



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METFORMİNİN NÖRONAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
PROLİFERASYON VE APOPTOSİS ÜZERİNE ETKİSİ

Biyolog Ali UCBEK

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2012
BOLU



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METFORMİNİN NÖRONAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
PROLİFERASYON VE APOPTOSİS ÜZERİNE ETKİSİ

Biyolog Ali UCBEK

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Özge UZUN
Yrd. Doç. Dr. Zeynep Güneş Özünal

TEMMUZ 2012
BOLU

Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Farmakoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN* (imza)
Farmakoloji, AİBÜ

Doç. Dr. Özge UZUN** (imza)
Farmakoloji, AİBÜ

Prof. Dr. Aysel KÜKNER (imza)
Histoloji ve Embriyoloji, AİBÜ

Tarih 21/09/2012

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Ali UCBEK'in Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU (imza)
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

* Jüri başkanı

** Tez danışmanı

ÖZET

METFORMİNİN NÖRONAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE PROLİFERASYON VE APOPTOSİS ÜZERİNE ETKİSİ

Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride); *Galega officinalis* isimli bitkinin özütünden elde edilen, Tip 2 Diabetes Mellitus (DM2) tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biridir. Diyabetik hastalarda hepatik glukoz üretimini azaltıp, insülin duyarlılığını ve glukoz utilizasyonunu artırmaktadır. Moleküler düzeyde etkisi 5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) enziminin aktivasyonu ile açıklanmaktadır. Bunun dışında, AMPK aktivasyonu memeli hücrelerinde mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibisyonu yaparak da protein sentezi ve hücre proliferasyonunu kontrol edebilmektedir. Bu bilgiler metforminin tümör büyümesini yavaşlatacağı ve kanser riskini azaltacağı varsayımını güçlendirmiştir. Nitekim son yıllarda özellikle hayvan modellerinde ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar metforminin kanser hücreleri üzerinde toksik etkinliği olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle biz de araştırmamızda insan glioblastoma multiforma (T98G) hücre serisinde metforminin etkinliğini bu açıdan değerlendirmeyi amaçladık. Diğer taraftan araştırmamızda, hücrelerde oksidatif stres ve buna bağlı apoptosis oluşturduğu bilinen hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında da metforminin T98G hücreleri üzerindeki etkinliği çalışılmıştır.

Deneyler için öncelikle T98G hücre kültürü yapılmış, daha sonra 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile morfolojik değerlendirme, sitokimyasal floresan boyama, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) yöntemi, kaspaz-3 aktivitesi ve agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak da metforminin T98G hücrelerinde proliferasyon ve apoptozis üzerine etkisi araştırılmıştır.

Sonuçta, çalışmalarımızın bulguları metforminin T98G hücre serisi üzerinde belirgin bir apoptotik etkisi olduğunu ve H_2O_2 varlığında da bu etkinin arttığını ortaya çıkartmıştır. Araştırmamızın diğer bir bulgusu ise metformine bağlı bu etkinin doza ve zamana bağımlı olduğudur.

Anahtar Kelimeler: Metformin, Apoptosis, Hidrojen peroksit, Hücre kültürü.

ABSTRACT

PROLIFERATIVE AND APOPTOTIC EFFECT OF METFORMIN ON NEURONAL CELL CULTURE

Metformin (1,1-dimethyl biguanide hydrochloride); extract obtained from the plant which name is *Galega officinalis*. Metformin is one of the drugs commonly used to treat Type 2 diabetes(DM2). Metformin reduces hepatic glucose production, increase insulin sensitivity and glucose utilization in diabetic patients. At the molecular level the effect of metformin is explained by the effect of the AMPK enzyme activation. In addition, as in mammalian cells activation of AMPK inhibition of mTOR, it able to control of protein synthesis and cell proliferation. This information strengthened the hypothesis that metformin reduce the risk of cancer and slow tumor growth. Studies in recent years, especially in animal models and cell cultures have shown that metformin has toxic effect in the cancer cells. For this reason, we also study the effectiveness of metformin in human glioblastoma multiforme (T98G) cell lines. On the other hand in our study; on T98G cells, effect of metformin the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) that is known to cause apoptosis via oxidative stress in cells.

Primarily, T98G cells to cultures for experiments, then MTT method and morphological evaluation, cytochemical fluorescent staining, TUNEL, caspase-3 activity and agarose gel electrophoresis method using the effect of metformin on T98G cells for determine proliferation and apoptosis were investigated.

In conclusion, the findings of our work; metformin significant apoptotic effect on the cell line T98G and in the presence of H_2O_2 that this effect increases. Another finding of our study is this effect of metformin is dose-and time-dependent.

Keywords: Metformin, Apoptosis, Hydrogen peroxide, Cell culture.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve tezimin hazırlanması ile ilgili çalışmalarımda bilimsel yol gösterici tutumu ile bilgi, deneyim ve yardımlarımdan yararlandığım başta değerli hocam, Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN'e;

Bilgi ve yardımlarıyla bana destek olan bölüm hocalarımdan ve tez danışmanlarım Doç. Dr. Özge UZUN ve Yrd. Doç. Dr. Zeynep Güneş ÖZÜNAL'a;

Yardımlarını ve deneyimlerini benden esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Aysel KÜKNER, Tıbbi Genetik Bölüm Başkanı Yrd. Doç. Dr. Selma DÜZENLİ'ye

Bu çalışmadaki deneysel sürecin her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, destek ve yapıcı eleştirileri ile bana yol gösteren ve tezimin deney kısmının yapılmasının çeşitli aşamalarında yardımcı olan Araş. Gör. Dr. Recep BAYRAM, Araş. Gör. Dr. Muhsine Zeynep YAVUZ, Uzman Bio. Ayşenur AYDOĞAR, Uzman Bio. Ali Osman ASLAN, Uzman Bio. Şeyda Özsoy ve Uzman Bio. Dilek DOĞRUER'e;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam sırasında da her zaman yanımda ve bana destek olan anneme ve babama;

Sonsuz Teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

• ONAY SAYFASI	iii
• ÖZET	iv
• ABSTRACT	v
• TEŞEKKÜR	vi
• İÇİNDEKİLER	vii
• ŞEKİLLER	x
• SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Metformin	3
2.1.1. Bulunuşu	3
2.1.2. Kimyasal Yapısı	5
2.1.3. Farmakokinetiği	5
2.1.4. Etki mekanizması	6
2.1.5. Metforminin Kullanım Alanları	9
2.2. Kanser ve Metformin	17
2.3. Hücre Kültürü	21
2.3.1. Hücre ve Doku Kültürü	21
2.3.2. Tarihçe	22
2.3.3. Hücre Kültürlerinin Kökenlerine Göre Sınıflandırılması	23
2.3.4. Kanser Hücre Hatları	24
2.3.5. T98G Gliablastoma Multiforma	24
2.4. Hücre Ölüm Şekilleri	25
2.4.1. Nekroz	25
2.4.2. Apoptosis	26
2.4.3. Otofaji	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Kullanılan Kimyasallar	30
3.2. Kullanılan Cihazlar	31
3.3. Kullanılan Yöntemler	31

3.3.1. Hücre Kültürü	31
3.3.2. Metformin Etkisinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi ve Etken Dozunun Hesaplanması	34
3.3.3. Metformin verilmiş hücrelerin morfolojik olarak gözlenmesi	35
3.3.4. Kaspaz- 3 Aktivasyonu Tayini	35
3.3.5. Akridin Orange ve Etidyum Bromid Boyama	36
3.3.6. DNA Fragmentasyonu	37
3.3.7. TUNEL apotag	38
3.3.8. İstatistiksel Değerlendirme	40
4. BULGULAR	41
4.1. MTT Yöntemi İle Hücre Canlılığının Belirlenmesi	41
4.1.1. H ₂ O ₂ 'nin Toksik Dozunun MTT Testi ile Belirlenmesi	41
4.1.2. Metformin ve Metforminin 2.5 mM H ₂ O ₂ Kombinasyonunun 24 Saatlik Maruziyeti Sonrasında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin MTT testi ile Belirlenmesi	42
4.1.3. Metforminin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi	44
4.2. Metformin ve H ₂ O ₂ Varlığında T98G Hücre Hattının Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	46
4.2.1. T98G Hücre Hattının 24 Saatlik Metformin, H ₂ O ₂ ve Metforminin H ₂ O ₂ kombinasyonunun Maruziyetinde Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	46
4.3. T98G Hücre Hattının Metformin ve H ₂ O ₂ Varlığında Acridine Orange ve Ethidium Bromide Boyama Sonuçları	48
4.3.1. T98G Hücre Hattının 24 Saatlik Metformin, H ₂ O ₂ ve Metforminin H ₂ O ₂ Kombinasyonunun Maruziyetinde Acridine Orange ve Ethidium Bromide Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi	48
4.3.2. T98G Hücre Hattının 48 Saatlik Metformin Maruziyetinde Acridine Orange ve Ethidium Bromide Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi	50

4.3.3. T98G Hücre Hattının 72 Saatlik Metformin Maruziyetinde Acridine Orange ve Ethidium Bromide Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi	51
4.4. T98G Hücre Hattının Metformin ve H ₂ O ₂ Varlığında TUNEL Sonuçları	52
4.4.1. T98G Hücre Hattının 24 Saatlik Metformin, H ₂ O ₂ ve Metforminin H ₂ O ₂ Kombinasyonunun Maruziyetinde TUNEL Sonuçlarının Değerlendirilmesi	52
4.5. ELISA Yöntemi İle Kaspaz- 3 Aktivasyonu Sonuçları	54
4.6. Metforminin ve Değişik Dozlarının H ₂ O ₂ ile Kombinasyonunda 24 Saatlik Maruziyeti Sonrasında DNA Fragmentasyonunun Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Gösterilmesi	56
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
7. KAYNAKLAR	62
8. ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER

2.1: <i>Galega officinalis</i> bitkisi ve bundan sentezlenen guanidin yapılı Moleküller	4
2.2: Metforminin kimyasal yapısı	4
2.3: AMPK aktivasyonunun molekül yapısı ve işleyişi	8
2.4: AMPK' nın organlarda ki başlıca etkileri	8
2.5: Metformin ve DM2 arasındaki ilişki	11
2.6: Metformin ve PKOS arasındaki ilişki	13
2.7: Metformin ve adipoz doku arasındaki ilişki	14
2.8: Metformin ve damarlar arasındaki ilişki	17
2.9: Metformin ve mTORC1 ilişkisi	19
2.10: Metforminin antitümöral etkinliği	21
2.11: T98G gliablastoma multiforma	25
2.12: Nekroz	26
2.13: Apoptosis	28
2.14: Otofaji	29
3.1: Hemositometre yöntemi ile hücre sayımı	33
4.1: Hidrojen peroksit'in (H_2O_2) T98G hücrelerindeki toksisitesinin MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	41
4.2: Metformin (met.) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve kombinasyonlarının 24 saatlik uygulama sonrası T98G hücrelerinde canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	43
4.3: Metforminin T98G hücrelerindeki 48 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	44
4.4: Metforminin T98G hücrelerinde 72 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları	45
4.5: Kontrol, 2,5mM H_2O_2 , metformin ve metforminin +2,5mM H_2O_2 kombinasyonunun 24 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinin faz kontrast invert mikroskopda görüntüleri	47
4.6: Kontrol, 2,5mM H_2O_2 , metformin ve metforminin +2,5mM H_2O_2 kombinasyonunun 24 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinin görüntüleri	49

4.7: Kontrol ve metforminin 48 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinde ki görüntüleri	50
4.8: Kontrol ve metforminin 72 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinde ki görüntüleri	51
4.9: Kontrol, 2,5mM H ₂ O ₂ , metformin ve metforminin +2,5mM H ₂ O ₂ kombinasyonunun 24 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinin görüntüleri	53
4.10: Metformin (met.) hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) ve kombinasyonlarının 24 saatlik uygulama sonrası T98G hücrelerinde kaspas-3'ün kat artışı sonuçları	55
4.11: Metformin (met.) ve metforminin 2.5 mM hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) kombinasyonunda 24 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerindeki agaroz jel görüntüleri	56

SİMGELER ve KISALTMALAR

3b-HSD	3b-hidroksisteroid dehidrojenaz
ACC	Asetil-CoA karboksilaz
AMPK	5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
aPKC	Atipik protein kinaz C
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Bovine serum albumin
CaMKK	Ca ²⁺ /kalmodulin bağımlı protein kinazın
CYP17	17a-hidroksilaz/17,20-liyaz/sitokrom P-450c17 α
DM2	Tip 2 Diabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
E ₂	17 β -östradiol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eNOS	Endotelial nitric oxide synthase
ER	Endoplazmik retikulum
ET-1	Endothelin-1
Fas	Hücre ölüm reseptörü
FCS	Fetal sığır serumu
GLUT4	Glucose transporter type 4
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-isoprenoid
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
ICAD	Inhibitor of caspase activated DNase
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
LKB-1	Liver Kinase B1
MO25	Mouse protein 25
mTOR	Mammalian target of rapamycin

mTORC1	mTOR Complex 1
MTT	Thiazoly blue tetrazolium bromide
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NCEP-ATP III	The national cholesterol education program adult treatment panel III
NO	Nitrik oksit
P450 _{scc}	P450 side-chain cleavage
p53	Tumor protein 53
p70 ^{S6K1}	p70 S6 kinase 1 onkoprotein
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PKOS	Polikistik Over Sendromu
PMAT	Plasma Membrane Monoamine Transporter
RNA	Ribonükleikasit
PPAR-1 α	Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptor- γ Koaktivator
PTP	Permeability transition por
PARP	Poly ADP-ribose polymerase
REDD1	Regulated in development and DNA damage response 1
ROS	Reaktif oksijen türleri
OCTs	Organic Cation Transporters
SHBG	Seks hormonu-bağlayıcı globulin
siRNA	Small interfering RNA
SPPS	Statistic Program for Social and Science
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding proteins
StAR, STARD1	Steroidogenic acute regulatory protein
STRAD	Ste20-bağımlı adaptör
T98G	İnsan gliablastoma multiforma hücresi
Thr ¹⁷²	Treonin 172
TNFR-1	Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TSC1/2	Tuberous sclerosis protein 1/2

TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin insitu nick-end labelling
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1.GİRİŞ

Metformin Tip 2 DM da sıkça reçete edilip, hastalar tarafından da yaygın olarak kullanılan biguanit türevi bir ilaçtır. İskelet kasları ve yağ hücrelerinde insülinin etkinliğini arttırıp, sindirim sisteminden ise glikoz absorpsiyonunu azaltarak etki göstermektedir (1-5). Son yıllarda metformin kadınlarda polikistik over sendromunun tedavisinde de kullanılmaktadır (6). Dikkate değer bir diğer durum ise; metformin kullanan diyabetiklerin ve kardiyovasküler hastalığı bulunan kişilerin hayatta kalma oranının arttığının gözlenmesidir (7). Araştırmalar metformine bağlı olarak daha sağlıklı bir hayat sağlanabileceğini düşündürmektedir (8-10).

Metforminin bu genel kullanımları dışında değişik hastalık durumlarında da olası etkinliği araştırılmaktadır. Araştırmalardan bazılarının konusu metforminin santral sinir sistemi hastalıkları üzerine etkileridir. Bu hastalıklar özellikle Alzheimer ve Parkinson gibi nöron hücrelerinin apoptozise uğradığı hastalıklardır. Nöron hücresi içersinde esas olarak apoptotik kaskatı düzenleyen mekanizmanın permeability transition pore (PTP) ve Bcl-2 ailesi proteinleri olduğu düşünülmektedir (11). Metformin ise hücrede PTP kanallarını kapatarak nöroprotektif etki gösterdiği gözlemlenmiştir (12). Diğer taraftan, nörodejeneratif hastalıkların ve nörolojik sorunların patolojisinde serbest oksijen radikallerinin büyük ölçüde rol oynadığı düşünülmektedir (13,14). Bu açıdan bakıldığında metforminin diyabetik hastanın sinir sisteminde antioksidan etki gösterdiğinin gösterilmiş olması önemli bir bulgudur (15). Bunların dışında yapıcı metformine çok benzeyen fenforminin NMDA reseptörleri aracılığı ile kalsiyum dengesini düzenlendiği ve nörotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (16).

Son zamanlarda metforminin kanser hücreleri üzerindeki etkisi üzerinde durulmaktadır (17). Bunun nedeni metformin kullanan DM2 hastalarında kanser riskinin azaldığını gösteren araştırmalardır(18,19). Söz konusu araştırmaların yanı sıra, meme kanseri tedavisinde metformin kullanılmasını destekleyen yayınlar da bulunmaktadır (20,21). Metforminin bu etkisi doğrudan AMPK aktivasyonu yapmasıyla açıklanmaktadır. Böylece metformin kanser hücrelerindeki proliferasyonu azaltmaktadır (22-25). Diğer bir görüş ise metforminin bu etkisini mTOR üzerinden gerçekleştirdiği yönündedir (26).

Önemli olan bir başka nokta ise; metforminin kan beyin bariyerini geçip geçemediğidir. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) metoduyla yapılan hayvan deneylerinde metforminin santral sinir sistemine de ulaşabildiği gösterilmiştir (27). Bunun yanında oral olarak uygulanan metforminin beyinde AMPK aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum; metforminin kan-beyin bariyerini geçebildiğinin ve sağlıklı beyinde farmakolojik etki gösterebildiğinin destekleyicisi olarak düşünülmektedir (28).

Yukarıda özetlediğimiz literatür ışığında planladığımız bu çalışmada; metforminin nöronal hücre kültürleri ve hidrojen peroksit bağımlı toksisite üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, araştırmamızın bulguları metforminin nöronal kaynaklı kanser hücreleri üzerindeki etkisini gösterecek ve belki de bu hastalıkların tedavisine yeni bir bakış açısı kazandıracaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metformin

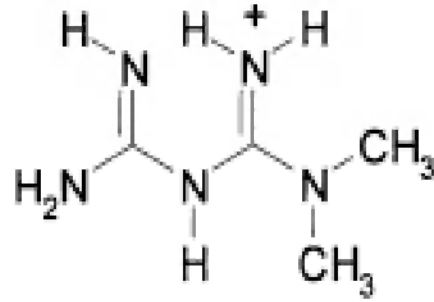
2.1.1. Bulunuşu

Metformin (1,1-dimetilbiguanid hidroklorid) Tip 2 Diabetes Mellitusta sıkça reçete edilip, hastalar tarafından da yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biridir. *Galega officinalis* isimli bitkinin özütünden elde edilen biguanid yapılı bir maddedir (29,30) (Şekil 2.1). Tarihte *Galega officinalis*'in ilk kullanımları bitkisel ilaç olarak ortaçağ Avrupasında görülmektedir. Diyabet tedavisinde kullanımı ise özellikle 1930'ların sonlarına doğru Fransa'da olmuştur. Aslında *Galega officinalis* ile ilk çalışmalar 1800'lerin sonlarında "guanidin" yapısının bulunmasıyla başlamış ve 1918 yılında da guanidinin hayvanlarda hipoglisemik aktiviteye sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak 1920'lerde guanidinin klinik kullanımının toksik olduğu görülünce yine aynı bitkiden elde edilmiş ve daha az toksik olan "galegin" antidiyabetik ilaç olarak kullanılmaya başlandı. Yine aynı yıllarda hem daha iyi tolere edilebilen hem de daha etkili iki sentetik diguanin olan "sitalin A" ve "sitalin B" de kullanılmaya başlandı. 1929'da ise "dimetilbiguanidinin" de içinde bulunduğu bazı biguanidlerin sentezlendi. Sentezlenen biguanidler hayvanlarda toksik değildi ancak insanlar üzerinde henüz hiçbir test yapılmamıştı (31). Metformin hakkında ilk ciddi makale ise Jean Sterne tarafından yayınlanmıştır. Bu makalede Sterne metformini glukoz yiyici anlamına gelen "Glucophage" olarak adlandırmaktaydı (32). Daha sonraları yine biguanidlerden olan "fenformin" ve "buformin" de kullanıma girdi. Ancak bu ilaçlarla oluşan laktik asidoz vakaları dikkat çekiciydi. İlerleyen yıllarda metformin, diğerlerine göre daha az laktik asidoza sebep olması, hipoglisemi ve kilo almaya neden olmamasıyla dikkat çekti. Sonuçta da tedavide en fazla tercih edilen biguanid oldu (31).

Guanidin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{NH}_2 \end{array}$
Galegin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \quad \parallel \\ \text{C} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Sintalin A	$\begin{array}{c} \text{NH} \quad \quad \quad \text{NH} \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_{10} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \end{array}$
Sintalin B	$\begin{array}{c} \text{NH} \quad \quad \quad \text{NH} \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_{12} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \end{array}$
Biguanid	$\begin{array}{c} \text{NH} \quad \quad \text{NH} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \end{array}$
Metformin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH} \quad \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \quad \parallel \quad \quad \parallel \\ \text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Fenformin	$\begin{array}{c} \text{NH} \quad \quad \text{NH} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ \text{H} - \text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{H} \end{array}$
Bufornin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_8 \quad \quad \text{NH} \quad \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \quad \parallel \quad \quad \parallel \\ \text{H} - \text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \end{array}$



Şekil 2.1. *Galega officinalis* bitkisi ve bundan sentezlenen guanidin yapıli moleküller (29,30)



Şekil 2.2. Metforminin kimyasal yapısı (33)

2.1.2. Kimyasal yapısı

Metformin sentezinin orijinal tanımı ilk olarak 1921 de yapılmıştır (34). Buna göre eşit molaritede dimetilamin ve 2-siyanoguanidin toluen içersinde eritilmiş ve sonra bu işlemler sırasında solüsyon soğutularak yoğunlaştırılmıştır. Sonrasında ise eşit molaritede HCl yavaşça solüsyona eklenmiştir. Karışım kendiliğinden kaynamaya başlayıp ve sonrasında soğutulduğunda metformin hidroklorit çökeltisi elde edilmiştir (35) (Şekil 2.2).

2.1.3. Farmakokinetiği

2.1.3.1. Absorbsiyon

Metformin gastrointestinal sistemden emilimi yavaş ve biyoyararlanımı %50-%60 oranında olan bir ilaçtır. Tek dozunun doruk plazma konsantrasyonuna (T_{max}) ulaşması yaklaşık üç saat olarak hesaplanmıştır (36). Metformin ile 850 mg'dan 2550 mg'a kadar dozlarda yapılan çalışmalarda emilimin tam olmaması ve doyunluğa ulaşması sebebiyle biyoyararlanımın doz ile doğrusal orantılı olmadığı tespit edilmiştir (37). Gastrointestinal sistemde metformin emiliminden temel olarak “Plasma Membrane Monoamine Transporter” (PMAT) proteinlerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (38). İnce bağırsakta az bulunmalarına rağmen “Organic Cation Transporters” (OCTs) OCT1 ve OCT2 proteinlerinin de metformin emiliminden sorumlu olduğu düşünülmektedir (39,40).

2.1.3.2. Dağılım

Metforminin kanda plazma proteinlerine bağlanmasının ihmal edilecek kadar az olduğu görülmüştür (36). Bununla birlikte, dokularda dağılımı yüksek olan bir ilaçtır. Metforminin sanal dağılım hacmi (V_d) 300 litre olarak hesaplanmış (41), kararlı durum plazma konsantrasyonuna 24-48 saat içinde eriştiği belirlenmiştir (37). Metforminin kandaki iyonizasyonu % 0.01 den daha azdır. Bu da metformini birçok bazik ilaçtan daha bazik yapmaktadır. Ancak metforminin lipofobik özellikte olması hücre içersine pasif difüzyonla hızlı bir şekilde girebilmesine engeldir (41). Yukarıda da belirtildiği gibi hücre içine ulaşmasının OCTs proteinleri tarafından gerçekleştirildiği bulunmuştur (39,40).

2.1.3.3. Metabolizma

Tek doz intravenöz uygulanmayı takiben metformin idrardan değişmeden atılmaktadır. Karaciğerde metabolizmaya uğramadığı gibi safra yoluyla da

atılmamaktadır (37). Aynı zamanda idrarda metformin metabolitlerine de rastlanılmamıştır (42).

2.1.3.4. Atılım

Sağlıklı deneklerde; günde iki kere 1000 mg'lık metformin verilmesi sonrasında plazma konsantrasyonunun 0.4mg/L ile 1.3mg/L arasında değiştiği saptanmıştır. Renal fonksiyon bozukluğu olmayan bireylerde metforminin yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) yaklaşık 5 saat olarak gösterilmiştir (43). Oral uygulanmasını takiben emilen ilacın yaklaşık % 90'ı böbrek yolu ile 24 saat içinde atılmaktadır (37). Metforminin renal klerensi yüksektir. Bunun üç nedeni olduğu düşünülmektedir: 1. Metformin ufak molekül yapısına sahiptir ve plazma proteinlerine bağlanmamaktadır 2. Böbrekte metforminin transportundan sorumlu birden çok protein bulunmaktadır 3. Metforminin yağda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle tekrar emilim minimum düzeyde olmaktadır (36,42,44).

2.1.4. Etki mekanizması

2.1.4.1. 5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)

Metforminin temel işlevi hepatik glukoz üretimini azaltması ve periferik insülin duyarlılığını artırarak hiperglisemiye düzeltmektir (45). Metformin aynı zamanda çizgili kaslarda glukoz utilizasyonunu artırıp, plazma trigliserid düzeyinin de düşmesini sağlamaktadır (46). Ayrıca metformin hepatik glukoneojenezisi de inhibe etmektedir (47). Metformin bu etkileri "Liver Kinase B1" (LKB1) bağımlı aktive edilmiş AMPK mekanizması aracılığı ile sağladığı düşünülmektedir (46,47). AMPK'nin ise özellikle enerji metabolizması ve dengesi yönünden çok önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir(48).

