sn vorteksle karıştırıldı.
- 3) 5 dk boyunca buz üzerinde inkübe edildi, her bir dakikada bir 5 sn vorteksle karıştırıldı.
- 4) 800 µl Reagent C karışıma eklenerek tüp birkaç kere alt üst edilerek karıştırıldı (vorteks yok).
- 5) 700g 10 dk +4°C'de santrifüj edildi.

- 6) Supernatant başka bir 2 ml'lik ependorfa transfer edildi ve 12.000g, +4°C'de 15 dk santrifüj edildi.
- 7) Supernatant (sitozol içeriyor) başka bir tüpe transfer edildi (Pellet izole mitokondriyi içermektedir).
- 8) Mitokondri içeren pellet üzerine 500 µl Reagent C eklendi ve 12.000g'de 5 dk santrifüj edildi, supernatant uzaklaştırıldı.
- 9) Sitozol içeren sıvı ve mitokondriyal pellet -80°C'de saklandı.

i. Mitokondri Lizisi

Western Blot çalışmalarında kullanılmak üzere elde edilen mitokondri pelleti mitokondri lizis tamponu (TBS: 25mM Tris, 0,15M NaCl, pH:7.2) hazırlanarak lize edildi. Bunun için öncelikle TBS içerisinde hazırlanan %2 CHAPS karışımından 100µl mitokondriyal pellete eklenerek 1 dakika boyunca vortekslendi. Daha sonra 2 dakika yüksek hızda santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Mitokondriyal protein içeren supernatant konsantrasyonu Biçinkoninik Asit (BCA) total protein analiz kiti (Thermo Pierce BCA Protein Assay Kit) ile belirlendi.

3.6.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Projede kullanılan HIF-1 α ve Piruvat Dehidrogenaz Kinaz-1 için özgül primerler "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>" sitesi kullanılarak dizayn edildi. Normoksik ve hipoksik koşullarda UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin ve DCA ile muamele sonrası HIF-1 α ve PDK-1 gen ekspresyonlarını incelemek amacıyla öncelikle Konvensiyonel PCR ile primerlerin optimizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra uygulanan ilaç dozları ile hedef genlerin (HIF-1 α ve PDK-1) mRNA ekspresyon düzeylerindeki olası değişimler Real Time PCR yöntemi ile incelendi. Bu amaçla, öncelikle hücrelerden total RNA izole edildi ardından PCR çalışmalarında kalıp olarak kullanılacak olan komplementer DNA (cDNA) sentezlendi.

i. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için hücre kültürüne uygun RNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel Nucleospin kit) kullanıldı. Yaklaşık 1×10^6 hücre pelleti β -merkaptoetanol içeren RA1 tamponu içerisinde 30 saniye vortekslenerek lize edildi. Kite ait Nucleospin filtrelele hücre lizatı aktarılarak 1 dakika 11.000g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki homojenize lizata %70 etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Elde edilen lizat, Nucleospin RNA kolon içeren tüplere aktarılarak 30 saniye 11.000g'de santrifüj edildi ve RNA'nın kolona tutunması sağlandı. Santrifüj sonrası karışıma membran de-salting tamponu eklenerek 1 dakika 11.000g'de santrifüj edildi. Hazırlanan DNaz reaksiyon tamponu kolona verilerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kitte belirtildiği şekilde yıkama tamponları ile yıkamalar yapıldıktan sonra, 60 μ l DNaz RNaz free dH₂O ile RNA'nın filtreden elüsyonu sağlandı. Elde edilen total RNA örnekleri daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik ölçüm (Nanodro 2000) ile belirlendi ve aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$C_{RNA} = A_{260nm} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{RNA saflığı} = A_{260nm}/A_{280nm} \text{ (1,8 – 2,0 arasında olmalı)}$$

ii. RNA'nın Agaroz Jelde Görüntülenmesi

İzole edilen RNA örnekleri bütünlüklerini değerlendirmek için % 1,2'lik formaldehit agaroz jelde görüntülendi. Jeli hazırlamak için bir erlen içerisinde 0,6 gr agaroz 5 ml 10X Formaldehit Jel tampon (Tablo 3) ve 45 ml DNaz/RNaz içermeyen dH₂O konuldu. Karışım eriyene kadar mikrodalga fırında kaynatıldı. Karışım soğutulduktan sonra üzerine 900 μ L % 37 Formaldehit eklendi. Hazırlanan çözelti horizontal elektroforez sistemine döküldü, taraklar yerleştirildi ve jelin polimerleşmesi için yaklaşık 30 dakika beklendi. Hazırlanan % 1,2'lik formaldehit agaroz jel, elektroforez sistemine yerleştirildi ve üzerine 1X FA yürütme tamponu (Tablo 3) konuldu. 5X RNA örnek yükleme tamponu (Tablo 3) ve 1 μ g total RNA örnekleri DNaz/RNaz içermeyen tüplerde 65°C'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edildi ve kuyulara yüklendi. Sabit 80 V'de 30-45 dakika elektroforez uygulandı ve jeller UVP jel dokümantasyon cihazında görüntülendi.

Tablo 3. % 1,2’lik Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	Özellikleri
10X Formaldehit Jel Tamponu	10 mM EDTA, pH 7,0 200 mM MOPS 50 mM Sodyum Asetat
5X RNA Örnek Yükleme Tamponu	80 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 720 µl % 37 Formaldehit 2 ml % 100 Gliserol 3084 µl Formamid 4 ml 10X FA Jel Tamponu Brom fenol mavisi 40 µg/ml Etidyum Bromür
1X Formaldehit Jel Yürütme Tamponu	50 ml 10X Formaldehit Jel Tamponu 10 ml % 37 Formaldehit 440 ml RNaz free dH ₂ O

iii.cDNA Sentezi

İzolasyon sonrası Real Time PCR deneylerinde kalıp olarak kullanılacak olan komplementer DNA (cDNA) sentezlendi. Total RNA’dan cDNA elde etmek için “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits” (Applied Biosystem) kullanıldı. Kitin talimatları doğrultusunda, 1µg total RNA, 2µl 10X RT tampon, 0,8µl 25X dNTP karışımı, 2µl 10X RT Random primer, 1µl Reverse transkriptaz ile karıştırılarak DNaz RNaz free su ile son hacim 20µl’ye tamamlandı. Karışım “Thermal Block Cycler PCR” cihazında 10 dakika 25°C, 120 dakika 37°C, 5 dakika 85°C’de inkübe edilerek cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

iv.Konvensiyonel PCR

Real Time PCR çalışmalarına başlamadan önce primerlerin uygun bağlanma sıcaklığını bulmak için konvensiyonel PCR yöntemi ile optimizasyon çalışması yapıldı. Bunun için ilk olarak Tablo 4'te gösterildiği gibi hazırlanan 9µl Master mix ile PCR tüpleri içerisinde reaksiyon kuruldu.

Tablo 4. Master mix hazırlanışı

Reaktifler	Örnek Başına Hacim (µl)
Primer Reverse	0,5
Primer Forward	0,5
PCR grade dH ₂ O	3,0
SYBR Green	5,0
TOTAL	9

Daha sonra her kuyuya ~50ng cDNA olacak şekilde cDNA (1µl) konuldu. SimpliAmp Thermal Cycler cihazına PCR tüpleri yerleştirildi ve 3 farklı ısı profili (58°-60°-62°) Tablo 5'te görüldüğü gibi uygulandı.

Tablo 5. SimpliAmp Thermal Cycler cihazında uygulanan ısı profili

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)	Döngü Sayısı
Pre-inkübasyon	95	900	1
Amplifikasyon	95	15	40
	58-60-62	30	
	72	30	
Erime	95	10	1
	65	30	
	97	1	
Soğutma	37	30	1

v. Agaroz Jel Elektroforezi

HIF-1 α , PDK-1 ve β -aktin PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. Bir erlen içersine 50 ml agaroz jel için; 0,5 gr agaroz ve 50 ml 1X TAE tamponu konuldu. Karışım iyice eriyene ve kaynayana kadar ısıtıcı blokta karıştırıldı. Hazırlanan çözelti Biorad horizontal elektroforez sistemine döküldü ve 15 kuyucuklu taraklar yerleştirildi. Jelin polimerleşmesi için yaklaşık 45 dakika boyunca beklendi. Daha sonra PCR ürünleri 40 μ g/ml Etidyum Bromür ile 5:1 oranında karıştırılarak hazırlandı ve kuyulara yüklendi. Sabit 80 V'de yaklaşık 1 saat elektroforez gerçekleştirildi ve jeller UVP jel dokümantasyon cihazında görüntülendi.

vi. Real Time PCR

Real Time PCR çalışmaları uygun sıcaklık (60°) belirlendikten sonra örnekler 96 kuyucuklu plağın her kuyusuna Tablo 4'te gösterildiği gibi hazırlanan 9 μ l Master mix pipetlenerek hazırlandı. Daha sonra her kuyuya ~50ng cDNA olacak şekilde cDNA (1 μ l) konuldu. Roche Light Cycler 480 cihazına plateler yerleştirildi ve Real Time PCR ısı profili olarak uygulanan basamaklar Tablo 6'da görüldüğü gibi uygulandı.

Tablo 6. Roche Light Cycler 480 cihazında uygulanan ısı profili

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)	Döngü Sayısı
Pre-inkübasyon	95	900	1
Amplifikasyon	95	15	40
	60	30	
	72	30	
Erime	95	10	1
	65	30	
	97	1	
Soğutma	37	30	1

Real-Time PCR analizi için referans gen olarak β -aktin kullanıldı. Roche Lightcycler 480 yazılımı kullanılarak her bir örneğe ait hedef gen ekspresyonu, eşlenik referans gen ekspresyonuna oranlanarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile "Rölatif Kantitasyon" yapıldı (34):

$\Delta Ct_{\text{kontrol}} = \text{kontrole ait hedef genin } Ct \text{ değeri} - \text{kontrole ait referans genin } Ct \text{ değeri}$

$\Delta Ct_{\text{örnek}} = \text{örneğe ait hedef genin } Ct \text{ değeri} - \text{örneğe ait referans genin } Ct \text{ değeri}$

Normalize edilmiş hedef gen ekspresyonu: $2^{-(\Delta Ct_{\text{örnek}} - \Delta Ct_{\text{kontrol}})} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.6.8. Western Blot

UPCI-SCC-131 hücrelerindeki HIF-1 α ve PDK-1 protein ekspresyonları Western Blot yöntemi ile incelendi. Hücreler tripsine edildikten sonra RIPA lizis tamponunda (150mM NaCl, %0,1 SDS, %1 NP-40, 20mM Tris-HCl pH 7,5) taze eklenen proteaz inhibitörleri varlığında (2 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A, 1mM PMSF, 10mM NaF) hücre lizizi gerçekleştirildi. Lize edilen örneklerdeki total protein miktarı Biçinkoninik Asit (BCA) total protein analiz kiti (Thermo Pierce BCA Protein Assay Kit) ile belirlendi. Protein tayinin ardından indirgeyici ve denatüre koşullar altında Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı [74]. Buna göre %8'lik ayırıcı jel içeren poliakrilamid jeller hazırlandı (Tablo 7). Bir tüpte 10-50 μ g protein lizatı ve 2X örnek yükleme tamponu (125mM Tris HCl, %4 SDS, %10 β -merkaptotanol, %20 Gliserol, %0,004 bromfenol mavisi) karıştırıldıktan sonra örnekler 95°C'de 5 dakika denatüre edildi. Daha sonra ilk olarak sabit 70V'de 30 dakika ardından 110V'de 90 dakika +4°C'de elektroforez işlemi uygulandı.

Tablo 7. SDS-PAGE poliakrilamid jellerin hazırlanması

<i>Kullanılan Reaktifler</i>	<i>%8'lik Ayırıcı Jel</i>	<i>%5'lik Paketleyici Jel</i>
dH ₂ O	2,3 ml	2,1 ml
%30 Akrilamid karışımı	1,3 ml	0,5 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3 ml	-
1,0 M Tris-HCl pH 6,8	-	380 μ l
% 10 SDS	50 μ l	30 μ l

% 10 APS	50 µl	30 µl
TEMED	3 µl	3 µl

Elektroforez sonrası jelde bulunan proteinler poliviniliden diflorür (PVDF) membrana transfer etkinliğinin yüksek olması nedeniyle ıslak transfer sistemi kullanılarak sabit 130 mA'de +4°C'de gece boyunca transfer edildi. Spesifik olmayan bantların oluşumunu engellemek için membran, bloklama çözeltisi olan %5'lik yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T (10mM Tris-HCl, 0,14M NaCl, %0,1 Tween 20, pH=7,5) içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlemten sonra membranlar HIF-1 α (1:500) ve PDK-1 (1:2000) primer antikorlarıyla gece boyunca +4°C'de inkübe edildi. Referans gen (housekeeping gen) olarak α -Aktinin (1:3000) primer antikoru kullanıldı. Membranlar TBS-T ile 3 kere 15-5-5-5 dakika yıkandıktan sonra HRP ile işaretli sekonder antikör ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrar edildikten sonra membranlar Kodak Image Station 4000MM görüntüleme cihazına yerleştirildi ve üzerlerine ECL DURA (Thermo Scientific) çözeltisi konularak görüntüleri alındı. Semi-kantitatif analiz için elde edilen bantların dansitometrik analizleri UVP Bioimaging system with LabWorks 4.6 Image Acquisition yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için her bantın alan (mm²) ve optik dansitesi (O.D/mm²) tayin edildi ve bantın yoğunluğu; “alan x optik dansite” formülünden hesaplandı. Her örneğe ait elde edilen hedef protein ekspresyon düzeyi (area density) eşlenik α -Aktinin protein ekspresyon düzeyine (area density) oranlanarak rölatif kantitasyon yapıldı [75].

3.6.9. Metabolik Akış Analizleri

UPCI-SCC-131 hücrelerinin Metformin ve DCA'ya yanıt olarak gösterdiği biyoenerjistik akışlar SeaHorse XFp Ekstrasellüler akış analizörü ile değerlendirildi (SeaHorse Biosciences). Hücreler 48 saat boyunca ajanlar ile belirlenen dozlarda muamele edildi. Deneylere başlamadan önce Agilent Seahorse XFp sensör kartuşu, XF kalibratör içerisinde gece boyunca CO₂ içermeyen inkübatörde 37°C'de nemlendirildi. UPCI-SCC-131 hücreleri, uygun hücre kültürü ortamı kullanılarak istenilen hücre yoğunluğunda (1x10⁵-2x10⁵) Agilent Seahorse XFp mini plak içerisine ekildi. Kültür ortamının buharlaşmasını önlemek için plak haznelerine steril dH₂O veya PBS eklendi. Agilent Seahorse XFp mini plak 37°C'lik inkübatörden çıkarılarak kültür ortamının sadece

20µl'si kalacak şekilde tüm ortam çekildi ve hazırlanan bazal ortam (1mM piruvat, 2mM glutamin ve 10mM glukoz, pH:7,4) ile hücreler yıkanarak ortam değiştirildi. Kuyu başına son hacim 180 µl olacak şekilde bazal ortam ile tamamlandı. Deneylere başlamadan önce mini plate 1 saat boyunca CO₂ içermeyen 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Mitokondriyal fonksiyon için 50µM Oligomisin (ATP sentaz kompleks V), 50µM FCCP (iç mitokondri membranı) hazırlanarak enjeksiyon kuyularına yüklendi. Sensör kartuşu cihaza verilerek 20 dakikalık kalibrasyon işlemi gerçekleştirildi. Kalibrasyon sonrası mini plate cihaza verilerek deney başlatıldı ve belirlenecek olan ardışık dakikalarda ölçümler alındı. Üçüncü ölçüm sonrası hücrelere hazırlanan test ajanları enjekte edilerek hücrelerin stres sonrası gösterdiği tepkiler eş zamanlı olarak izlendi. Bazal ve stres sonrası hücrelerin oksijen tüketimi ve ekstrasellüler asidifikasyon hızı analiz edildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

İş paketleri

1. Literatür taraması
2. Gerekli malzemenin alınması
3. Hücre Kültürü, hücre canlılığı, ilaç kombinasyon testleri
4. Mitokondri İzolasyonu
5. Real-Time PCR çalışmaları
6. Western Blot çalışmaları
7. Metabolik Akış Analizleri
8. Sonuçların değerlendirilmesi
9. Tez yazımı

	2016	2017						2018							2019		
AYLAR	6. ay - 12. ay	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay-12.ay	13.ay	14.ay	15.ay	16.ay	17.ay	18.ay	19.ay-24.ay	25.ay	26.ay	27.ay-30.ay
Literatür taraması	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Malzeme Temini		x	x	x	x	x											
Hücre Kültürü, Sitotoksosite Denemeleri		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Mitokondri İzolasyonu					x	x	x										
RT-PCR								x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Western Blot								x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Metabolik akış analizleri															x	x	
Verilerin Değerlendirilmesi															x	x	x
Tez yazımı															x	x	x

3.8. Verilerin değerlendirilmesi

Elde edilen veriler Graph Pad 8.0 (San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi ve ortalama $\pm$ Standart Sapma şeklinde verildi. Tüm alışmalar en az 3 kere tekrar edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar one way ANOVA testi ve unpaired t test ile değerlendirildi. Post hoc testler olarak Dunnett'in Post Hoc testinden yararlanıldı. p değerleri olarak * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Araştırmanın sınırlılıkları bulunmamaktadır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Etik kurul onayı, 21.07.2016 tarihli 2775-GOA dosya numarası ile Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar No: 2016/20-32) (EK-2).

