

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METFORMİNİN SİTOTOKSİK, APOPTOTİK
VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Dr. Tuba SARIAYDIN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2018**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METFORMİNİN SİTOTOKSİK, APOPTOTİK
VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Dr. Tuba SARIAYDIN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT**

**ANKARA
2018**

**METFORMİNİN SİTOTOKSİK, APOPTOTİK VE GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Dr. Tuba SARIAYDIN

Danışman: Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT

Bu çalışma 05.07.2018 tarihinde, jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Doktora Programında” doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

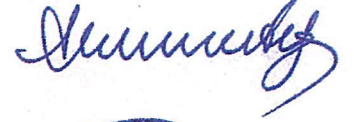
Jüri Başkanı: Prof. Dr. A. Nursen BAŞARAN
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Aylin GÜRBAY
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Ahmet AYDIN
(Yeditepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Yalçın DUYDU
(Ankara Üniversitesi)

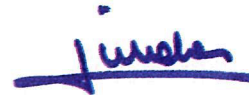


Üye: Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ
(Hacettepe Üniversitesi)



Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

30 Temmuz 2018



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- **Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.**
- **Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)**
- **Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. (2)**
- **Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. (3)**

22.106/2018

 (İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı
 Tuba SARIAYDIN

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığımı verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

20.06.2018

Tuba SARIAYDIN



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan ve kendisinden çok şey öğrendiğim, her türlü zorlukta yanımda olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT'a,

Desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bizlere yön veren hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN'a,

Tez sürecinde güler yüzü ve bilgisiyle destek olan hocam Sayın Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ'e

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım anabilim dalının diğer tüm saygıdeğer hocalarıma,

Tezimin hazırlanmasında büyük emeği geçen ve bu süreçte beni sabırla karşılayan ve yardımlarını esirgemeyen anabilim dalı araştırma görevlisi arkadaşım Uzm. Ecz. Tuğbagül ÇAL'a,

Bu süre içinde dostluğu ve samimiyetiyle yanımda olan anabilim dalı araştırma görevlisi arkadaşım Uzm. Ecz. Ünzile SUR'a,

Bu dönemde birlikte çalıştığım ve eğitim aldığım tüm anabilim dalı araştırma görevlilerine,

Yaşamım boyunca karşılaştığım her türlü zorlukta yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim sevgili anne ve babama,

Bu zorlu süreçte bana destek olan varlığıyla mutlu olduğum eşim ve biricik kızıma,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Sarıaydın, T. Metforminin Sitotoksik, Apoptotik ve Genotoksik Etkilerinin İn Vitro Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Metformin, diabetes mellitus tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir biguanid türevidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda metforminin antikanser özelliği gösterilmiştir. Metforminin olası antikanser etki mekanizmaları tam olarak açıklık kazanmamıştır. Bu sebeple çeşitli insan kanser hücre hatlarında, hücre çoğalması ve apoptoz üzerine etkilerine olan ilgi artmış ve bu konuda çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu tezde HepG2 ve HeLa hücre hatlarında metforminin sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. HepG2 hücrelerinde metforminin 48 saatlik inkübasyon sonrası 0,5-2 mM konsantrasyon aralığında (-) kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı; ancak 4 mM ve üzeri konsantrasyonlarda doz bağımlı olarak hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı azalttığı görülmüştür. HepG2 hücrelerinde IC₅₀ değeri 57,3 mM bulunmuştur. HeLa hücrelerinde metforminin 0,5-16 mM konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyon sonrası (-) kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı; ancak 32 ve 64 mM konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı azalttığı görülmüştür. HeLa hücrelerinde IC₅₀ değeri 76,9 mM bulunmuştur. Comet yöntemi ile değerlendirmede HepG2 ve HeLa hücrelerinde metforminin çalışılan tüm konsantrasyonlarında (5-1000 µM) (+) kontrolle kıyaslandığında DNA hasarını istatistiksel olarak anlamlı azalttığı belirlenmiştir. HepG2 hücreleri ile yapılan hücre siklusu analizinde hücre popülasyonunda sadece 32 mM konsantrasyonda % 10 oranında apoptoz gözlenmiştir. HepG2 hücrelerinde hücre siklusuna metforminin etkisi (-) kontrol ile kıyaslandığında 4, 8 ve 64 mM konsantrasyonlarda G0/G1 fazında birikimde artış gözlenmiş olup (-) kontrole (% 80) göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla % 91, % 99, % 97). HepG2 hücrelerinde proliferasyon gözlenmiştir. HeLa hücreleri ile yapılan hücre siklusu analizinde hücre popülasyonunda 4, 32 ve 64 mM'lik konsantrasyonlarda sırasıyla % 30, % 39, % 27 oranında apoptoz gözlenmiştir. Çalışma sonuçları, metforminin sitotoksik olmayan yüksek dozlarında oksidatif DNA hasarını azaltabileceğini ve apoptozu yol açabileceğini göstermektedir, ancak bu sonuçların desteklenmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metformin, HepG2, HeLa, sitotoksisite, genotoksisite, apoptoz, MTT, Comet, flow sitometri