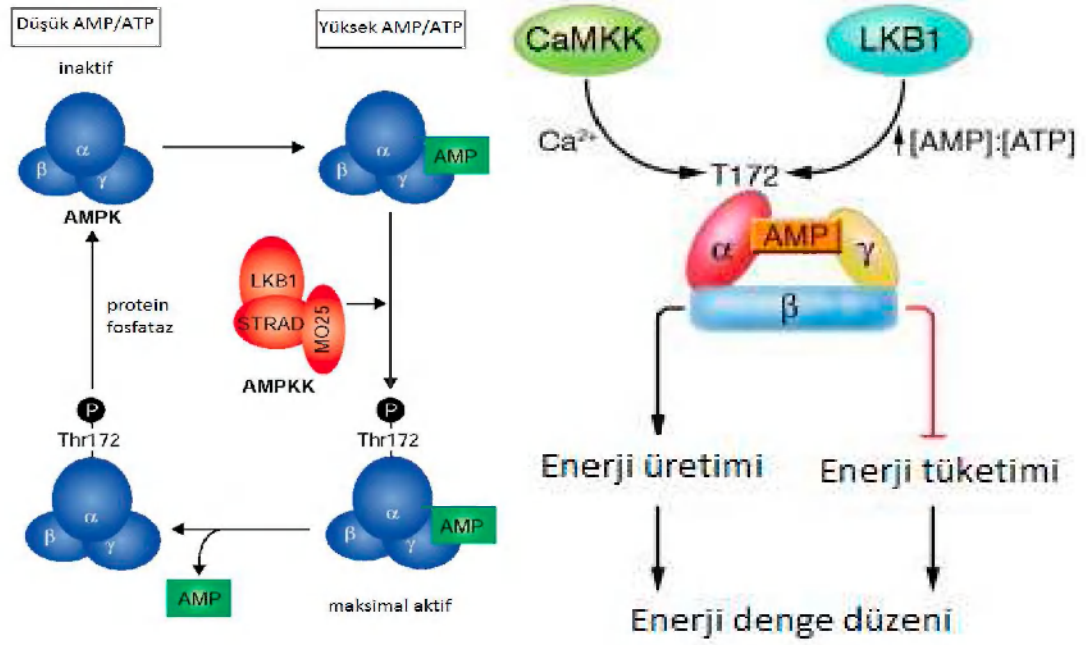
Memelilerde, AMPK'nin görevi yağ asidi, protein ve kolesterol sentezi gibi metabolik yolların modülasyonunu sağlamaktır. Bunun yanında hücre içine glukoz taşınması ve karaciğer ile iskelet kaslarında glikoliz mekanizmasında da rol oynamaktadır (49). Bu aşamalarda AMPK, hücre içi enerji sensörü olarak glukoz modülasyonu ve yağ asidi metabolizmasında görev almaktadır (50). AMPK'nin eksersiz gibi fiziksel uyarı, kas kasılması, adiponektin ve leptin gibi hormonlarla, fizyolojik strese, glukoz yoksunluğunda, hipokside, oksidatif strese ve osmotik şokta etkin hale geldiği gösterilmiştir. Bu durumun glukoneojenezisi ve lipogenezisi inhibe ederken, yağ asidi oksidasyonunu ve lipolizisi arttırdığı düşünülmektedir

(51,52) (Şekil 2.4).

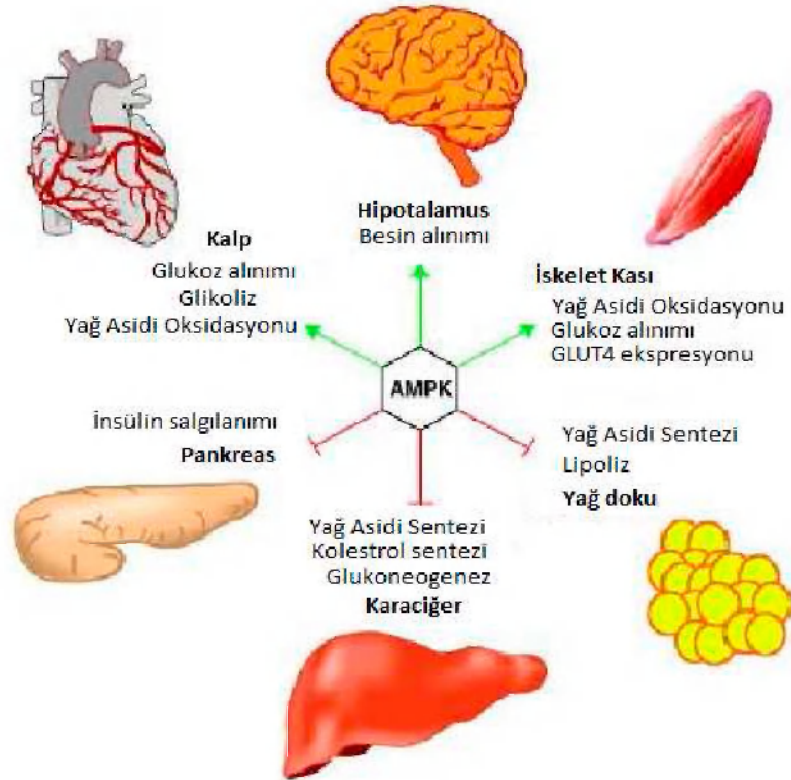
AMPK aracılıklı mekanizmanın bulunuşu 1973 yılında yayınlanan birbirinden bağımsız iki ayrı çalışma ile olmuştur. Bu araştırmalarda asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-isoprenoid (HMG-CoA) redüktazın Adenozin trifosfat (ATP) ile inkübe edilmesi sonucu inaktive olduğu rapor edilmiştir (53,54). Bu yayınlarda; bulunan bu iki grubun etkinliğinin fosforilasyon sonucu ortaya çıktığı, bu fosforilasyonu sağlayan da bir protein kinaz olduğu düşünülmekteydi. Nitekim, 1987 yılında bu protein kinaz bulunarak adı AMPK olarak belirlendi (55).

AMPK'nin birçok alt üniteden oluştuğu belirlenmiştir. Bunlar, her biri iki veya daha fazla izoformu olan, farklı genler tarafından kodlanan, farklı dokularda farklı oranlarda sentezlenen α , β ve γ alt üniteleridir (56). α alt ünitesinin iki izoformu ($\alpha 1$, $\alpha 2$) kinaz bölgesinde N-terminalin yarısını oluşturmaktadır (57). Aynı zamanda α alt ünitesi katalizör bölgeyi de içermektedir ve burada başka kinazlar tarafından fosforile edilen önemli bir düzenleyici olan threonin 172 (Thr¹⁷²) bulunmaktadır (58). β ($\beta 1$, $\beta 2$) alt ünitesi glikojen-bağlayan C-terminal bölgesini içermektedir. İskelet kaslarında hücre içi yüksek glikojen seviyesinin β alt ünitesini etkileyerek AMPK'yi inhibe edebileceği gösterilmiştir (59). γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) alt ünitesi ise dört tekrarlı iki bölgeden oluşmaktadır (57) (Şekil 2.3).

AMPK'nin aktivasyonunun iki şekilde olduğu düşünülmektedir. Birincisi AMP'nin bağlanması sonucu AMPK'nin aktive olması (55), ikincisi ve daha önemlisi, AMPK α alt ünitesine LKB1 kinazın bağlanarak AMPK'yi fosforile etmesidir (60). AMPK'nin α alt ünitesinde bulunan Thr¹⁷² bölgesini fosforile eden ana kinazın LKB1 ve iki yardımcı alt ünite STRAD (Ste20-bağımlı adaptör) ve MO25 (mouse protein 25) olduğu düşünülmektedir. STRAD ise LKB1 kompleksine katılan Thr¹⁷² nin fosforilasyonu için gerekli olan bir alt ünite (61) (Şekil 2.3). LKB1'nin aynı zamanda AMPK alt ailesinden 13 kinazı aktive edebildiği gösterilmiştir (62). LKB1, STRAD ve MO25'in yanında AMPK'yı LKB1'den bağımsız Ca²⁺/kalmodulin bağımlı protein kinazın (CaMKK) da aktive edebildiği düşünülmektedir (63). Hücre içi Ca²⁺ artışının ise CaMKK aktivitesinin artışından sorumlu olduğu bilinmektedir (64) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. AMPK aktivasyonunun moleküler yapısı ve işleyişi (65,66)



Şekil 2.4. AMPK'nın organlarda ki başlıca etkileri (67)

AMPK aktivitesinin hücre içi solunum zincirindeki Kompleks 1 inhibisyonuna bağlı olduğu da gösterilmiştir (68). Kompleks 1'in inhibisyonu AMP/ATP düzeyinin artmasına bunun da AMPK'nin aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (68). Hücre içi solunumun azalması sonucu ise hücrede glikojenezis azalmaktadır (69). Bu bulguyla uyumlu olarak yüksek metformin konsantrasyonunun hücrede total ATP seviyesini baskıladığı bildirilmiştir. Bu durumun da hücrede AMP/ATP oranının artmasına neden olduğu açıktır (70).

AMPK'nin bir diğer işlevinin ise çizgili kas heksokinaz ve glukoz taşıyıcılarının (Glut4: Glucose transporter type 4) ekspresyonunu indüklemesi olduğu düşünülmektedir (71). AMPK aktivasyonunun aynı zamanda "sterol regulatory element-binding proteins" (SREBP-1) mRNA ve protein ekspresyonunun azalmasında rol oynadığı düşünülmektedir. SREBP-1'in ise dislipidemi ve insülin direncinin patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (72).

2.1.5. Metforminin kullanım alanları

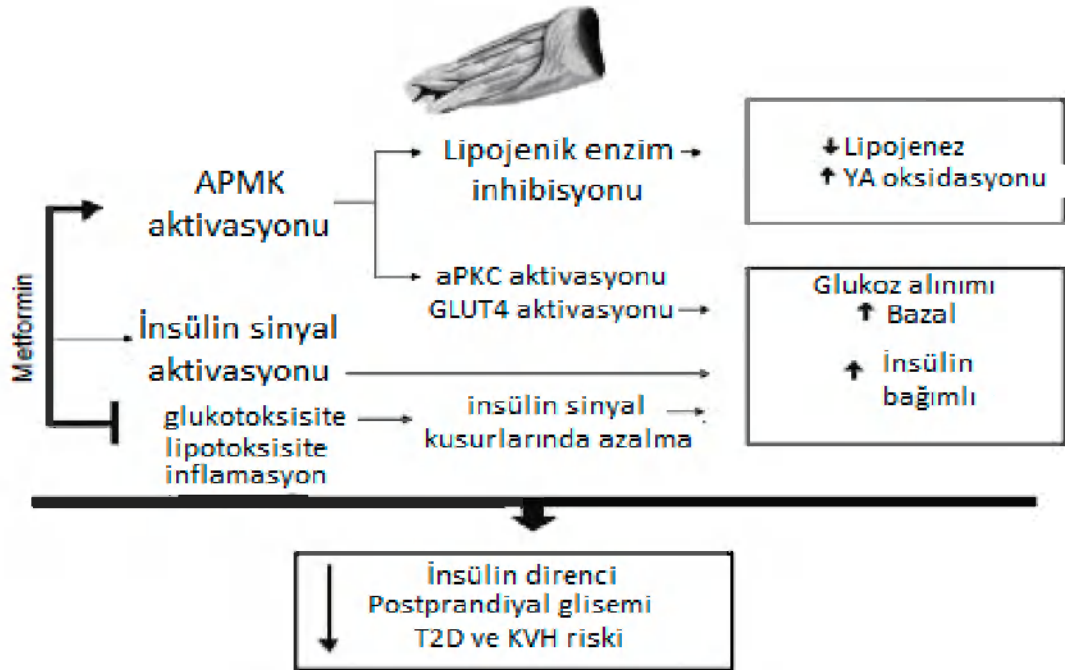
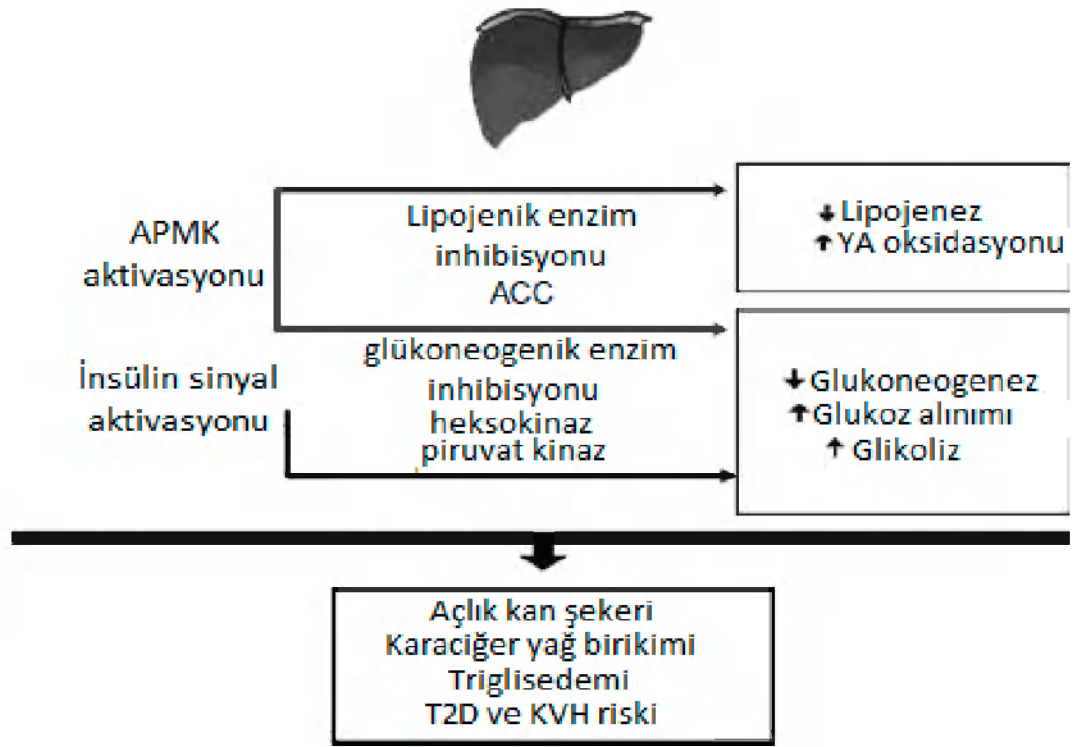
2.1.5.1. Metformin ve diyabet

2025 yılında dünya genelinde 300 milyon bireyin diabetes mellitus olacağı öngörülmektedir (73). Dünya sağlık örgütü (WHO) diyabet tanısını kan glukoz düzeyine göre açlıkta; glukoz ≥ 70 mg/dl ve glukoz yüklenmesinin (75g) ardından 2 saatin sonunda; glukoz ≥ 110 mg/dl olarak belirlemiştir (74). Diyabet hastalarının % 90 gibi büyük bir bölümü DM2 hastasıdır, geri kalan % 10'luk bir kısmını ise tip 1 ve diğer diyabet hastaları oluşturmaktadır. DM2 karakteristik olarak 4 ana metabolik anormallik göstermektedir: 1. Obezite 2. İnsülin etkinliğinde azalma 3. İnsülin salıverilmesinde fonksiyonel bozukluk 4. Dokuların glukoz kullanımında azalma (75,76).

Metforminin hepatik glukoz üretimini doğrudan glukoneogenik enzimleri (fosfoenolpruvat karboksikinaz, fruktoz-1,6-bisfosfataz, ve glukoz- 6-fosfataz) inhibe ederek düşürdüğü düşünülmektedir (77). Metforminin karaciğere glukoz alınmasını arttırmasının yanı sıra glikolitik enzimleri (heksokinaz, glukokinaz ve piruvat kinazı) aktive ederek glikolizisi uyardığı da bilinmektedir (77). Bunun yanı sıra metformin insülin reseptör birimlerinin (insulin reseptör substrat (IRS) -1 ve -2) fosforilasyonunu arttırmaktadır (77). Metforminin karaciğerde anahtar glukoneogenik genlerin ekspresyonunu da inhibe etmektedir (78). Diğer taraftan,

metforminin iskelet kaslarında da insülin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (77). Metforminin insüline dirençli iskelet kası hücrelerinde insülin reseptörlerinde IRS-1 fosforilasyonu ve fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) aktivasyonunu azaltarak etki gösterdiği anlaşılmıştır (77). İskelet kaslarındaki bir başka etkisi ise atipik protein kinaz C (aPKC) izoformunu indükleyerek glukoz taşınmasında görev alan GLUT-4'ü aktive etmektir (77). Metforminin pankreatik adacık hücrelerinde de AMPK aktivasyonunu düzenleyerek β -hücre fonksiyonlarını etkileyebildiği düşünülmektedir (79). Özetle; Metformin; 1. İnsülin duyarlılığını arttırarak (80), 2. Kaslarda glukoz utilizasyonunu arttırarak (81), 3. Hepatik glukoz üretimini azaltarak (82), 4. Glukoz ve yağ asidi metabolizmasında rol oynayan AMPK yolağının aktivasyonunu arttırarak (83) etki gösterir.

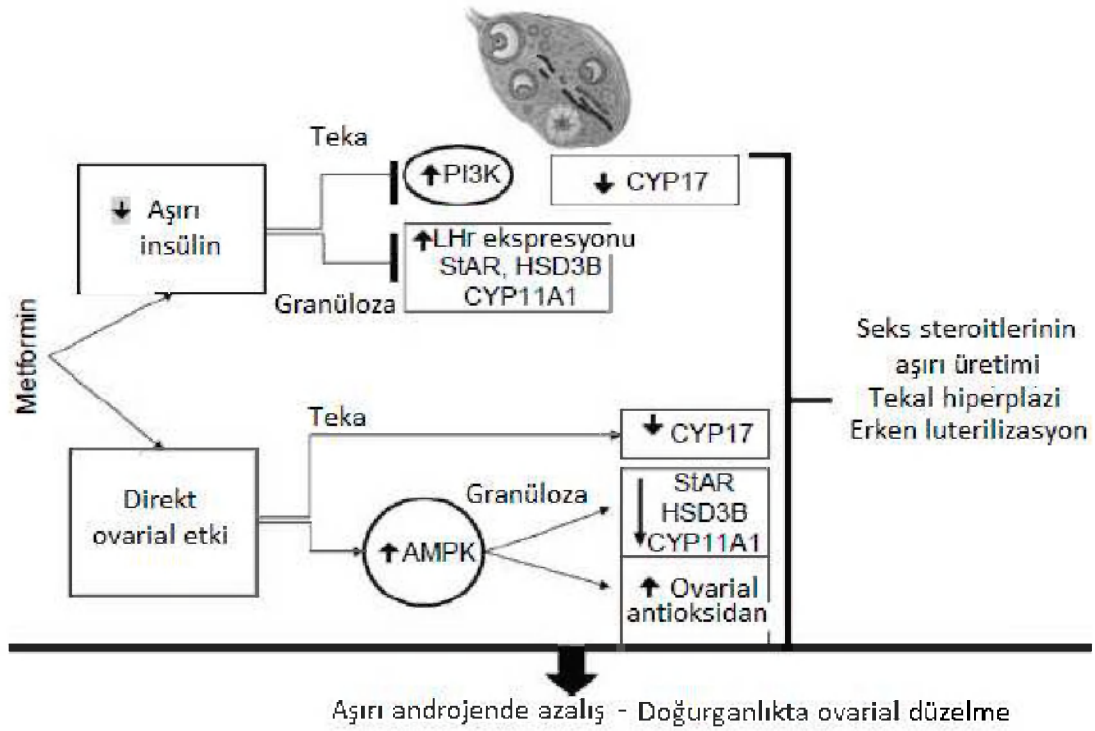
DM2'de metformin kullanımı ekonomik olması, kilo kaybını arttırması, hipoglisemiye sebep olmaması ve glukoz düşürücü etkisi sebebiyle European Association for the Study of Diabetes (EASD) ve American Diabetes Association (ADA) tarafından tavsiye edilmektedir (84). DM2'li obez hastalarda kan glukoz seviyesini kontrol etmede metformin kullanımını öngören (85) yayınların yanında obez olmayan DM2'li hastalarda da metformin kullanımında kan glukoz düzeyinin düzenlenmesinde metforminin etkinliğini destekleyen yayınlar bulunmaktadır (86)(Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Metformin ve DM2 arasındaki ilişki (77)

2.1.5.2. Metformin ve polikistik over sendromu (PKOS)

PKOS üreme çağındaki kadınların % 5-10'unu etkileyen bir hastalıktır (87). PKOS tanısı konmuş kişilerde doğurganlığın azalması, menstrüel düzensizlik, hiperandrojenizm, kronik anovulasyon (88), düşük riskinde artış (89) ve obezite (90) görüldüğü bilinmektedir. Hastalığın başrolünde insülin rezistansına bağlı hiperinsülinemisinin de rol oynadığı düşünülmektedir (91). Buna göre hiperinsülinemi androjen üretimini ve seks hormonu-bağlayıcı globulin (SHBG) sentezini artırmakta ve sonuçta hiperandrojenizm ve PKOS ortaya çıkmaktadır (92). Bu durum metforminin insülin-glukoz metabolizmasını düzenleyerek PKOS'da etkili bir tedavi aracı olabileceği ortaya çıkartmaktadır (93). Bilindiği gibi insülin bazı steroidojenik enzimler; 17a-hidroksilaz/17,20-liyaz(CYP17) ve 3b-hidroksisteroid dehidrojenaz (3b-HSD), P450 side-chain cleavage (P450scc) ve steroidogenic acute regulatory protein (StAR, STARD1) proteinini üzerinde uyarıcı bir etkiye sahiptir (77). PKOS'da metforminin insülin direncini azaltarak, sitokrom P-450c17 α (CYP17) aktivasyonunu düşürerek androjen üretimini azalttığı düşünülmektedir (94). Bunun yanında metforminin overler üzerindeki doğrudan etkisi ile insülin tarafından granüloza hücrelerinde üretimi uyarılan 17 β -östradiol (E₂) ve progesteron üretimini inhibe ettiğini gösteren yayınlar da vardır (95) (Şekil 2.6). Yukarıda anlatılan mekanizmaya uygun olarak PKOS nedeniyle 6 ay metformin tedavisi uygulanmış hastalarda folükül büyümesinin yavaşladığı, müllerian hormon ve folükül sayısında da azalma olduğu belirlenmiştir (96). Bu hastalarda metformin tedavisi daha düzenli bir ovulasyon sağlamış ve aynı zamanda menstrüel döngüyü de olumlu şekilde düzenlemiştir (97, 98).



Şekil 2.6. Metformin ve PKOS arasındaki ilişki (77)

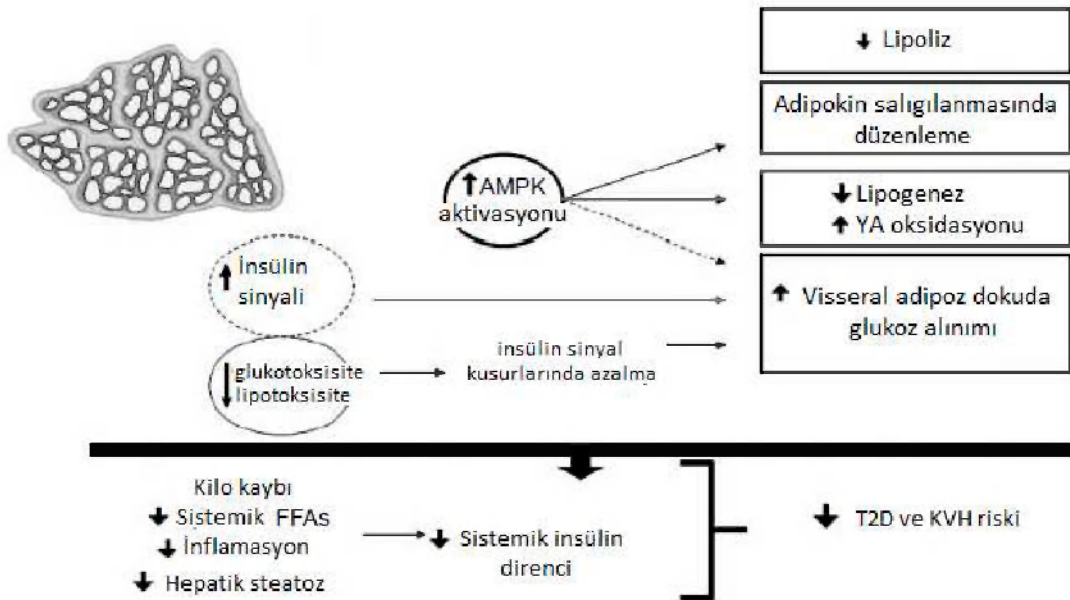
The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) tanımlamasına göre kadınlardaki metabolik sendromun tanısı 5 kriterden en az 3'üne uymak olarak değerlendirilmektedir. Bunlar; 1. Bel çevresinin 88 cm üstünde olması 2. Kan basıncının 130/85 mm Hg ve üstünde olması 3. Açlık serum glukoz düzeyinin en az 100 mg/dl olması 4. Trigliserid düzeyinin en az 150 mg/dl olması ve 5. HDL kolesterol düzeyinin en az 50 mg/dl olmasıdır (99). PKOS'li kadınların % 33-44'ü NCEP-ATP III'ün tanımladığı metabolik sendrom tanı kriterlerine uymaktadır (100). Nitekim, kontrollü diyet eşliğinde metformin ile uzun dönem tedavi gören PKOS'li kadınların metabolik profillerinde de düzelme saptanmıştır (101). Bununla birlikte, kontrollü bir diyet olmadan, metforminin tek başına kullanımının bu hastalarda etkisiz olduğunu gösteren yayınlar da bulunmaktadır (102).