4. BULGULAR

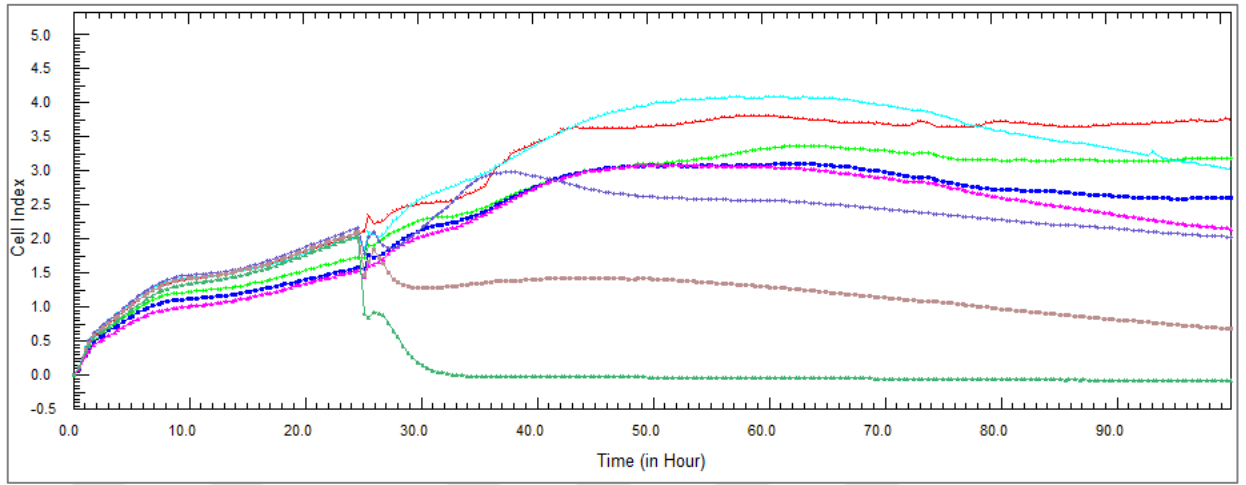
4.1. Metformin ve Dikloroasetatın Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin ve DCA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkileri xCELLigence cihazı ve WST canlılık testi ile incelendi. Kuyu başına 1×10^4 hücre olacak şekilde hücreler ekildikten sonra Metformin için; 1-128 mM; DCA için ise 5-120 mM dozları hücrelere 72 saat boyunca normoksik ve hipoksik koşullar altında uygulandı. Metformin ve DCA'ya ait grafikler ve IC₅₀ değerleri GraphPad Prism 8.0 software ile hesaplandı.

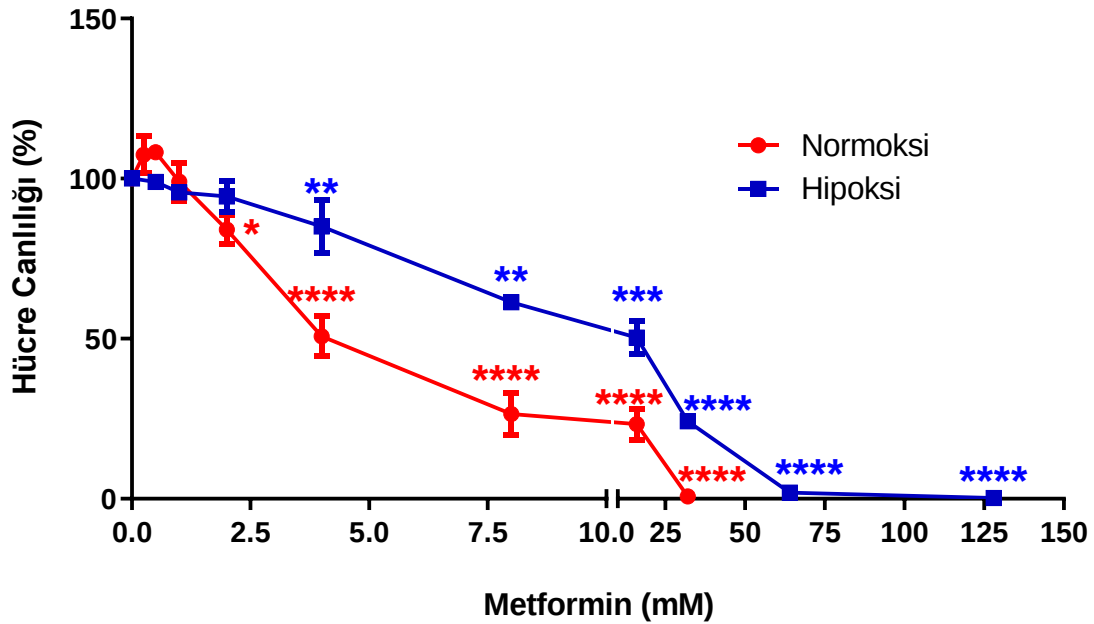
UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin'in hücre canlılığı üzerine gösterdiği etkiler zamana karşı hücre indeks değerleri kullanılarak xCELLigence RTCA cihazı ile gerçek zamanlı olarak ölçüldü (Şekil 8). WST-1 hücre canlılığı sonuçlarına göre Metformin normoksik ve hipoksik koşullarda doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltmıştır. Hücre canlılığını %50 inhibe eden IC₅₀ değerleri 72.saat için normoksik koşullarda 4mM; hipoksik koşullarda 14mM olarak hesaplandı (Şekil 9). Real Time PCR ve Western Blot deneylerine hücre canlılığı çalışmalarından elde edilen IC₅₀ değerlerinin altındaki dozlar olan 2mM ve 3mM Metformin ile devam edildi.

Benzer şekilde DCA'nın da zamana bağlı olarak gösterdiği hücre indeks değerleri Şekil 11'de gösterildi. Dikloroasetat'ın UPCI-SCC-131 hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı ve IC₅₀ değerinin normoksik koşullar için 30mM; hipoksik koşullar için ise 40mM olduğu belirlendi (Şekil 12).

Metformin ve DCA'nın klonojenik hücre sağkalımı üzerindeki uzun süreli etkisi koloni oluşum testi ile incelendi. Hücreler 14.günün sonunda %4'lük paraformaldehit ile fiks edilip %1'lik kristal viole ile boyandı. Koloni görüntüleri UVP Jel Dökümantasyon cihazı kullanılarak elde edildi ve koloni sayımları yapıldı. Hücrelerin koloni oluşturma kapasitesinin Metformin (Şekil 10) ve DCA (Şekil 13) konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı sağkalım grafikleri ile desteklendi.

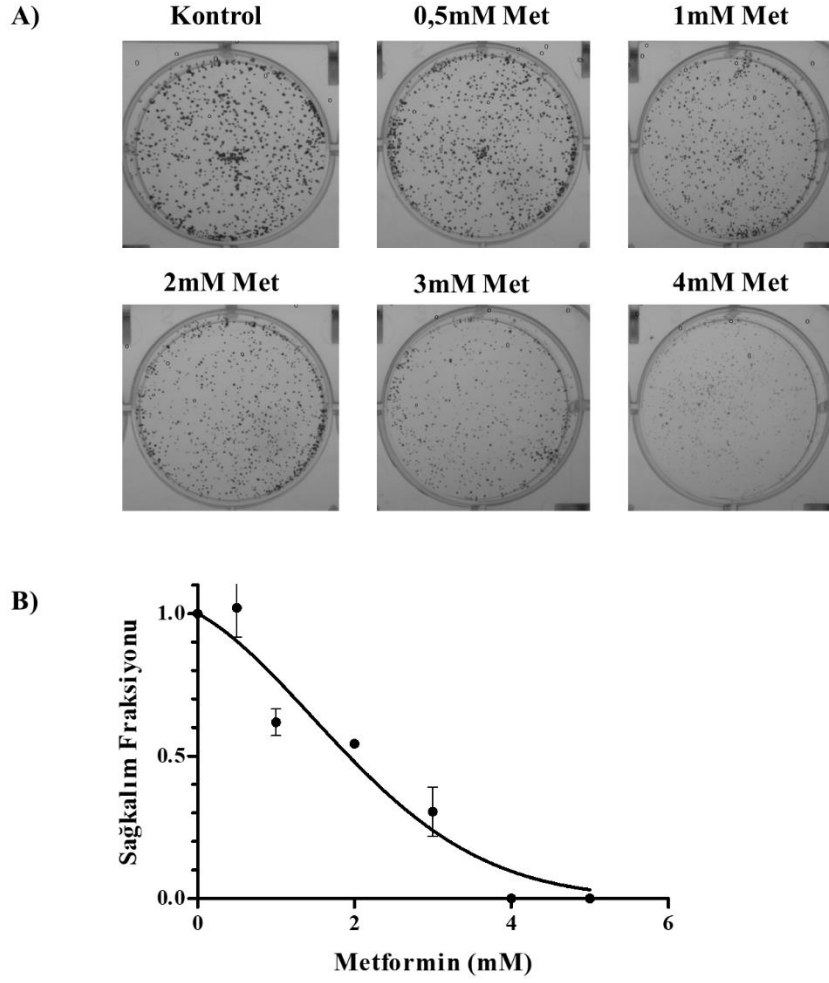


Şekil 8. UPCI-SCC-131 hücrelerinin normoksik koşullarda farklı konsantrasyonlardaki Metformin'e karşı gösterdiği hücre indeks grafiği. Hücreler 72 saat boyunca MEM (kırmızı), 1mM (açık yeşil), 2mM (mavi), 4mM (pembe), 8mM (açık mavi), 32mM (yeşil), 64mM (mor) ve 128mM (kahverengi) Metformin ile muamele edildi.

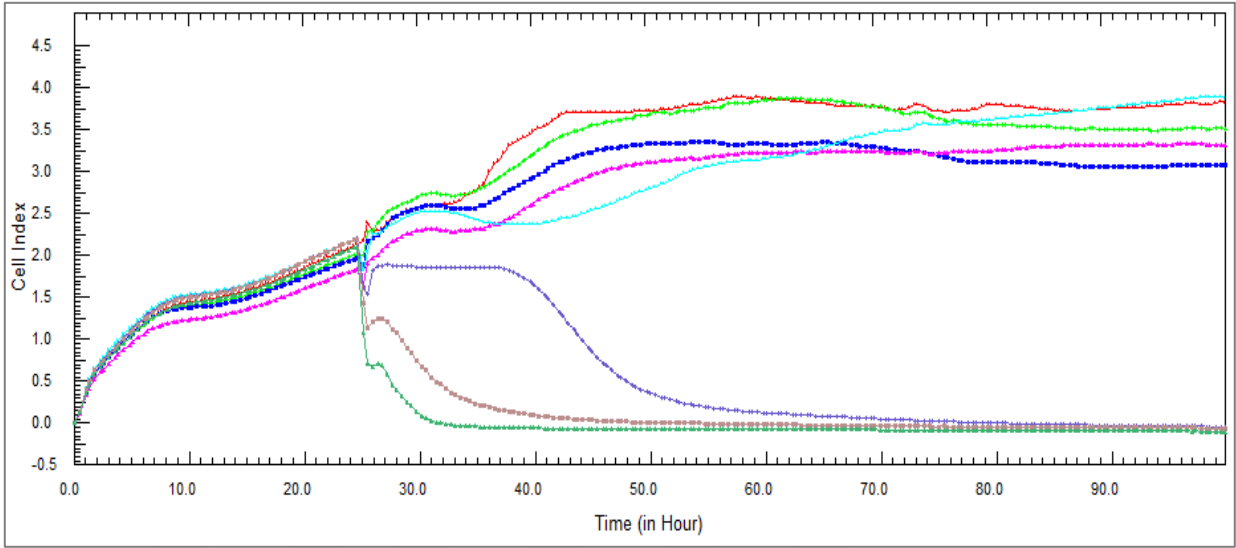


Şekil 9. UPCI-SCC-131 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda Metformin ile 72 saat muamele edilmesinin % hücre canlılığı üzerine etkisi (n=4). Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi.

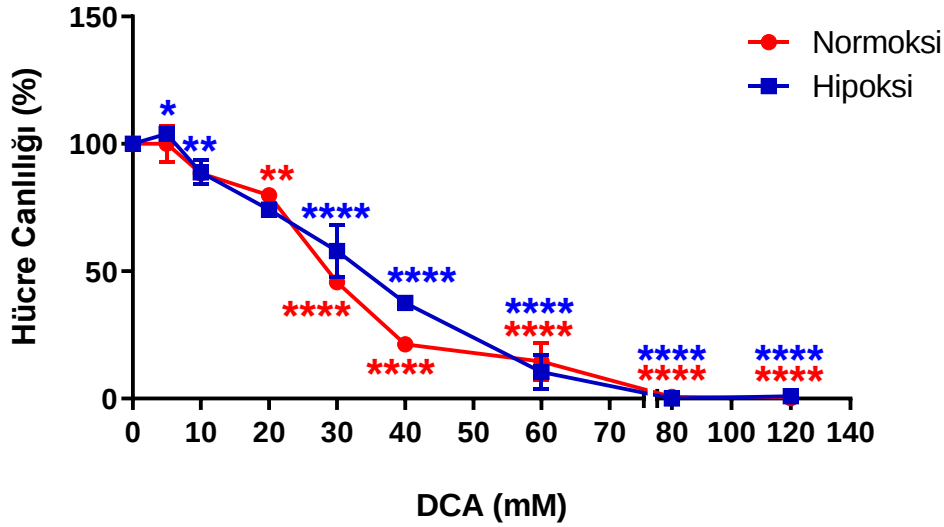
* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$



Şekil 10. UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin uygulaması sonrası oluşan **A)** koloni görüntüleri ve **B)** sağkalım grafiği

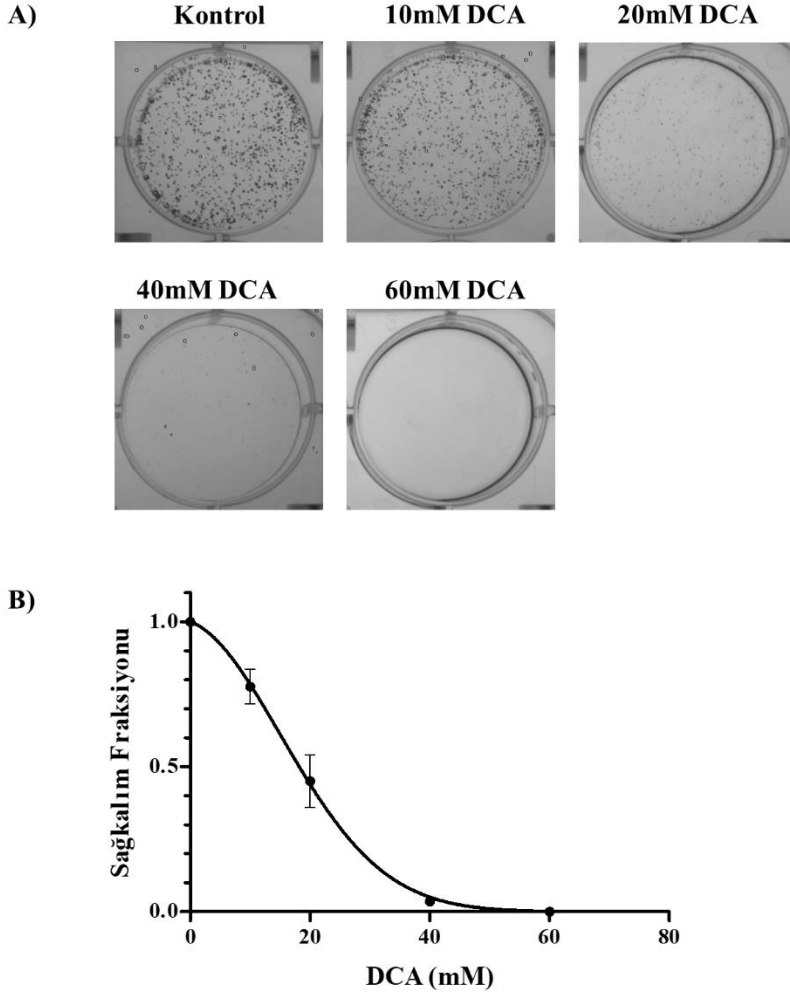


Şekil 11. UPCI-SCC-131 hücrelerinin normoksik koşullarda farklı konsantrasyonlardaki DCA'ya karşı gösterdiği hücre indeksi grafiği. Hücreler 72 saat boyunca MEM (kırmızı), 5mM (açık yeşil), 10mM (mavi), 20mM (pembe), 40mM (açık mavi), 80mM (mor), 120mM (kahverengi) ve 160mM (yeşil) DCA ile muamele edildi.