ABSTRACT

Sarıaydın, T. In vitro assessment of cytotoxic, apoptotic and genotoxic effects of metformin Hacettepe University Health Sciences Institute Doctorate Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2018. Metformin is a biguanide derivative widely used in the treatment of diabetes mellitus. Recent studies have shown the anticancer properties of metformin. The possible mechanisms of anticancer effects of metformin have not been fully elucidated. For this reason, interest in the effects on cell proliferation and apoptosis has increased in various human cancer cell lines and studies have been started. In this thesis, it is aimed to investigate cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects of metformin on HepG2 and HeLa cell lines. Metformin in HepG2 cells did not produce a significant cytotoxic effect when compared to (-) control after 48 h incubation in the 0.5 - 2 mM concentration range; but at a concentration of 4 mM and above, there was a statistically significant decrease in cell viability in a dose-dependent manner. The IC_{50} value in the HepG2 cells was found to be 57.3 mM. In HeLa cells, metformin did not produce a significant cytotoxic effect when compared to (-) control after 48 h incubation in the concentration range of 0.5-16 mM; but cell viability decreased in a dose-dependent manner at concentrations of 32 and 64 mM which was statistically significant. The IC_{50} value in HeLa cells was found to be 76.9 mM. It was determined that when compared to (+) control all the concentrations of metformin (5-1000 μ M) in the HepG2 and HeLa cells were statistically significantly reduced by the Comet method. Cell cycle analysis with HepG2 cells revealed a 10 % apoptosis in the cell population at a concentration of only 32 mM. Effect of metformin on cell cycle in HepG2 cells, increase in G0 / G1 phase accumulation was observed at 4, 8 and 64 mM concentrations compared to (-) control (80 %) and it was found higher compared with the (-) control of cell cycle (91 %, 99 %, 97 % respectively). Proliferation was observed in HepG2 cells. Cell cycle analysis with HeLa cells revealed apoptosis of 30 %, 39 %, 27 % in the cell population at 4, 32 and 64 mM concentrations, respectively. Our results have shown that it may reduce oxidative DNA damage in non-cytotoxic high doses of metformin and may lead to apoptosis, but further studies are needed to support these results.

Key Words: Metformin, HepG2, HeLa, cytotoxicity, genotoxicity, apoptosis, MTT, Comet, flow cytometri