2.1.5.3. Metformin ve obezite

Genetik, metabolik, davranışsal, çevresel, kültürel ve sosyo-ekonomik etkenler obezite nedeni olabilmektedir (103). Obezite bilindiği gibi koroner kalp hastalıkları, DM2, karaciğer yağlanması, inme, safra kesesi hastalıkları ve kanser gibi değişik kronik hastalıklara neden olabilmektedir (104,105). Bilindiği gibi

obezite alınan enerji ile kullanılan enerji arasındaki dengesizlik olara tanımlanmaktadır. Alınan enerji ise hipotalamusda bulunan özelleşmiş nöronlar aracılığı ile insülin ve leptin gibi metabolik sinyallerle düzenlenmektedir (106,107). Hipotalamusta bulunan bu özelleşmiş nöronların yemek tüketim kontrolünü AMPK aracılığı olarak gösterdiği düşünülmektedir (108). Bu nedenle AMPK üzerinden bir etkinliğe sahip olan metforminin obezite tedavisinde de yararlı olabileceği düşünülebilir (Şekil 2.7). Nitekim, metforminin PKOS'lu hastalarda kilo yönünden yararlı bir etkisi olduğu gösterilmiştir (109).

Metforminin PKOS ve DM2 gibi hastalığı bulunmayan obez bireylerde de etkinliği araştırma konusudur (110). Metforminin doğrudan etkisiyle adipoz dokunun genişlemesini ve pre-adiposit kültür hücrelerinde hücre içi lipid birikimini önlediği gösterilmiştir (77). Metforminin bu etkisi kilo kaybının nedeni olarak düşünülebilir. Beyaz adipoz dokuda metformin AMPK aracılığı katabolik yolağı etkin hale getirmenin yanında trigliserit depolanmasını azaltarak daha ufak adipozit hücrelerin oluşmasını sağlamaktadır (111). Metforminin bir başka etkisi ise leptin düzeylerini düşürmektir (112).



Şekil 2.7. Metformin ve adipoz doku arasındaki ilişki (77)

2.1.5.4. Metformin ve kardiyovasküler sistem

2.1.5.4.1. Kalp

Kalp ve kaslar minimal düzeyde enerji depolayabilen dokulardır, bu yüzden metabolik stres altındaki bu organlarda AMPK enerji sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Metabolik stres sırasında AMPK aktivasyonu sonucu ATP üretiminin ve bunun sonucu dokularda yağ asidi oksidasyonu, glukoz alımı ve glikolizisin arttığı gösterilmiştir (113-115). Diğer taraftan kalp yetmezliği ile mitokondrial biogenezis arasında önemli bir bağ olduğu düşünülmektedir (116). Bu açıdan bakıldığında AMPK'nin hipertansiyonda, miyokart hasarında, anterogenezis ve enflamasyonda rol aldığı gösterilmiştir (117).

AMPK aktivasyonunun fosforilasyon ve endothelial nitrik oksit sentez (eNOS) aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir (118). Bunun yanında AMPK aktivasyonu mitokondrial biyogenez ve fonksiyonunda etkili “Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptor- γ Koaktivator” (PPAR-1 α) ekspresyonunu da artırmaktadır (119). Bir başka bulgu ise iskemik kalpte AMPK aktivasyonunun enerji homeostazında anahtar rol oynadığıdır (115).

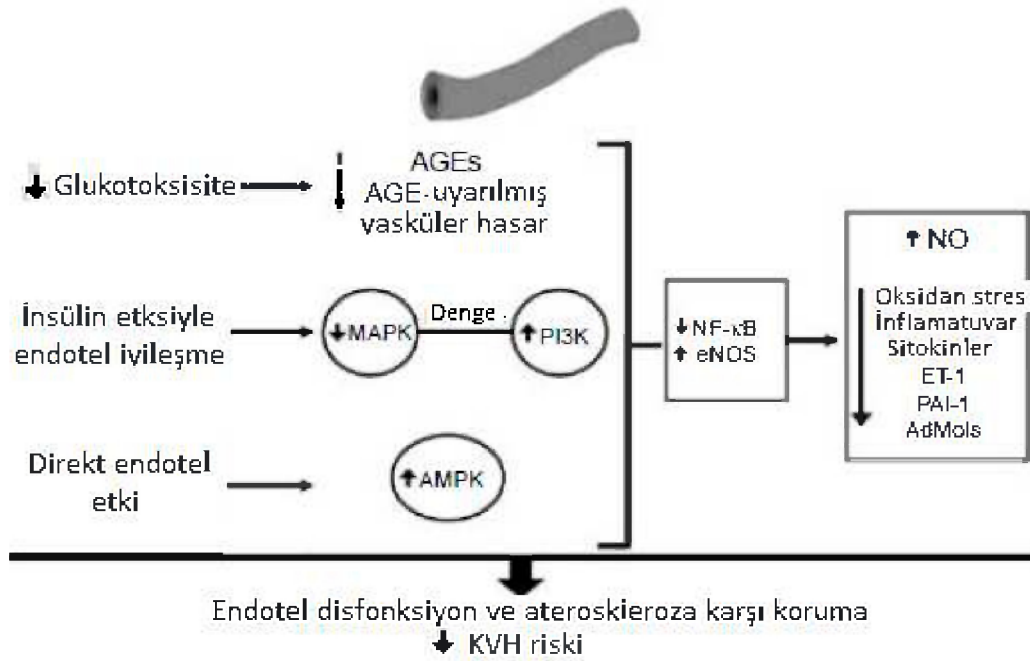
DM2 olmayan obez kişilerde yapılan BIGPRO (biguanides and the prevention of the risk of obesity) çalışması bu açıdan ilginçtir. Bu çalışmada bir yıl boyunca metformin ve plasebo verilen kişilerdeki metabolik parametrelerdeki değişiklikler gözlenmiştir. Çalışmada kilo, plazma insülin, glukoz, total kolesterol ve fibrinolitik marker değerlerindeki değişiklikler takip edilmiştir (120,121). Çalışmanın sonuçları metforminin kardiyovasküler risk açısından önemli olan açlık insülin düzeyi, total kolesterol ve Apo B düzeylerinde düzelme sağladığını göstermiştir (122,123).

Metforminin kardiyovasküler açıdan yararını sadece antihiperglisemik etkisi ile açıklamak yetersiz olacaktır. Metformin aynı zamanda lipid metabolizmasını, kalp kası ve damar düz kasında hücre içi kalsiyumun kullanımı ve endotelial fonksiyonları düzenleyerek de olumlu kardiyovasküler etkiler göstermektedir (45). Benzer şekilde, metforminin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu, kardiyak fibrozisi inhibe ettiği de literatürde yer almaktadır (124-126).

2.1.5.4.2. Damarlar

Endotel disfonksiyonunda obezite ve insülin direncinin de rol oynadığını gösteren yayınlar bulunmaktadır (127). Endotel disfonksiyonu; kabaca vazokonstriktör maddeler ile vazodilatör maddeler arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır (128). Kardiyovasküler sistemde endotel fonksiyonları açısından insülinin, nitrik oksit (NO), endothelin-1 (ET-1) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) salıverilmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (129).

AMPK aktivasyonunun eNOS ve NO sentezini arttırdığı anlaşılmıştır (118,130). Diğer taraftan meforminin doğrudan damar genişletici etkisi olduğu da düşünülmektedir (131). Metforminin vazodilatasyon oluşturmamasının mekanizması olarak önerilen bir başka olaysa arteriyel düz kas hücrelerinde hücre içi kalsiyum düzeylerini düşürmesidir (132). Bu etkilerin bir sonucu olarak metforminin pulmoner arterial hipertansiyonda koruyucu etki gösterdiği anlaşılmıştır (133). Metforminin kardiyovasküler koruyucu etkisine antioksidan özelliğinin katkısı da bulunabilir (134). Başka bir önemli bulgu da AMPK aktivasyonun düz kas proliferasyonundan sorumlu önemli bir madde olan anjiyotensin II'yi inhibe etmesidir (135). Metforminin damar duvarındaki hücrelerde pro-inflamasyonu inhibe etmesi de kardiyovasküler açıdan önemlidir (136) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Metformin ve damarlar arasındaki ilişki (77)

2.1.5.5. Metformin ve alkolik olmayan karaciğer yağlanması

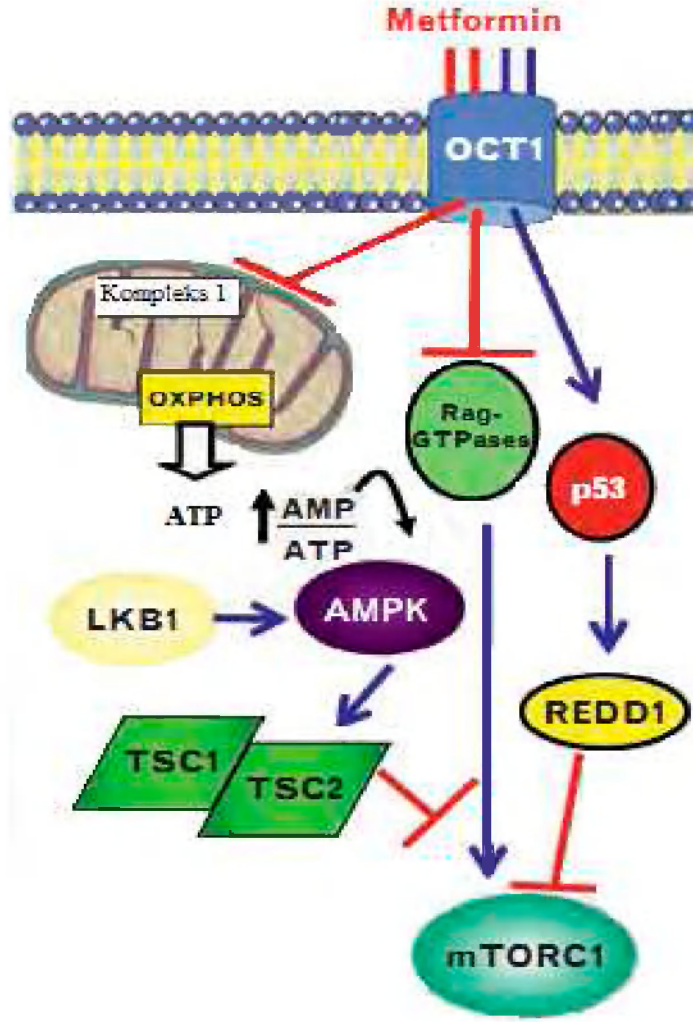
Alkolik olmayan karaciğer yağlanması (non-alcoholic fatty liver disease) (NAFLD) Asya-pasifik bölgesinde insanların % 20 sini etkileyen bir hastalıktır ve hastaların %70-80'lik kısmını obezler oluşturmaktadır (137,138). NAFLD ile metabolik sendrom arasında ilişki olduğu bunun yanında NAFLD'nin obezite ve DM2 hastaları için önemli bir risk olduğu da düşünülmektedir (139). Abdominal yağ birikmesi ile karaciğer yağlanması arasında bağ olduğu ve bunun temelinde de insülin direncine bağlı metabolik anormallik olduğu düşünülmektedir (140). Bu durumda NAFLD'li hastalarda metforminin yararlı olabilir (141). Bu düşünceye paralel olarak, metforminin obez farelerde karaciğer yağlanmasını düzelttiğine yönelik bir yayın mevcuttur (142).

2.2. Kanser ve Metformin

Vaka kontrol çalışmalarında DM2 hastalarının kanser olma risklerinin arttığı gösterilmiştir (143). DM2 hastalarında görülen yüksek kilo ve obezite kanserleşmede etkin olan faktörler olarak değerlendirilebilir (144). DM2 hastalarında kanser görülme sıklığının, insüline karşı direnç ve hiperinsülinemi ile ilişkisi olabilir. Bunun yanında IGF, steroid seks hormonları sentezinin artışı, enflamatuvar sürecin ve

adipokin homeostazının bozulması da kansere neden olan etkenler olarak düşünülmelidir (145). İlginç olarak, metformin kullanan DM2'li kanser hastarında ölüm oranının düştüğü anlaşılmıştır (146,147). Metforminin spesifik olarak meme, prostat ve pankreas kanserlerinde azalış sağladığına ilişkin bulgular dikkat çekicidir (148,149). Metforminin bir başka özelliği ise; standart kemoterapinin neden olduğu toksisiteyi azaltmasıdır. Bu yüzden tedavide metforminin destekleyici bir ilaç olabileceği akla gelmektedir (150).

Metforminin kanser hücreleri üzerindeki etkisinin, bu hücrelerde AMPK/mTOR Complex 1 (mTORC1) yolağındaki düzenleyici rolüyle ilgili olabileceği düşünülmüştür. mTORC1; protein sentezini ve hücre proliferasyonunu düzenleyen bir proteindir (151). Metforminin antineoplastik etkinliği AMPK aracılıklı mTORC1 inhibisyonu yapması ve sonuçta protein sentezini ve hücre proliferasyonunu azaltmasıyla açıklanmaktadır (152,154). AMPK inhibisyonu yapan small interfering RNA (siRNA) ve compound C varlığında ise metforminin antiproliferatif etkisi ortadan kalkmaktadır (152,153). Bunun yanında metforminin mTORC1'i AMPK ve Tuberous sclerosis protein 1/2 (TSC1/2) yolağından bağımsız Rag GTPase aracılıklı inhibe ettiği de bulgular arasındadır (155) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Metformin ve mTORC1 ilişkisi (151)

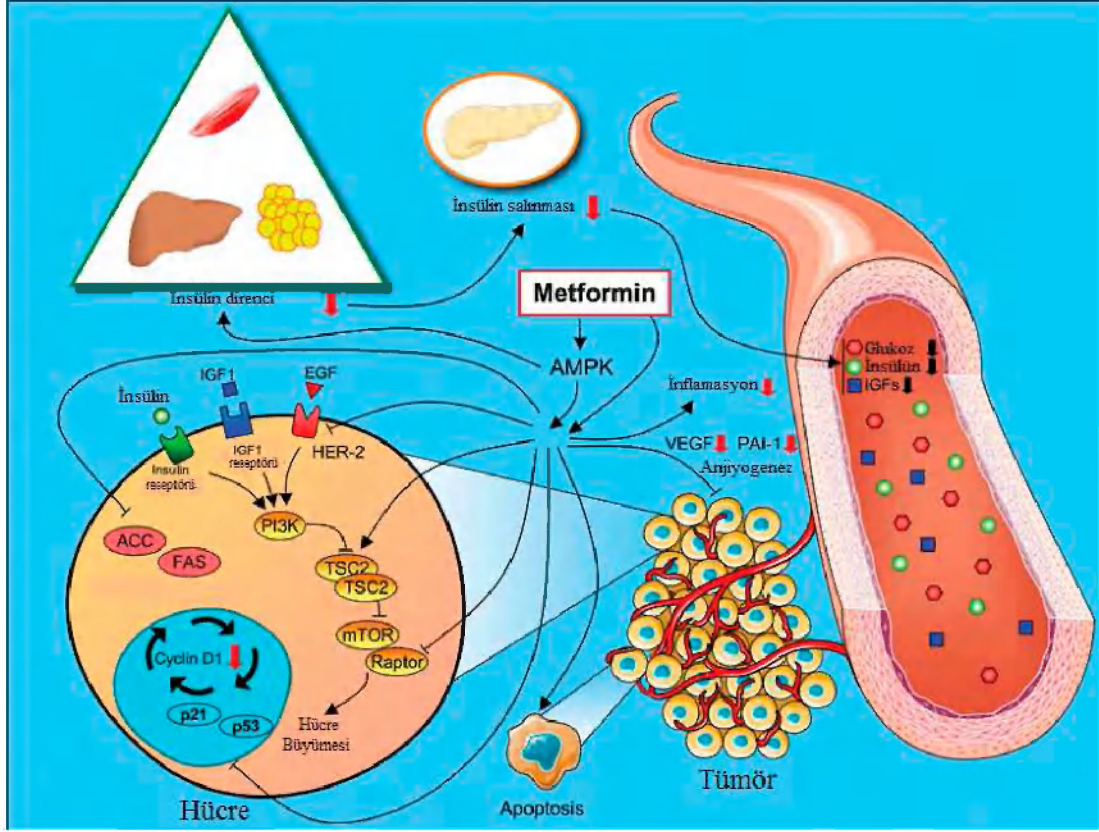
Metforminin kanser hücrelerinde apoptozisi tetiklediğini gösteren yayınlar da vardır (156-158). Bu olay kanser hücrelerinde kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımlı olmayan yollardan gerçekleşmektedir (158,159). Bununla birlikte metforminin lösemi ve gliyoma kanser hücrelerinde sisplatine karşı antagonist etkinlik gösterdiği gösterilmiştir. Burada metforminin sisplatinin indüklediği apoptozisi Akt yolağı aktivasyonu ile baskılandığı düşünülmektedir (160).

Metformin kanser hücrelerini apoptozise götürmesinin yanınada, bu hücrelerde otofajiyi de indüklemektedir (161). Bu etki ise hücrelerde otofajiyi ve metabolik strese cevabı yöneten AMPK/mTOR aracılığı ile gerçekleşmektedir. Otofajinin; kanser hücrelerinin metformine duyarlılık düzeyine göre oluştuğu düşünülmektedir. Diğer taraftan metforminin AMPK aktivasyonunu indüklemesi için

tumor suppressor protein olan LKB1'e gereksinimi duyduğu saptanmıştır (162). Ancak metforminin antitümoral etkinliğini LKB1 bağımlı olmadan da gösterdiğini bildiren bir yayın mevcuttur (163).

Birçok araştırmanın desteklediği bir durum da metforminin kanser hücrelerinde hücre siklusunun ilerleyişini durdurmasıdır. Hücre siklusundaki bu noktalar G₀/G₁, G₂/M veya S evreleri olarak düşünülmektedir (151). Bunun yanında AMPK'nin tumor protein 53 (p53) ekspresyonu ve forforilasyonundan sorumlu olduğu ve (164,165) örneğin prostat kanser hücre hattında p53 bağımlı siklin D1 protein ekspresyonunu ve “regulated in development and DNA damage response 1” (REDD1) düzeyini düşürerek hücre siklusunu durdurduğu gösterilmiştir (166). Metforminin Akt aktivasyon etkinliğini düşürerek kolon kanser hücre hattında proliferasyonu azalttığı da rapor edilmiştir (167).

Metforminin bir diğer ilgi çeken etkinliği ise “vascular endothelial growth factor” (VEGF) ve “plasminogen activator inhibitor-1” (PAI-1) düzeyini azaltması olarak belirtilmiştir. Bu yol metforminin tümörde anjiyogenezi durdurma mekanizmalarından biri olabilir (168). Metforminin antitümör etkinliği için önerilen mekanizmalardan bir diğeri ise AMPK aracılıklı yağ asidi sentezini ve ACC'yi düşürmesidir (169). Meme kanser hücre hattında ise metformin, hem AMPK bağımlı hem de AMPK'den bağımsız olarak p70 S6 kinase 1 onkoprotein (p70^{S6K1}) inhibisyonu ile “human epidermal growth factor receptor 2'nin” (HER-2) ekspresyonunu baskılamaktadır (170) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Metforminin antitümöral etkinliği (171)

2.3. Hücre Kültürü

2.3.1. Hücre ve doku kültürü

Hücre kültürü temel olarak hücrelerin kontrol altında kendi çevrelerinden ayrı bir kültür ortamında yaşatılmasıdır. Burada tek bir hücre veya hücrelerin doku ile bağıntısı olmadan in vitro çoğalması anlaşılmalıdır (172,173). Sonuç olarak hücre kültürlerinde bitkilerin, mantarların, bakterilerin protistlerin ve ökaryotik hayvan hücrelerinin kültürleri yapılabilmektedir. Günümüzde hücre kültürlerinden birçok kanser araştırmasında yararlanılmaktadır. Bunun yanı sıra bu teknik; sitogenetik, biyokimyasal, moleküler ve biyolojik çalışmalarda, farmasötik proteinlerin üretiminde, çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, doku mühendisliğinde, aşı üretiminde, kök hücre araştırmalarında, tüp bebek ve kısırlık tedavileri konusunda yapılan araştırmalarda kullanılmaktadır (172).

Hücre kültürü çalışmalarının çeşitli avantajları vardır. Bunların başında çok sayıda hayvanın öldürülmesinin önlenmesi gelmektedir. Başka avantaj ise hücre kültürlerinde sonucun hızlı alınması ve varsa etkinin doğrudan doğruya

gözlenebilmesidir. Bunun yanında hücre kültürlerinde çalışılan maddenin etiksi her cins doku veya hücrede ayrı ayrı araştırılabilir ve karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan araştırmalar da yapılabilir. Ancak tek başına hücre kültürlerinden yeterli bilgi sağlanması da mümkün değildir. Bunun yanında hücre kültürü çalışmalarında bazı nedenlerle sonuçlar değişken ve yanlış olabilir. Bunlar; kültürlerin bakteri, mantar veya mikoplazmalar tarafından kontamine olmaları, medyumdaki besin seviyesindeki azalma ve hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimlerinden kaynaklanan nedenler olarak sıralanabilir (172).

2.3.2. Tarihçe

1885 yılında Wilhelm Roux, tavuk embriyosunun medullar plağını sıcak tuzlu suda birkaç gün yaşatabilmiştir. Bu bildirilmiş ilk başarılı eksplantasyon olayıdır. 1887 yılında ise Arnold, akçaağaç ağacının yumuşak süngerimsi doku parçalarını kurbağaya implante etmiş, bunlar lökositler tarafından istila edildiğinde ise lökositleri sıcak tuz solusyonu bulunan bir kaba almış ve lökositlerin tuzlu suya geçerek kısa bir süre yaşadıklarını göstermiştir. Bu ön çalışmaların ardından insan doku ve hücrelerindeki çalışmaların 1898 yılında başlamış ve Ljunggren tarafından ilk kez başarıya ulaşılmış olduğu genel kabul görmektedir. Bu ilk çalışmada insan deri dokusunu asidik sıvıda yaşatılması başanılmıştır. Hücre kültüründe en önemli köşe taşlarından biri; 1907 yılında Ross Harrison'ın kurbağa embriyoları ile yaptığı deneylerde, hücrelerin normal fonksiyonlarını in vitro olarak sürdürdüğünü göstermiş ve tekrarlanan bir teknik olduğu için bu çalışma doku kültürünün gerçek başlangıcı olarak kabul edilmiştir. Kanseri hücrelerinin kültürünü yapmayı ise 1914 yılında Losee ve Ebeling başarmışlardır. Hücre kültürü yönteminde en ekili çalışmalar Dr. Wilton Earle tarafından gerçekleştirilmiştir. 1943 yılında Earle, ilk kez devamlı kemirgen hücre kültür hattını cam üzerinde yapmayı başarmıştır. Bugünkü hücre kültürü ile ilgili mevcut metodlarımızın mükemmelliği Dr. Wilton Earle başkanlığındaki Amerikan Ulusal Kanseri Enstitüsündeki gruba çok şey borçludur. Bu grup ilk defa doğrudan cam üzerinde çok sayıda hücre üretmiş, ilk defa tek hücrelerden kültür oluşturmuş ve ilk defa süspansiyon hücre kültürlerini hazırlamıştır. 1950 ve 1960 lı yıllarda Eagle, Fischer, Parker, Healy, Morgan, White ve Waymouth, hücre kültürlerinde kullanılmak üzere medyum araştırmaları ile günümüzde kullanılan kültür medyumlarının gelişmesine büyük katkılar

sağlamışlardır. Devamlı kanser hücre hatlarında ilk başarılı çalışma 1952 yılında George Gey tarafından gerçekleştirilmiştir. İnsan servikal karsinomasından HeLa hücre soyunu üretmiştir. 1955 yılında Eagle, doku kültürü metodlarını ve kullanılan medyumları tanımlamıştır. Böylece kolay sterilizasyon ve kontaminasyon şansının azalması mümkün olmuştur. Hücre kültürü çalışmalarında köşe taşlarında biri de; 1958 yılında Harris aynı türlerin farklı tiplerini içeren hücre hibridizasyonunu indüklemeyi başarmıştır. 1965 yılında Ham, ilk defa serumsuz medyumunu tanımlamıştır. Nihayetinde 1975 yılında Köhler ve Milstein, hibrit hücre kültüründe monoklonal antikör üretmeyi başarmışlardır. 1986 yılında Martin ve Evans ile arkadaşları, fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini saflaştırarak kültürünü yapmışlardır. 1998 yılında ise Thomson, insan embriyonik kök hücrelerini izole ederek kültürünü yapmayı başarmıştır(172-175)

2.3.3. Hücre kültürlerinin kökenlerine göre sınıflandırılması

Primer Hücre Kültürü: Primer hücre kültürü doğrudan yaşayan canlıdan alınan hücrelerle yapılmaktadır. Bu hücre hatlarında doğrudan organizmadan alınmış hücrelerle deneyler gerçekleştirilir. İlaç, aşı, virüs gibi araştırma ve geliştirmede bu tip kültürler kullanılmaktadır. Bu yöntemin tercih edilme nedeni ise primer hücre kültürlerinin ait olduğu türe en yakın hücreler olmalarıdır (172).

Sınırlı Hücre Hatları (İkincil Hücre Hatları): Primer hücre kültürü hücrelerinin bulunduğu kültürden alınarak pasajlanması yapıldığında bu hücreler ikincil (sekonder) hücre kültürleri olarak adlandırılır. Bu kültür hücreleri belirli sayıda bölünme yeteneğine sahiptir ve pasajlarla karyotiplerinde değişikliğe uğrarlar. En çok 50 kere pasajlanabildikleri için sınırlı hücre hatları olarak isimlendirilmektedir. Hücreler bölünme sınırlarına varınca yaşlanmaya girerek ölürlür. Bu tip hücre hatları da orjinal dokuya yakın olarak değerlendirilmektedir ve ilk pasajlarında orjinleri ile %75 oranında aynı karyotiplidirler. Primer hücre kültürleri gibi ait olduğu türe yakındırlar ve daha fazla hücre sayısına ulaşabildiği için çalışmalarda tercih edilmektedir (147).