Şekil 12. UPCI-SCC-131 hücrelerinde farklı konsantrasyonlardaki DCA'nın % hücre canlılığı üzerine etkisi (n=4). Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$

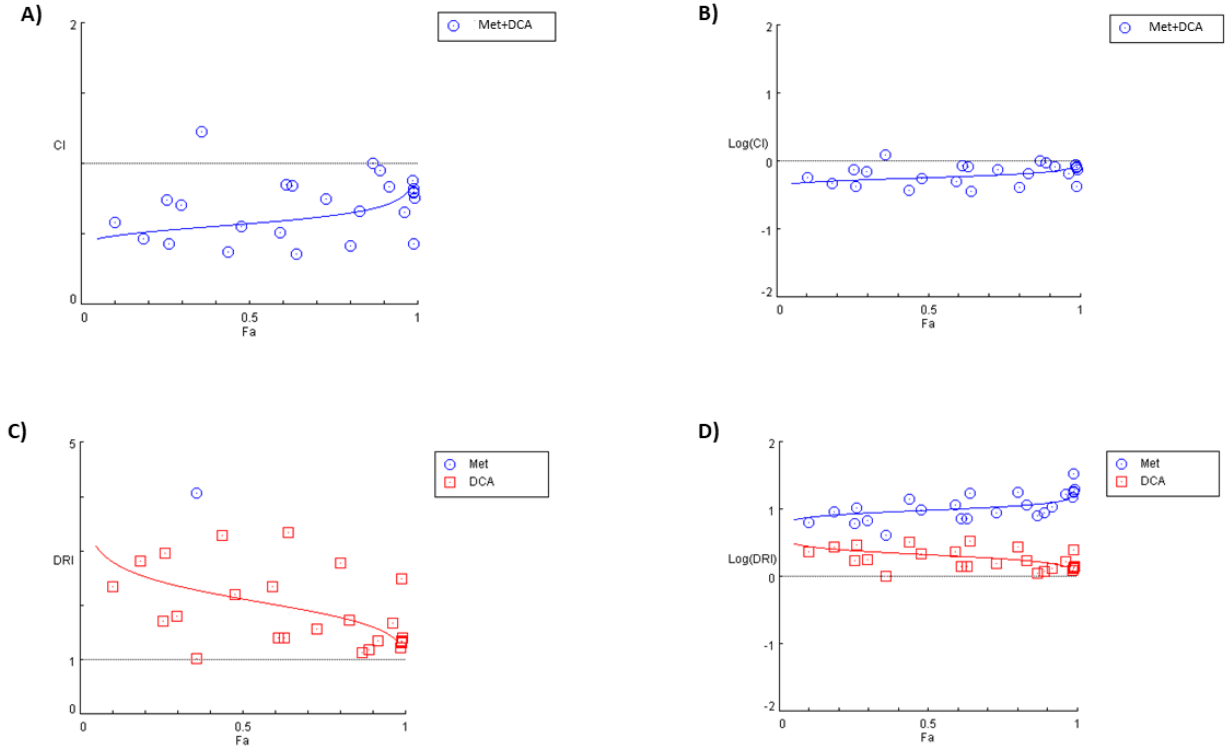


Şekil 13. UPCI-SCC-131 hücrelerinde DCA uygulaması sonrası oluşan **A)** koloni görüntüleri ve **B)** sağkalım grafiği

4.2. Metformin ve Dikloroasetat Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Metformin ve DCA kombinasyonu UPCI-SCC-131 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Chou-Talalay metoduna göre değerlendirildi. Kombinasyon indeksi (CI) ve DRI değerlerini hesaplamak için CompuSyn software kullanılarak normoksik koşullarda iki ilaç sabit oranda (1:20) kombine edildi. Tablo 8'de gösterildiği gibi, CI ve DRI değerlerini belirlemek için 0,05-0,5-0,75-0,90-0,95 ve 0,097 inhibitör etki (Fa) değerleri kullanıldı. Metformin ve DCA kombinasyonuna ait tüm CI değerleri 0,46 ile 0,80 arasında bulundu (Şekil 14 A ve B). Bu durum UPCI-SCC-131 hücre canlılığına karşı Metformin ve DCA kombinasyonunun normoksik koşullarda sinerjistik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, OSCC hücre canlılığını azaltmak için gerekli olan

Metformin veya DCA'nın uygun doz azalımını sağlayan tüm DRI değerleri “1” in üzerinde bulundu (Şekil 14 C ve D).



Şekil 14. UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin ve DCA kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi. **A)** Kombinasyon indeks grafiği (Fa-CI plot) **B)** Logaritmik kombinasyon indeks grafiği [Log(CI)-Fa] **C)** Doz azalım indeks grafiği (Fa-DRI plot), **D)** Logaritmik doz azalım indeks grafiği [Log(DRI)-Fa]. Met; Metformin

Tablo 8. UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin ve DCA kombinasyonuna ait İnhibitor Etki (Fa), Kombinasyon İndeksi (CI) ve Doz Azalım İndeksi (DRI) değerleri

<i>İnhibitör Etki (Fa)</i>	<i>Kombinasyon İndeksi (CI)</i>	<i>Metformin (mM)</i>	<i>DCA (mM)</i>	<i>Doz Azalım İndeksi (DRI) Metformin</i>	<i>Doz Azalım İndeksi (DRI) DCA</i>
0,05	0,46762	1,04536	9,18084	7,00837	3,07755
0,5	0,57499	5,43718	23,7410	9,70531	2,11887

0,75	0,63372	10,05920	33,8417	10,9588	1,84341
0,90	0,70434	18,61030	48,2398	12,3743	1,60377
0,95	0,75988	28,28020	61,3926	13,4401	1,45883
0,97	0,80343	38,08780	72,8819	14,2538	1,36375

4.3. Metformin ve DCA'nın hedef gen ekspresyonları üzerindeki etkileri

Metformin ve DCA uygulaması sonrası UPCI-SCC-131 hücrelerindeki HIF-1 α , PDK-1 ve β -aktin mRNA ekspresyon düzeyleri, Light Cycler 480 1.5 (Roche Diagnostic) kullanılarak belirlendi. Her gene ait Ct (Threshold cycle) değerlerinden yararlanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile rölatif mRNA ekspresyon analizleri yapıldı.

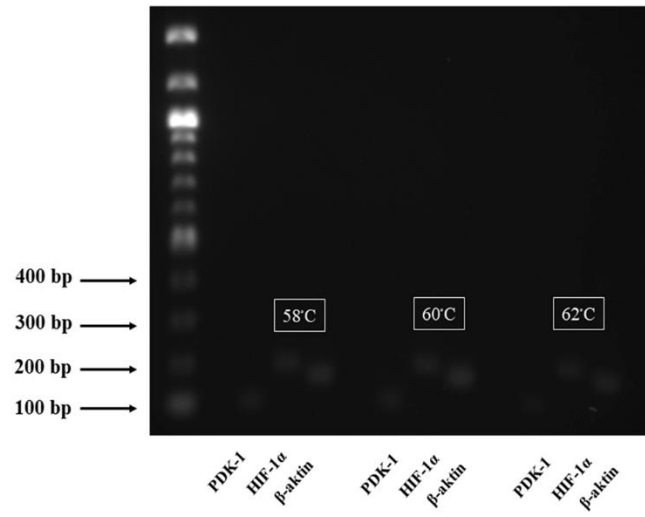
İzole edilen RNA örneklerinin intakt olup olmadığını belirlemek amacıyla denatüre koşullar altında agaroz jel elektroforezi uygulandı. Bu jel görüntülerine göre, RNA örneklerinin intakt (28S ve 18S'de keskin banda sahip) olduğu görüldü (Şekil 15).

Projede kullanılan primerlerin sekansları ve ampikon boyutları Tablo 9'da verildi. Real Time PCR çalışmalarına başlamadan önce primerlerin uygun bağlanma sıcaklığını bulmak için optimizasyon çalışması yapıldı. Bu amaçla SimpliAmp Thermal Cycler ile 3 farklı bağlanma sıcaklığı (58°-60°-62°C) denenerek konvensiyonel PCR deneyi kuruldu. Elde edilen bant görüntülerine göre bütün primerler için uygun sıcaklık "60°C" olarak seçildi ve çalışmalara bu sıcaklıkla devam edildi (Şekil 15). Her 3 gene ait erime eğrileri Şekil 16'da gösterildi.

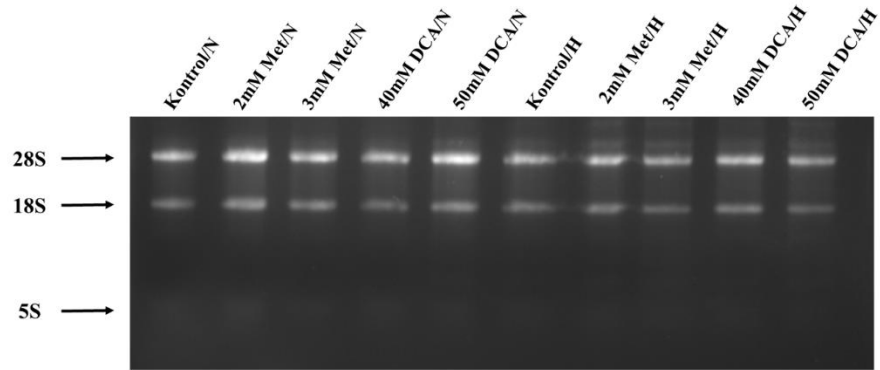
Tablo 9. Projede kullanılan primerlerin sekans ve ampikon boyutları

Hedef Gen	Primer Sekansı	Ampikon Boyutu (bp)
HIF-1α	Forward: 5' - AAGAACAAAACACACAGCGAAGC - 3' Reverse: 5' - TCACAAATCAGCACCAAGCAGG - 3'	199
PDK-1	Forward: 5' - CAACAGAGGTGTTTACCCCC - 3' Reverse: 5' - ATTTTCCTCAAAGGAACGCC - 3'	105
β-aktin	Forward: 5' - AGCCTCGCCTTTGCCGA - 3' Reverse: 5' - CTGGTGCCTGGGGCG - 3'	175

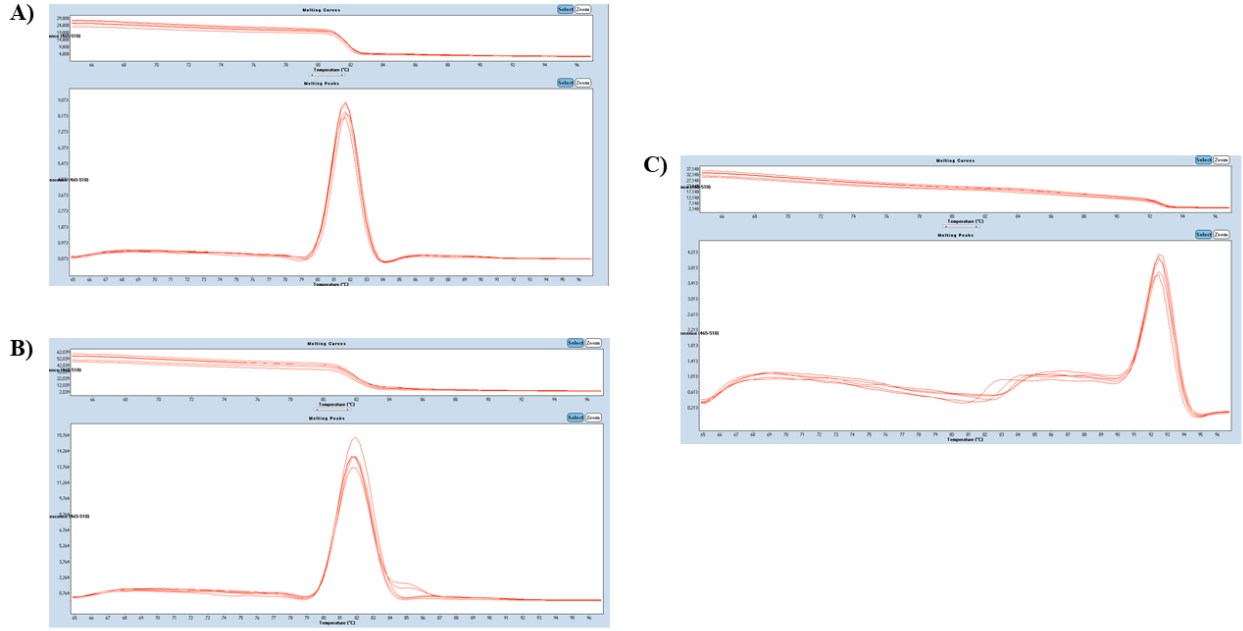
A)



B)



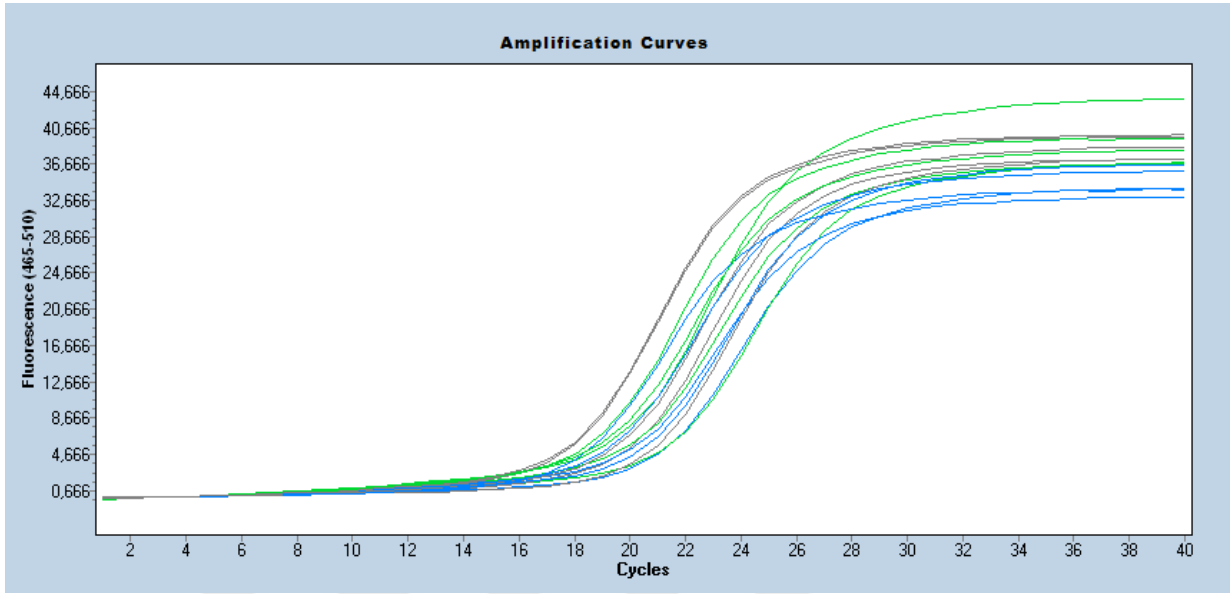
Şekil 15. A) RNA örneklerin formaldehit agaroz jel görüntüleri. N: Normoksi, H: Hipoksi **B)** Optimizasyon için kullanılan örneklerin agaroz jel görüntüsü



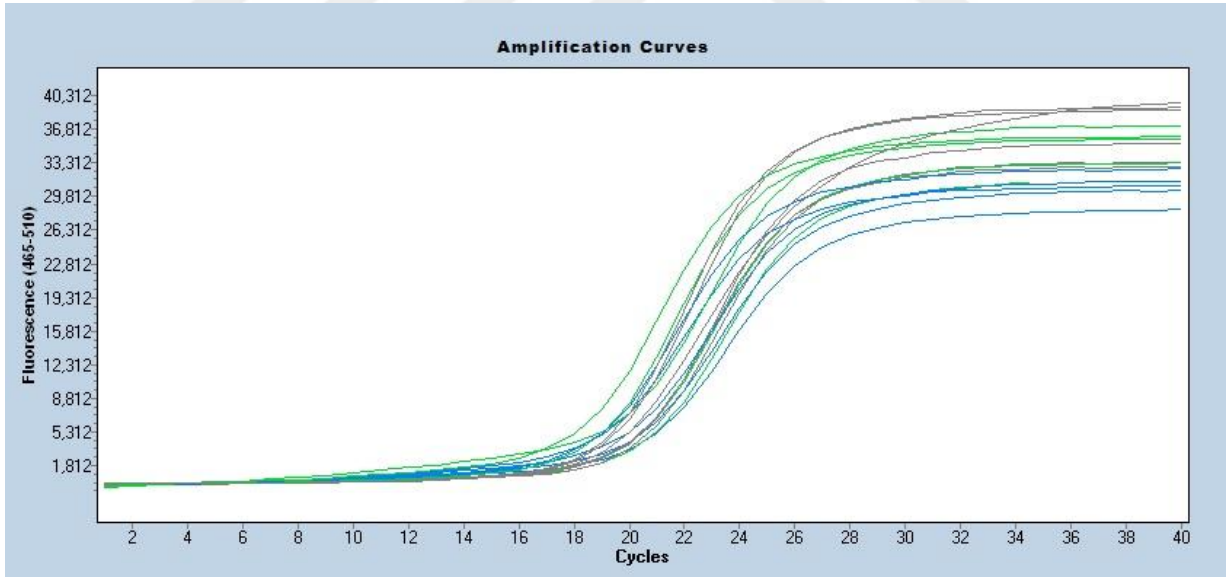
Şekil 16. A) HIF-1 α B) PDK-1 C) β -aktin'e ait erime eğrileri (melting curve)

4.3.1. HIF-1 α Gen Ekspresyonu

Real-Time PCR çalışması ile belirlenen normoksi ve hipoksi koşullarındaki Kontrol, 2mM Metformin, 3mM Metformin, 40mM DCA ve 50mM DCA örneklerindeki HIF-1 α gen ekspresyon amplifikasyon eğrileri ve ortalama kat değişim (fold change) değerleri sırasıyla (Şekil 17 ve 18) ve Tablo 10'da gösterildi.



Şekil 17. Normoksik koşullarda HIF-1 α amplifikasyon eğrileri (n=3).