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prediyabet ve Diyabet Tanımı ve Sınıflandırılması	3
2.1.1. Tip 1 Diyabet	8
2.1.2. Tip 2 Diyabet	11
2.1.3. Gestasyonel Diyabet	12
2.1.4. Diyabetin Spesifik Türleri	13
2.2. Diyabet Tanı ve Tarama Testleri	15
2.2.1. Tip 1 Diyabet Taraması	15
2.2.2. Tip 2 Diyabet Taraması	15
2.2.3. Gestasyonel Diyabet Taraması	16
2.2.4. C Peptit Düzeyi	17
2.2.5. Adacık Otoantikorları	17
2.3. Diyabet Tedavisi	17
2.3.1. Eğitimi	17
2.3.2. Tıbbi Beslenme Tedavisi	17
2.3.3. Egzersiz	18
2.3.4. Medikal Tedaviler	18
2.4. Metformin	19
2.4.1. Metforminin Farmakokinetik Etkinliği	21
2.4.2. Metforminin Hücresel Alımı	22
2.4.3. Metformin ve Mitokondriyal Oksidatif Fosforilasyon	23
2.4.4. Metforminin Antineoplastik Etkinliği	24
2.5. Diyabet ve Kanser	26
2.5.1 Diyabet ve Hepatosellüler Karsinom	28
2.5.2 Diyabet ve Serviks Kanseri	28

2.6. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Özellikleri	28
3.GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	32
3.3. Çalışma Çözeltileri	33
3.4. Yöntemler	34
3.4.1. HepG2 ve HeLa Hücre Hatlarında MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	34
3.4.2. HepG2 ve HeLa Hücre Hatlarında COMET Yöntemi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi	36
3.4.3. HepG2 ve HeLa Hücre Hatlarında Apoptotik Etkilerin Flow Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi	37
3.5. İstatistiksel Yöntemler	38
4. BULGULAR	39
4.1. Metformin Sitotoksitesinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	39
4.1.1. HepG2 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Metformin Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	39
4.1.2. HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Metformin Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	40
4.2. Metformin Genotoksisitesinin COMET Yöntemi ile Belirlenmesi	42
4.2.1. Metforminin HepG2 Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Genotoksisitesinin ve H ₂ O ₂ ile İndüklenen DNA Hasarına Karşı Etkisinin COMET Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Bulgular	42
4.2.2. Metforminin HeLa Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Genotoksisitesinin ve H ₂ O ₂ ile İndüklenen DNA Hasarına Karşı Etkisinin COMET Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Bulgular	46
4.3. Metforminin Apoptotik Etkilerinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi	49
4.3.1. Metforminin HepG2 Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	49
4.3.2. Metforminin HeLa Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	53
5. TARTIŞMA.	56
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. KAYNAKLAR	63
8. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	Amerikan Diyabet Derneği
AMP	Adenozin Monofosfat
AMPK	Aktive Edilmiş Protein Kinaz
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
APG	Açlık Plazma Glukozu
ATP	Adenozin Trifosfat
BAG	Bozulmuş Açlık Glukozu
BGT	Bozulmuş Glukoz Toleransı
CDA	Kanada Diyabet Birliği
CO₂	Karbon Dioksit
COMET	Tek Hücreli Jel Elektroforez
DKA	Diyabetik Ketoasidoz
DMEM	Dulbetco's Modifiet Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPP-4 Inh	Dipeptidil Peptidaz 4 İnhibitörleri
EDTA	Etilen Diyamin Tetraasitik Asit Disodyum Tuzu
FBS	Yeni Doğan Sığır Serum
FITC	Fluoresein İzotiyosiyanat
GAB 65	Glutamik Asit Dekarboksilaz 65
GDM	Gestasyonel Diyabetes Mellitus
GLP-1RA	Glukagon Like Peptit 1 Reseptör Agonistleri
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HBS	Fetal Bovine Serum

HCC	Hepatosellüler Karsinom
HeLa	İnsan Serviks Adenokarsinoma Hücresi
HepG2	İnsan Hepatosellüler Karsinoma Hücresi
IADPSG	Uluslararası Diyabet ve Gebelik Çalışma Grubu
IC₅₀	Hücrelerin % 50'sinin Öldüğü İnhibitör Konsantrasyon
IDH	İzositrat Dehidrogenaz
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
LGA	Yaşına Göre Büyük Doğum Ağırlığı
LKB1	Lökotrien B1
LMPA	Düşük Erime Noktalı Agar
MODI	Genç Yaşta Ortaya Çıkan Tip II Diyabet
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür
NIH	Ulusal Sağlık Enstitüsü
NMPA	Normal Erime Noktalı Agar
OCT	Organik Katyon Taşıyıcı
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
OXPOS	Mitokondriyal Oksidatif Fosforilasyon
PBS	Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
PI	Propityum İyodür
PMAT	Plazma Membran Monoamin Taşıyıcı
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
µM	Mikromolar
ATM	Ataksi Telanjiektazi mutasyona uğramış protein kinazı