Devamlı Hücre Hatları: Diploid veya kanserli dokulardan elde edilen primer hücre kültürlerinden ve sekonder hücre hatlarından transformasyon ile meydana gelen hücre hatlarıdır. Transformasyon işlemi kimyasallar veya virüsler yoluyla gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemle hücreler devamlı bölünüp çoğalma özelliği

taşıyan hücrelere dönüşürler. Sonuçta elde edilen hücre hatları temelde kanser hücreleriyle benzer özellik gösterdiği için kanser araştırmalarında tercih edilmektedir (147).

Hibridomalar: Bu tip hücre kültürü, canlıdan alınan hücrelerle devamlı bir hücre hattının birleştirilmesinden meydana gelmektedir. Sonuç olarak yeni bir hibrit hücre hattı ortaya çıkar. Bu yöntem monoklonal antikor üretiminde kullanılmaktadır (147).

2.3.4. Kanser hücre hatları

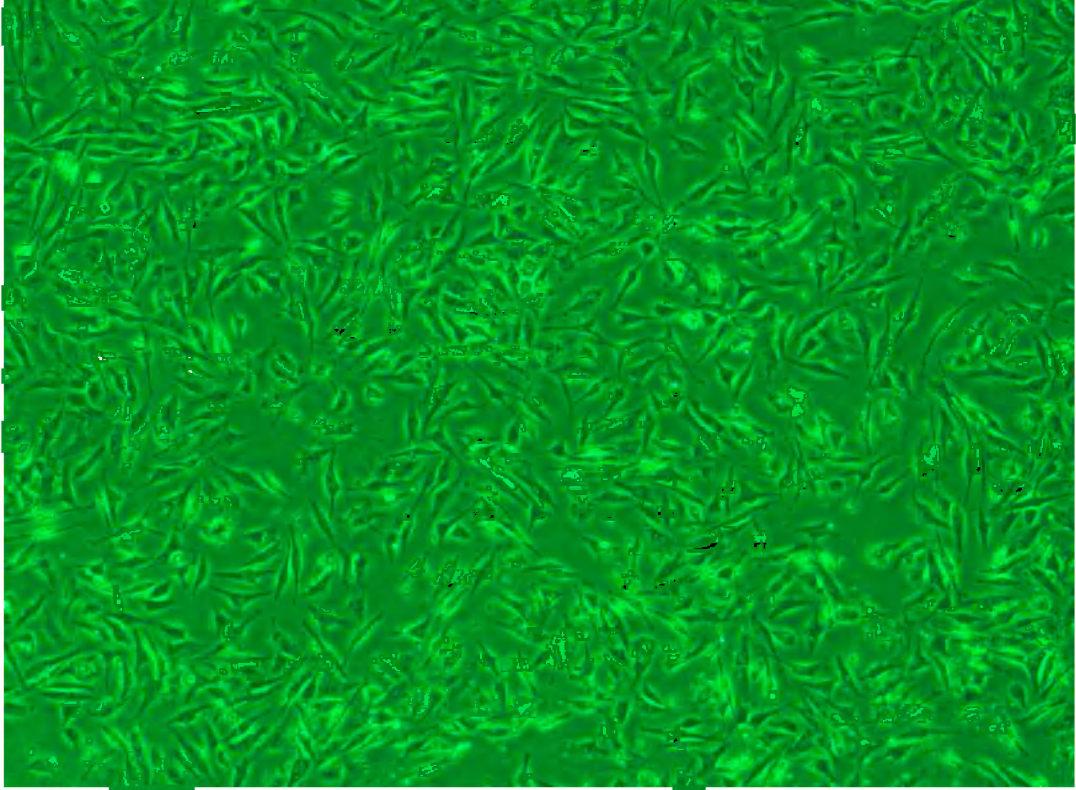
Kanser hücreleri; hızlı ve sınırsız çoğalabilen, çevre dokuya yayılabilen ve özgün mikroçevresinden bağımsız olarak yaşamını devam ettirerek metastatik özellik kazanabilen hücrelerdir. Tümör hücreleri bu özelliklerini hücrenin, canlılığını devam ettirebilmesi, büyümesi ve farklılaşması gibi biyolojik olayları etkileyen pek çok mutasyonun birikmesi sonucu, genetik yapılarının değişmesi ile kazanmaktadır (176).

Literatürde yaklaşık 3000 kadar kanser hücre hattı tanımlanmıştır. Genellikle bunların 100 kadarı çalışmalarda tercih edilerek sıklıkla kullanılmaktadır. İlk defa 1951 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde servikal kanser hastası Afrika kökenli bir hastanın kanser dokularının laboratuvarında kültürü gerçekleştirilmiştir. Henrietta Lack adındaki kişi kanser sonucu ölmüş ancak kişiden izole edilen hücre kültürüne, isminin ve soyisinin ilk iki harf alınarak HeLa adı verilmiştir. HeLa kanser hücre hattı halen bugün de araştırmalarda kullanılmaktadır. Kanser hücre hattı çalışmalarının en büyük avantajı değişik laboratuvarlarda tekrarlanabilir olmalarıdır (172). Devamlı hücre hatları “The European Collection of Cell Cultures (ECACC)” veya “American Type Culture Collection (ATCC)”den temin edilebilir.

2.3.5. T98G glioblastoma multiforma

Nöroglia hücrelerinin yapısı nöronlara benzemekle birlikte görevleri onlardan farklıdır. Bunlar sinir dokusunun dejenere olduğu yerlerde çoğalarak orayı bir yama gibi kapatır, nöronların beslenmesinde ve artık maddelerin uzaklaştırılmasında rol oynarlar. Nöronları komşu nöronlardan ayırarak, impulsların nöron boyunca düzenli iletilmesine yardımcı olur ve nöronlar arasında destek görevi görürler. Ayrıca mikrop, toksin v.b. zararlı etkenlerin nöronlara ulaşmasına engel olurlar (177).

T98G glioblastoma multiforma hücre hattı 13.11.1986 tarihinde 61 yaşında, erkek, kafkas kökenli bir insanın glioblastoma multiforma tümöründen izole edilmiştir. T98G hücre hattı morfolojik olarak fibroblast özellikte olan transforme edilmiş bir hücre hattı olarak tanımlanabilir (178) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. T98G glioblastoma multiforma

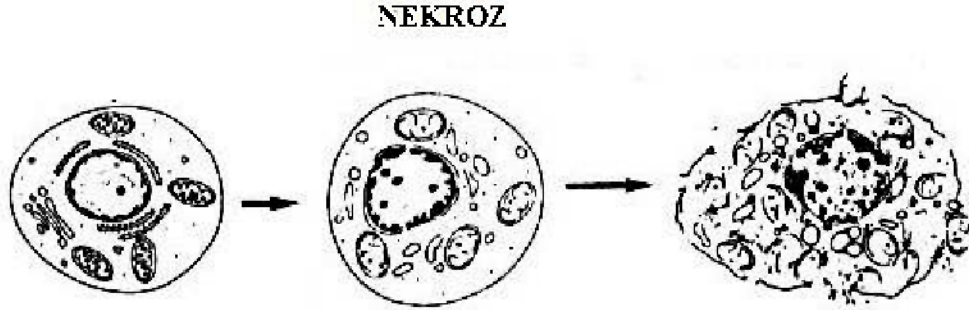
2.4. Hücre Ölüm Şekilleri

Tüm canlılarda hücre ölümü patolojik yada fizyolojik süreçler sonunda gerçekleşmektedir. Başlıca iki tip hücre ölüm şekli vardır; patolojik hücre ölümleri (nekroz) ve fizyolojik “programlanmış” hücre ölümleri (apoptozis)’dir. Bunların yanında alternatif programlı hücre ölümü olarak tanımlanan otofajik ölümden de söz edilebilir.

2.4.1. Nekroz

Nekroz; hücrenin şişip parçalanması ile oluşan, ani ağır iskemi, yüksek toksin seviyeleri ve mekanik travma gibi çevresel faktörlerin neden olduğu patolojik bir süreçtir. Bu güne kadar nekrozda hücre içi denetim mekanizmalarının herhangi bir aktivitesinin olduğuna dair bir kanıt bulunamamıştır. Hücrenin kendi isteği ile değil

çevresel bir etken sonucu öldüğü genel kanıdır. Hücrenin şişmesi ve sonuç olarak hücrenin parçalanmasıyla hücre içeriğinin çevreye dağılması bu bölgede inflamasyona neden olmaktadır (179) (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Nekroz (180)

2.4.2. Apoptozis

Gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak dokularda gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölüm şekline apoptozis denir (181). Apoptozis ve yeniden yapım (mitoz) dokularda homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir (182). Çok sayıdaki önemli hastalığın ortaya çıkma nedeni bu dengenin bozulmasıdır. Bir şekilde hızlanmış veya yavaşlamış apoptozis patolojiktir. Programdaki bozukluğun neden olduğu aşırı hücre artışı kansere, hücre azalışı ise nörodejenaratif gibi hastalıklara neden olmaktadır (183). Normalde canlıda yaşlı veya hasarlı hücreler doğal süreç içerisinde programlı olarak kendi kendini apoptozis ile öldürür. Apoptozisin en önemli işlevlerinden biri DNA hasarına uğramış hücrelerin ölümünü sağlaması olarak bilinmektedir. Bu tip hücrelerin mutasyona uğrayıp bir tümör hücresine dönüşmeden apoptotik program ile öldürüldüğü düşünülmektedir (184). Apoptozisin düzenlenmesindeki hatalar kanser biyolojisinin ana konularından birini teşkil etmektedir (185).

Apoptozisi başlatan sinyal hücre dışından veya hücre içinden gelebilir (186). Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin spesifik ligandlarının uyarılması sonucu apoptozis hücre dışından başlatılır. Apoptozis, Fas (diğer isimleriyle APO-1/CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1'i (TNFR-1) ilgili ligandların uyarılmaları sonucu

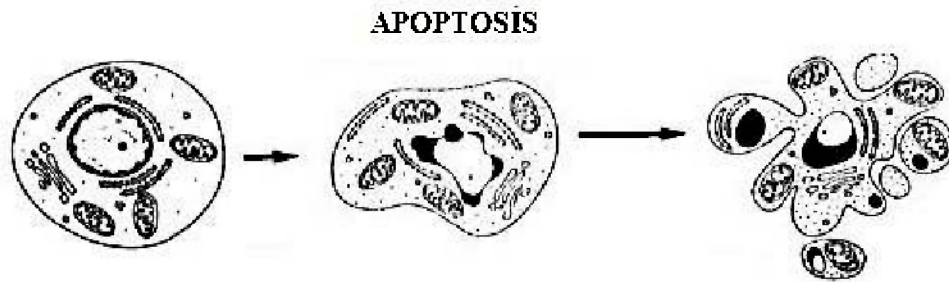
dışarıdan indüklenir (187). Bunun yanında hücre ölüm sinyallerini içeriden başlatan DNA hasarı, hücre içi pH değişiklikleri, hücre içi kalsiyum seviyesinde ki artış ve hücre siklus bozuklukları da hücreyi apoptozise götüren hücre içi etkenler olarak düşünülmektedir(188). Bunların yanında endoplazmik retikulum (ER) aracılıklı apoptoziste söz konusudur. Kaspaz ailesinin bir üyesi olan kaspaz-12'nin hücrede ER ile primer ilişkisinin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (189).

Apoptozisin mekanizması gerçek anlamda tam olarak açıklanamamasına rağmen, apoptozis ile bağlantı kurulan en önemli olay kaspazların aktivasyonudur. Kaspazlar; sistein proteazlardır, hücrede inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Apoptozisin hücre içi işleyişinde Bax ve Bad proteinlerinin mitokondride PTP (permeability transition por) oluşumunu sağladığı ve buna bağlı olarak da mitokondriden sitokrom-c salıverimesi ile önemli rol üstlendikleri düşünülmektedir (190). Bunun yanında Bcl-2 proteinlerinin de neden olduğu hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak sitokrom-c salıverilmesine yol açtığı düşünülmektedir (191). Mitokondriden salıverilen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli bir rol teşkil etmektedir (191). Sitokrom-c sitoplazmik protein olan APAF-1'e (apoptotic protease activating factor-1) bağlanarak aktivasyonunu sağlar. Ardından ATP'nin de katılımıyla "apoptozisom" adı verilen bir kompleks oluşur (192). Bu kompleksin işlevi inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlamaktır. Aktif kaspaz-9'un ise apoptoziste önemli bir rolü olan efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive ettiği belirtilmiştir.

Apoptoziste işlevsel olarak en önemli rollerden birini kaspaz-3 oynamaktadır. Kaspaz-3 aktivitesi ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindiriminin ve kromozomal DNA'nın degradasyonunun sağlandığı düşünülmektedir. Aktif kaspaz-3'ün, ICAD'ı(inhibitor of caspase activated DNase) CAD(caspase activated DNase) haline getirerek kaspaza bağlı DNA fragmentasyonunu başlatan ana etken olduğu düşünülmektedir. Böylece sonuçta DNA apoptozise özgü 180-200bp ve katları şeklindeki küçük parçalara ayrılmaktadır (193). Kaspazların ayrıca DNA'nın tamirinde görevli olan enzimlerden Poly ADP-ribose polymerase'ı (PARP) da engelleyerek etkinlik gösterdiği düşünülmektedir (194). Özetlenecek olursa apoptoziste birbirini izleyen dört basamaktan söz edilebilir:

1. Hücre dışı veya hücre içi faktörlerden kaynaklanan uyarı ile apoptozisin programlanması
2. Hücrede kaspazların aktivasyonu
3. Hücrede morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler
4. Apoptotik cisimciklerin fagositozu

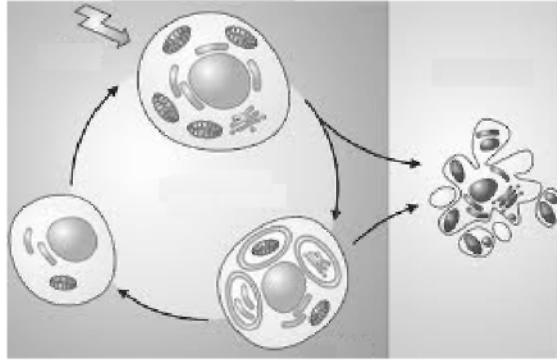
Apoptozis, hücrede kendine özgü morfolojik değişiklikler sergiler. Hücreler yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederek su kaybederler. Böylece hücre küçülür ve büzüşmüş bir hal alır. Sitoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirlerine yakınlaştığı izlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar ve organeller genel olarak sağlamdır. Dilatasyona uğrayan sisternalar hücrenin yüzeyi ile birleşerek yüzeyde krater manzarası oluşturur. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar. En önemli karakteristik değişiklik çekirdekte izlenir. Çekirdek de hücre gibi büzülür. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Elektron mikroskobu ile bakıldığında kromatinden yoğun granüllerin yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Nukleus bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apoptotik cisim” adı verilir. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur (195) (Şekil 2.14).



Şekil 2.13. Apoptozis (180)

2.4.3. Otofaji

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınıp lizozomal olarak parçalanmasıdır. Temel olarak işlevi; uzun ömürlü proteinlerin ve hücre içi organellerin parçalanarak oluşan yapı taşlarını hücre kullanımına yeniden kazandırmaktır. Bazı koşullar altında otofaji hücreyi kaspazdan bağımsız bir yolla üzerinden öldürebilmektedir. Otofajik hücre ölümünde en karakteristik özellik, sitoplazmada oluşan, içersinde hayati önem taşıyan proteinlerin ve mitokondri gibi organellerin bulunduğu, iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili keseciklerin oluşmasıdır. Bu kesecikler lizozomla birleşip içlerinde taşıdıkları protein ve organellerin lizozomal enzimler tarafından parçalanmasını sağlarlar (196) (Şekil 2.13).



Şekil 2.14. Otofaji (197)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İnsan glablastoma multiforma hücre kültüründe (T98G) metforminin apoptotik etkisinin incelenmesi amacıyla planlanan bu çalışmada kullanılan T98G hücre kültürü İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Histoloji Bölümü Laboratuvarından temin edilmiştir. Çalışmanın tamamı Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Fakültesi Farmakoloji AD. Hücre Kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasallar

1. DMEM, GIBCO (ABD)
2. Fetal Sığır Serumı , GIBCO (ABD)
3. Tripsin EDTA, %0.05, GIBCO cat:03-053-1A (ABD)
4. Antibiyotik, GIBCO 100X (ABD)
5. Metformin, Sigma-Aldrich (ABD)
6. H₂O₂, %50, Acros Organics (ABD)
7. Caspase 3 colorimetric kit, Invitrogen, KHZ0022 (ABD)
8. Methyl Green, TACS cat:4800-30-18 (ABD)
9. MTT, Roche (ALMANYA)
10. PBS, Santa Cruz 10X liquid (ABD)
11. Biüret çözeltisi, Norateks Kimya San. Tic. Lts. Sti. (TÜRKİYE)
12. Acridine oranj, Invitrogen (ABD)
13. Ethidium Bromide, Sigma (ABD)
14. TUNEL, Millipore (ABD)
15. DNA izolasyon kiti, Roche (ABD)
16. Microscopy entellan, Merck (ABD)
17. Loading dye, Vivantis 6X (MALEZYA)
18. BSA, GIBCO (ABD)
19. Agaroza, Biotechnologie Gmbti, PeqGOLD Universal (İNGİLTERE)
20. TBE Buffer, Biochemical, Vivantis 10X (MALEZYA)

3.2. Kullanılan Cihazlar

1. ELISA, Thermo Scientific, Multiskan FC (FİNLANDİYA)
2. Mikroskop, Olympus CKX41 ve Nikon eclipse 80i (JAPONYA)
3. Kamera, Infinity lite ve Nikon DS-Fi1 (JAPON)
4. Santrifüj, Hettich Zentrifugen, Universal 320R (ALMANYA)
5. Etüv, Nuare autoflow, iso class 5 (ABD)
6. Kabin, Biosafety Cabinet, class II (TÜRKİYE)
7. Elektroforez Güç Kaynağı, Enduro, Power Supplies (TAYVAN)
8. Elektroforez Tank, Thermo Scientific, owl easycast B2 (FİNLANDİYA)
9. UV Görüntüleme, Vilber Lourmat, Infinity-1100/20M (FRANSA)

3.3. Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Hücre kültürü

3.3.1.1. Sıvı azot tankından alınan hücrelerin ekimi ve tripsinizasyonu

Dondurulmuş halde sıvı azot tankında bulunan kriyotüplerdeki T98G hücreleri 37°C'lik su banyosunda hızla çözüldü. Hücreler çözüldükten sonra tüp kapağı %70'lik alkol ile silindi. 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 10 ml medyum (%10 FBS, %1 antibiyotik, DMEM) yavaşça eklendi ve 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan hücre pelletine 10 ml medyum yavaşça eklendi ve 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra Hücre pelleti üzerine 5ml yeni medyum eklendi ve hücreler iyice süspanse edildi. Süspansiyon 25cm²'lik flasklara aktarıldıktan sonra mikroskop altında değerlendirildi ve 37°C derece CO₂ inkübatörüne kaldırılarak bir gün beklemeye alındı. Ertesi gün mikroskop altında hücre canlılığı incelendi ve medyumları değiştirildi.

24 saatlik inkübasyondan sonra flask inkübatörden alındı ve steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki medyum döküldü. Flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 1ml PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra PBS döküldü ve üzerine 1ml %0,05'lik tripsin-EDTA ilave edilerek flask hücreler zeminden ayrılmaya kadar inkübatörde bekletildi. Inkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları belirlendikten sonra, hücreleri tripsinden uzaklaştırmak için flaska 2 ml medyum eklenerek hücreler steril falkon tüpe aktarıldı ve 1500 RPM'de

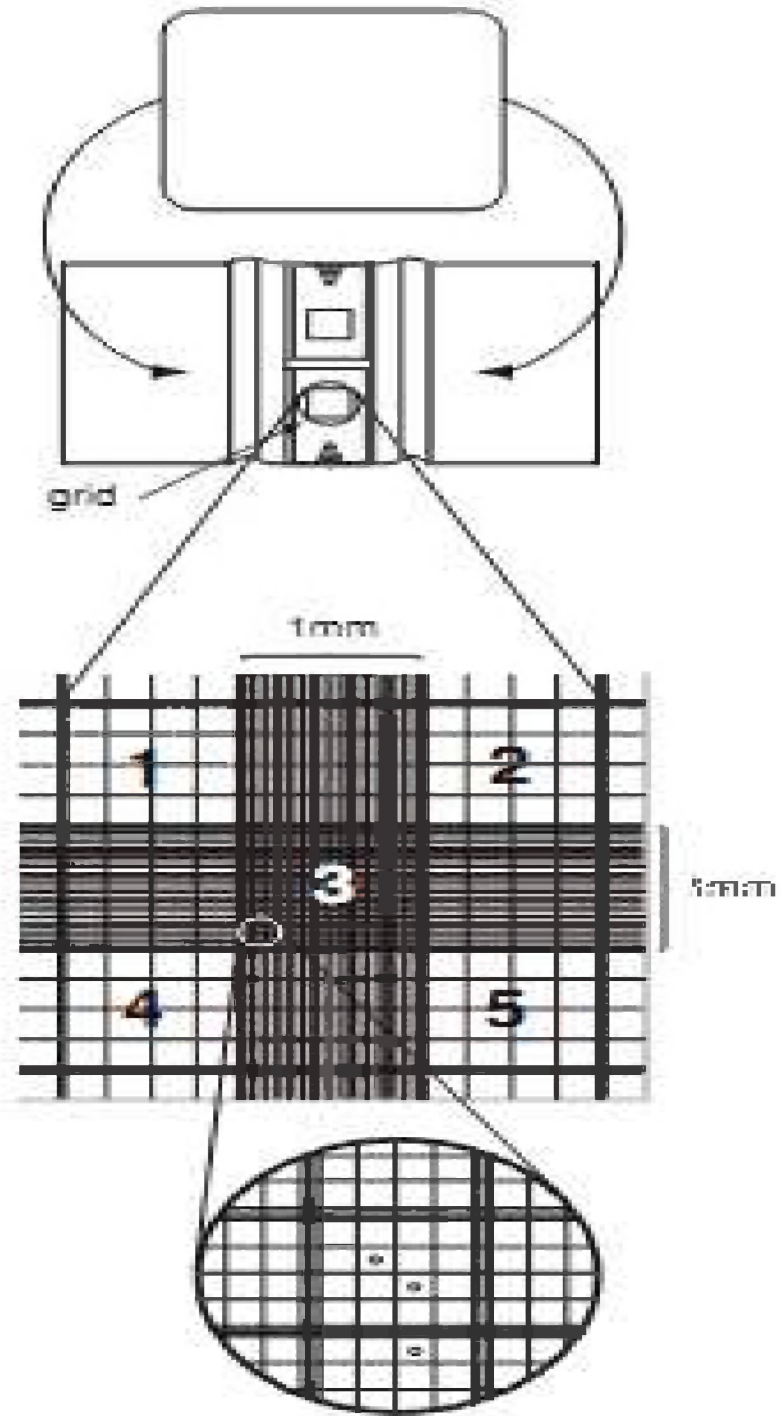
3 dakika santrifüj edildi. santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ardından tüpün dibinde kalan hücre pelleti uygun hacimde medyum içinde süspanse edildi. Hücreler sayılarak istenen sayıda flaska ekim yapıldı.

3.3.1.2. Hücre sayımı

Hücre sayımı hemasitometre yöntemiyle özel sayım lamalarında yapıldı. Santrifüj sonrasında pellet üstünde kalan sıvı dökülerek uzaklaştırıldı, falkon tüpünün dip kısmında kalan hücreler 1ml medyumla iyi bir şekilde pipetaj yapılarak süspansiyon elde edildi. Pipetle 10µl çekilerek lama yayıldı. Faz kontrast mikroskopta lamın alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücreler sayılıp aritmetik ortalamaları alındı. Toma lamında hücreler sayıldıktan sonra aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı elde edildi.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = A \times SF \times 10.000$$

Burada A 20 karede sayılan hücre sayısı, SF sayırltme faktörü, 10.000 ise 0,1 mm³'deki sayım sonucunu 1ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir (198) (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Hemasitometre yöntemiyle hücre sayımı (198)

3.3.1.3. Alt kültürleme

Hücrelerin pasajlanması, üç-dört günde bir olacak şekilde yapıldı. Bir önceki kültürdeki hücreler Tripsin- EDTA ile kaldırılıp, 1500 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi ve toplam hücre miktarının en fazla 1/3'ü kadar hücre 10 ml'lik besiyerine alınıp 75cm²'lik flasklara aktarılması şeklinde yapıldı. Çalışmadan bir önceki pasajın semi-konflens hücreler kullanılarak yapılması ve pasajdan sonra hücrelerin zemine tutunabilmeleri için 24 saat beklenmesine dikkat edildi.

3.3.2. Metformin etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi ve etkin dozunun hesaplanması

ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzim sonucu oluşan renk değişikliğinin spektrofotometreyle ölçümüne dayanan kantitatif bir ölçüm yöntemidir.

Kolorimetrik metot olarak ilk kez Mossmann(1983) tarafından tanımlanan MTT yönteminde, sarı tetrazolium tuzu canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile tetrazolium halkasının kırılması sonucu formazan kristallerine dönüştürülür. Oluşan formazan kristalleri izopropanol ve DMSO gibi çözücülerde çözülmesi sonucu ortamda oluşan renk, spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve ölçülen değer canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir (199).