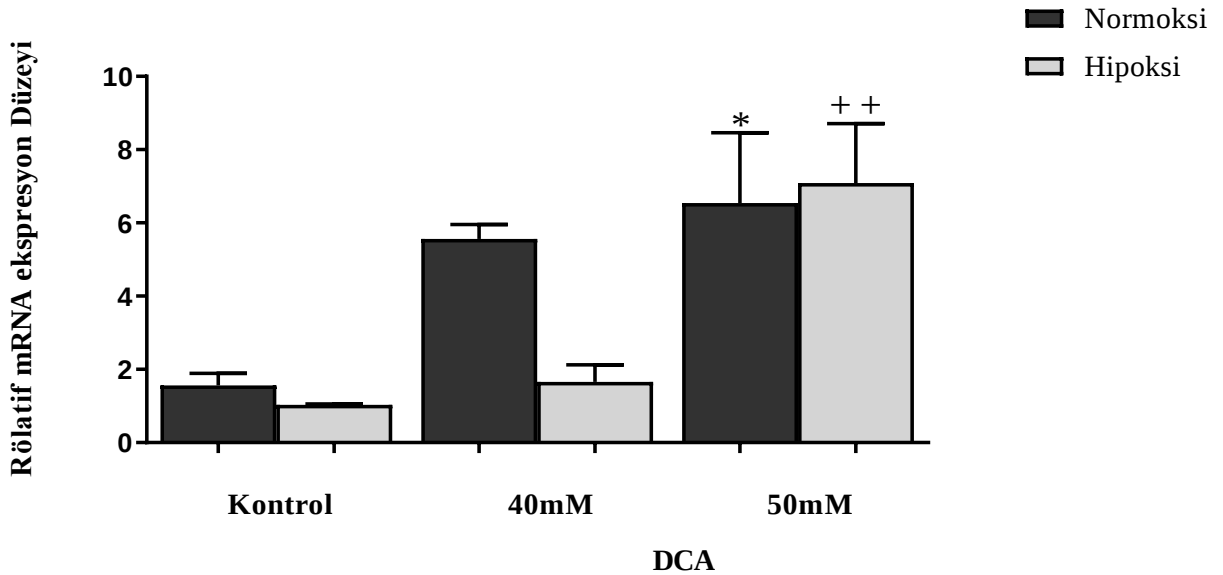


Şekil 18. Hipoksik koşullarda HIF-1 α amplifikasyon eğrileri (n=3).

Tablo 10. Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1 α ortalama kat değişim değerleri

<i>Örnekler</i>	<i>Ortalama Kat Değişim Değerleri</i> <i>(Normoksi)</i>			<i>Ortalama Kat Değişim Değerleri</i> <i>(Hipoksi)</i>		
	1.tekrar	2.tekrar	3.tekrar	1.tekrar	2.tekrar	3.tekrar
Kontrol	1,04	1,74	2,43	1,034	1,059	1,002
2mM Metformin	1,54	1,37	1,28	1,129	1,634	1,504
3mM Metformin	1,71	1,04	1,13	2,115	1,354	1,032
40mM DCA	4,52	6,26	6,06	1,332	-	1,988
50mM DCA	6,53	3,17	4,54	7,135	8,690	5,440

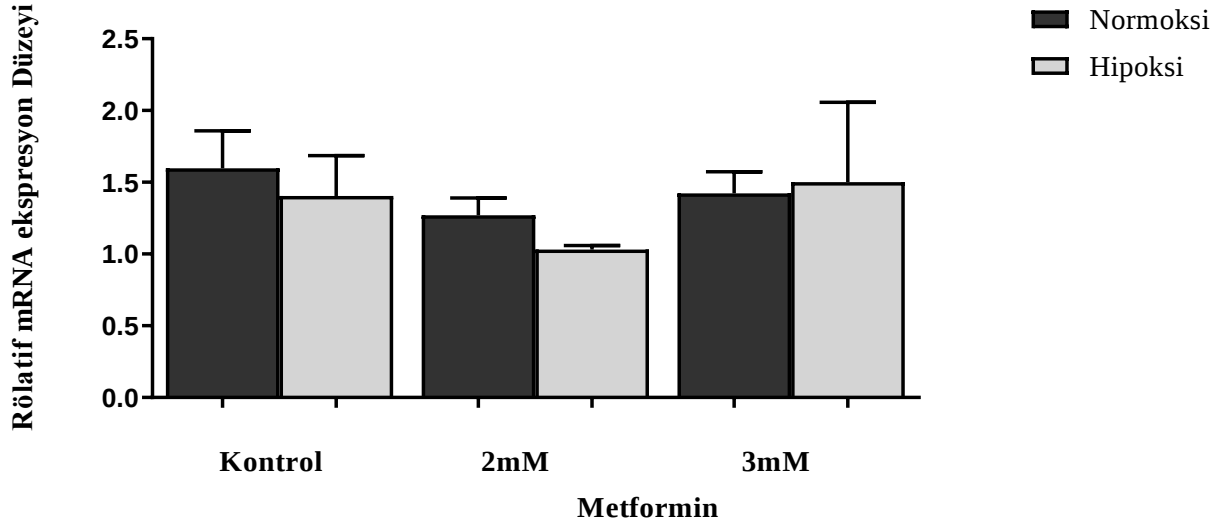
UPCI-SCC-131 hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonu açısından normoksik ve hipoksik koşullarda kontrole kıyasla 40mM DCA'nın bir etkisi yokken; 50mM DCA hem normoksik (p=0,0243) hem de hipoksik koşullarda (p=0,016) anlamlı olarak artış gösterdi (Şekil 19).



Şekil 19. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda 40mM ve 50mM DCA'nın HIF-1 α mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)

İstatistiksel olarak anlamlı: * $p \leq 0,05$; ++ $p \leq 0,01$

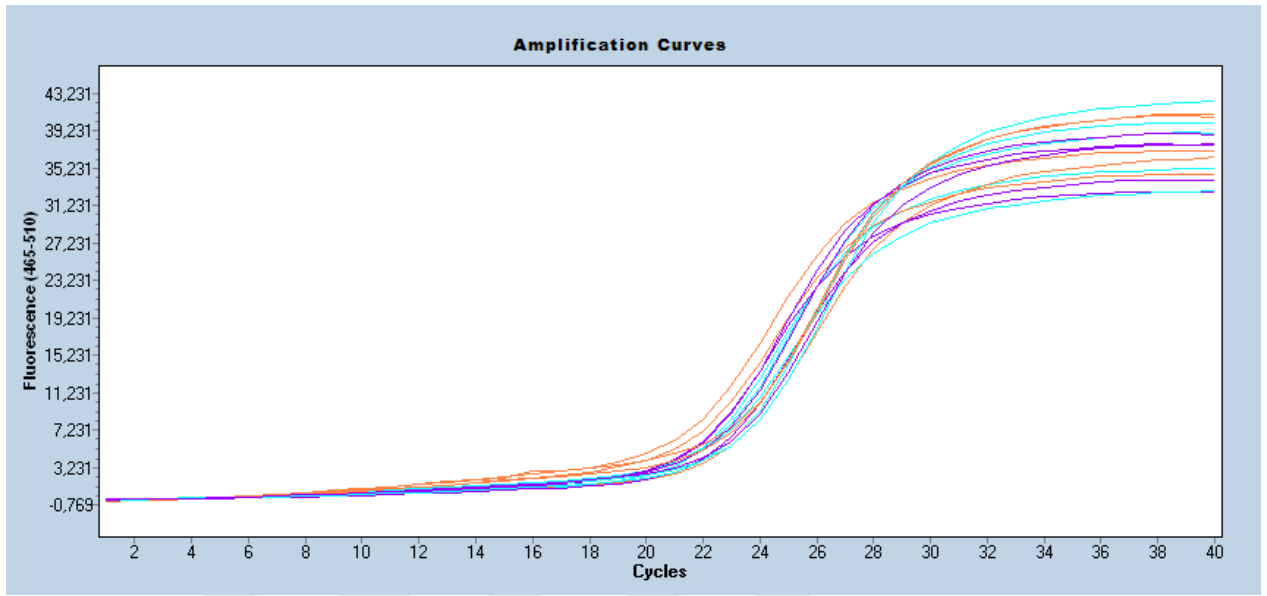
UPCI-SCC-131 hücrelerinde 2mM ve 3mM Metformin ile HIF-1 α mRNA ekspresyonunda hem normoksik hem de hipoksik koşullarda kontrole kıyasla anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 20).



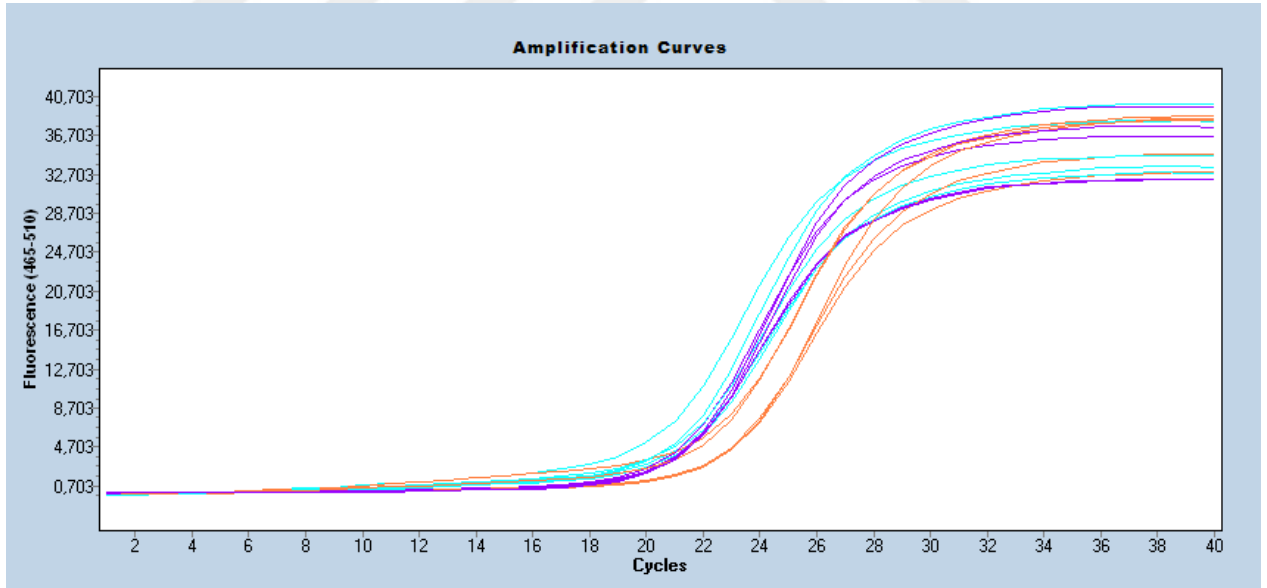
Şekil 20. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda 2mM ve 3mM Metformin'in HIF-1 α mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)

4.3.2. *Piruvat Dehidrogenaz Kinaz-1 Gen Ekspresyonu*

Real-Time PCR çalışması ile belirlenen normoksi ve hipoksi koşullarındaki Kontrol, 2mM Metformin, 3mM Metformin, 40mM DCA ve 50mM DCA örneklerindeki PDK-1 gen ekspresyon amplifikasyon eğrileri ve ortalama kat değişim (fold change) değerleri sırasıyla (Şekil 21 ve 22) ve Tablo 11'de gösterildi.



Şekil 21. Normoksik koşullarda PDK-1 amplifikasyon eğrileri (n=3).

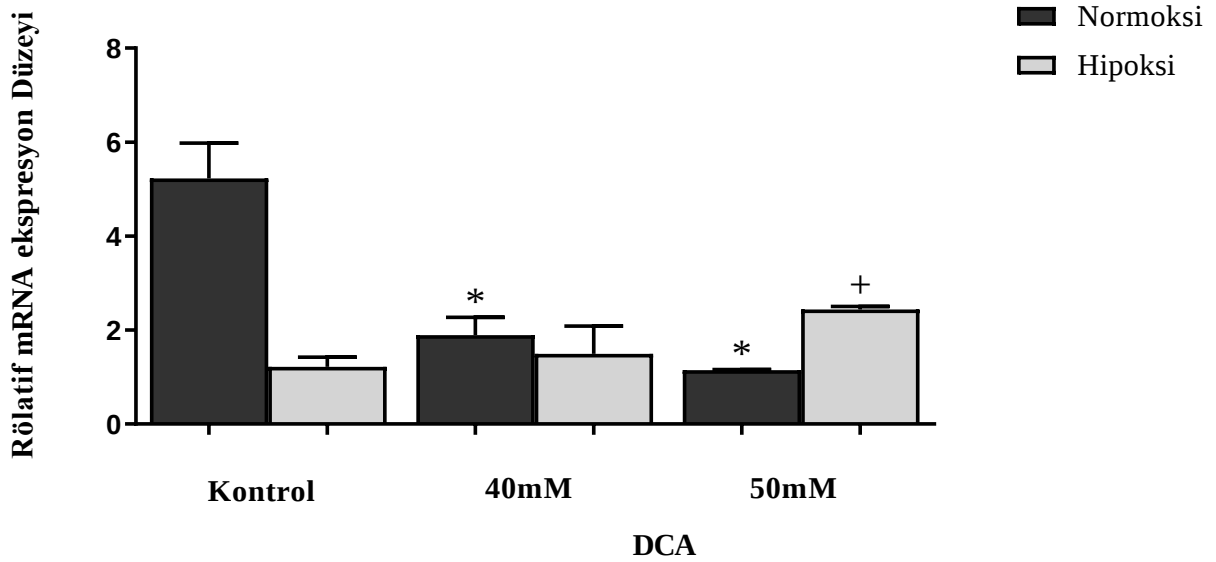


Şekil 22. Hipoksik koşullarda PDK-1 amplifikasyon eğrileri (n=3).

Tablo 11. Normoksik ve hipoksik koşullarda PDK-1 ortalama kat değişim değerleri

Örnekler	Ortalama Kat Değişim Değerleri (Normoksi)			Ortalama Kat Değişim Değerleri (Hipoksi)		
	1.tekrar	2.tekrar	3.tekrar	1.tekrar	2.tekrar	3.tekrar
Kontrol	4,470	1,150	1,397	1,434	1,0253	1,202
2mM Metformin	1,660	1,114	1,295	1,214	1,126	1,477
3mM Metformin	1,480	0,803	1,221	1,530	1,151	1,187
40mM DCA	1,510	1,301	1,101	1,284	2,163	1,040
50mM DCA	1,140	2,565	1,547	3,228	2,483	2,388

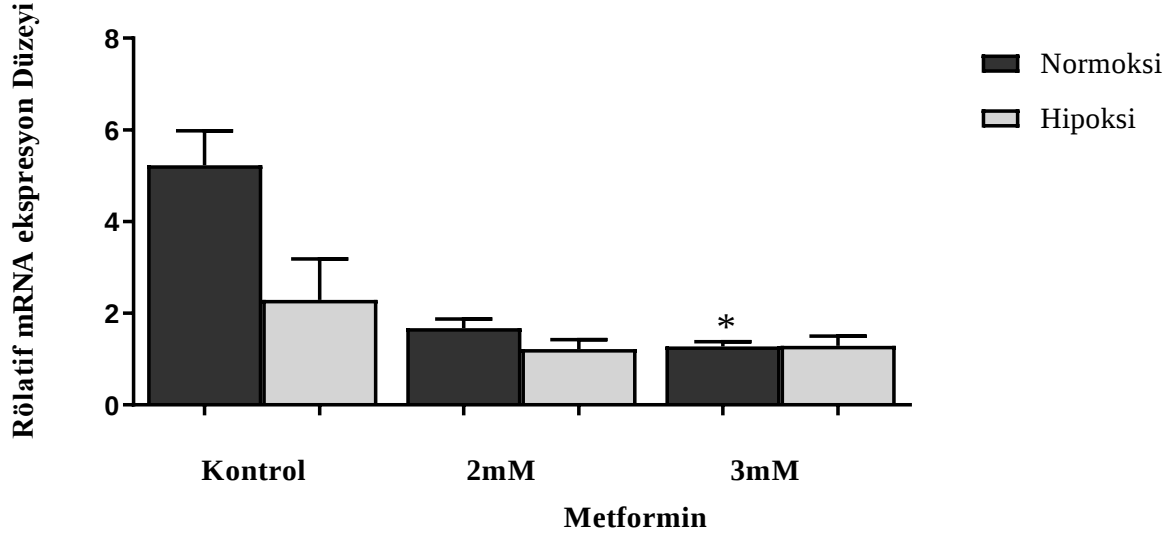
UPCI-SCC-131 hücrelerinde, PDK-1 mRNA ekspresyon düzeyleri açısından normoksik koşullarda 40mM DCA ($p=0,0278$) ve 50mM DCA ($p=0,0160$) konrole kıyasla baskılanırken; hipoksik koşullarda sadece 50mM DCA’da anlamlı bir etki gözlemlendi ($p=0,0354$) (Şekil 23).



Şekil 23. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda 40mM ve 50mM DCA’nın PDK-1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)

İstatistiksel olarak anlamlı: * $p \leq 0,05$; + $p \leq 0,05$

UPCI-SCC-131 hücrelerinde, Metformin uygulaması sonrası PDK-1 mRNA ekspresyon düzeyleri açısından normoksik koşullarda kontrole kıyasla herhangi bir fark belirlenmezken; hipoksik koşullarda sadece 3mM Metformin ile azalma görüldü ($p=0,0371$) (Şekil 24).