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Tip 2 Diyabet Tanı ve Tarama	15
2.2. Oral Antidiyabetiklerin Etkinliğindeki Hedef Organlar	19
2.3. Galega Officinalis	21
2.4. Metforminin Etki Mekanizması	22
2.5. HepG2 ve HeLa hücrelerinin mikroskopik görünümüleri	32
4.1. Metforminin 48 saat maruziyette HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi	44
4.2. Metforminin 48 saat maruziyette HeLa hücre canlılığı üzerine etkisi	46
4.1. Metforminin HepG2 hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisine dair bulgular	48
4.3. Metforminle 48 saat inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerindeki DNA hasarı görüntüleri	49
4.4. Metforminin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisine dair bulgular	53
4.5. Metforminle 48 saat inkübasyon sonrası HeLa hücrelerindeki DNA hasarı görüntüleri	54
4.6. Metforminin HepG2 hücrelerindeki apoptotik etkileri ve hücre siklus analizleri	57
4.7. Metforminin HepG2 hücrelerindeki flow sitometri sonuçları	58
4.8. Metforminin HeLa hücrelerindeki apoptotik etkileri ve hücre siklus analizleri	60
4.9. Metforminin HeLa hücrelerindeki flow sitometri sonuçları	61

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1.	Diyabet Tanı Kriterleri	4
2.2.	Prediyabet Tanı Kriterleri	4
2.3.	Diyabet ve diğer glukoz metabolizma bozukluklarında tanı kriterleri	5
2.4.	Tip 1 Diyabet Evreleri	10
2.5.	Gestasyonel Diyabet Tarama	16
2.6.	Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri	31
4.1.	Metforminin 48 saat maruziyette HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi	43
4.2.	Metforminin 48 saat maruziyette HeLa hücre canlılığı üzerine etkisi	45
4.3.	Metforminin HepG2 hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisine dair bulgular	47
4.4.	Metforminin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisine dair bulgular	52
4.5.	Metforminin HepG2 Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Siklus Analizleri	56
4.6.	Metforminin HeLa Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Siklus Analizleri	59

1. GİRİŞ

Metformin (1,1-dimetilbiguanid hidroklorür) tip 2 Diyabetes mellitus tedavisinde yaygın olarak kullanılan ayrıca insülin direnci, bozulmuş açlık glukozu, bozulmuş glukoz toleransı ve polikistik over sendromu gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan biguanid grubu ilaçtır (1). Hiperinsülinemi ve insülin direnci olgularında kan dolaşımındaki insülin düzeylerini düşürdüğü için metformin sıklıkla “insülin duyarlaştırıcı” olarak anılır.

Metformin hakkında ileri sürülen etki mekanizması; insülin reseptörü ile sinyalizasyonda artışa yol açtığı, bu durumun insülin direnci geliştirdiği, ardından insülin düzeylerinin düştüğü şeklindedir (2). Bununla birlikte, metforminin esas olarak glukoneogenezi baskılayarak karaciğerden glukoz salınımını azalttığı ve bunun sonucunda insülin duyarlılığını, periferik dokularda glukoz kullanımını ve serbest yağ asidi miktarını arttırdığı da gösterilmiştir (3). Metformin insülin direncini düzeltici etkilerini, lökotrien B1 (LKB1) bağımlı mekanizma yoluyla karaciğerde siklik adenosin monofosfat (AMP) kinaz enzim aktivitesini arttırarak meydana getirmektedir (3,4).