Hücrelerin mikropklara ekimi yaklaşık 2 günde replike olmaları nedeniyle 24, 48 ve 72 saatler için farklı sayılarda yapıldı. 24 saat için 3X10⁴, 48 saat için 1.5X10⁴, 72 saat için 0.75X10⁴ hücre her bir kuyucuğa ekildi. 96'lık mikropkğa uygulanmak üzere kontrol grubu, H₂O₂ (0,1mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM) ve metforminin (1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM) farklı konsantrasyonlarını içeren gruplar oluşturuldu. Ekimden sonraki 24. saatte hücreler 24 saat H₂O₂, metformin ise 24, 48, 72 saat maruz kalmak üzere uygulandı.

H₂O₂ ve metformin ile muamelesi biten gruplara 10 µl MTT solüsyonundan eklenerek 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda hücreler üzerinde meydana gelen formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Ertesi gün DMSO ile kristaller çözüldükten sonra mikropk ELISA ile 570 nm'de okutuldu. H₂O₂ için okunan değerlere göre elde edilen grafiğin eğrisinden hücre yaşama oranının yaklaşık %

50'sini azaltan doz LD₅₀ dozu olarak kullanıldı.

Bu işlemlerin ardından 24 saat için 3X10⁴ adet hücre 96'lık mikroplağın her bir kuyucuğuna eklendi. 24 saatin ardından 1 adet kontrol, 1 adet önceden LD₅₀ dozu olarak belirlenmiş 2,5mM H₂O₂ ve metforminin 1 mM, 5mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM dozlarının 30 dk'lık maruziyetinden sonra 2,5 mM H₂O₂ dozu eklenerek kombinasyonlar oluşturuldu. İlaçlar verildikten 24 saat sonra ELISA okuyucu ile 570 nm'de absorbanlar ölçüldü.

3.3.3. Metformin verilmiş hücrelerin morfolojik olarak değerlendirilmesi

Faz kontrast mikroskopunda hücre proliferasyonunu morfolojik olarak gözlemlemek için 25cm²'lik flasklara 1,2X10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. H₂O₂ (0,1mM, 0,5mM, 1mM, 2,5mM, 5mM, 10mM) ve metforminin (1mM, 5mM, 10mM, 50mM, 100mM) farklı konsantrasyonlarını içeren gruplar oluşturularak ortama eklendi. 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirmek için inkübasyona bırakıldı ve faz kontrast mikroskopunda 400X resimleri alındı.

3.3.4. Kaspaz-3 aktivasyonu tayini

Yöntemin prensibi kaspaz-3'ün substratı olan N-Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'den (Ac-DEVDpNA) kromofor p-nitroanilin (pNA) serbestleşmesinin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır.

Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi için aşağıdaki işlemler sırasıyla gerçekleştirildi:

- T98G hücrelerinin ekimi 25 cm²'lik flasklara 24 saatlik uygulama için her kuyucukta 1,2X10⁵ hücre olacak şekilde yapıldı.
- 24 saat sonra metformin 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM ve H₂O₂'nin apoptoz yaptığı düşünülen LD₅₀ dozu olan 2,5 mM doz hücrelere uygulandı.
- 24 saat sonunda hücreler tripsinle flasklardan toplandı ve tripsinden uzaklaştırmak için iki katı hacimde medyum ortama eklenerek 1500 rpm de 3 dakika sanrifüj edildi.
- Hücreler 1 ml medyum içinde ependorfa aktarılıp sayıldı.
- Tekrar 4000 rpm de 4 dakika sanrtifüjden sonra medyum çekildi ve üzerine 50 µl hücre lizis tamponu eklendi.
- Ependorflar 10 dk. buzda bekletildi.

- Ependorflar 11000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi, süpernatant alınıp farklı bir ependorfa aktarıldı.
- Protein tayini biüret yöntemi ile yapıldı.
- 50 µl'de 50-200 µg protein olacak şekilde hücre lizis tamponu buffer eklendi.
- 1 ml 2X reaksiyon tamponuna 10 µl 1M'lık DTT eklendi.
- Her örneğe 50 µl 10 mM'lık DTT içeren 2X reaksiyon tamponuna eklendi.
- 4 mM'lık DEVDpNA'dan final konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde 5 µl eklendikten sonra 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
- 405 nm'de ölçüm yapıldı.

3.3.4.1. Biüret yöntemi

Biüret metodu örnek içerisindeki çözünür protein miktarının belirlenmesi için kullanılabilecek bir metottur. Protein miktarı arttıkça çözelti rengi koyulaşmaktadır. Renk yoğunluğundaki değişiklik spektrofotometreyle ölçülerek ortamdaki protein miktarı belirlenebilmektedir.

- BSA(Bovine serum albumin) ile standart protein çözeltisi; 64g/l, 32g/l, 16g/l, 8g/l, 4g/l, 2g/l, 1g/l ve boş örnek (0g/l) hazırlandı.
- Hazırlanan standart protein çözeltilerinden her bir çözelti için 96'lık mikroplatinin 2 kuyucuğana 20 µl eklendi ve üzerlerine 80 µl biüret çözeltisi konuldu. Bu sayede ölçüm sonucu derişim-absorbans grafiğı elde edildi.
- Elimizdeki her bir örnek için 96'lık mikroplatin 2 kuyucuğana 20 µl eklendi ve üzerlerine 80 µl biüret çözeltisi konuldu.
- 96'lık mikropate oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 570 nm'de ölçüm yapıldı.

3.3.5. Akridin oranj ve etidyum bromid boyama

Akridin oranj boyası hücrelerdeki nükleik asitlere bağlanarak yeşil floresan ışık yaymaktadır. Apopitotik hücrelerdeki kromatin yoğunlaşması ise daha yoğun bir ışık vererek belirlenmektedir. Elektron mikroskopu ile bakıldığında kromatinden yoğun granüllerin yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiğı izlenir. Apoptotik hücrelerde nükleusların yoğunlaşarak birden

fazla kümelenmesi de görülebilmektedir. Canlı hücrelerin nükleusları ise tek parça ve sınırı düzgün olarak yeşile boyanmaktadır. Etidyum Bromür boyası ise ölü hücrelerin nükleik asitlerine bağlanarak kırmızı floresan ışık yaymaktadır. Apoptotik hücreler ölü hücrelerin arasından daha ufak nükleus yapılarıyla ve daha parlak kırmızı ışık yaymalarıyla ayırt edilebilmektedir (200).

Hücrelerin mikropatlara ekimi yaklaşık 2-3 günde replike olmaları nedeniyle apoptozis değerlendirmesi açısından negatif sonuçlar doğurabileceğinden 24, 48 ve 72 saatler için farklı sayıda hücre ekimi uygulaması yapıldı. T98G hücreleri 24 saatlik uygulama için 24'lük mikropate her kuyucukta $1,2 \times 10^5$, 48 saatlik uygulama için her kuyucukta $0,6 \times 10^5$ ve 72 saatlik uygulama için her kuyucukta $0,3 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Metforminin 1mM, 5mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM dozları eklendi. Bunaların yanında metforminin 1mM, 5mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM dozlarının 30 dakikalık maruziyetinden sonra önceden LD₅₀ dozu olarak belirlenmiş 2,5 mM H₂O₂ dozu eklendi ve 24, 48, 72 saat 37°C de inkübatör ortamında tutuldu. Bu sürenin bitiminde hücrelerin ortamına daha önce hazırlanmış 1:10 oranında PBS içerisinde seyreltilen 200 µl Akridin Oranj (100 µg/ml) ve Etidyum bromür (100 µg/ml) karışımı eklendi. Hücreler 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra floresan mikroskop ile incelemeye alındı ve 400X fotoğrafları çekildi.

3.3.6. DNA fragmentasyonu

Apoptozun varlığını saptamak amacıyla DNA fragmentasyonu yatay agaroz jel elektroforezi kullanılarak gösterilebilmektedir. Bu yöntem agaroz jel içerisinde elektriksel alana maruz bırakılan, DNA parçalarının büyüklüklerine göre ayrıştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Agar agar'dan izole edilen agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu flüoresan etki göstermesi ile olur (201).

DNA fragmentasyonu; hücrelerin apoptozise özgü DNA yapısının 180 ve 200 bp ve katları şeklinde kesilmesinin elektroforezde gösterim yöntemidir. Bu işlem için $3,75 \times 10^5$ adet T98G hücresi 25 cm²'lik flasklara ekildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda bu flasklardan 1 adet flask kontrol grubu olarak ayrıldı. 1 flask önceden LD₅₀ dozu olarak belirlenmiş 2,5mM H₂O₂ eklendi. 5 adet flask ise metforminin 1

mM, 5mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM dozlarına maruz bırakıldı. 5 adet flaska ise metforminin 1mM, 5mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM dozlarının 30 dakikalık maruziyetinden sonra 2,5 mM H₂O₂ dozu eklendi. 24 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'lar %1,5'luk agoroz jelde 70V da 1,5 saat yürütülerek görüntülendi.

3.3.7. TUNEL apoptag

TUNEL; terminal “deoksinukleotidil-transferaz-aracılı deoksiüridin trifosfat nick-end” işaretleme yöntemidir. DNA kırıklarının in situ olarak belirlenmesi prensibine dayanır. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturur. Açığa çıkan DNA kırıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksiüridin trifosfatlar (TdT) eklenir. Sonrasında DNA fragmanları digoksisenin ile işaretlenir. İşaretlenmiş deoksinukleotidler anti-digoksisenin-HRP (horseradish peroksidaz) konjugatı ile belirlenir. Konjugat diaminobenzidin ile reaksiyona girer ve apoptotik fragmanlara özgü kahverengi görüntü ışık mikroskopunda izlenir. Bunun yanında hücrelere methyl green uygulaması yapılarak canlı hücrelerin ışık mikroskopunda mavi olarak izlenmesi sağlanır (202).

- 2cm'lik oval lameller alkole batırılıp ardından ateşten geçirilerek yakılarak kurutuldu.
- Lameller 24'lük mikroplağın kuyucuklarına yerleştirildi.
- T98G hücreleri 24 saatlik uygulama için 24'lük mikroplate her kuyucukta $1,2 \cdot 10^5$ hücre olacak şekilde ekildi.
- 24 saatlik inkübasyon sonunda bu flasklardan 1 adet lamel kontrol gurubu olarak ayrıldı, 1 lamel 2,5 mM H₂O₂ eklendi. 5 adet lamel ise metforminin 1mM, 5mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM dozlarına maruz bırakıldı. 5 adet lamel ise metforminin 1 mM, 5 M, 10 mM, 50 mM, 100 mM dozlarının 30 dakikalık maruziyetinden sonra 2,5 mM H₂O₂ dozu eklendi.
- 24 saatin sonunda lamellerin bulunduğu kuyuckların medyumları dikkatlice hücreleri yerlerinden oynatmayacak şekilde kenarından alındı.
- Hücre fiksasyonu için -20°C %100 metanol 2 ml kuyucuklara ekledi. 10 dakika beklendikten sonra metanol uzaklaştırıldı.

- Diğer işlemlere geçmeden önce ekilibrasyon tamponu -20°C'den çıkartılarak oda ısısında çözülmeye bırakıldı.
- 2ml PBS eklenip 5 dakika beklendi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. İşlemler sonucunda lameller peçete yardımıyla dikkatlice kurutuldu.
- Lameller 24'lük flasklardan daha geniş bir çalışma alanına 6'lık flasklara alındı.
- Bu sırada -20°C'den reaksiyon tamponu ve TdT enzim çıkarılarak oda ısısında çözülmeye bırakıldı.
- 20µl ekilibrasyon tamponu eklendi ve lamellerin üzerlerine parafin yerleştirildi. Her bir örnek için 5 dakika beklendi. İşlem sonunda lameller peçete ile dikkatlice kurutuldu.
- Diğer işlemlerden önce yıkama/durdurma tamponu ve anti-digoxigenin -20°C'den çıkarılarak oda ısısında çözülmeye bırakıldı.
- reaksiyon tamponu ve TdT enzim kitinde belirtildiği oranda karıştırıldı ve her bir örneğe 20µl konuldu. Üzerlerine parafin bant yerleştirildi ve 37°C de nemli ortamda (bu işlem için etüv ideal) 1 saat beklendi.
- Anti-digoxigenden yeterli miktar bir ependorfa aktarıldı ve oda ısısına gelmesi beklendi.
- Yıkama/durdurma tamponu kitinde belirtildiği gibi dH₂O ile karıştırılarak hazırlandı ve her bir kuyucuğa 2ml eklenerek çalkalayıcıda 15 çalkalandıktan sonra 10 dk oda ısısında bekletildi.
- Lamellerin üzerine 2ml PBS eklenerek 1 dakika bekletildi. Bu işlem üç kere tekrarlandı ve lameller peçete yardımıyla kurutuldu.
- Diğer işlemlerden önce DAP subtrat ve DAB dilusyon tamponu -20°C'den çıkartılarak oda ısısında çözülmeye bırakıldı.
- Lamellerin üzerine 20µl anti-digoxigenin eklendi ve üzerleri parafin ile kapatılarak 30 dakika bekletildi.
- 2ml PBS eklenerek 2 dakika beklendi. Bu işlem 4 kez tekrarlandı.
- DAP substrate ve DAB dilusyon tamponu kitte belirtildiği oranda karıştırılarak working strength peroxidase substratı hazırlanıp lamellerin üzerine 20µl konup üzerleri parafin bant ile kapatıldı.
- 3-6 dakika arası örnekler ışık mikroskopunun altında kontrol edildi ve

yeterli boyama sağlandığı düşünöldüğünde kuyucuklara 2ml dH₂O eklendi ve 1 dakika beklendi. Bu işlem 3 kere tekrarlandı.

- Bir kez daha 2ml dH₂O konuldu ve bu sefer 5 dakika beklendi.
- Metil yeşili uygun oranda serum fizyoloji ile sulandırıldı ve lameller üzerine 20µl eklenerek üzerleri parafın ile kapatılıp 10 dakika beklendi.
- Kuyucuklara 20 ml dH₂O eklenerek 10 kere pipetaj yapıldı. Bu işlem 3 kere tekrarlandı.
- Kuruyan lameller mounting medium ile lama yapıştırıldı ve ışık mikroskopunda fotoğrafları çekildi.

3.3.8. İstatistiksel değeriendirme

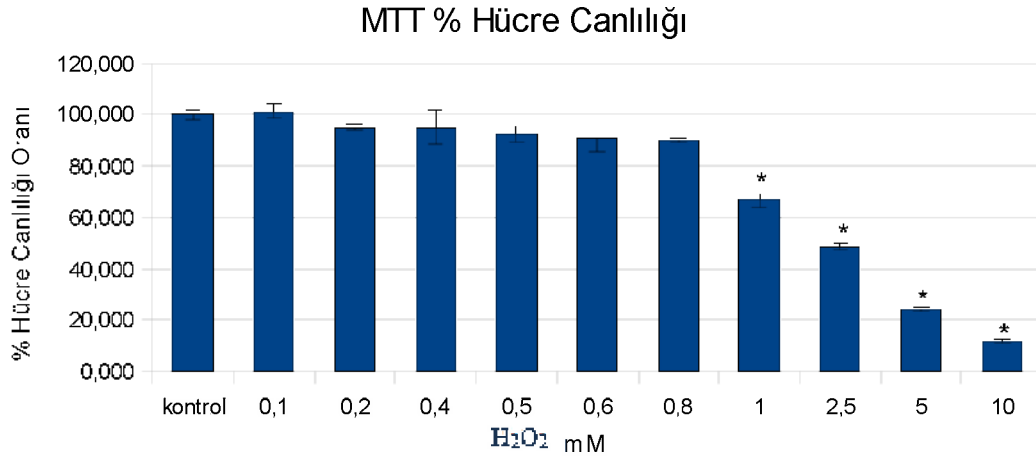
Deney sonuçları, SPSS (Statistic Program for Social and Science) istatistik programında değeriendirildi. Gruplar arasındaki anlamlılık one-way ANOVA ve anlamlılık belirlenmişse Post-Hoc olarak da Tukey testi kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. MTT Yöntemi İle Hücre Canlılığının Belirlenmesi

4.1.1. H₂O₂'nin toksik dozunun MTT testi ile belirlenmesi

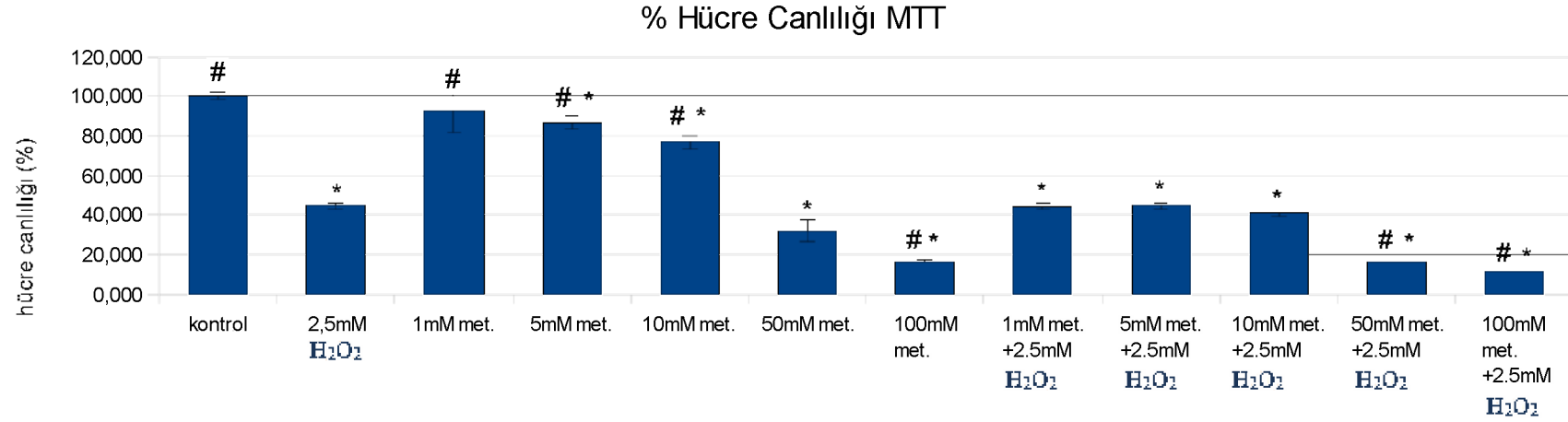
H₂O₂'nin glial kaynaklı T98G hücre hattı üzerindeki 24 saatlik maruziyet sonrası toksik etkileri anlamlı olarak 1mM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre 1mM H₂O₂ hücre canlılığını %100±2,01'den %66,5±2,79'e düşürmüştür. 2.5mM H₂O₂ hücre canlılığını %100±2,01'den %46,3±0,88'e düşürmüştür. 5mM H₂O₂ ve 10mM H₂O₂ ise hücre canlılığını %100±2,01'den %24,1±0,6'ya ve %11,4±0,73'e düşürmüştür (Şekil: 4.1.). Bu sonuçlara göre H₂O₂'nin LD₅₀ dozu T98G glioblastoma hücrelerinin yaklaşık % 50'sini öldüren 2.5mM olarak seçilmiştir (*; p<0,001).



Şekil 4.1: Hidrojen peroksit'in (H₂O₂) T98G hücrelerindeki toksisitesinin MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. Kontrol grubuna göre *; p<0,001. (n=3)

4.1.2. Metformin ve Metforminin 2,5 mM H₂O₂ kombinasyonunun 24 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

24 saatlik uygulamadan sonra, metforminin 5mM ve artan dozları hücre canlılığını kontrol grubuna anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Kombinasyon grupları için hücre canlılığını yaklaşık %50 oranında düşüren H₂O₂'nin 2,5mM H₂O₂ dozu seçilmiştir. 2,5mM H₂O₂ hücre canlılığını %100±1.64'den %44.6±1.23'e düşürmüştür. Metforminin 1mM, 5mM ve 10mM'lık H₂O₂ kombinasyonları yalnız 1, 5, 10 mM'lık metformine göre hücre canlılığını daha fazla düşürmüştür. Metforminin 50mM ve 100mM'lık H₂O₂ kombinasyonları yalnız 2,5mM'lık H₂O₂ dozuna göre %44.6±1.23'den %16.39± 0.22'ye ve %11.85±0.08' düşüş sağlamıştır (Şekil 4.2).

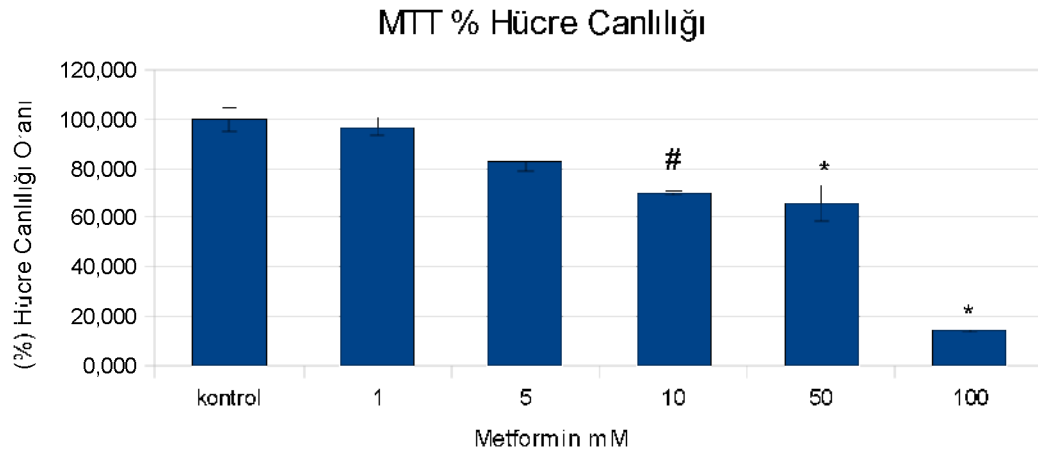


Şekil 4.2: Metformin (met.) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve kombinasyonlarının 24 saatlik uygulama sonrası T98G hücrelerinde canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. (Kontrol grubuna göre *; $p < 0.001$, 2,5 H_2O_2 'ye göre #; $p < 0.001$) (n=3)

4.1.3. Metforminin hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

4.1.3.1. Metforminin 48 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

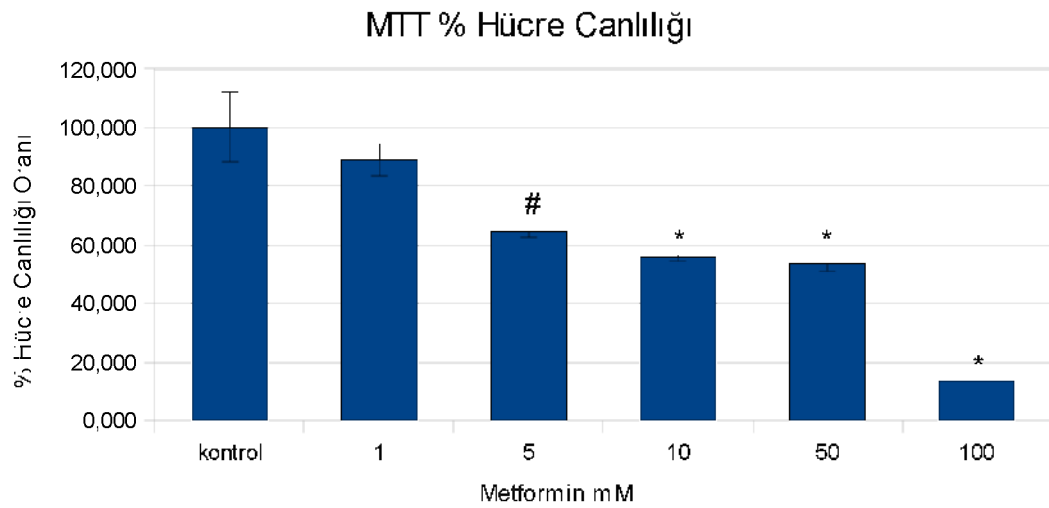
Metforminin glial kaynaklı T98G hücre hattı üzerindeki 48 saatlik maruziyet sonrası toksik etkileri anlamlı olarak 10mM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre 10mM metforminin hücre canlılığını 100 ± 5 'den $70,2 \pm 0,77$ 'e düşürmüştür (#; $p < 0,05$). 50mM ve 100mM metforminin hücre canlılığını 100 ± 5 'den $65,8 \pm 7,29$ 'a ve $14,2 \pm 0,33$ 'e düşürmüştür. (*; $p < 0,001$) (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3: Metforminin T98G hücrelerinde 48 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. Kontrol grubuna göre *; $p < 0,001$, #; $p < 0,05$. (n=3)

4.1.3.2. Metforminin 72 saatlik maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

Metforminin glial kaynaklı T98G hücre hattı üzerindeki 72 saatlik maruziyet sonrası toksik etkileri anlamlı olarak 5mM seviyesinde başlamıştır. Kontrol grubuna göre 5mM metforminin hücre canlılığını $100 \pm 11,91$ 'den $64,7 \pm 2,41$ 'e düşürmüştür (#; $p < 0,05$). 10mM, 50mM ve 100mM metforminin hücre canlılığını $100 \pm 11,91$ 'den $55,4 \pm 0,94$ 'e, $53,7 \pm 2,53$ 'e ve $13,6 \pm 0,18$ 'e düşürmüştür. (*; $p < 0,001$) (Şekil 4.4).