Şekil 24. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda 2mM ve 3mM Metformin'in PDK-1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)

4.4. Metformin ve DCA'nın HIF-1 α ve PDK-1 protein ekspresyonları üzerindeki etkileri

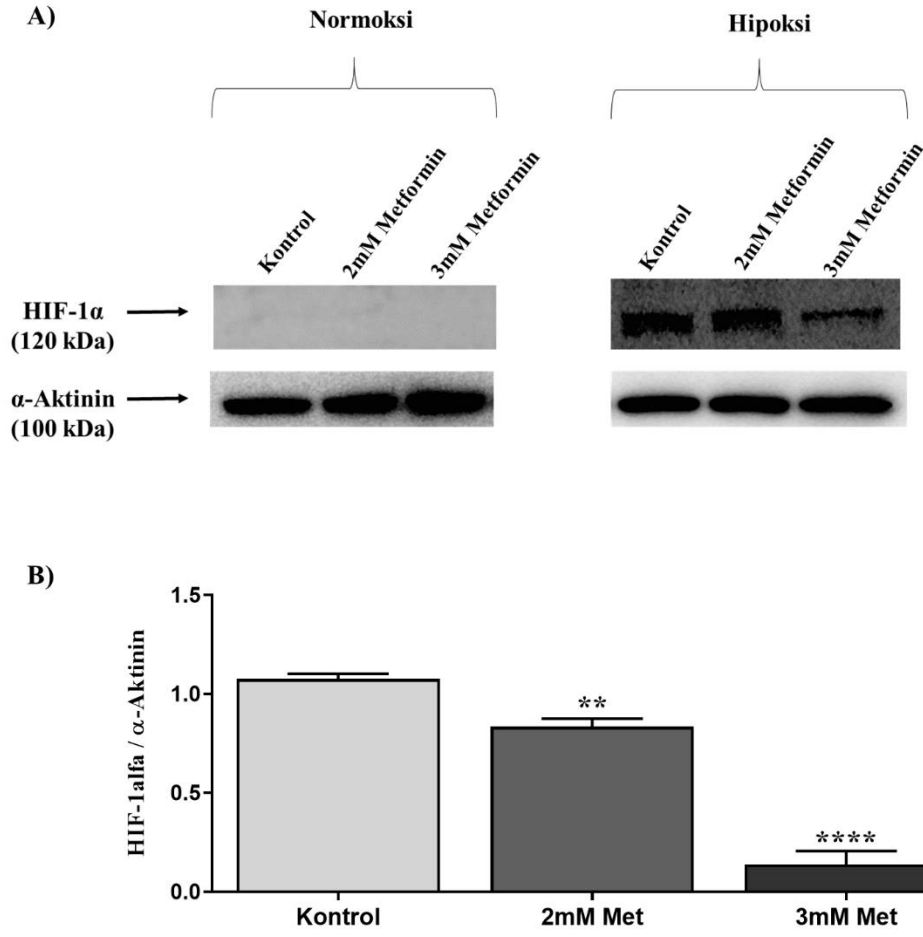
UPCI-SCC-131 hücrelerinde 48 saat boyunca Metformin ve DCA uygulaması sonrası HIF-1 α ve PDK-1 protein ekspresyon düzeyleri incelendi. Western Blot sonrası elde edilen bantların dansitometrik analizleri UVP Bioimaging system with LabWorks 4.6 Image Acquisition Software programı kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için her bantın alan (mm^2) ve optik dansitesi (O.D./mm^2) belirlendi ve bant yoğunluğu; "area density = alan x optik dansite" formülünden hesaplandı. Her gruba ait protein ekspresyon düzeyleri eşlenik α -aktinin protein ekspresyon düzeyine oranlanarak rölatif kantitasyon yapıldı.

4.4.1. HIF-1 α Protein Ekspresyonu

Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde HIF-1 α protein ekspresyon düzeyinin hipoksik koşullarda 2mM ($p=0,0075$) ve 3mM Metformin ($p<0,0001$) ile kontrole göre anlamlı olarak baskılandığı görüldü (Şekil 25). Normoksik koşullarda ise HIF-1 α proteini hızlı bir şekilde degrade olduğu için HIF-1 α 'ye ait bant gözlenmedi ve analiz yapılamadı (Şekil 25 A).

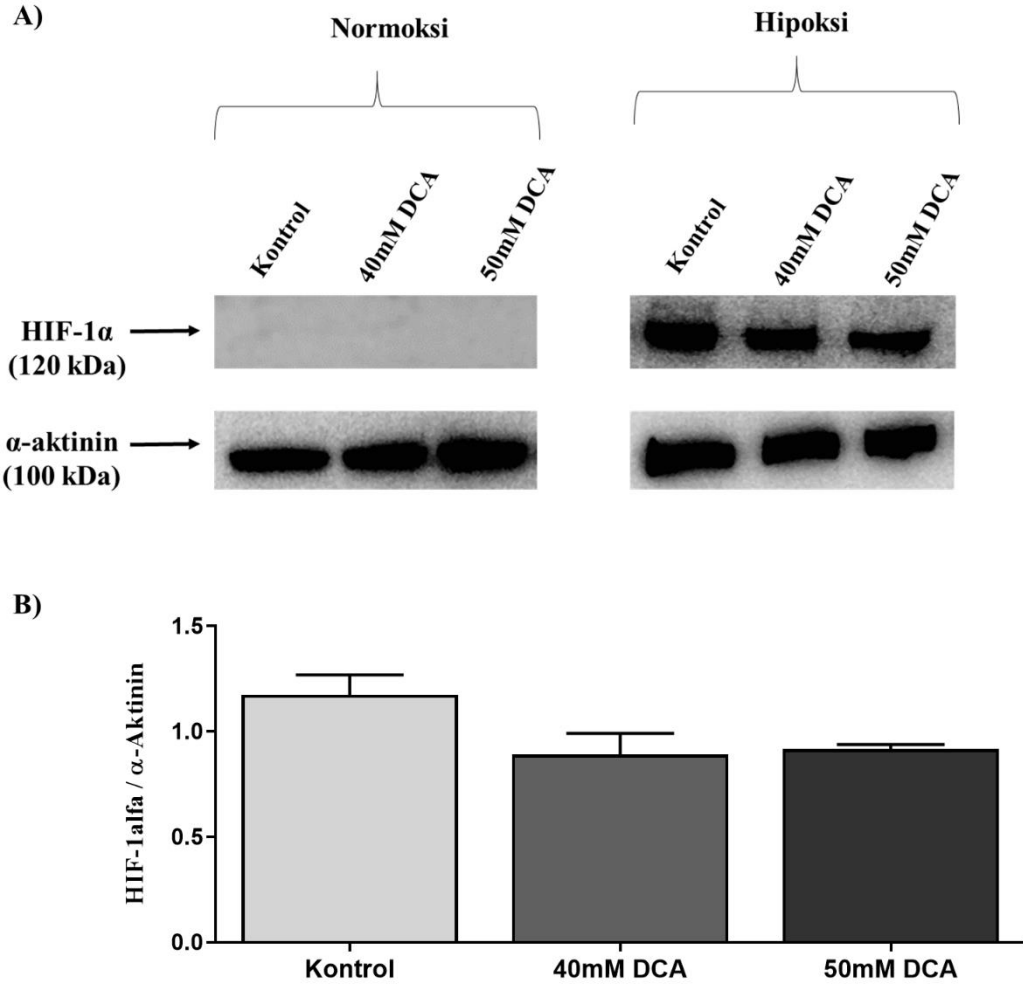
Dikloroasetat uygulanan gruplarda ise HIF-1 α protein ekspresyonu açısından anlamlı fark görülmedi (Şekil 26).

Kombinasyon analiz sisteminden elde edilen normoksi için $F_a=0,25$ (0,7mM Met+14mM DCA) ve $F_a=0,50$ (1mM Met+22mM DCA); hipoksi için $F_a=0,50$ (12mM Met+19mM DCA) ve $F_a=0,75$ (17mM Met+25mM DCA) değerlerine denk gelen Metformin ve DCA konsantrasyonları kombine olarak 48 saat boyunca hücrelere uygulandı. Hipoksik koşullarda her iki doz uygulamasında da bant yoğunluğunda kontrole göre detekte edilemeyecek ölçüde azalma görüldü ($p=0,0240$ ve $p=0,0241$) (Şekil 27).

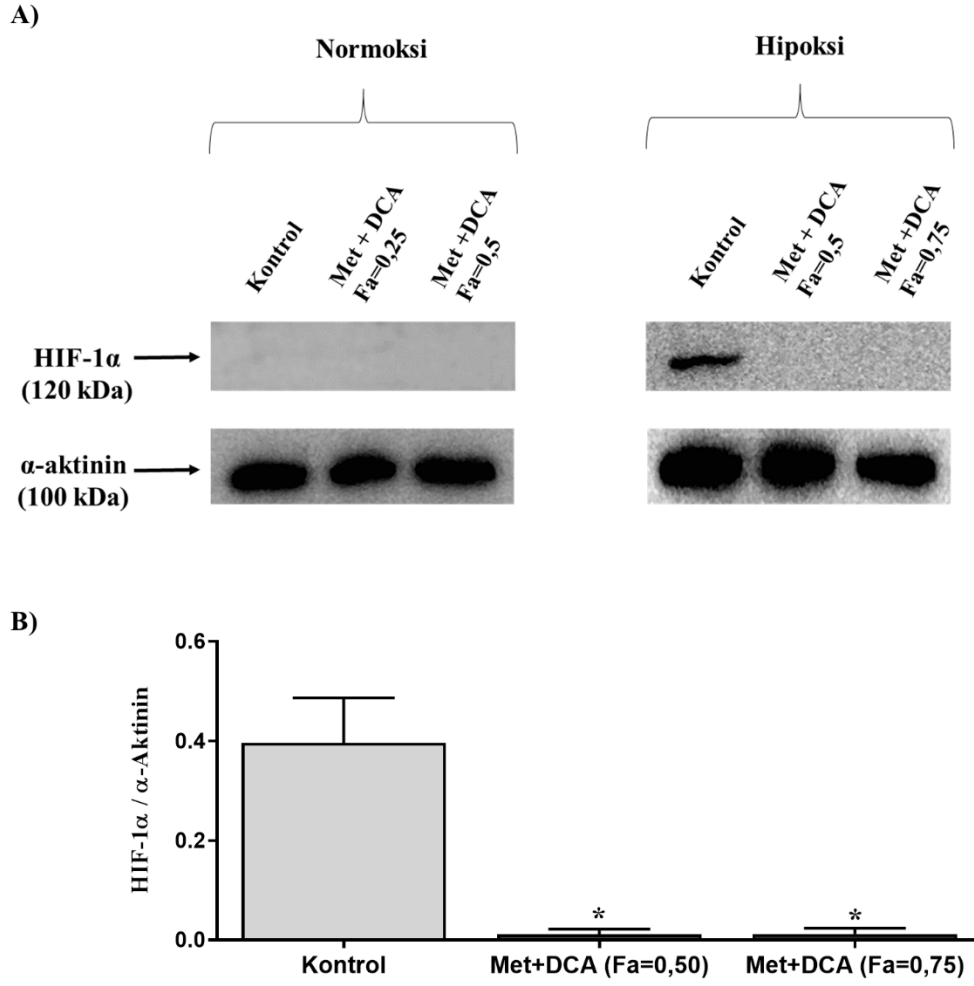


Şekil 25. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde 2mM ve 3mM Metformin'in hipoksik koşullarda HIF-1 α protein ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).

İstatistiksel olarak anlamı: ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$



Şekil 26. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde 40mM ve 50mM DCA'nın hipoksik koşullarda HIF-1 α protein ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).



Şekil 27. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde Metformin ve DCA kombinasyon dozlarının hipoksik koşullarda HIF-1 α protein ekspresyon düzeylerine etkisi.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$

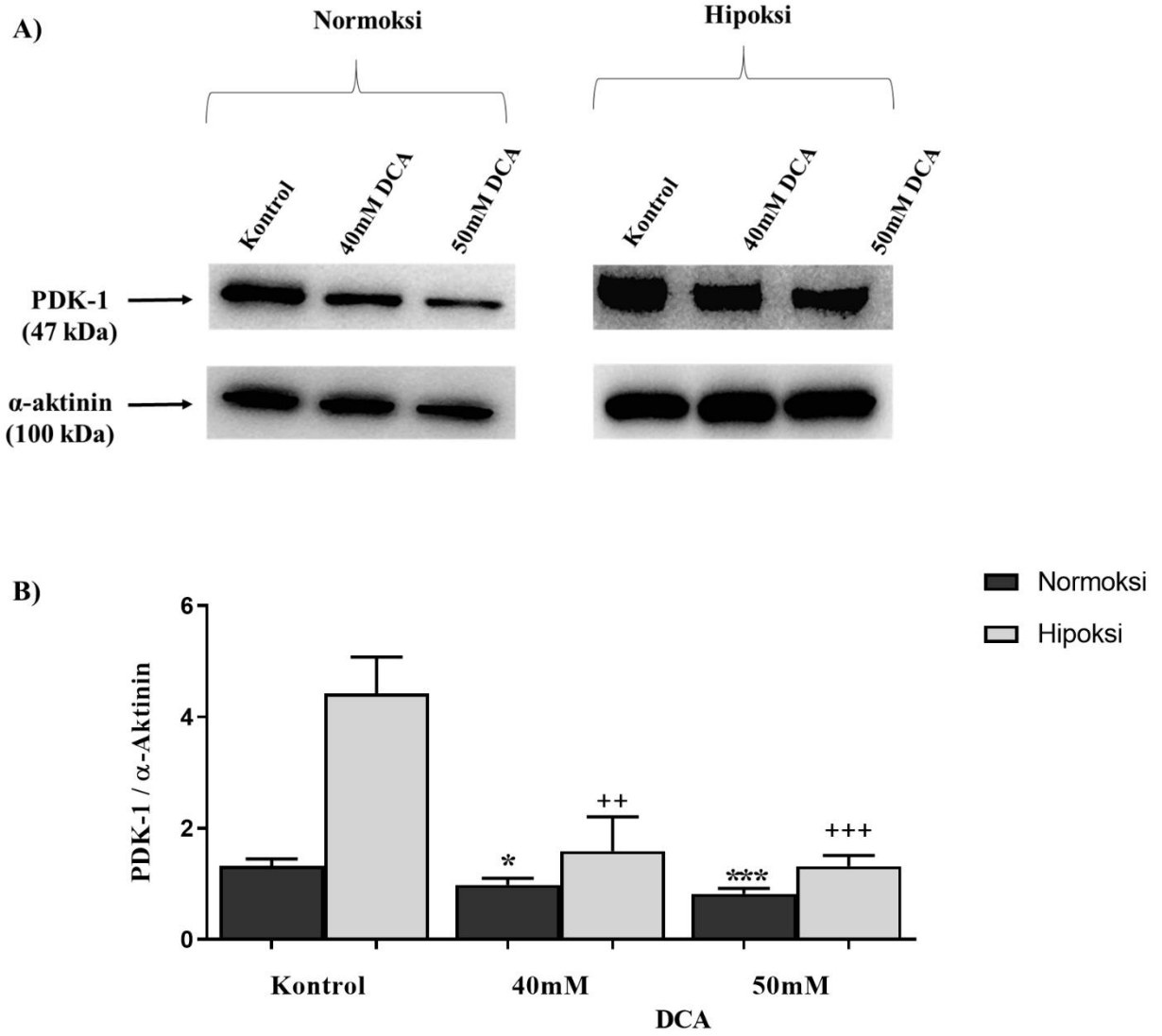
4.4.2. PDK-1 Protein Ekspresyonu

UPCI-SCC-131 hücrelerinde PDK-1 protein ekspresyon düzeyi hem normoksi hem hipoksida 40 mM ($p=0,0011$) ve 50 mM DCA ($p=0,0007$) ile kontrole göre anlamlı olarak baskılandı (Şekil 28). Metformin uygulanan hücrelerde ise normoksik koşullarda 3mM Metformin ($p=0,0148$) ile

kontrole göre anlamlı azalma görüldü (Şekil 29). Hipoksik koşullarda bant yoğunluğunda kontrole göre bir azalma gözükse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

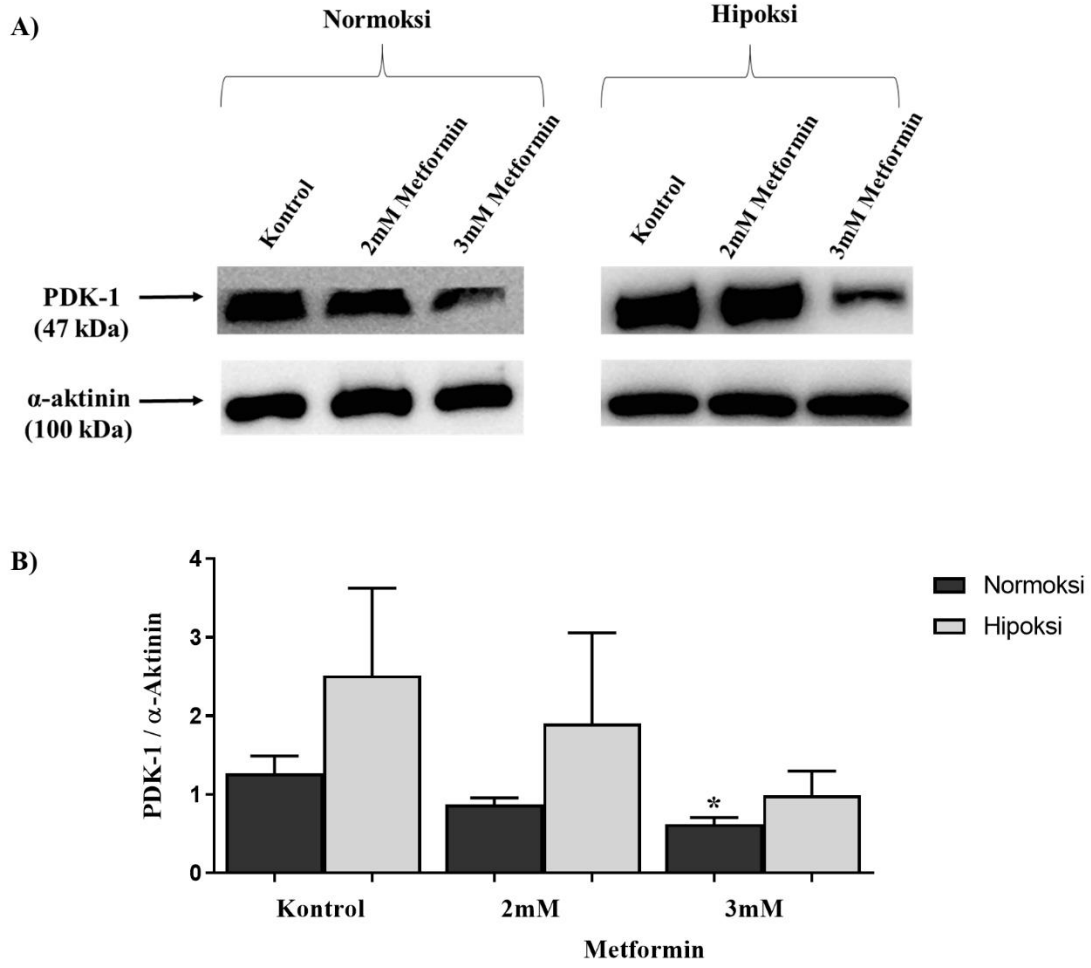
Kombinasyon dozlarında normoksik koşullarda $Fa=0,50$ değerine denk gelen kombinasyon dozlarında anlamlı baskılanma görüldü ($p=0,0159$). Benzer şekilde hipoksik koşullarda da $Fa=0,50$ ve $Fa=0,75$ değerlerine denk gelen kombinasyon dozlarında PDK-1 ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak baskılandı ($p=0,0158$; $p=0,0081$) (Şekil 30).