Metformin kullanımı ya da kalori kısıtlaması enerji stresine yol açmaktadır bu durum AMP/ATP dengesinde artışla sonuçlanır (5). Hücrel homeostazi düzenleyen AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK), enerji stresine cevapta görevlidir (6). Bir serin/tironin kinaz olan AMPK glukoz yağ asitlerinin düzenlenmesinde rol oynayarak hücre içi enerji algılayıcısı olarak işlev yapar (7). AMPK aktivasyonunun belirgin etkisi, karaciğer yağ asitlerinin oksidasyonunda ve ketojenizde artış; kolesterol, trigliserit sentezi ve lipojenizde azalmadır. Bu olay iskelet kasının yağ asitlerini okside etmesini arttırdığı gibi, kas hücrelerinin glukoz alımının ve pankreas hücrelerinin insülin salgılamasının düzenlenmesini sağlar (8).

Metformin kullanımının Tip 2 Diabetes mellitus hastalarında kanser riskini azalttığı bildirilmiştir (9-13). Metforminin hücre çoğalması ve apoptoz üzerine etki ederek antikanser etki gösterdiği ileri sürülmüş (14,15); hücre çoğalmasını inhibe ettiği, koloni oluşumunu azalttığı ve kanser hücresinde kısmi hücre döngüsünün durmasına neden olduğu gösterilmiştir (16). Metforminin tümör hücrelerindeki 5-adenosin monofosfat aktive proteini (AMP) ve aktive protein kinazı (AMPK) uyararak, kısmen protein sentezi inhibisyonuna ve büyüme inhibisyonuna yol açtığı savunulmaktadır (17,18). AMPK aktivasyonu malign ve malign olmayan hücrelerde mTOR sinyal inhibisyonu, protein ve yağ asidi sentez inhibisyonu ve p53-p21 eksenini uyarılması yoluyla, hücrelerin hücre çoğalmasını güçlü bir şekilde baskılar (19-23).

Apoptoz, organizmanın canlılığını devam ettirebilmesi ve gelişebilmesi için gerekli olan programlanmış hücre ölümüdür. Hücrelerin, kendi çekirdek bileşenlerini, çekirdek ve sitoplazmanın çeşitli protein bileşenlerini yok eden belirli enzimleri etkinleştirdiği ardışık olarak düzenlenmiş bir özkıyım programıdır. Bu düzenli yolağın bozulması, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına yol açar (24). Apoptoz ve apoptozu kontrol eden genlerin kansere karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır (25).

Metforminin olası antikanser etki mekanizmaları tam olarak açıklık kazanmamıştır. Bu sebeple çeşitli insan kanser hücre hatlarında, hücre çoğalması ve apoptoz üzerine etkilerine olan ilgi artmış ve bu konuda çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Yaptığımız bu tez çalışmasında, metforminin HeLa ve HepG2 hücre hatlarında sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerinin COMET ve MTT yöntemleriyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prediyabet ve Diyabet Tanımı ve Sınıflandırılması

Diyabet, pankreas yeterli insülin üretmediğinde ya da vücut ürettiği insülini etkili bir şekilde kullanamadığında ortaya çıkan ciddi, kronik bir hastalıktır (26). Diyabet için tanısal kriterler Tablo 2.1’de özetlenmiştir. Bu kriterler, venöz numuneler ve laboratuvar yöntemlerine dayanmaktadır. Semptomatik hiperglisemi bulunmaması durumunda, tek bir laboratuvar test sonucu diyabet aralığında ise, bir başka günde tekrarlayan bir doğrulayıcı laboratuvar testi (APG, A_{1C} , 75g OGTT’de 2. saat PG) yapılmalıdır. Aynı testin onaylanması için tekrarlanması gerekir. Asemptomatik bir bireyde diyabet aralığında rastgele bir plazma glukozunun alternatif bir test ile teyit edilmesi gerekir. Semptomatik hiperglisemi durumunda, teşhis konulmuştur ve tedaviye başlanmadan önce bir doğrulayıcı test gerekmemektedir. Tip 1 diyabet olasılığı olan bireylerde (genç veya zayıf veya semptomatik hiperglisemi ile birlikte özellikle ketonüri veya ketonemi varsa), doğrulama testi, hızla kötüye gidişi önlemek için tedavinin başlamasını geciktirmemelidir. İki farklı testin sonuçları mevcutsa ve her ikisi de diagnostik sınır noktalarının üzerindeyse diyabet tanısı doğrulanmıştır.