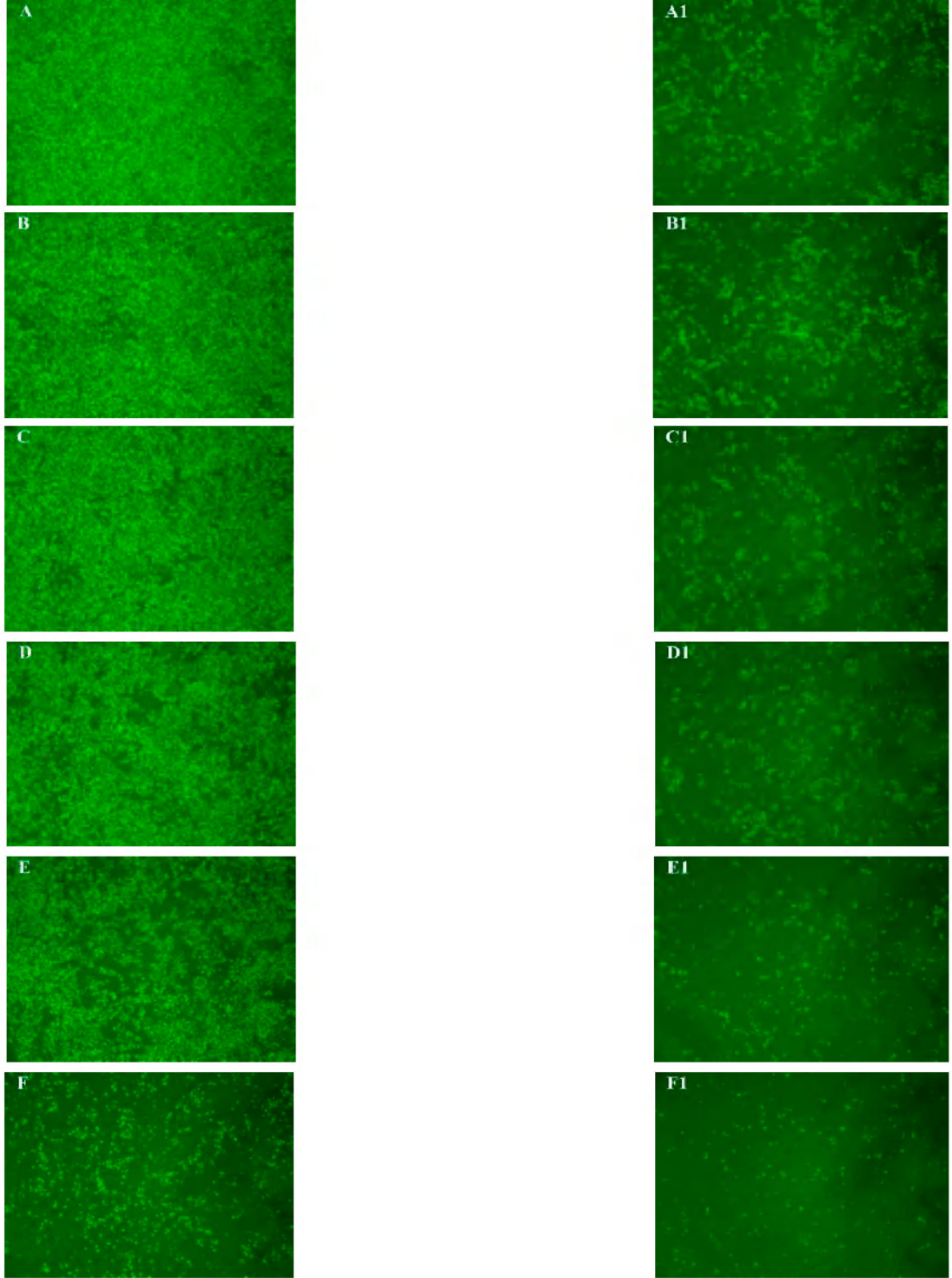


Şekil 4.4: Metforminin T98G hücrelerinde 72 saatlik uygulama sonrası canlılığın MTT testi ile ölçülmüş sonuçları. Kontrol grubuna göre *; $p < 0,001$, #; $p < 0,05$. (n=3)

4.2. Metformin ve H₂O₂ Varlığında T98G Hücre Hattının Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

4.2.1. T98G hücre hattının 24 saatlik metformin, H₂O₂ ve metforminin H₂O₂ kombinasyonunun maruziyetinde morfolojik olarak değerlendirilmesi

Faz kontrast invert mikroskopta 200X ile alınan resimler üzerinden T98G hücrelerinin morfolojileri kontrol grubu, H₂O₂, metforminin 1mM, 5mM, 10mM, 50mM, 100mM dozları ve 1mM metformin+2,5mM H₂O₂, 5mM metformin+2,5mM H₂O₂, 10mM metformin+2,5mM H₂O₂, 50mM metformin+2,5mM H₂O₂, 100mM metformin+2,5mM H₂O₂ dozları değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda hücreler düzgün yapıda ve morfolojik yönden normal olarak değerlendirilirken, 5mM metformin uygulanan grupta hücre sayısında azalma başladığı görüldü. En çok hücre kaybının ise 50mM ve 10mM metformin, 2,5mM H₂O₂ ve metformin ile 2,5mM H₂O₂ kombinasyonunda ki tüm gruplarda görüldü. Bu dozlarda hücrelerin deforme olup morfolojik olarak bozulduğu saptandı. Kombinasyon grupları yalnız 2,5mM H₂O₂ grubuna göre değerlendirildiğinde ise artan metformin dozunun hücre sayısında azalamaya neden olduğu saptandı (Şekil 4.5).

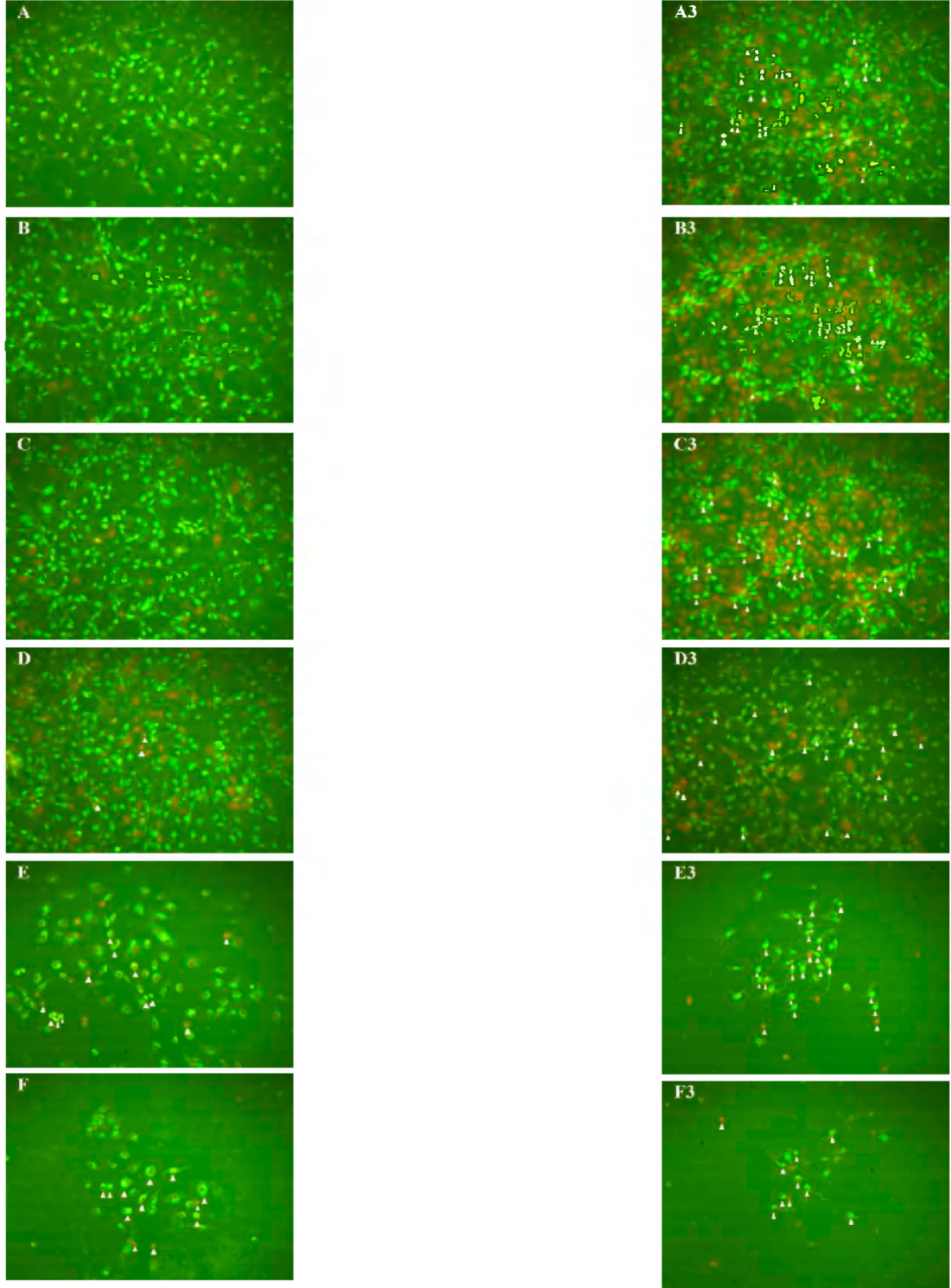


Şekil 4.5: Kontrol, 2,5mM H₂O₂, metformin ve metforminin 2,5 mM H₂O₂ kombinasyonunun 24 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinin faz kontrast invert mikroskopda görüntüleri. Kontrol grubu; A, metformin 1mM; B, metformin 5mM; C, metformin 10mM; D, metformin 50 mM; E, metformin 100mM; F, 2,5mM H₂O₂; A1, 1mM metformin+2,5mM H₂O₂; B1, 5mM metformin+2,5mM H₂O₂; C1, 10mM metformin+2,5mM H₂O₂; D1, 50mM metformin+2,5mM H₂O₂; E1, 100mM metformin+2,5mM H₂O₂; F1.

4.3. T98G Hücre Hattının Metformin ve H₂O₂ Varlığında Akridin Oranj ve Etidyum Bromür Boyama Sonuçları

4.3.1. T98G hücre hattının 24 saatlik metformin, H₂O₂ ve metforminin H₂O₂ kombinasyonunun maruziyetinde akridin oranj ve etidyum bromür boyama sonuçlarının değerlendirilmesi

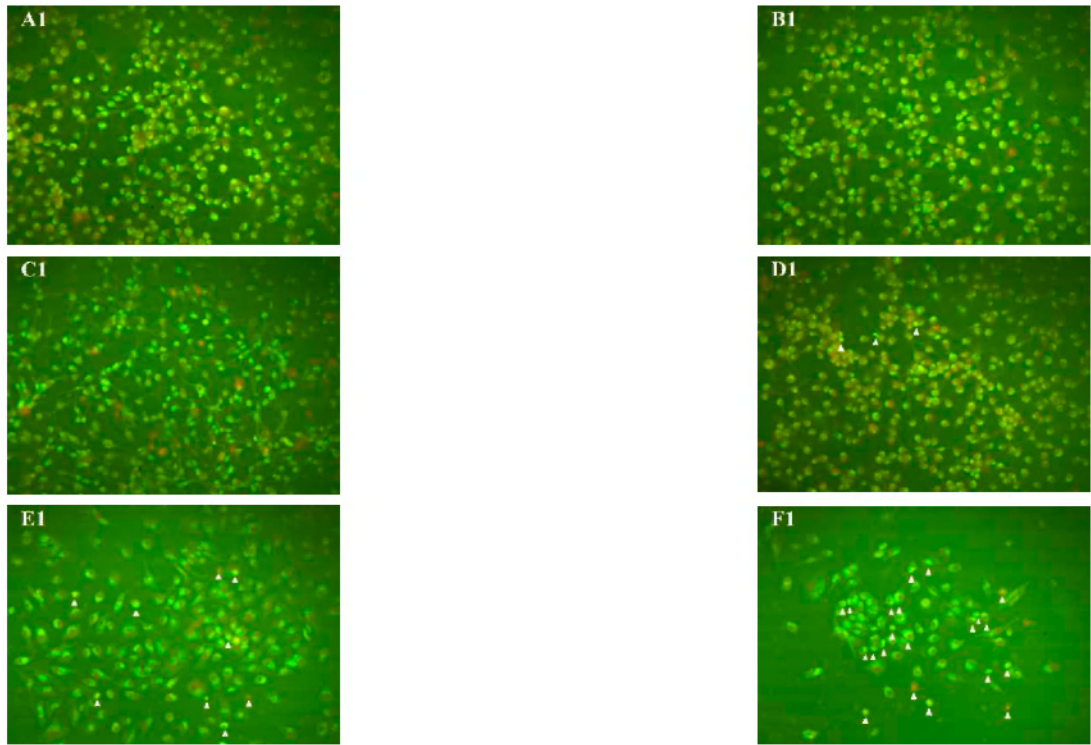
T98G hücrelerinde apoptozis kontrol grubu, H₂O₂, metforminin 1mM, 5mM, 10mM, 50mM, 100mM dozları ve 1mM metformin+2,5mM H₂O₂, 5mM metformin+2,5mM H₂O₂, 10mM metformin+2,5mM H₂O₂, 50mM metformin+2,5mM H₂O₂, 100mM metformin+2,5mM H₂O₂ dozları değerlendirilmiştir. 24 saatlik uygulaması biten hücelere akridin oranj ve etidyum bromürle hazırlanan boya karışımı eklendikten sonra floresan mikroskopunda apoptotik hücreler tespit edildi. Kontrol grubunda apoptotik hücelere rastlanmadı. Apoptotik hücelere 10mM metforminde rastlanmaya başlandı. 50mM ve 100mM metforminde apoptotik hücreler gözlemlendi. 2,5mM H₂O₂ ve metformin+2,5mM H₂O₂ kombinasyonundaki tüm gruplarda apoptozis saptandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Kontrol, 2,5mM H₂O₂, metformin ve metforminin+2,5 mM H₂O₂ kombinasyonunun 24 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinin görüntüleri. Kontrol; A, metformin 1mM; B, metforminin 5mM; C, metformin 10mM; D, metformin 50mM; E, metformin 100mM; F, 2,5mM H₂O₂; A3, 1mM metformin+2,5mM H₂O₂ ; B3, 5mM metformin+2,5mM H₂O₂; C3, 10mM metformin+2,5mM H₂O₂; D3, 50mM metformin+2,5mM H₂O₂; E3, 100mM metformin+2,5mM H₂O₂; F1.

4.3.2. T98G hücre hattının 48 saatlik metformin maruziyetinde akridin oranj ve etidyum bromür boyama sonuçlarının değerlendirilmesi

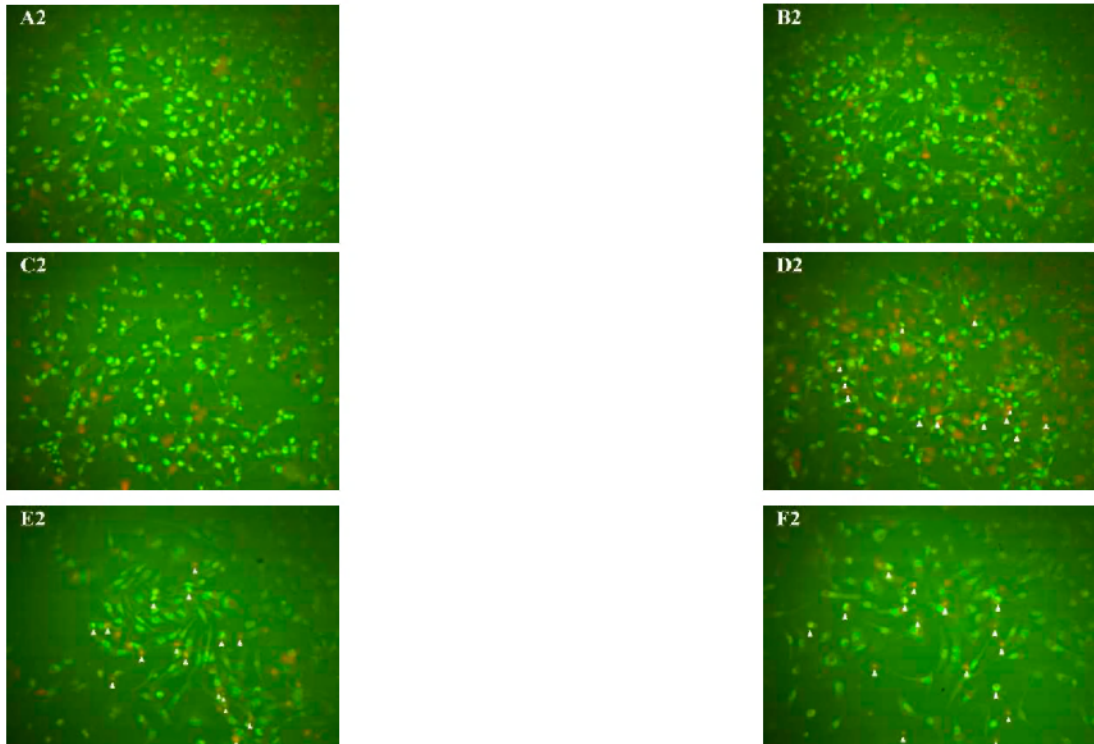
T98G hücre hattında kontrol ve metforminin 1mM, 5mM, 10mM, 50mM, 100mM dozları uygulandı. 48 saatlik metformin uygulaması biten hücelere akridin oranj ve etidyum bromürle hazırlanan boya karışımı eklendikten sonra floresan mikroskopunda apoptotik hücelere tespit edildi. Kontrol grubunda apoptotik hücelere rastlanmadı. Apoptotik hücelere 10mM metforminde rastlanmaya başlandı. En çok apoptotik hücre ise 50mM ve 100mM metforminde saptandı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Kontrol ve metforminin 48 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinde ki görüntüleri. Kontrol; A1, metformin 1mM; B1, metformin 5mM; C1, metformin 10mM; D1, metformin 50mM; E1, metformin 100mM F1.

4.3.3. T98G hücre hattının 72 saatlik metformin maruziyetinde akridin oranj ve etidyum bromür boyama sonuçlarının değerlendirilmesi

T98G hücre hattında kontrol ve metforminin 1mM, 5mM, 10mM, 50mM, 100mM dozları uygulandı. 72 saatlik metformin uygulaması biten hücelere akridin oranj ve etidyum bromürle hazırlanan boya karışımı eklendikten sonra floresan mikroskobunda apoptotik hücreler tespit edildi. Kontrol grubunda apoptotik hücelere rastlanmadı. Apoptotik hücelere 10mM metforminde rastlanmaya başlandı. En çok apoptotik hücre ise 50mM ve 100mM metforminde saptandı (Şekil 4.8).

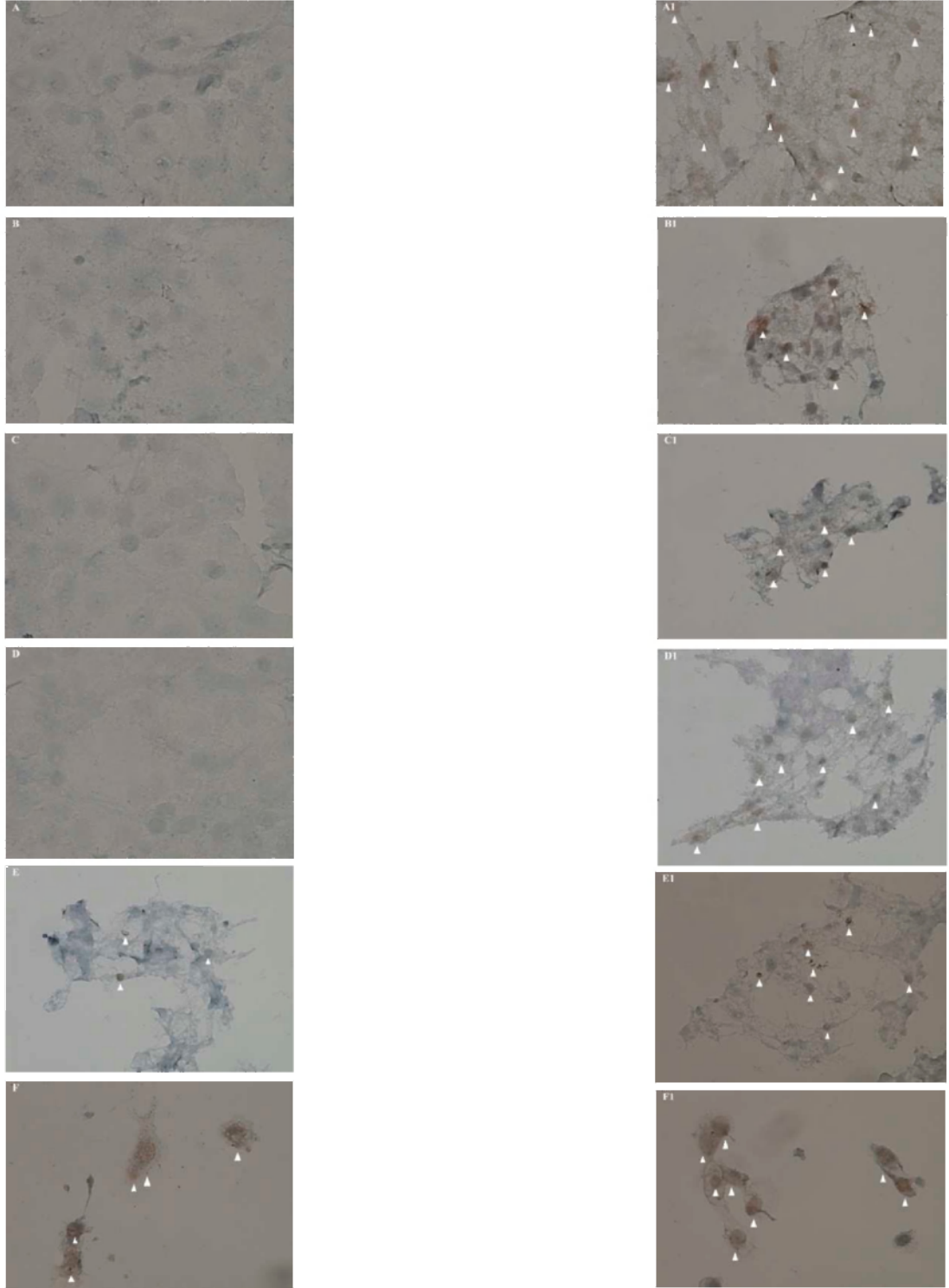


Şekil 4.8: Kontrol ve metforminin 72 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinde ki görüntüleri. Kontrol; A2, metformin 1mM; B2, metformin 5mM; C2, metformin 10mM; D2, metformin 50mM; E2, metformin 100mM; F2.

4.4. T98G Hücre Hattının Metformin ve H₂O₂ Varlığında TUNEL Sonuçları

4.4.1. T98G hücre hattının 24 saatlik metformin, H₂O₂ ve metforminin H₂O₂ kombinasyonunun maruziyetinde TUNEL sonuçlarının değerlendirilmesi

T98G hücrelerinde apoptozis kontrol grubu, H₂O₂, metforminin 1mM, 5mM, 10mM, 50mM, 100mM dozları ve 1mM metformin+2,5mM H₂O₂, 5mM metformin+2,5mM H₂O₂, 10mM metformin+2,5mM H₂O₂, 50mM metformin+2,5mM H₂O₂, 100mM metformin+2,5mM H₂O₂ dozları değerlendirilmiştir. 24 saatlik uygulaması biten hücrelere TUNEL protokolu uygulandıktan sonra ışık mikroskopunda apoptotik hücreler tespit edildi. Kontrol grubunda apoptotik hücrelere rastlanmadı. Apoptotik hücreler 50mM ve 100mM metformin dozunda saptandı. 2,5mM H₂O₂ ve metformin ile 2,5mM H₂O₂ kombinasyonundaki tüm gruplarda apoptozis saptandı (Şekil 4.9).

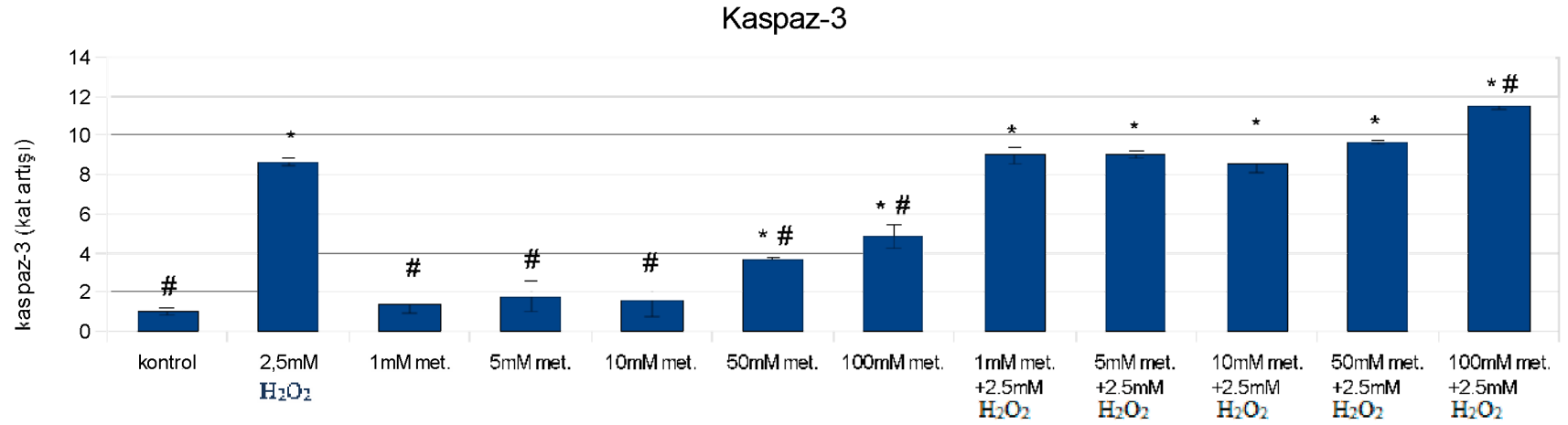


Şekil 4.9: Kontrol, 2,5mM H₂O₂, metformin ve metforminin+2,5mM H₂O₂ kombinasyonunun 24 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerinin görüntüleri. Kontrol; A, metformin 1mM; B, metformin 5mM; C, metformin 10mM; D, metformin 50mM; E, metformin 100mM; F, 2,5mM H₂O₂; A1, 1mM metformin+2,5mM H₂O₂; B1, 5mM metformin+2,5mM H₂O₂; C1, 10mM metformin+2,5mM H₂O₂; D1, 50mM metformin+2,5mM H₂O₂; E1, 100mM metformin+2,5mM H₂O₂; F1.