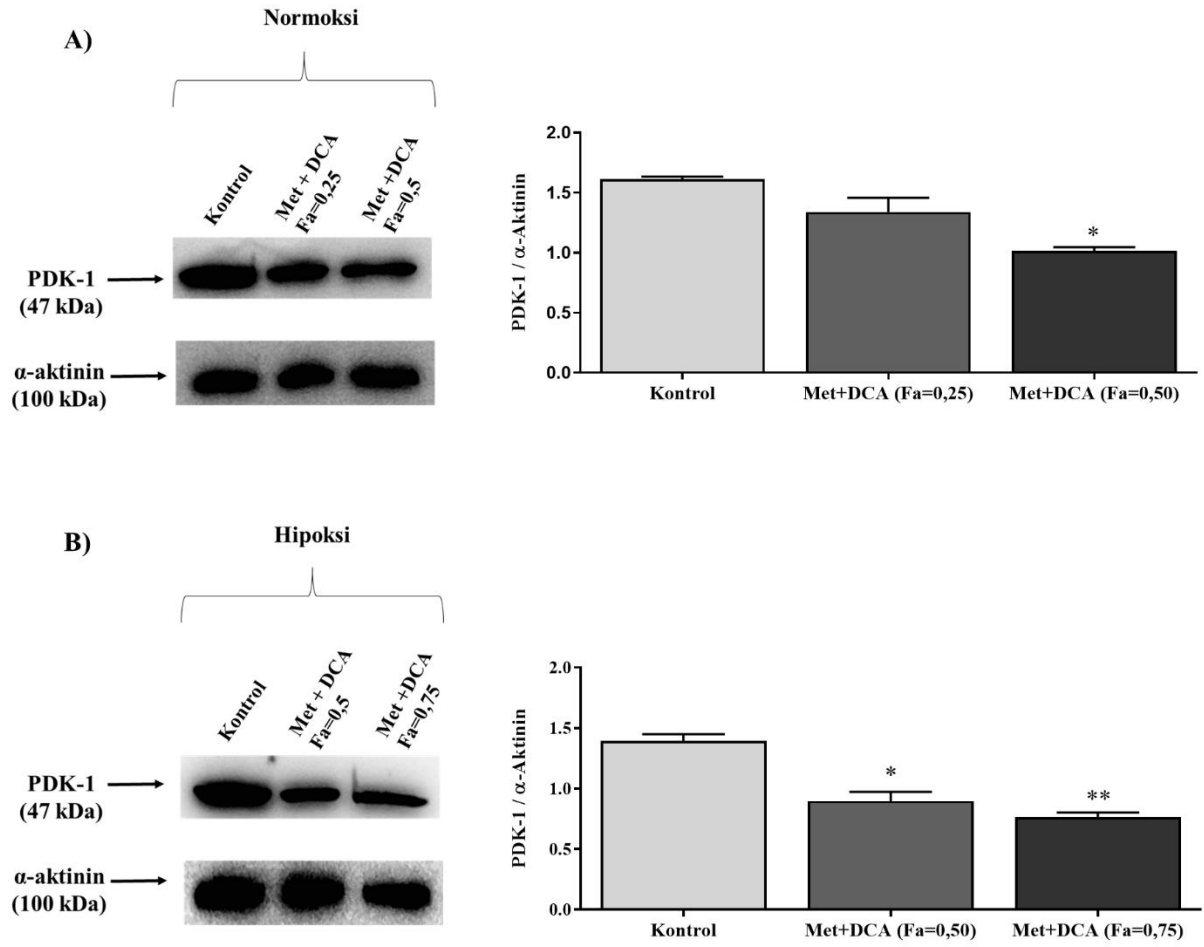
Şekil 28. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde 40mM ve 50mM DCA'nın normoksik ve hipokaik koşullarda PDK-1 protein ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama ±Standart hata).

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; ++ $p \leq 0,01$; +++ $p \leq 0,001$



Şekil 29. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde 2mM ve 3mM Metformin'in normoksik ve hipoksik koşullarda PDK-1 protein ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$

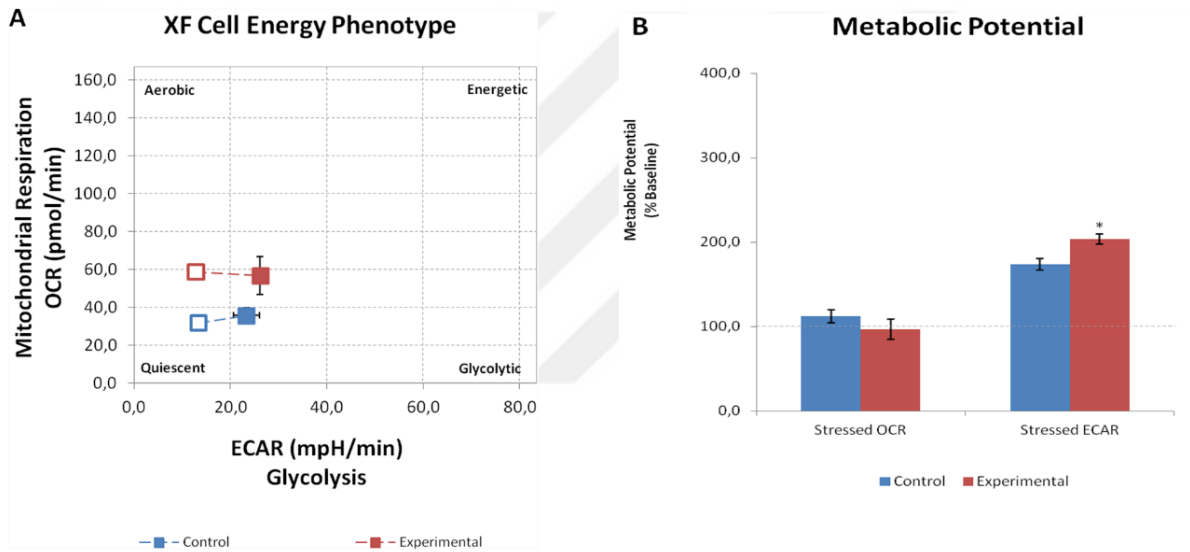


Şekil 30. Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde Metformin ve DCA kombinasyon dozlarının hipoksik koşullarda PDK-1 protein ekspresyon düzeylerine etkisi.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

4.4. Metformin ve DCA'nın Metabolik Akış Üzerindeki Etkileri

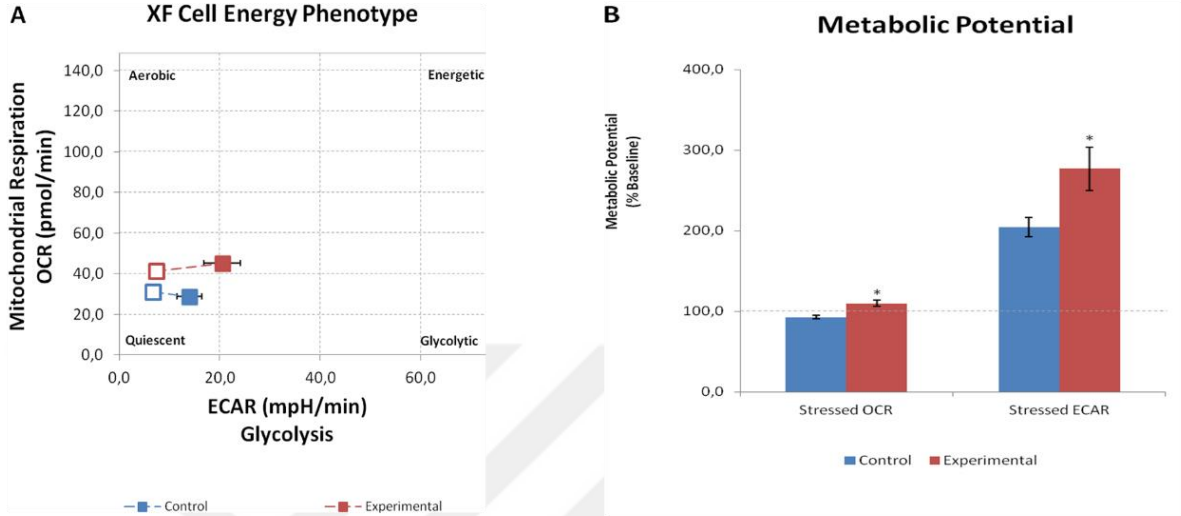
Hücreler 48 saat boyunca 1mM Metformin ile muamele edildiğinde, hücresel enerji fenotipinin glikolitik yola kaydığı, oksijen tüketim hızının (OCR) anlamlı olmasa da azaldığı ($p=0,1970$) ve ekstrasellüler asidifikasyon (ECAR) hızının ise anlamlı olarak arttığı ($p=0,0207$) gözlemlendi (Şekil 31). Bu sonuç mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sisteminin (OXPHOS) azaldığını ve metabolik kaymanın glikoliz yönüne doğru olduğunu göstermiştir.



Şekil 31. UPCI-SCC-131 hücrelerinde 1mM Metformin'in **A)** hücresel enerji fenotipi, **B)** OCR ve ECAR üzerindeki etkileri (n=3).

* istatistiksel olarak anlamlı, $p \leq 0,05$

UPCI-SCC-131 hücrelerini 48 saat boyunca 10mM DCA ile muamele edildiğinde hücresel enerji fenotipinin enerjistik yola kaydığını ve hem OCR'nin ($p=0,0047$) hem de ECAR'nın anlamlı olarak arttığını ($p=0,0167$) belirlendi (Şekil 32). Bu sonuç OXPHOS'un arttığını ve metabolik kaymanın enerjistik yöne olduğunu göstermiştir.



Şekil 32. UPCI-SCC-131 hücrelerinde 10mM DCA'nın **A)** hücresel enerji fenotipi, **B)** OCR ve ECAR üzerindeki etkileri (n=3).

* istatistiksel olarak anlamlı, $p \leq 0,05$

5. TARTIŞMA

Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC), yılda 300.000'in üzerinde yeni vakanın bildirildiği dünya çapında en sık görülen 6. kanser türüdür [76]. Oral kanserler için mevcut tedavi stratejileri cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve/veya platin temelli kemoterapidir. Tarama ve erken tanı konusundaki ilerlemelere rağmen, OSCC hastalarında 5 yıllık sağkalım, bu tümörün tedavilere karşı gösterdiği agresif biyolojisi nedeniyle oldukça yetersizdir. Bu sebeple OSCC hastaları için yenilikçi terapötik tedavilerin araştırılması, FDA onaylı mevcut ilaçların yeniden konumlandırılması ve böylece daha düşük maliyetli ve daha az yan etkileri olan tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada hipoksinin etkili olduğu oral skuamöz hücreli karsinomda (UPCI-SCC-131 hücre hattı) Metformin ve DCA ilaçlarının hücre canlılığına, hücre metabolizmasına ve hipoksi göstergesi olan HIF-1 α ve Piruvat Dehidrogenaz Kinaz-1 (PDK-1) ekspresyonlarına olan etkisi incelendi. Elde edilen hücre canlılığı sonuçlarına göre özellikle HIF-1 α molekülünü doza bağlı olarak inhibe ettiği bilinen Metformin'in OSCC hücre canlılığı üzerindeki IC₅₀ değerleri hipoksik koşullarda normoksiye göre artış gösterdi. Bu durum oksijen düzeyinin %1 olduğu koşullarda normal koşullara kıyasla (oksijen düzeyinin %20 olduğu) UPCI-SCC-131 hücrelerinin Metformin'e verdiği tepkinin yaklaşık 3,5 kat daha dirençli olduğunu göstermektedir. Benzer etki DCA molekülünde de görüldü ve hipoksida elde edilen IC₅₀ değeri normoksiye göre yaklaşık 1.3 kat daha dirençli bulundu. Ancak DCA'nın anti-spesifik olması, düşük potansiyel göstermesi ve yüksek doz gereksiniminden (25-100 mg/kg vücut ağırlığı) dolayı antikanser tedavisine yönelik uygulamalarda terapötik etki göstermesi sınırlıdır. DCA'nın neden olduğu toksik etkiler arasında, ilk metabolit olan oksalik asitin üretilmesinden kaynaklanan nöropatik etkiler, katarakt oluşumu ve testis dejenerasyonu bulunmaktadır. Bu nedenle, OSCC tedavisi için DCA'nın monoterapi olarak kullanılmasından ziyade Metformin gibi diğer metabolik ilaçlarla kombine terapiler olarak kullanılmasının daha güçlü bir etki göstereceğini öngörmekteyiz.

Her iki ilaca ait belirlenen IC₅₀ değerlerinden yola çıkarak CompuSyn software programı kullanılarak kombinasyon analizleri gerçekleştirildi ve ilaçların sinerji gösterip göstermedikleri incelendi. Chou-Talalay kombinasyon indeksine göre analiz edilen Metformin ve DCA kombinasyonunun UPCI-SCC-131 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine güçlü sinerjizm gösterdiği

belirlendi (CI<1). Sonuçlarımızla benzer şekilde Li ve arkadaşları, over kanseri hücrelerinde DCA ve Metformin kombinasyonunun hücre canlılığını %50'ye kadar azaltabildiğini bildirmiştir [68]. Ayrıca, DCA ve Metformin kombinasyonunun sinerjik olarak meme kanseri hücrelerinde oksidatif hasar ile apoptozu indüklediği başka bir çalışma ile gösterilmiştir [67], [77]. Florio ve ark. hem Metformin hem de DCA'nın, paraganglioma otonom sinir sistemi tümörlerinde hücre canlılığını azalttığını ve DCA/Metformin/GW6471 kombinasyonun hücre canlılığı ve klonojenik yetenek üzerinde güçlü sinerjistik etkileri olduğunu rapor etmiştir [78].

Solid tümörler, artan oksijen tüketimi ile anormal tümör vaskülarizasyonundan kaynaklanan yetersiz oksijen iletimi arasındaki dengesizlikten dolayı sıklıkla hipoksik bölgeler içermektedir. İntratümoral hipoksi, invazif ve metastatik bir fenotipe sahip olan metabolizmanın yanı sıra radyasyon ve kemoterapiye direnç ile ilişkilidir. Hipoksi ve tümör progresyonuna karşı hücre sel yanıtta yer alan bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1α'nın, hipoksiyi hedef alan yeni kanser terapötiklerini geliştirmek için potansiyel bir molekül olabileceği düşünülmektedir [79]. Bugüne kadar Metformin ve PX478 gibi HIF-1α'nın direkt veya indirekt inhibisyonundan sorumlu bir çok ajan tanımlanmıştır.

Piruvat Dehidrogenaz Kinaz-1 (PDK-1) molekülü hipokside artış gösteren HIF-1α'nın hedef genlerinden biri olup mitokondriyal solunumun anahtar enzimidir ve Warburg etkisinin başlatılmasıyla ilişkili olup birçok insan tümör örneklerinde overeksprese olarak bulunmuş ve zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Tablo 12) [80].