4.5. ELISA Yöntemi İle Kaspaz- 3 Aktivasyonu Sonuçları

Hücrelerde apoptozisi belirlemek için ELISA yöntemiyle hücrelerin kaspaz-3 seviyeleri ölçüldü. Yöntemin prensibi kaspaz-3'ün substratı olan N-Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'den (Ac-DEVDpNA) kromofor p-nitroanilinin (pNA) serbestleşmesinin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır.

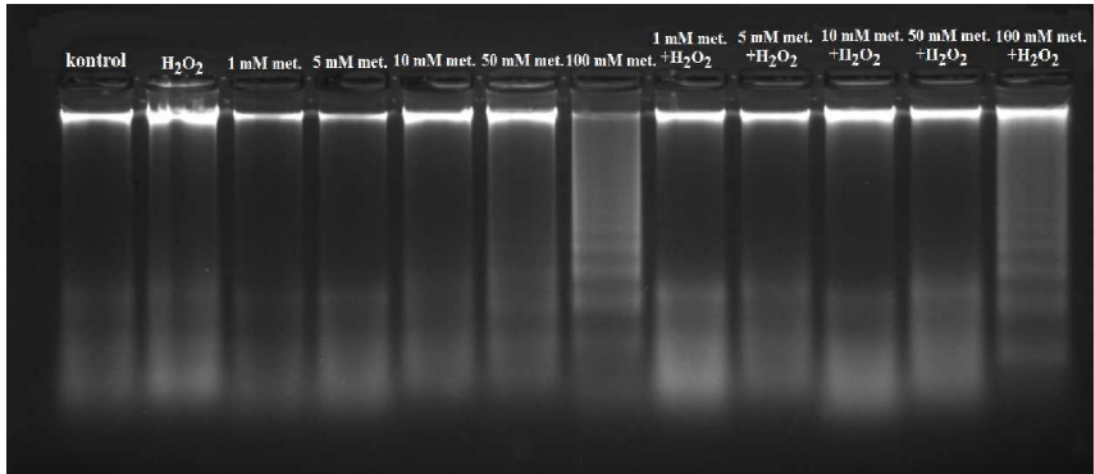
2,5mM H₂O₂ kontrol grubuna göre kaspaz-3 seviyesini $1\pm0,20$ 'den $8,67\pm0,18$ 'e arttırmıştır. 50mM ve 100mM metformin dozunun kontrol grubuna göre kaspaz-3 seviyesini $1\pm0,20$ 'den $3,73\pm0,07$ 'e ve $4,87\pm0,59$ 'a arttırmıştır. Tüm kombinasyon gruplarında kontrol grubuna göre kaspaz-3 seviyeleri anlamlı şekilde artmıştır. Metforminin 100mM dozu kaspaz-3 seviyesini yalnız 2,5mM H₂O₂'ye göre $8,67\pm0,18$ 'den $11,53\pm0,18$ 'e arttırmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Metformin (met.) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve kombinasyonlarının 24 saatlik uygulama sonrası T98G hücrelerinde kaspaz-3'ün kat artışı sonuçları. (Kontrol grubuna göre *; $p < 0.001$, 2,5 H_2O_2 'ye göre #; $p < 0.001$) (n=3)

4.6. Metforminin ve Değişik Dozlarının H₂O₂ ile Kombinasyonunda 24 Saatlik Maruziyeti Sonrasında DNA Fragmentasyonunun Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Gösterilmesi

T98G hücre hattında kontrol, 2,5mM H₂O₂ ve metforminin 1mM, 5mM, 10mM, 50mM, 100mM dozları ile 1mM metformin+2,5mM H₂O₂, 5mM metformin+2,5mM H₂O₂, 10mM metformin+2,5mM H₂O₂, 50mM metformin+2,5mM H₂O₂, 100mM metformin+2,5mM H₂O₂ dozları uygulandı. 24 saatlik maruziyet sonrasında hücrelere agaroz jel elektroforez yöntemi protokolu uygulandı ve UV ışık altında görüntüleri alındı. Metforminin 50mM, 100mM dozlarında DNA fragmentasyonuna rastlandı. Bunun yanında 100mM metformin+2,5mM H₂O₂ dozunda da DNA fragmentasyonu gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Metformin (met.) ve metforminin 2,5mM hidrojen peroksit (H₂O₂) kombinasyonunda 24 saatlik maruziyetinin T98G hücrelerindeki agaroz jel görüntüleri.

5. TARTIŞMA

Tip II diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan metforminin asıl bilinen etkinliği kasların glukoz alımını artırması, insülin direncini kırması ve insülin duyarlılığını iyileştirmesidir (203). Bununla birlikte son yıllarda metforminin obezite tedavisi, polikistik over sendromu ve alkolik olmayan karaciğer hastalığında yararlı olabileceği ve kardiyovasküler hastalıklara karşı da koruyucu etkileri bulunduğu anlaşılmıştır (203). İlginç olarak metforminin Alzheimer ve Parkinson hastalığı açısından da riski azaltıcı bir madde olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır (204,205). Çalışmamız açısından dikkat çekici olan konu ise metformin kanser ilişkisidir. Çünkü araştırmalar Tip 2 diyabeti olan kişilerde metforminin kanser riskini azalttığını göstermektedir (206,207). Metforminin tümör büyümesi üzerine inhibitör etkili oluşu dolaşımdaki insülin ve glukoz düzeylerini düşürmesiyle ilgili olabilir (208). Diğer taraftan çok sayıda araştırmada metforminin apoptozise neden olarak hücre proliferasyonunu engellediğini ve hücreyi ölüme götürebildiğini göstermiştir (209-211). Bu etki ise metforminin AMPK-LKB1 yolağı aktivasyonuna neden olup cyclin D1 düzeylerini düşürmesi ve mTOR aktivitesini inhibe etmesiyle açıklanmaktadır (212-215).

Gliablastoma multiforma yetişkinlerde santral sinir sisteminin en kötü huylu tümörlerinden biri olarak bilinmektedir. Son yıllardaki ilerlemelere rağmen kemoterapötiklerin yüksek toksisiteleri, sınırlı etkinlikleri ve etki yerine ulaşmadaki sorunlar nedeniyle tedavide başarılı olunamamıştır (216,217). Tedavide yeni yaklaşımlar, kemoterapi ve radyoterapi ile birlikte hücre yaşamını ve apoptozisi hedef alan mekanizmalara yoğunlaşmaktadır. Yukarıda sözünü ettiğimiz özellikleri nedeniyle metformin, gliablastoma multiforma tedavisi için araştırılmaya değer bir moleküldür. Üstelik kan-beyin engelini de kolayca aşabilmektedir (218,219). İşte bu nedenlerle biz de çalışmamızda insan gliablastoma multiforma hücrelerinde metforminin apoptotik etkinliğini araştırdık.

Apoptotik etkinliğini belirleyebilmek için farklı yöntemler kullandığımız bu araştırmada öncelikle metforminin hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla MTT testi yapılmıştır. Bu deneylerde metforminin 5 farklı dozunun 24, 48, 72 saatlerde hücre canlılığı üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Diğer taraftan

metformine bağılı değişiklikler faz kontrast invert mikroskopta da incelenmiş, hücre yoğunluğundaki azalma ve hücrelerde gerçekleşen morfolojik değişiklikler gösterilmiştir. Bunların ardından apoptozise özgü DNA kırıklarını belirlemek amacıyla agaroz jel elektroforezi ile DNA fragmantasyonlarının görüntüleri alınmıştır. Floresan boyama yöntemi ile  l  ve canlı h crelerler belirlenerek resimleri alınmış,  l  hücreler arasından apoptozise giden hücreler belirlenerek işaretlenmiştir. Ardından apoptozise özgü bir boyama yöntemi olan TUNEL yöntemi uygulanarak apoptotik hücrelerin resimleri çekilmiş ve işaretlenmiştir. En son olarak da apoptozise uğrayan hücrelerde kaspaz-3 düzeyleri  l lm şt r. Yukarıda sözü edilen deneyler apoptozise neden olduğu bilinen H₂O₂ varlığında da tekrarlanmıştır. Bulgularımızın ortaya çıkardığı sonuç řu şekilde özetlenebilir: 1. Metformin; T98G hücreleri üzerine doz bağımlı apoptotik bir etkinlik göstermiştir. Hücre canlılığını azaltmıştır. 2. Metforminin H₂O₂ ile kombinasyonu ise T98G hücreleri üzerindeki apoptotik etkinliğin artmasına neden olmuştur.

Çalışmamızda öncelikle metforminin hücre canlılığı üzerindeki etkisini MTT yöntemiyle belirledik. Bu yöntem hücre kültürlerinde sitotoksik maddelerin etkisinin gösterilmesi açısından en uygun yollarından biri olarak bilinmektedir. Ancak bu yolla hücrenin hangi yolla öldüğünü belirlememiz olası değildi (220). Bu nedenle deneylerimizin ikinci aşamasında apoptozisi belirlemede farklı yöntemlerle sonuca gitmeyi uygun bulduk. Bilindiği gibi apoptozis programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanabilecek aktif bir süreçtir. Aşırlığı ya da azlığı pek çok hastalığın patogeneğinde (kanser, otoimmün hastalıklar, diyabet, Alzheimer, organ ve kemik iliği transplant red reaksiyonu...)  nemlidir. Bu nedenle çabuk ve kolay yöntemlerle belirlenebilmesinin önemi açıktır (221). Ne var ki apoptozisi belirlemede kullanılan yöntemlerin sınırlayıcı tarafları da vardır. Örneğin  alışmamızda metformin maruziyetine uğramış hücreleri floresan boyama yöntemi kullanarak boyadık ve böylece  l  hücrelerin arasından apoptotik hücreleri gösterdik. Bu yöntemde apoptozise uğramış hücreleri belirlemek için nukleusların morfolojisini ve ışık yayma oranlarını değerlendirdik. Ancak bu yöntemin de diğer boyama yöntemlerinin olumsuzluklarına sahip olduğu bilinmektedir (221). Örneğin, bu süreçte deney boyunca hücre yıkama ve transferleri hücre membranı hasarı, hücre popülasyonunun dağılımını ve apoptotik ve/veya nekrotik hücre oranını değiştirebilir (222).

Apoptozise özgü bir başka boyama yöntemi ise TUNEL tekniğidir. Bununla birlikte bu yöntemle de bazı hücrelerde yanlış pozitif yanıtın alınabildiği bilinmektedir (221). Yöntemlerin kimi kısıtlılıklarına rağmen elde edilen sonuçların birbirini doğrular nitelikte olması metforminin apoptotik etkinlikte olduğu sonucunu kuvvetle düşündürmektedir.

Boyama yöntemleri ile aldığımız sonucu T98G hücrelerinde kaspaz-3 düzeylerini ölçerek de doğruladık. Sonuçlarımız metformine bağlı olarak kaspaz düzeylerinin yükseldiğini gösterdi. Ancak burada üzerinde durulabilecek önemli bir nokta metforminin kaspazdan bağımsız bir yoldan da hücreyi apoptoza götürebileceğidir (223). Bu yol hücrede artan poli(ADP-riboz) polimeraz sentezi ve AIF'nin (apoptosis-inducing factor) çekirdeğe translokasyonu ile ilişkilidir. Çalışmamızda kaspazdan bağımsız olan bu mekanizma değerlendirilmemiştir. Son olarak metforminin apoptotik etkinliğini göstermek üzere apoptozise özgü DNA fragmentasyonu agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin dezavantajı ise özellikle erken dönem apoptozis olarak adlandırılan hücrelerdeki DNA fragmentasyonunun gösterilememesidir (224).

Araştırmamızda T98G hücrelerinde yalnızca metforminin değil aynı zamanda H₂O₂ ile metformin kombinasyonunun etkisi de çalışılmıştır. Bilindiği gibi H₂O₂ hücrede serbest oksijen hasarı oluşturarak apoptozise neden olan bir bileşiktir ve kanser hücre hatlarında da apoptozisi indüklemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla önce T98G hücreleri üzerinde H₂O₂ için bir LD₅₀ değeri belirlenmiş (2,5mM) ve metforminle kombinasyon bu dozda yapılmıştır. Sonuçlarımız H₂O₂ metformin kombinasyonu sonucu apoptotik etkinin arttığını göstermektedir. Aslında metforminin sitotoksik ilaçlarla kombinasyonun tümör büyümesini daha güçlü bir şekilde inhibe ettiğine dair araştırmalar bulunmaktadır (225,226). Bu nedenle araştırmaların sahipleri kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiğe ek olarak metformin de verilmesinin akılcı olacağını belirtmektedirler. Diğer taraftan bu iddialı ve erken bir yaklaşım da olabilir. Çünkü metforminin kanser hücrelerinde sisplatine bağlı apoptotik hücre ölümünü azaltabileceği de gösterilmiştir (227).

Araştırmamızın özgün tarafı metforminin apoptotik etkisinin T98G hücrelerinde ilk kez gösteriliyor olmasıdır. Glioblastoma multiforme yetişkinlerde sık rastlanan ve ne yazık ki henüz etkin bir tedavisi olmayan, hücre büyümesi,

proliferasyonu, yaşamı ve apoptozis mekanizmalarında görevli sinyal mekanizmalarının bozulması ile karakterize bir tümördür. Günümüz koşullarında ortalama yaşam süresi yaklaşık 15 aydır (228,229). Bilindiği gibi normal bir hücrenin malin bir tümöre dönüşmesi birtakım hücresel değişiklikler sonucu oluşur. Bu açıdan bakıldığında tümör hücrelerinin yaşamında önemli olan sinyal mekanizmaları ve bunlara bağlı olarak apoptozis düzenleyicilerinde oluşan değişiklikler önemlidir. Glioblastoma multiforme hücrelerinin yaşamını sürdürmeleri için geliştirdikleri sinyal mekanizmaları araştırıldığında sınıf 1 fosfoinositol-3 kinaz yolağı (PI3K), bununla bağlantılı olarak epitelial büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) ve mTOR ilişkisi önemli görülmektedir (228). Bu nedenle de PI3K yolağı yalnız ya da EGRF ve mTOR inhibitörleri ile birlikte yeni bir tedavi hedefi haline gelmiştir. Metforminin de kanser hücresi metabolizmasını hedefleyen bir mTOR inhibitörü olduğu göz önüne alınırsa öngörülen tedavi biçimlerine önemli katkılar sağlayabileceğini düşünebiliriz. Diğer taraftan tümör mikroçevresinin immün sistem hücrelerinin etkisinde olduğu ve bu mekanizmaların da kanser gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (230). Metforminin antienflamatuar olduğunu gösteren çalışma sayısı yeterli olmamakla birlikte bu olasılık metforminin tümör mikroçevresinin düzenlenmesi ile de tümör gelişimine karşı bir rol oynayabileceğini akla getiriyor (231,232).

Sonuç olarak, gerçekçi bir yaklaşımla, Glioblastoma multiforme için gelecekteki tedavi yönünün tümörün çıkarılması için cerrahinin optimize edilmesi ve sinerjistik etkili çok hedefli ilaç kombinasyonları ile olacağını öngörebiliriz. Burada hücrenin yaşam mekanizmaları ve apoptozisi hedef alan ilaçların önemi olacaktır. Bu açıdan apoptotik özelliği olduğunu gösterdiğimiz metformin tedavi protokollerine katılabilecek iyi bir aday olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmamızın sonucu aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. Metformin; T98G hücreleri üzerine doz bağımlı apoptotik bir etkinlik göstermiştir. Hücre canlılığını azaltmıştır.
2. Metforminin H_2O_2 ile kombinasyonu ise T98G hücreleri üzerindeki apoptotik etkinliğin artmasına neden olmuştur.
3. Metformine bağlı bu etkinin doza bağlı olduğu anlaşılmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak metforminin kanser tedavilerine eklenebilecek bir aday molekül olabileceği yorumunu yapabiliriz. Bununla birlikte metforminin apoptotik etkinliğinin hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğinin aydınlatılması için başka moleküler çalışmalara da gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

1. **Hundal HG, Ramldal T, Reyes R, Leiter LA.** Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology*. **1992**; 131:1165–1173
2. **Klip A, Guma A, Ramldal T, Bilan PJ, Lam L, Leiter LA.** Stimulation of hexose transport by metformin in L6 muscle cells in culture. *Endocrinology*. **1992**;130:2535–2544
3. **Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R.** Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. **1998**; 338:1876–1880
4. **Wiernsperger NF, Bailey CJ.** The antihyperglycemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. *Drugs*. **1999**;58:31–39
5. **Hardie DG.** AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2007**; 47:185–210
6. **E. Diamanti-Kandarakis, C. Kouli, T. Tsianateli, A. Bergiele.** Therapeutic effects of metformin on insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome, *Eur. J. Endocrinol*. **1998**;138:269–274.
7. **Scarpello JH.** Improving survival with metformin: the evidence base today. *Diabetes Metab* **2003**;29: 6S36–43.
8. **Anisimov VN.** Insulin/IGF-1 signaling pathway driving aging and cancer as a target for pharmacological intervention. *Exp Gerontol*. **2003**;38: 1041–1049.
9. **Ingram DK, Anson RM, de Cabo R, Mameczarz J, Zhu M, et al.** Development of calorie restriction mimetics as a longevity strategy. *Ann NY Acad Sci*. **2004**;1019: 412–423.
10. **Ingram DK, Zhu M, Mameczarz J, Zou S, Lane MA, et al.** Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell*. **2006**;5: 97–108.
11. **Kroemer, G., & Reed, J. C.** Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*. **2000**; 6, 513–519.
12. **El-Mir MY, Daille D, R-Villanueva G et al.** Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol Neurosci*. **2008**;34:77–87.
13. **C. Behl, M. Widmann, T. Trapp, F. Holsboer.** 17 β -Oestradiol protects neurons from oxidative stress induced cell death in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1995**;216:473–482.
14. **S. Turnbull, B.J. Tabner, O.M.A. El-Agnaf, S. Moore, Y. Davies, D. Allsop.** alpha-Synuclein implicated in Parkinson's disease catalyses the formation of hydrogen peroxide in vitro, *Free Radic. Biol. Med*. **2001**; 30:1163–1170.
15. **Correia S, Carvalho C, Santos MS et al.** Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. *Med Chem*. **2008**;4:358–364.
16. **J. Lee, S.L. Chan, C. Lu, M.A. Lane, M.P. Mattson.** Phenformin suppresses calcium responses to glutamate and protects hippocampal neurons against excitotoxicity, *Exp. Neurol*. **2002**;175:161–167.

17. **Martin-Castillo, B.; Vazquez-Martin, A. Oliveras-Ferraro, C. Menendez, J.A.** Metformin and cancer. *Cell Cycle* .**2010**; 9:1057–1064.
18. **Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD.** Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ Clinical research ed.* **2005**;330:1304–5.
19. **Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, et al.** Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* **2009**;27:3297–302.
20. **Cazzaniga M, Bonanni B, Guerrieri-Gonzaga A.** Decensi A. Is it time to test metformin in breast cancer clinical trials? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2009**;18:701–5.
21. **Goodwin PJ, Ligibel JA, Stambolic V.** Metformin in breast cancer: time for action. *J Clin Oncol.* **2009**;27: 3271.
22. **Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M.** Metformin is an AMP kinase–dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* **2006**;66:10267–10273.
23. **Zakikhani M, et al.** Dependent Translation Initiation in Breast Cancer Cells– Metformin Inhibits Mammalian Target of Rapamycin. *Cancer Res.* **2006**; 66:10269-73.
24. **Buzzai M, et al.** Metformin, diet and breast cancer, An avenue for chemoprevention. *Cancer Res.* **2007**; 67:6745-52.
25. **Zakikhani M, et al.** Genome-wide inhibitory impact of the AMPK activator metformin on [kinesins, tubulins, histones, auroras and polo-like kinases] M-phase cell cycle genes in human breast cancer cells. *Cancer Prev Res.* **2008**; 1:369-75.
26. **Dowling RJ, et al.** Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* **2007**; 67:10804-12.
27. **Labuzek K, Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopień B.** Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep.* **2010**; Sep-Oct;62(5):956-65.
28. **S. Ramamurthy, G.V. Ronnett.** Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain, *J. Physiol.* **2006**;574:85–93.
29. **Ian W Campbell.** Metformin -- life begins at 50. *British Journal of Diabetes & Vascular Disease* **2007**;7: 247.
30. **Lee A. Witters.** The blooming of the French lilac. *J. Clin. Invest.* **2001**;108:1105–1107.
31. **Bailey CJ, Day C.** Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes Int.* **2004**;21:115-17.
32. **Sterne J.** Du nouveau dans les antidiabetiques. La NN dimethylamine guanyl guanide (N.N.D.G.). *MarocMed.* **1957**; 36: 1295–1296.
33. **H. Khouiri, F. Collin, D. Bonnefont-Rousselot, A. Legrand, D. Jore and M. Garde's-Albert.** Radical-induced oxidation of Metformin. *Eur. J. Biochem.* **2004**;271:4745–4752.
34. **Werner E, Bell J.** The preparation of methylguanidine, and of $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. *J Chem Soc, Transactions.* **1921**;121:1790–5.
35. **William Andrew.** Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia (Sittig's Pharmaceutical

Manufacturing Encyclopedia). 3rd ed. Vol. 3. *Norwich, NY: 2007.*

36. **Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, et al.** Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol* **1981**; 12: 235-46
37. **Bristol-Myers Squibb.** U.S. Food and Drug Administration. Glucophage (Metformin hydrochloride tablets) *Label Information*. August 27; **2009**-12-08.
38. **Zhou M, Xia L, Wang J.** Metformin transport by a newly cloned proton stimulated organic cation transporter (plasma membrane monoamine transporter) expressed in human intestine. *Drug Metab Dispos.* **2007**;35: 1956-62.
39. **Choi MK, Song IS.** Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2008**;23:243-53.
40. **Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, et al.** Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos.* **2007**;35: 1333-40
41. **Garry G. Graham, Jeroen Punt, Mani Arora, Richard O. Day, Matthew P. Doogue, Janna K, et al.** Timmins and Kenneth M. Williams. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet.* **2011**;50 (2): 81-98 0312-5963/11/0002-0081
42. **Pentikainen PJ, Neuvonen PJ, Penttilä A.** Pharmacokinetics of Metformin after intravenous and oral administration to man. *Eur J Clin Pharmacol.* **1979**; 16: 195-202.
43. **Timmins P, Donahue S, Mecker J, et al.** Steady-state pharmacokinetics of a novel extended-release Metformin formulation. *Clin Pharmacokinet.* **2005**;44: 721-9.
44. **Beckmann R.** Absorption, distribution in the organism and elimination of Metformin. *Diabetologia.* **1969**;5:318-24.
45. **Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR.** Metformin: an update. *Ann Intern Med.* **2002**;137:25-33.
46. **Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bayenholm P, Rooyackers O, et al.** Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* **2002**; 51:2074 -2081.
47. **Marc Foretz, Sophie Hébrard, Jocelyne Leclerc, Elham Zarrinpashneh, Maud Soty, Gilles Mithieu et al.** Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* **2010**;120 (7):2355-2369.
48. **Hardie, D. G.** The AMP-activated protein kinase cascade, the key sensor of cellular energy status.
49. **Long YC, Zierath JR** AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest.* **2003**; 116:1776-1783.
50. **Mhairs C. Towler, D. Grahame Hardie.** AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circ Res.* **2007**;100:328-341.
51. **Mhairs C. Towler, D. Grahame Hardie.** AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circ Res.* **2007**;100:328-341.
52. **Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen ZP, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams JJ.** AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans.* **2003**;31:162-168.
53. **Carlson, C. A. and Kim, K. H.** Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by

phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **1973**; 248, 378–380.

54. **Beg, Z. H., Allmann, D.W. and Gibson, D. M.** Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**;54, 1362–1369.
55. **Carling, D., Zammit, V. A. and Hardie, D. G.** A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* **1987**; 223, 217–222.
56. **Hardie DG.** AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2007**;47:185–210.
57. **Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE.** Mammalian AMP activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem.* **1996**;271: 611–614.
58. **Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG.** Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver, and identification of threonine-172 as the major site at which it phosphorylates and activates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* **1996**;271:27879–27887.
59. **Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B. J, van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S. C., Jennings, I. G., et al.** AMPK β subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr. Biol.* **2003**;13, 867–871.
60. **Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, et al.** LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* **2003**;13: 2004–2008.
61. **Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R. and Hardie, D. G.** Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* **2003**; 2:28.
62. **Lizcano, J. M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S. A., Udd, L., Makela, T. P., Hardie, D. G. and Alessi, D. R.** LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* **2004**; 23, 833–843.
63. **Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA.** The Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem.* **2005**;280:29060–29066.
64. **Witters LA, Kemp BE, Means AR.** Chutes and ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends Biochem Sci.* **2005**;12: 12.
65. www.jbiol.com. Erişim tarihi: 14.2.2012
66. www.jci.org. Erişim tarihi: 12.2.2012
67. www.innovitaresearch.org. Erişim tarihi: 12.2.2012
68. **Owen MR, Doran E & Halestrap AP.** Evidence that Metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemical Journal.* **2000**; 348 607–614.
69. **Ebert BL, Firdi JD, Ratcliffe PJ.** Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter- via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem.* **1995**;270:29083-9.