Tablo 12. Piruvat dehidrogenaz kinaz overekspresyonu ile hasta mortalitesi arasındaki ilişki

<i>Kanser Türü</i>	<i>PDK izoformları</i>	<i>Prognoz</i>	<i>Referans</i>
Meme Kanseri	PDK-2	Zayıf	36
Kolon Kanseri	PDK-3 ve PDK'lar	Zayıf	36,37
Gastrik Kanseri	PDK-1	Zayıf	39
Glioblastoma	PDK'lar	Zayıf	35
Baş ve Boyun Kanseri	PDK-1 ve PDK-2	Zayıf	15,40,41

Hepatosellüler Karsinoma	PDK'lar	Zayıf	42
Akciğer Kanseri	PDK-2 ve PDK'lar	Belirlenmemiş	36,43
Melanoma	PDK-1 ve PDK'lar	Zayıf	14,44
Myeloma	PDK-1	Zayıf	45
Renal Hücre Karsinomu	PDK-1	Korelasyon yok	46

Yüksek PDK-1 aktivasyonu ve glikolitik yollara olan bağıllık artan tümorojenite ile ilişkilidir. Hipoksi indüklenabilir faktör-1α'nın aktivasyonu [58] veya p53 gen kaybı [81] gibi kanser progresyonu açısından kritik olan birçok onkogen veya transkripsiyon faktörünün PDK-1 ekspresyonunu indüklediğine dair çalışmalar vardır. Sonuç olarak kanser hücrelerindeki PDK'ların hedeflenmesi ve metabolizmanın yeniden programlanması antikanser ajanların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada OSCC hücrelerinde hipoksi ve metabolizmayı hedef alan Metformin ile DCA'nın HIF-1α ve PDK-1 ekspresyonları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Real-Time PCR ve Western Blot sonuçları beraber incelendiğinde, hipoksik koşullarda 48 saatlik Metformin uygulanması sonrasında HIF-1α gen ekspresyonu açısından anlamlı bir etki görülmezken; protein ekspresyonunda yaklaşık 3 katlık bir baskılanma belirlendi. Bu durum UPCI-SCC-131 hücrelerinde Metformin'in uygulanan bu dozlardaki etkisinin HIF-1α gen ekspresyonundan ziyade protein ekspresyonuna yansıdığını göstermektedir. Metformin'in HIF-1α üzerindeki bu etkisinin altında yatan mekanizma Metformin'in mitokondriyal kompleks 1 inhibisyonu ile oksijen tüketimi ve ATP üretimini azaltması ve buna bağlı intrasellüler oksijenin artması sonucu prolil hidroksilazın (proteozomal HIF-1α degradasyonunu tetikleyen enzim) aktive olması ile açıklanabilir. Literatürde benzer şekilde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda hepatosellüler karsinomda Metformin'in doza ve zamana bağlı olarak hipoksi indüklü HIF-1α'yı baskıladığı hem Western Blot hem de Immunofloresans yöntemleri ile bildirilmiştir [82], [83]. Erişilebilir literatür incelendiğinde DCA'nın tek başına HIF-1α üzerindeki etkisi pek bilinmemekle birlikte elde edilen sonuçlara göre

her iki koşulda da DCA HIF-1 α mRNA ekspresyonunu artırırken, bu etki protein ekspresyonuna yansımamaktadır. Normoksik koşullarda ise HIF-1 α proteini hızlı bir şekilde proteozomal degradasyona uğradığı için detekte edilecek düzeyde herhangi bir bant gözlenmedi.

PDK-1 ekspresyonu açısından incelendiğinde, UPCI-SCC-131 hücre hattında Metformin ve DCA'nın hem normoksik hem hipoksik koşullarda PDK-1 ekspresyonunu baskıladığı RT-PCR ve Western blot çalışmaları ile gösterildi. Dikloroasetat'ın PDK-1 üzerinde gösterdiği bu baskılanmayı, PDK-1'in inhibe ettiği Piruvat Dehidrogenaz enziminin fosforile/fosforile olmayan formlarının hem gen/protein ekspresyonu hem de aktivite düzeyleri açısından desteklemek planlanan çalışmalarımız arasında yer almaktadır.

Günümüzde FDA-onaylı ilaçların yeniden konumlandırılıp farklı tedavi alanlarında kullanılması oldukça popüler ve ilgi gören bir yaklaşımdır. Yeni bir ilacın tasarlanıp geliştirilmesi ve Faz aşamalarını geçip klinikte uygulanabilir hale gelmesi oldukça uzun süren aşamalardan oluşmaktadır. Bunun yerine hali hazırda FDA onayına sahip ilaçlar hem zaman hem maliyet açısından daha avantajlı olmaktadır. Bu çalışmada Metformin ve DCA kombinasyonunun OSCC hücre canlılığı üzerinde sinerjizm gösterdiği belirlendi. CompuSyn software programından elde edilen Metformin ve DCA'ya ait kombinasyon doz değerleri hücrelere uygulandığında kontrole oranla hem hipoksi hem de normoksi de HIF-1 α ve PDK-1 ekspresyonları açısından baskılanma olduğu Western Blot çalışmaları ile gösterildi. Bu durum OSCC hücrelerinde tek başına etki görülen doz aralığından daha düşük konsantrasyonlar kullanılarak, daha etkili bir tedavi stratejisinin geliştirilebileceğini önermektedir.

Kanser metabolizması yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi açısından umut verici bir alana dönüşmektedir. Normal hücrelere kıyasla, kanser hücreleri metabolik olarak yeniden programlanır, yeterli oksijenlenmenin olduğu koşullarda bile glikolitik yolu kullanır (Warburg etkisi). Kanser hücreleri glikolizin bir sonucu olarak azalan ATP'yi telafi etmek için, glukoz taşıyıcılarını kodlayan genleri (GLUT), piruvat dehidrogenaz kinaz (PDK) ve laktat dehidrogenaz (LDH) gibi glikolitik enzimleri düzenler. Bu yüksek oranda glukoz alımı ve değişmiş metabolizma hücrelerin hipoksik koşullar altında hayatta kalmalarını sağlar. Bu çalışmada OSCC metabolizmasını hedef alan Metformin ve DCA'nın hücresel fenotip üzerindeki etkileri SeaHorse XF Analyzer sistemi kullanılarak gerçek zamanlı olarak incelendi. Metformin'in düşük dozda OSCC hücrelerinde

glikolotilik yolu uyardığı ve ekstrasellüler asidifikasyonu anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi. Literatürde benzer şekilde Metformin'in SKOV3 hücrelerinde (over kanseri hücre hattı) OCR/ECAR oranını azalttığı metabolizma çalışmaları ile rapor edilmiştir [68]. Böylece Metformin'in kompleks 1 inhibisyonu sonucu metabolizmayı glikolitik yola sürüklediği ve laktik asit üretimini arttırarak asidifikasyonu uyardığı bu çalışmalarla desteklendi. Bir sonraki aşama olarak Metformin'in OSCC metabolizmasındaki rolünü daha iyi anlamak için AMPK ve mTOR yolları açısından irdelemek bir sonraki çalışmalarımız arasında yer almaktadır.

Oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde, Metformin'in oluşturduğu bu etkiyi tersine çevirebilecek potansiyele sahip olan DCA'nın ise olasılıkla mitokondriyal fonksiyonları aktive ederek metabolizmayı enerjistik yola sürüklediği metabolik akış deneyleri ile gözlemlendi. Benzer başka bir çalışmada DCA uygulanan MCF7 hücrelerinde (meme hücre hattı) oksijen tüketim hızının (OCR) kontrole kıyasla arttığı, bunun da piruvatın artan oksidasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [67] Yine başka bir çalışmada DCA özellikle mitokondriyal solunum bozukluğu bulunan hücrelerde paklitaksel direncini tersine çevirerek etki etmiş ve glikoliz inhibisyonuna yol açan daha yüksek düzeylerinde, ilaca dirençli olan hücrelerde sitrat birikimine neden olmuştur [84].

Bu çalışmada metabolizma açısından oksijen tüketimi ve oluşan asidifikasyon SeaHorse cihazı kullanılarak hızı incelendi. Bunların yanı sıra laktik asit, glukoz, Ase-CoA, ATP gibi metabolik ürün düzeylerini çalışarak, çıkan sonuçları desteklemek çalışmayı daha ileri bir boyuta taşıyacaktı.

Metformin ve DCA'nın tek ajan olarak kullanılmalarının aksine klinik potansiyelini maksimuma çıkarmayı amaçlayan kombinasyon stratejilerinin daha etkili olabileceği öngörülmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaç kombinasyonlarının anti-tümörjenik davranış göstermesi beklenmektedir. Bu bağlamda, sonuçlarımız, bir antikanser ajan olarak Metformin ve DCA kombinasyonunun potansiyel kullanımının, OSCC tedavisi için umut verici bir terapötik strateji olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Çalışmalarımız oral skuamöz hücreli karsinom (UPCI-SCC-131) hücre hattında hipoksik ve normoksik koşullarda gerçekleştirildi.
2. Bu hücre hattında hem hipoksik hem de normoksik koşullar altında hücre canlılığı çalışmaları ile Metformin ve DCA'ya ait IC50 değerleri hesaplandı.
3. Metformin ve DCA'nın birlikte güçlü bir sinerjizm gösterdiği belirlendi.
4. Metformin uygulaması sonrası HIF-1 α ekspresyon düzeyleri hipoksik koşullarda baskılandı ve metabolizma deneyleri ile hücrelerin glikolitik yola sürüklendiği gözlemlendi.
5. DCA'nın PDK-1 protein düzeylerini baskıladığını ve olasılıkla mitokondriyal fonksiyonları aktive ederek metabolizmayı enerjistik yola sürüklediği belirlendi.
6. Metformin ve DCA kombinasyonunun düşük dozlarda HIF-1 α ve PDK-1 ekspresyonlarını baskıladığı belirlendi.
7. OSCC hücrelerinde belirlenen, istatistiksel olmayan farkların anlamlı olup olmadığını irdelemek amacıyla deneysel tekrar sayılarının artırılması gerektiği öngörüldü.
8. Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan Metformin ve PDK inhibitörü olan DCA kombinasyonunun etkili olması, oral kavite kanserli hastaların tedavisinde bu ilaçların anti-tümörijenik ajan olarak ilaç piyasasında kullanımını bir adım öteye taşıyacaktır.
9. Metformin ve DCA'nın hem eski ilaçların yeni kullanım alanlarında uygulanması, hem de kemo/radyoterapötik ajanlara göre düşük maliyetli olması ve SGK tarafından karşılanması nedeniyle ulusal ekonomiye ve refah düzeyine katkıda bulunabilecektir.

7. KAYNAKLAR

- [1] P. Boyle, "The globalisation of cancer," *The Lancet*, vol. 368, no. 9536, pp. 629–630, 2006.
- [2] T. Kirita and K. Omura, *Oral cancer: diagnosis and therapy*. Springer, 2015.
- [3] O. Warburg, "On the origin of cancer cells," *Science*, 1956.
- [4] G. Q. Zhu *et al.*, "Hypoxia inducible factor 1 α and hypoxia inducible factor 2 α play distinct and functionally overlapping roles in oral squamous cell carcinoma," *Clinical Cancer Research*, 2010.
- [5] P. O. De Lima, C. C. Jorge, D. T. Oliveira, and M. C. Pereira, "Hypoxic condition and prognosis in oral squamous cell carcinoma," *Anticancer Research*. 2014.
- [6] S. E. Inzucchi *et al.*, "Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach.," *Diabetologia*, 2015.
- [7] M. Grzybowska, J. Bober, and M. Olszewska, "Metformina – mechanizmy działania i zastosowanie w terapii cukrzycy typu 2 [Metformin - mechanisms of action and use for the treatment of type 2 diabetes mellitus]," *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2011.
- [8] D. B. S. *et al.*, "Metformin: Multi-faceted protection against cancer," *Oncotarget*. 2011.
- [9] M. Kunkel *et al.*, "Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma," *Cancer*, 2003.
- [10] N. W. Johnson, P. Jayasekara, A. A. Amarasinghe, and K. Hemantha, "Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: Epidemiology and aetiology," *Periodontology 2000*, 2011.
- [11] A. Sahu and C. M. Krishna, "Optical diagnostics in oral cancer: An update on Raman spectroscopic applications," *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2017.
- [12] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2014," *CA: A Cancer Journal*

for Clinicians, 2014.

- [13] S. Marur and A. A. Forastiere, “Head and neck cancer: Changing epidemiology, diagnosis, and treatment,” in *Mayo Clinic Proceedings*, 2008.
- [14] D. G. Pfister *et al.*, “Head and neck cancers, version 2.2014,” *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2014.
- [15] B. MJ and H. WC, “Why don’t we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression.,” *Nature medicine*, 2011.
- [16] P. K., F. F., S. A., and J. D., “Targeting the tumor microenvironment: Focus on angiogenesis,” *Journal of Oncology*, 2012.
- [17] J. A. Joyce, “Therapeutic targeting of the tumor microenvironment,” *Cancer Cell*, 2005.
- [18] F. Danhier, O. Feron, and V. Préat, “To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery,” *Journal of Controlled Release*. 2010.
- [19] G. L. Semenza, “Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics.,” *Oncogene*, 2010.
- [20] W. R. Wilson and M. P. Hay, “Targeting hypoxia in cancer therapy,” *Nature Reviews Cancer*. 2011.
- [21] A. L. Harris, “Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth,” *Nature Reviews Cancer*, 2002.
- [22] K. L. Covello and M. C. Simon, “HIFs, Hypoxia, and Vascular Development,” *Current Topics in Developmental Biology*, 2004.
- [23] E. B. Rankin and A. J. Giaccia, “The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis,” *Cell Death and Differentiation*. 2008.
- [24] G. L. Semenza, “Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1,” *Seminars in Cancer Biology*. 2009.

- [25] R. K. Bruick and S. L. McKnight, "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF," *Science*, 2001.
- [26] W. G. Kaelin and P. J. Ratcliffe, "Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway," *Molecular Cell*. 2008.
- [27] E. J. Moon *et al.*, "NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010.
- [28] L. E. Huang, R. S. Bindra, P. M. Glazer, and A. L. Harris, "Hypoxia-induced genetic instability - A calculated mechanism underlying tumor progression," *Journal of Molecular Medicine*. 2007.
- [29] C. A. *et al.*, "Expression of hypoxia-inducible factors is correlated with the presence of a fibrotic focus and angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinomas," *Histopathology*, 2005.
- [30] L. W. S. Finley *et al.*, "SIRT3 Opposes Reprogramming of Cancer Cell Metabolism through HIF1 α Destabilization," *Cancer Cell*, 2011.
- [31] P. Swietach, R. D. Vaughan-Jones, and A. L. Harris, "Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9," *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007.
- [32] X. Lu and Y. Kang, "Hypoxia and hypoxia-inducible factors: Master regulators of metastasis," *Clinical Cancer Research*. 2010.
- [33] B. J. Moeller, R. A. Richardson, and M. W. Dewhirst, "Hypoxia and radiotherapy: Opportunities for improved outcomes in cancer treatment," *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007.
- [34] C. Fischer *et al.*, "Panobinostat reduces hypoxia-induced cisplatin resistance of non-small cell lung carcinoma cells via HIF-1 α destabilization," *Molecular Cancer*, 2015.
- [35] M. B. Gariboldi *et al.*, "The BH3-mimetic obatoclax reduces HIF-1 α levels and HIF-1 transcriptional activity and sensitizes hypoxic colon adenocarcinoma cells to 5-

fluorouracil,” *Cancer Letters*, 2015.

- [36] M. Jiao and K. J. Nan, “Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1 α pathway contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in hepatocellular carcinoma,” *International Journal of Oncology*, 2012.
- [37] W. Su *et al.*, “Noscapine sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin through inhibition of HIF-1 α ,” *Cancer Letters*, 2011.
- [38] B. Viollet, B. Guigas, N. S. Garcia, J. Leclerc, M. Foretz, and F. Andreelli, “Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview,” *Clinical Science*, 2011.
- [39] A. Luengo, L. B. Sullivan, and V. G. V. Heiden, “Understanding the complex-I-ty of metformin action: Limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy,” *BMC Biology*, 2014.
- [40] V. C. Sandulache, J. S. Hamblin, H. D. Skinner, M. W. Kubik, J. N. Myers, and J. P. Zevallos, “Association between metformin use and improved survival in patients with laryngeal squamous cell carcinoma,” *Head and Neck*, 2014.
- [41] Z. J. Zhang and S. Li, “The prognostic value of metformin for cancer patients with concurrent diabetes: A systematic review and meta-analysis,” *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2014.
- [42] C. J. Currie, C. D. Poole, S. Jenkins-Jones, E. A. M. Gale, J. A. Johnson, and C. L. Morgan, “Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes: Impact of metformin on survival,” *Diabetes Care*, 2012.
- [43] W. W. Wheaton *et al.*, “Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis,” *eLife*, 2014.
- [44] T. A. Guimarães *et al.*, “Metformin increases PDH and suppresses HIF-1 α ; under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma,” *Oncotarget*, 2016.
- [45] R. K. Hanna *et al.*, “Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer

cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway,” in *Gynecologic Oncology*, 2012.

- [46] D. Iliopoulos, H. A. Hirsch, and K. Struhl, “Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types,” *Cancer Research*, 2011.
- [47] S. Jiralerspong *et al.*, “Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, 2009.
- [48] H. A. Hirsch, D. Iliopoulos, P. N. Tsichlis, and K. Struhl, “Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission,” *Cancer Research*, 2009.
- [49] G. Z. Rocha *et al.*, “Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth,” *Clinical Cancer Research*, 2011.
- [50] X. Qi *et al.*, “Metformin sensitizes the response of oral squamous cell carcinoma to cisplatin treatment through inhibition of NF- κ B/HIF-1 α signal axis,” *Scientific reports*, vol. 6, p. 35788, Oct. 2016.
- [51] K. Harada, T. Ferdous, T. Harada, and Y. Ueyama, “Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting the Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma,” *International Journal of Oncology*, 2016.
- [52] T. Griss *et al.*, “Metformin Antagonizes Cancer Cell Proliferation by Suppressing Mitochondrial-Dependent Biosynthesis,” *PLoS Biology*, 2015.
- [53] R. Hussien and G. A. Brooks, “Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines,” *Physiological Genomics*, 2010.
- [54] P. P. Hsu and D. M. Sabatini, “Cancer cell metabolism: Warburg and beyond,” *Cell*, 2008.
- [55] F. Petrelli *et al.*, “Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: A systematic review and meta-analysis of 76 studies,” *Acta Oncologica*. 2015.

- [56] R. A. Gatenby and R. J. Gillies, "Why do cancers have high aerobic glycolysis?," *Nature Reviews Cancer*, 2004.
- [57] G. L. Semenza, "Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine," *Cell*, 2012.
- [58] J. W. Kim, I. Tchernyshyov, G. L. Semenza, and C. V. Dang, "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia," *Cell Metabolism*, 2006.
- [59] T. R. Knoechel *et al.*, "Regulatory roles of the N-terminal domain based on crystal structures of human pyruvate dehydrogenase kinase 2 containing physiological and synthetic ligands," *Biochemistry*, 2006.
- [60] Z. Alkarakooly, Q. A. Al-Anbaky, K. Kannan, and N. Ali, "Metabolic reprogramming by Dichloroacetic acid potentiates photodynamic therapy of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells," *PLoS ONE*, 2018.
- [61] B. M. Madhok, S. Yeluri, S. L. Perry, T. A. Hughes, and D. G. Jayne, "Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells," *British Journal of Cancer*, 2010.
- [62] J. E. Han *et al.*, "Inhibition of HIF1 α and PDK Induces Cell Death of Glioblastoma Multiforme," *Experimental Neurobiology*, 2017.
- [63] V. Ruggieri *et al.*, "Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: a metabolic perspective of treatment," *Oncotarget*, 2015.
- [64] M. Wang, C. Liao, Y. Hu, Qinwen Pan, and J. Jiang, "Sensitization of breast cancer cells to paclitaxel by dichloroacetate through inhibiting autophagy," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017.
- [65] X. X. Stander, B. A. Stander, and A. M. Joubert, "In vitro effects of an in silico-modelled 17 β -estradiol derivative in combination with dichloroacetic acid on MCF-7 and MCF-12A cells," *Cell Proliferation*, 2011.
- [66] J. L. Roh, J. Y. Park, E. H. Kim, H. J. Jang, and M. Kwon, "Activation of mitochondrial

oxidation by PDK2 inhibition reverses cisplatin resistance in head and neck cancer,” *Cancer Letters*, 2016.

- [67] A. B. Haugrud, Y. Zhuang, J. D. Coppock, and W. K. Miskimins, “Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells,” *Breast Cancer Research and Treatment*, 2014.
- [68] B. Li *et al.*, “Dichloroacetate and metformin synergistically suppress the growth of ovarian cancer cells,” *Oncotarget*, 2016.
- [69] J. M. Davis, “Basic Cell Culture: A practical approach,” *The practical approach series*. 1996.
- [70] N. Ke, X. Wang, X. Xu, and Y. A. Abassi, “The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2011.
- [71] M. V Berridge, A. S. Tan, K. D. McCoy, and R. Wang, “The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts,” *Biochemica*, 1996.
- [72] T. C. Chou and P. Talalay, “Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem,” *Trends in Pharmacological Sciences*, 1983.
- [73] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays,” *Journal of Immunological Methods*, 1983.
- [74] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,” *Nature*, 1970.
- [75] B. T. Kurien and R. H. Scofield, “Protein blotting: a review,” *Journal of Immunological Methods*, 2003.
- [76] M. L. Durr, A. Van Zante, D. Li, E. J. Kezirian, and S. J. Wang, “Oral tongue squamous cell carcinoma in never-smokers: Analysis of clinicopathologic characteristics and survival,” *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*, 2013.
- [77] S. E. Hong *et al.*, “Targeting HIF-1 α is a prerequisite for cell sensitivity to dichloroacetate

- (DCA) and metformin,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016.
- [78] R. Florio *et al.*, “Effects of dichloroacetate as single agent or in combination with GW6471 and metformin in paraganglioma cells,” *Scientific Reports*, 2018.
 - [79] A. Rapisarda and G. Melillo, “Combination Strategies Targeting Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) for Cancer Therapy,” in *The Tumor Microenvironment*, R. G. Bagley, Ed. New York, NY: Springer New York, 2010, pp. 3–21.
 - [80] W. Zhang, S. L. Zhang, X. Hu, and K. Y. Tam, “Targeting tumor metabolism for cancer treatment: Is pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs) a viable anticancer target?,” *International Journal of Biological Sciences*. 2015.
 - [81] T. Contractor and C. R. Harris, “p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2,” *Cancer Research*, 2012.
 - [82] X. Zhou *et al.*, “Metformin suppresses hypoxia-induced stabilization of HIF-1 α ; through reprogramming of oxygen metabolism in hepatocellular carcinoma,” *Oncotarget*, 2015.
 - [83] C. H. Chen *et al.*, “Metformin disrupts malignant behavior of oral squamous cell carcinoma via a novel signaling involving Late SV40 factor/Aurora-A,” *Scientific Reports*, 2017.
 - [84] X. Zhou *et al.*, “Dichloroacetate restores drug sensitivity in paclitaxel-resistant cells by inducing citric acid accumulation,” *Molecular Cancer*, 2015.

8. EKLER

EK-1 ETİK KURUL BELGESİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
ÇAĞIRI ADRESİ	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43 etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	2775-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Hipoksik Mikroçevresinde HIF-1α ile İlişkili Mitokondriyal Glukoz Metabolizmasının Rolünün İncelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Gülgün OKTAY Tıbbi Biyokimya A.D.
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/20-32	Tarih:21.07.2016
	Prof.Dr.Gülgün OKTAY'ın sorumlusu olduğu "Baş ve Boyun Kanseri Hücrelerinin Hipoksik Mikroçevresinde HIF-1α ile İlişkili Mitokondriyal Glukoz Metabolizmasının Rolünün İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Reyhan</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katlıbaşı</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ece</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Vesile</i>
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katlıbaşı</i>
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>M. Gülmüştekin</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ayşe</i>
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Nihal</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katlıbaşı</i>
Doç.Dr.Şeyda SEREN İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Şeyda</i>
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Sefa</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katlıbaşı</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Ahmet</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Mehmet</i>

EK-2 ARBİS ÖZGEÇMİŞ

ŞENİZ İNANÇ SÜRER

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası 13183314598
Doğum Tarihi 17/05/1985
İletişim Adresi Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Telefon (555) 603 29 28
E-posta seniz.inanc@gmail.com
Web Adresi

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2013 - Şu Anda (5 yıl 10 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOKİMYA (DR)

01 Eylül 2009 - 01 Şubat 2013 (3 yıl 6 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Matris Metalloproteinaz -1, -8 Ve -13 Aktivitelerinin Belirlenmesi
Amaçla Kollajen Zimografi Yöntemi'nin Standardizasyonu
Tez Konusu: Bu Çalışmada; Kollajen Zimografi Tekniğinin Standardizasyonu
Sağlanarak Kollajenazların (mmp-1, -8 Ve -13) Aktivitelerinin Kantitasyonu
Amaçlanmıştır. Kollajen Zimografi Yönteminde Substrat Olarak Kullanılan Tip I
Kollajen Sıçan Kuyruk Tendonlarından Ekstrakte Edilerek Saflaştırılmıştır. İnsan
Rekombinant Kollajenazları Kullanılarak Kollajen Zimografi Tekniği Standardize
Edilmiştir, Gelecekte Yapılacak Olan Projelerimizde Kullanmak Üzere Standart
Grafikleri Oluşturulmuştur.
Tarih: 2011
Tez Danışmanı: GÜLGÜN OKTAY
Diploma Numarası: 949
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.19 / 4.0

01 Eylül 2004 - 01 Temmuz 2009 (4 yıl 11 ay)
Lisans, İkinci Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA BÖLÜMÜ
Diploma Numarası: 15029

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

S. INANC, D. KELES & G. OKTAY, An improved collagen zymography approach for evaluating the collagenases MMP-1, MMP-8, and MMP-13, BIOTECHNIQUES, 2017, 0736-6205, 63, 4, 174-180.

M. AKHİSAROĞLU, D. KELES, F. HOSGORLER, S. TANRİVERDİ-AKHİSAROĞLU, S. INANC, U. CANKURT, Z. AYDOĞDU, A. D. UCAR, O. CETİNAYAK, G. OKTAY & S. G. ARDA, Anti-inflammatory and Anti-apoptotic Effect of Valproic Acid and Doxycycline Independent from MMP Inhibition in Early Radiation Damage, BALKAN MEDICAL JOURNAL, 2016, 2146-3123, 33, 5, 488-495.

Bildiriler

Ş. İNANÇ SÜRER, E. ÇAKIROĞLU, K. SÖMEK, G. KARACA, D. AKÇAY, L. Z. ARICAN ALICIKUŞ, H. ELLİDOKUZ, G. ESKİİZMİR, K. YAPICI & Y. BAŞBINAR, Gold Nanoparticles: A Novel Nanoparticle For Radiosensitization In Oral Cavity Cancer, Poster Sunumu, Euromedlab, 11 Temmuz 2017, 15 Temmuz 2019, 492 - 492.

Y. BAŞBINAR, G. ESKİİZMİR, Ş. İNANÇ SÜRER, T. B. ELÇİTEPE, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, L. Z. ARICAN ALICIKUŞ, D. AKÇAY & K. YAPICI, Radyoterapi Dirençli Oral Kavite Kanser Hücre Hattında İlaç Taşıyıcı Altın Nanopartiküllerin Etkisi, Poster Sunumu, Ulusal Kanser Kongresi, 19 Nisan 2017, 23 Nisan 2019, 305 - 305.

F. TOKSÖZ, T. SEVER, Ş. İNANÇ SÜRER, H. E. MEÇO, H. KURTER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, Y. BAŞBINAR & H. N. OLGUN, The Effect Of Normoxic/hypoxic Microenvironment On Hypoxia-inducible Factor 1 Mechanism In Neuroblastoma, Tam Metin Bildiri, Uluslararası Hipokrat Tıp Ve Sağlık Bilimleri Kongresi, 01 Mart 2019, 03 Mart 2019, 102 - 111.

Ş. İNANÇ SÜRER, D. KELEŞ BARTIK & G. OKTAY, Effects Of Metformin And Dichloroacetate On Mitochondrial Energy Metabolism In Oral Cavity Cancer Cells, Poster Sunumu, Febs Congress, 07 Temmuz 2018, 12 Temmuz 2018, 334 - 334.

Y. BAŞBINAR, Ş. İNANÇ SÜRER, T. B. ELÇİTEPE, D. AKÇAY, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, L. Z. ARICAN ALICIKUŞ, G. ESKİİZMİR & K. YAPICI, Silver Nanoparticles: A Novel Nano-chemo-radiotherapy Agent For Treatment Of Radiotherapy Resistant Oral Cavity Cancer, Poster Sunumu, Eacr Oxford Congress, 12 Mart 2018, 14 Mart 2018, 45 - 45.

G. ESKİİZMİR, Y. BAŞBINAR, Ş. İNANÇ SÜRER, S. DUMAN, G. ÇALIBAŞI KOÇAL & K. YAPICI, Oral Kavite Kanserinde Lazer Uyarılmalı Karbon Nanotüp Nanoşerit-sisplatin Nano-ilacın Kemo-fototermal Etkinliğinin Araştırılması, Sözlü Sunum, 39. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz Ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, 08 Kasım 2017, 12 Kasım 2017.

G. ESKİİZMİR, Y. BAŞBINAR, Ş. İNANÇ SÜRER, S. DUMAN, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, G. KARACA & K. YAPICI, Oral Kavite Kanserinde Pulsed Lazerle Uyarılmış Aktif Hedeflenmiş Grafen Oksitsetüksimab Nano-ilacın Kompleksinin Yaratıldığı Kemofototermal Etkinin İncelenmesi, Sözlü Sunum, Ulusal Kanser Kongresi, 19 Nisan 2017, 23 Nisan 2017, 225 - 225.

G. ESKİİZMİR, Y. BAŞBINAR, Ş. İNANÇ SÜRER, K. SÖMEK, G. ÇALIBAŞI KOÇAL & K. YAPICI, Graphene-based Nanoparticles: A Novel Nano-drug For Cancer, Sözlü Sunum, Febs, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016.

D. KELEŞ BARTIK, G. OKTAY, M. SİPAHI, Ş. İNANÇ SÜRER & M. DJAMGÖZ, The Effect Of Voltage-gated Sodium Channel On Matrix Metalloproteinase Expression And Activity In Human Breast Cancer Cells, Poster Sunumu, Febs, 04 Eylül 2015, 09 Eylül 2015, 318 - 318.

D. KELEŞ BARTIK, M. SİPAHİ, Ş. İNANÇ SÜRER & G. OKTAY, Rhoc-gtpase Promotes Colon Cancer Cell Invasion In Matrix Metalloproteinase Dependent Manner, Poster Sunumu, Febs Congress, 30 Ağustos 2014, 04 Eylül 2014, 500 - 500.

Ş. İNANÇ SÜRER, D. KELEŞ BARTIK & G. OKTAY, Standardization Of Collagen Zymography Method For Determining Matrix Metalloproteinases -1, -8 And -13 Activities, Poster Sunumu, Febs/ Embo Congress, 30 Ağustos 2014, 04 Eylül 2014.

M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, Ş. İNANÇ SÜRER, F. TOKSÖZ, R. SALIMI, D. HARMANCI KARAGÜLLE, R. SAFARI, F. G. KIRKALI, İ. ASTARCIOĞLU & G. AKDOĞAN, An Outlook To Journal Publications From Theses Of Msc And Phd Students At Dokuz Eylül University Graduate School Of Health Sciences, Poster Sunumu, Febs Congress, 06 Temmuz 2013, 11 Temmuz 2013, 625 - 626.

Ş. İNANÇ SÜRER, D. KELEŞ BARTIK & G. OKTAY, Matriks Metalloproteinaz-1, -8 Ve -13 Aktivasyonlarının Belirlenmesi Amacıyla Kollajen Zimografi Yönteminin Standardizasyonu, Sözlü Sunum, Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 13 Aralık 2012, 16 Aralık 2012.

D. KELEŞ BARTIK, Ş. İNANÇ SÜRER, A. E. CANDA, M. C. TERZİ, M. SİPAHİ, M. FÜZUN & G. OKTAY, The Expression And Activity Levels Of Rhoc, Rock-ı, Rock-ıı And Mmp-2 In Colorectal Cancer, Poster Sunumu, Febs Congress, 04 Eylül 2012, 09 Eylül 2012, 539 - 539.

Projeler

1001 - ARAŞTIRMA, BURSIYER, Oral Kavite Kanserinde Metformin Ve Dikloroasetat'ın Mitokondriyal Enerji Metabolizması Ve Setüksimab Kemo-duyarlılığı Üzerine Sinerjistik Etkisinin Değerlendirilmesi: İlaç Yeniden Konumlandırma, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Baş Ve Boyun Kanser Hücrelerinin Hipoksik Mikroçevresinde Hıf-1? İle İlişkili Mitokondriyal Glukoz Metabolizmasının Rolünün İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TÜBİTAK 1001/3501/1003, BURSIYER, Ağız Boşluğu Ve Larenks Kanseri Hücre Hatlarında Radyoterapi İle Birlikte Altın, Gümüş Ve Platin Nanotaşıyıcılarla Kombine Sisplatin Etkinliğinin Karşılaştırılmalı İncelemesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) , 01 Eylül 2015, 01 Mart 2018.

3001 - BAŞLANGIÇ AR-GE, DİĞER, Oral Kavite Kanserinin Tedavisinde Sisplatin Yüklenmiş Grafen Tabanlı Nanomalzemelerle Kombine Edilen Pulsed Lazer Hipertermisinin Etkisinin Değerlendirilmesi: Bir In Vitro Çalışma, Yürütülen Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2015, 01 Mayıs 2017.

Ödüller

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Bildiri Sertifikası / Birincilik Ödülü, Oral Kavite Kanserinde Lazer Uyarımlı Karbon Nanotüp Nanoşerit-sisplatin Nano-ilacın Kemo-fototermal Etkinliğinin Araştırılması, Ödül Alınan Kurum: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE, 12 Kasım 2018.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Prof. Dr. Ali Haydar Taşpınar, Grafen Nanopartiküllerin Lazer Terapi Sonrası Etkinliğinin İncelenmesi, Ödül Alınan Kurum: Türkiye Kanseri Savaş Derneği (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 20 Nisan 2017.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Prof. Dr. Bedii Gorbun Ödülü, Radyoterapi İle Konkuran Uygulanan Polietilen Glikol (peg) İle Fonksiyonlaştırılmış Altın Nanopartiküllerin Radyoterapi Dirençli Oral Kavite

Kanser Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi, Ödül Alınan Kurum: Türkiye Kanserle Savaş Derneği (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 20 Nisan 2017.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

1085379, Onkogen İndüklü Prematüre Senesensin Modülasyonunda Hipoksinin Etkileri: Hif-1 Alfa ile Mif in Rollerinin İnsan Diploid Fibroblast Hücrelerinde Araştırılması, Uluslararası, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.02.2010 - 01.05.2010, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.03.2009 - 01.09.2012.

1155483, Ağız Boşluğu ve Larenks Kanser Hücre Hatlarında Radyoterapi ile Birlikte Altın, Gümüş ve Platin Nanotaşıyıcılarla Kombine Sisplatin Etkinliğinin Karşılaştırılmalı İncelemesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.09.2015 - 15.03.2018, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.09.2015 - 15.03.2018.

1185576, Oral Kavite Kanserinde Metformin ve Dikloroasetat'ın Mitokondriyal Enerji Metabolizması ve Setüksimab Kemoduyarlılığı Üzerine Sinerjistik Etkisinin Değerlendirilmesi: İlaç Yeniden Konumlandırma, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.12.2018 - 01.12.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.12.2018 - 01.12.2020.

BİDEB Destekleri

ŞENİZ İNANÇ SÜRER, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Başvurusu Reddedildi, 2017 - 2, 01.12.2018 - 01.12.2018.

ŞENİZ İNANÇ SÜRER, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Başvurusu Reddedildi, 2018 - 1, 01.12.2018 - 01.06.2019.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0