70. **El-Mir, M.Y., et al.** Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **2000**;275:223–228.
71. **Holmes, B.F., Kurth-Kraczek, E.J., and Winder, W.W.** Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J. Appl. Physiol.* **1999**; 87:1990–1995.
72. **Shimomura, I., et al.** Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol. Cell.* **2000**; 6:77–86.
73. **King H, Aubert RE, Herman WH.** Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* **1998**; 21:1414–1431.
74. World Health Organization Expert Committee. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: *World Health Organization.* **1999**.
75. **Weir, G.C., and Leahy, J.L.** Pathogenesis of non–insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. In Joslin's diabetes mellitus. 13th edition. C.R. Kahn and G.E. Weir, editors. Lea & Febiger. Philadelphia, PA. **1994**; 240–264.
76. **Bogardus, C.** Metabolic abnormalities in the development of noninsulin- dependent diabetes mellitus. In Diabetes mellitus. D. LeRoith, S.I. Taylor, and J.M. Olefski, editors. *Lippincott-Raven Publishers.* Philadelphia, PA. **1996**; 459 pp.
77. **Evanthia Diamanti-Kandarakis, Charikleia D Christakou, Eleni Kandarakis and Frangiskos N Economou.** Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology.* **2010**;162 193–212.
78. **He L, et al.** Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell.* **2009**;137(4):635–646.
79. **Leclerc I, Rutter GA.** AMP-activated protein kinase: a new beta-cell glucose sensor?: regulation by amino acids and calcium ions. *Diabetes* **2004**; 53: S67–S74.
80. **E.I. Widen, J.G. Eriksson, L.C.** Metformin normalizes nonoxidative glucose metabolism in insulin-resistant normoglycemic first-degree relatives of patients with NIDDM. *Diabetes.* **1992**;41 354–358.
81. **Hundal, H. S., Ramlal, T., Reyes, R., Leiter, L. A. and Klip, A.** Cellular mechanism of Metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology.* **1992**; 131, 1165–1173.
82. **R.S. Hundal, M. Krssak, S. Dufour, D. Laurent, V. Lebon, V. Chandramouli, S.E. Inzucchi, W.C. Schumann, K.F. et al.** Mechanism by which Metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes.* **2000**;49:2063–2069.
83. **G. Zhou, R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doeber, N. Fujii, N. Musi, et al.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of Metformin action. *J. Clin. Invest.* **2001**;108:1167–1174.
84. **Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al.** Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia.* **2009**;52:17-30.
85. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Effect of intensive bloodglucose control with

- Metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. **1998**;352:854-865.
86. **Ito H, Ishida H, Takeuchi Y, Antoku S, Abe M, Mifune M, Togane M.** Long-term effect of Metformin on blood glucose control in non-obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrition & Metabolism*. **2010**;7:83.
 87. **Frank S.** Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. **1995**;333:853–61.
 88. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PKOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. **2004**;81:19–25.
 89. **Homburg R, Armar NA, Eshel A, Adams J, Jacobs HS.** Influence of serum luteinizing hormone concentrations on ovulation, conception, and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *BAJL*. **1988**;297: 1024–1026.
 90. **Ehrmann DA.** Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. **2005**;352:1223–1236.
 91. **Dunaif A.** Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. **1997**, 18:774-800.
 92. **Harborne L, Fleming R, Lyall H, Norman J, Satter N.** Descriptive review of the evidence for the use of Metformin in polycystic ovary syndrome. *Lancet*. **2003**;361:1892-901.
 93. **Stefano Palomba, Angela Falbo, Fulvio Zullo, and Francesco Orio,** Evidence-Based and Potential Benefits of Metformin in the Polycystic Ovary Syndrome: A Comprehensive Review. *Endocrine Reviews*. **2009**. 30(1):1–50.
 94. **la Marca A, Egbe TO, Morgante G, Paglia T, Cianci A, De Leo V, Ciani A.** Metformin treatment reduces ovarian cytochrome P-450c17₂ response to human chorionic gonadotrophin in women with insulin resistance-related polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. **2000**;15:21–23
 95. **Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H.** Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril*. **2003**;79:956–962.
 96. **Piltonen T, Morin-Papunen L, Koivunen R, Perheentupa A, Ruokonen A, Tapanainen JS.** Serum anti-Müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during Metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. **2005**;20:1820-6.
 97. **Palomba S, Orio F Jr, Falbo A, Russo T, Tolino A, Zullo F.** Effects of Metformin and clomiphene citrate on ovarian vascularity in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **2006**;86:1694-1701.
 98. **Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R.** Effects of Metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. **1998**;338:1876-80.
 99. **Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al.** Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. **2005**;112:2735–52.
 100. **Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, Azziz R, Legro RS, Ghazzi MN.** Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. **2006**;91:48–53.
 101. **Glueck CJ, Aregawi D, Agloria M, Winiarska M, Sieve L, Wang P.** Sustainability of 8%

- weight loss, reduction of insulin resistance, and amelioration of atherogenic-metabolic risk factors over 4 years by Metformin-diet in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* **2006**;55:1582–89.
102. **Tang T, Glanville J, Hayden CJ, White D, Barth JH, BalenAH.** Combined lifestyle modification and Metformin in obese patients with polycystic ovary syndrome. A randomized, placebo-controlled, double-blind multicentre study. *Hum Reprod.* **2006**;21:80–89.
 103. **Pi-Sunyer FX.** The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res.* **2002**;10(Suppl 2):97S–104S.
 104. **Vega GL.** Obesity, the metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Am Heart J.* **2001**; 142:1108–1116.
 105. **James, P.T., Leach,R., Kalamara, E., and Shayeghi, M.** The worldwide obesity epidemic. *Obes. Res.* **2001**;9:228S–223S.
 106. **Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW.** Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* **2004**;15:362–369.
 107. **Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG.** Central nervous system control of food intake. *Nature.* **2000**; 404:661–671.
 108. **Kola B.** Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. *Journal of Neuroendocrinology.* **2008**; 20:942–951.
 109. **Palomba S, Falbo A, Russo T, Manguso F, Tolino A, Zullo F, De Feo P, Orio F Jr.** Insulin sensitivity after Metformin suspension in normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* **2007**;92:3128–3135.
 110. **Kara M, Levri, Elizabeth Slaymaker, Allen Last, Julie Yeh, Jonathan Ference, Frank D’Amico, Stephen A. Wilson.** Metformin as Treatment for Overweight and Obese Adults: A Systematic Review. *Ann Fam Med.* **2005**;3:457–461.
 111. **Lenhard JM, Klier SA, Paulik MA, Plunket KD, Lehmann JM & Weiel JE.** Effects of troglitazone and Metformin on glucose and lipid metabolism: alterations of two distinct molecular pathways. *Biochemical Pharmacology* **1997**;54:801–808.
 112. **Srinivasan S, Ambler GR, Baur LA, et al.** Randomized, controlled trial of Metformin for obesity and insulin resistance in children and adolescents: improvement in body composition and fasting insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* **2006**;91:2074–80.
 113. **Dyck JR, Lopaschuk GD.** AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol.* **2006**;574:95–112.
 114. **Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD.** High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* **1995**;270:17513–17520.
 115. **Russell RR 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ.** AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest.* **2004**;114:495–503.
 116. **Ning XH, Zhang J, Liu J, Ye Y, Chen SH, From AH, Bache RJ, Portman MA.** Signaling and expression for mitochondrial membrane proteins during left ventricular remodeling and contractile failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* **2000**;36:282–287.

117. Chunying Li and John F Keaney Jr. AMP-activated protein kinase: a stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*.**2010**;10:111–115.
118. **Morrow VA, Fougelle F, Connell JM, Petrie JR, Gould GW, Salt IP.** Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. **2003**;278:31629–31639.
119. **Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM.** AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007**;104:12017–12022.
120. **Fontbonne A, Charles MA, Juhan-Vague I, Bard JM, Andre P, Isnard E, et al.** The effect of Metformin on the metabolic abnormalities associated with upper-body fat distribution. *Diabetes Care*. **1996**;19:920–6.
121. **Charles MA, Moranj P, Eschwege E, Andre P, Vague P, Juhan-Vague I.** Effect of weight change and Metformin on fibrinolysis and the von Willebrand factor in obese nondiabetic subjects: theBIGPRO1Study. Biguanides and the Prevention of the Risk of Obesity. *Diabetes Care*. **1998**;21: 1967–72.
122. **Charles MA, Eschwege E, Grandmottet P, Isnard E, Cohen JM, Bensoussan JL, et al.** Treatment with Metformin of non-diabetic men with hypertension, hypertriglyceridaemia and central fat distribution: the BIGPRO 1,2 trial. *Diabetes Metab Res Rev* **2000**;16:2–7.
123. **A. Fontbonne, I. Diouf , M. Baccara-Dinet , E. Eschwege, Charles.** Effects of 1-year treatment with Metformin on metabolic and cardiovascular risk factors in non-diabetic upper-body obese subjects with mild glucose anomalies: A post-hoc analysis of the BIGPRO1 trial *Diabetes Metab Res Rev* **2000**;16:2–7.
124. **Susheel Gundewar, John W. Calvert, Saurabh Jha, Iris Toedt-Pingel, Sang Yong Ji, Denise Nunez.** Activation of AMP-Activated Protein Kinase by Metformin Improves Left Ventricular Function and Survival in Heart Failure. *Circ. Res*. **2009**;104:403-411
125. **Solskov L, Lofgren B, Kristiansen SB, Jessen N, Pold R, Nielsen TT et al.** Metformin induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury in the rat heart 24 h after administration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2008**;103:82–87
126. **Han Xiao, Xiaowei Ma, Wei Feng, Yongnan Fu, Zhizhen Lu, Ming Xu.** Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF β 1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovascular Research* **2010**; 87. 504–513
127. **A. Enrique Caballero.** Endothelial Dysfunction in Obesity and Insulin Resistance: A Road to Diabetes and Heart Disease. *OBESITY RESEARCH* Vol. 11 No. 11 November **2003**
128. **Quyyumi AA.** Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med*. **1998**;105:32S–39S.
129. **Maria Assunta Potenza, Francesco Addabbo, and Monica Montagnani.** Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2009**;297: E568–E577.
130. **Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA.** AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* **1999**;443:285–289.
131. **Verma S, Yao L, Dumont AS, McNeill JH.** Metformin treatment corrects vascular insulin resistance in hypertension. *J Hypertens* **2000**;18:1445–1450.

132. **Dominguez LJ, Davidoff AJ, Srinivas PR, Standley PR, Walsh ME, Sowers JR.** Effects of Metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Endocrinology* **1996**;137: 113–121
133. **C Agard, M Rolli-Derkinderen, E Dumas-de-La-Roque, M Rio, C Sagan, JP Savineau.** Protective role of the antidiabetic drug Metformin against chronic experimental pulmonary hypertension. *British Journal of Pharmacology* **2009**;158, 1285–1294
134. **Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, Beaudoux JL ().** Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metab* **2005**;54: 829–834. Bp
135. **Nagata D, Takeda R, Sata M, Satonaka H, Suzuki E, Nagano T, Hirata Y.** AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* **2004**;110:444–451.
136. **Kikuo Isoda, James L. Young, Andreas Zirlik, Lindsey A. MacFarlane, Naotake Tsuboi, Norbert Gerdes.** Metformin Inhibits Proinflammatory Responses and Nuclear Factor- κ B in Human Vascular Wall Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2006**;26:611–617.
137. **Chitturi S, Farrell GC, Hashimoto E, Saibara T, Lau GK, Sollano JD.** Non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: definitions and overview of proposed guidelines. *J Gastroenterol Hepatol* **2007**;22: 778–787. 4
138. **Amarapurkar DN, Hashimoto E, Lesmana LA, Sollano JD, Chen PJ, Goh KL.** How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences? *J Gastroenterol Hepatol* **2007**; 22: 788–793.
139. **Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al.** Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* **2003**; 37: 917–923.
140. **Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R, Janssen I.** Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2002**;282:E657–63. 45 1285
141. **M. Duvnjak, V. Tomasic, M. Gomercic, Smircic Duvnjak, N. Barsic, I. Lerotic.** Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status. *journal of physiology and pharmacology* **2009**; 60, suppl 7, 57–66
142. **Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM.** Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptindeficient mice. *Nat Med* **2000**; 6: 998–1003.
143. **Giovannucci, E., Harlan, D. M., Archer, M. C., Bergenstal, R. M., Gapstur, S. M., Habel, L. A.** Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* **2010**;33. 1674–1685
144. **Calle EE, Kaaks R.** Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* **2004**;4:579–91
145. **Jalving, M., Gietema, J. A., Lefrandt, J. D., de Jong, S., Reyners, A. K., Gans, R. O. and de Vries, E. G.** Metformin: taking away the candy for cancer? *Eur. J. Cancer* **2010**;46, 2369–2380.
146. **Bowker, S. L., Yasui, Y., Veugelers, P. and Johnson, J. A. ()** Glucose-lowering agents and cancer mortality rates in type 2 diabetes: assessing effects of time-varying exposure. *Diabetologia* **2010**;53, 1631–1637
147. **Libby, G., Donnelly, L. A., Donnan, P. T., Alessi, D. R., Morris, A. D. and Evans, J. M. ()**

New users of Metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2009**;32, 1620–1625

148. **Bodmer, M., Meier, C., Krahenbuhl, S., Jick, S. S. And Meier, C. R.** Long-term Metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes Care* **2010**;33, 1304–1308
149. **Wright, J. L. and Stanford, J. L. ()** Metformin use and prostate cancer in Caucasian men: results from a population-based case-control study. *Cancer Causes Control* **2009**;20, 1617–1622
150. **Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, et al.** Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* **2009**; 27:3297–3302.
151. **Frederic Bost, Issam Ben Sahraa, Yannick Le Marchand-Brustel and Jean-Francois Tanti.** Metformin and cancer therapy. Wolters Kluwer Health Lippincott Williams & Wilkins **2011**;1040-8746
152. **Dowling, R. J., Zakikhani, M., Fantus, I. G., Pollak, M. and Sonenberg, N.** Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* **2007**;67, 10804–10812
153. **Zakikhani, M., Dowling, R., Fantus, I. G., Sonenberg, N. and Pollak, M.** Metformin is an AMP kinase- dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* **2006**;66, 10269–10273
154. **Green, A. S., Chapuis, N., Trovati Maciel, T., Willems, L., Lambert, M., Arnoult, C. et al.** The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood* **2010**;116, 4262–4273
155. **Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, et al.** Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* **2010**; 11:390–401
156. **Zhuang Y, Miskimins WK.** Metformin induces both caspase-dependent and poly(ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* **2010**; 9:603–615.
157. **Yasmeen A, Beauchamp MC, Piura E, et al.** Induction of apoptosis by Metformin in epithelial ovarian cancer: involvement of the Bcl-2 family proteins. *Gynecol Oncol* **2011**; 121:492–498.
158. **Liu B, Fan Z, Edgerton SM, et al.** Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle* **2009**; 8:2031–2040
159. **Isakovic, A., Harhaji, L., Stevanovic, D., Markovic, Z., Sumarac-Dumanovic, M., Starcevic, V., Micic, D. And Trajkovic, V.** Dual antiglioma action of Metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**;64, 1290–1302
160. **Janjetovic K, Vucicevic L, Misirkic M, et al.** Metformin reduces cisplatin- mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of AKT. *Eur J Pharmacol* **2011**; 651:41–50.
161. **Egan DE, Shackelford DB, Mihaylova MM, et al.** Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **2011**; 331:456–461.
162. **Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al.** The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of Metformin. *Science* **2005**; 310:1642–1646.
163. **Algire C, Amrein L, Bazile M, et al.** Diet and tumor LKB1 expression interact to determine

- sensitivity to antineoplastic effects of Metformin in vivo. *Oncogene* **2011**; 30:1174–1182.
164. **Jones RG, Plas DR, Kubek S, et al.** AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* **2005**; 18:283–293.
 165. **Feng Z, Hu W, de Stanchina E, et al.** The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* **2007**; 67:3043–3053.
 166. **Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, et al.** The antidiabetic drug Metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* **2008**; 27:3576–3586.
 167. **Algire C, Amrein L, Zakikhani M et al.** Metformin blocks the stimulative effect of a high-energy diet on colon carcinoma growth in vivo and is associated with reduced expression of fatty acid synthase. *Endocr Relat Cancer* **2010**; 17: 351–360.
 168. **Ersoy, C., Kiyici, S., Budak, F., Oral, B., Guclu, M., Duran, C. ve ark.** The effect of Metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2008**;81, 56–60
 169. **Grisouard, J., Dembinski, K., Mayer, D., Keller, U., Muller, B. and Christ-Crain, M.** Targeting AMP-activated protein kinase in adipocytes to modulate obesity-related adipokine production associated with insulin resistance and breast cancer cell proliferation. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2011**;3,16
 170. **Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C. And Menendez, J. A.** The antidiabetic drug Metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. *Cell Cycle* **2009**;8, 88–96
 171. **Benoit V, Bruno G, Nieves S, Jocelyne L, Marc F and Fabrizio A.** Cellular and molecular mechanisms of Metformin: an overview. *Clinical Science* **2012**; 122, 253–270
 172. **S. P. Langdon.** Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, **2001**
 173. **Yard. Doç. Dr. Gül ÖZCAN ARICAN.** Memeli Hücre ve Doku Kültürü Ders Notu. İstanbul Üniversitesi. Fen fakültesi. Biyoloji Bölümü. Erişim Tarihi: 12.04.2012
 174. **Köhler, G. & Milstein, C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *In: Nature. Bd.* **1975**;256, S. 495–497.
 175. **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM** "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts". *Science* **1998**;282 (5391): 1145–7.
 176. **Sezin YAKUT.** Glial tümörlerde artı tümör süpresör geninde loh ve metilasyon profillerinin araştırılması. T.C. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. **2006**
 177. **Didem COŞAN.** İnsan ve sıçan glial tümör hücre dizilerinde telomeraz aktivitesi ve hücre yüzey sialilasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması. T.c. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. **2007**
 178. <http://cellbank.nibio.go.jp>. Erişim tarihi: 23.04.2012
 179. **Dive, C., Gregory, C. D., Phipps, D. J., Evans, D. L., Milner, A. E., Wylie, A. H.,** Analyses and Discrimination of necrosis and Apoptosis (Programmed Cell Death) by Multiparameter Flow Cytometry, *Biochimica et Biophysica*, **1992**;1133, 275-285

180. www2.uah.es Erişim tarihi: 18.05.2.12
181. **Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D.**, Apoptozun önemi. *Toraks Dergisi*, **2001**;91-95,
182. **Wyllie, A. H.**, Glucocorticoid-induced Thymocyte Apoptosis in Associated with Endogenous Endonuclease Activation. *Nature*, **1980**;284 (5756). 555-556 .
183. **Helts SW.** To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* **1998**; 278: 300-307.
184. **Krauss, G.**, Biochemistry and Signal Transduction and Regulation. Wileyvch. Germany, **2001**.
185. **Ulukaya E.** Apoptosis Ders Notları Ankara, **2003**.
186. **Cohen JJ.** Apoptosis. *Immunol Today* **1993**; 14: 126-130.
187. **Takahashi, M., Saito, H., Okuyama, T., Miyashita, T., Kosuga, M., Sumisa, F., Yamada, M., Ebinuma, H. and Ishii, H.**, Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. *J. Hepatol.* **1999**;31(2): 315-322,
188. **Chen, M. & Wang, J.** Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* **2002**;7, 313-9
189. **Lee D, Scott AL, Jerry AL.** Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J Biol Chem.* **2000**; 275: 16007-16014.
190. **Pollack M, Lécuyerburgh C.** Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **2001**; Nov;56(11):B475-82.
191. **Nakatsuka H, Ohta S, Tanaka J, Toku K, Kumon Y, Maeda N, Sakanaka M, Sakaki S.** Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Research.* **1999**; 849: 216-219.
192. Elizabeth C. Ledgerwood and Ian M. Morison. Targeting the Apoptosome for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2009;15:420-424.
193. **Nagase H, Fukuyama H, Tanaka M, Kawane K and Nagata S.** Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation. *Cell Death and Differentiation.* **2003**; 10, 142-143.
194. **Ricci JE, Gottlieb RA, Gren DR.** Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biology* **2003**; 160: 65-75.
195. **Cohen JJ.** Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* **1993**; 15: 35-43.
196. **Shintani T, Klionsky DJ.** Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **2004**;306:990-5.
197. www.biochemsoctrans.org. Erişim tarihi: 18.05.2.12
198. **Mary C. Phelan.** Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology* **1998**; 1.1.1-1.1.10
199. **Denizot F, Lang R.** Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods.* **1986**; Vol: 89, Issue 2, Pages 271-277
200. **Alexei I.Kononov, Evgeniya B.Moroshkina.** Photophysical Processes in the Complexes of DNA

- with Ethidium Bromide and Acridine Orange: A Femtosecond Study. *J. Phys. Chem. B*, **2001**; *105*(2), pp 535–54
201. **Paola Bossù**. Qualitative Analysis of DNA Fragmentation by Agarose Gel Electrophoresis. Dompé Research Center, L'Aquila, Italy. **2009**
 202. **Adrien Negoescu, Philippe Lorimier, Francoise Labat-moleur, Christian Drouet, Catherine Robert, Christiane Guillermet**. In Situ Apoptotic Cell Labeling by the TUNEL Method: Improvement and Evaluation on Cell Preparations. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **1996**; Vol. 44, No. 9, pp. 919-968.
 203. **Ian W Campbell**. Metformin life begins at 50. *British Journal of Diabetes and Vascular Disease* **2007**; 7: 247.
 204. **Wahlqvist ML, Lee MS, Hsu CC, Chuang SY, Lee JT, Tsai HN**. Metformin-inclusive sulfonylurea therapy reduces the risk of Parkinson's disease occurring with Type 2 diabetes in a Taiwanese population cohort. *Parkinsonism Relat Disord*. **2012 Jul**; *18*(6):753-8. Epub 2012 Apr 10.
 205. **Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z**. Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacol Biochem Behav*. **2012 Jun**; *101*(4):564-74.
 206. **Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD**. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. **2005 Jun 4**; *330*(7503):1304-5.
 207. **Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM**. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. **2009 Sep**; *32*(9):1620-5.
 208. **Gallagher EJ, LeRoith D**. Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci*. **2011 Dec**; *1243*:54-68.
 209. **Zhuang Y, Miskimins WK**. Metformin induces both caspase-dependent and poly(ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells. *Mol Cancer Res*. **2011 May**; *9*(5):603-15.
 210. **Will MA, Palaniappan M, Peezel H, Kayampilly P, Menon KM**. Metformin: direct inhibition of rat ovarian theca-interstitial cell proliferation. *Fertil Steril*. **2012 Jul**; *98*(1):207-14.
 211. **Colquhoun AJ, Venier NA, Vandersluis AD, Besla R, Sugar LM, Kiss A, Fleshner NE, Pollak M, Klotz LH, Venkateswaran V**. Metformin enhances the antiproliferative and apoptotic effect of bicalutamide in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. **2012 May 22**.
 212. **Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE**. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. **2001 Oct**; *108*(8):1167-74.
 213. **Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al**. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of Metformin. *Science* **2005**; *310*:1642–1646.
 214. **Zhuang Y, Miskimins WK**. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1. *J Mol Signal*. **2008 Dec 1**; *3*:18.
 215. **Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, Le Marchand-Brustel Y, Auberger P, Tanti JF, Giorgetti-Peraldi S, Bost F**. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res*. **2011 Jul 1**; *71*(13):4366-72.

216. **Peacock KH, Lesser GJ.** Current therapeutic approaches in patients with brain metastases. *Curr Treat Options Oncol.* **2006** Nov;7(6):479-89.
217. **Zhou J, Atsina KB, Himes BT, Strohbehn GW, Saltzman WM.** Novel delivery strategies for glioblastoma. *Cancer J.* 2012 Jan-Feb;18(1):89-99.
218. **Lv WS, Wen JP, Li L, Sun RX, Wang J, Xian YX, Cao CX, Wang YL, Gao YY.** The effect of metformin on food intake and its potential role in hypothalamic regulation in obese diabetic rats. *Brain Res.* **2012** Mar 20;1444:11-9. Epub 2012 Jan 20.
219. **Labuzek K, Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopień B.** Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep.* **2010** Sep-Oct;62(5):956-65.
220. **P.R. Twentyman & M. Luscombe.** A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer* **1987**;; 56, 279-285
221. **Deborah Ribble, Nathaniel B Goldstein, David A Norris and Yiqun G Shellman.** A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology* **2005**;5:12 doi:10.1186/1472-6750-5-12
222. **Jagan Muppidi, Melissa Porter, Richard M. Siegel.** Current Protocols in Immunology, Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death. *John Wiley & Sons, Inc:* **2004**; 3.17.1-3.17.36
223. **Zhuang Y, Miskimins WK.** Metformin induces both caspase-dependent and poly(ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* **2010**; 9:603–615
224. **Susan Elmore.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol June* **2007** vol. 35 no. 4495-516
225. **Rattan R, Graham RP, Maguire JL, et al.** Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of Cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia* **2010**;13:483–491
226. **Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K.** Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer Res* **2010**; 71:3196–3201.
227. **Janjetovic K, Vucicevic L, Misirkic M, et al.** Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of AKT. *Eur J Pharmacol* **2011**; 651:41–50.
228. **Kraskstad C, Chekenya M.** Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutic. *Molecular Cancer* **2010**; 9:123
229. **Mao H, Lebrun DG, Yang J, Zhu VF, Li M.** Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. **2012** Jan;30(1):48-56.
230. **Coussens LM, Werb Z.** Inflamm cancer. *Nature* **2002**; 420:860–867.
231. **Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K.** Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* **2006**; 47:1183–1188.
232. **Arai M, Uchiba M, Komura H, et al.** Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. *J. Pharmacol Exp Ther* **2010**; 334:206–213.

8. ÖZGEÇMİŞ

Ali UCBEK 30.04.1985 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Haziran 2009'da mezun oldu. 2009-2012 yılları arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine başladı. Eylül 2012'de yüksek lisans öğrenimini tamamladı.