Prediyabet, bozulmuş açlık glukozu (BAG), bozulmuş glukoz toleransı (BGT) veya % 6,0-6,4 arasında glikolize hemoglobin (A_{1C}) ile ilgili pratik ve kullanışlı bir terimdir. Daha önce “Latent Diyabet” ya da “Sınırdaki Diyabet” diye tanımlanan BAG ve BGT, artık “Prediyabet” olarak kabul edilmektedir. Prediyabet için tanısal kriterler Tablo 2.2’de özetlenmiştir. Prediyabetik bireyler gelişmekte olan diyabet ve onun komplikasyonları açısından yüksek risk altındadır. Prediyabetik olan her birey mutlak diyabet hastası olmaz. Gerçekten, BAG veya BGT tanısı konan insanların önemli bir kısmı normoglisemiye döner. Prediyabetli kişiler, diyabette görüldüğü gibi mikrovasküler hastalık riski taşımasa da diyabet ve kardiyovasküler hastalık gelişimi açısından risk altındadırlar (30).

Tablo 2. 1. Diyabet Tanı Kriterleri (27-29)

<p>APG\geq7,0 mmol / L</p> <p>Açlık= en az 8 saat boyunca kalori alımı yok</p> <p>veya</p> <p>A_{1c}\geq % 6,5 (yetişkinlerde)</p> <p>A_{1c} 'nin doğruluğunu etkileyen faktörlerin yokluğunda standartlaştırılmış, doğrulanmış bir test kullanılarak ve tip 1 diyabet şüphesi yokken</p> <p>veya</p> <p>75g OGTT'de 2. Saat PG \geq 7,0 mmol / L</p> <p>veya</p> <p>Rasgele PG\geq11,1 mmol / L</p> <p>Rasgele = son yemekten bu yana geçen süre dikkate alınmaksızın günün herhangi bir saati</p>

APG: Açlık plazma glukozu

A_{1c}: Glikozillenmiş hemoglobin A_{1c}

OGTT: Oral glukoz tolerans testi

PG: Plazma glukozu

Tablo 2. 2. Prediyabet Tanı Kriterleri

Bu kriterlerden bir tanesi ile teşhis edilir:

BAG (APG 6,1-6,9 mmol/L) (30)

BGT (75g OGTT’de 2.saat PG, 7,8-11,0 mmol/L) (30)

A_{1C} % 6,0-6,4

(A_{1C}’nin doğruluğunu etkileyen faktörlerin bulunmadığı yetişkinlerde ve şüpheli tip 1 diyabet yokken) (31)

BAG: Bozulmuş açlık glukozu

APG: Açlık plazma glukozu

BGT: Bozulmuş glukoz toleransı

OGTT: Oral glukoz tolerans testi

PG: Plazma glukozu

A_{1C}: Glikozillenmiş hemoglobin A_{1C}

BAG tanımında dünya çapında bir görüş birliği bulunmamasına rağmen (32,33), Kanada Diyabet Birliği (CDA) BAG’yi 6,1-6,6 mmol/L’lik bir APG değeri olarak tanımlamaktadır; çünkü bu kişilerde diyabet gelişme riski BAG’nin 5,6- 6,9 mmol/L APG değeri olarak tanımlanmasına kıyasla daha yüksektir (33). Amerikan Diyabet Derneği (ADA), prediyabette A_{1C}’yi % 5,7-6,4 arasında tanımlarken, Kanada Diyabet Birliği bu tanımın daha yüksek bir risk grubuna dayandığını ve prediyabet için tanısal bir kriter olarak % 6,0-6,4 arasında A_{1C}’yi içerdiğini belirtmiştir (27). Bununla birlikte, % 6’nın altındaki A_{1C} seviyeleri, diyabet için artmış bir risk ile ilişkilendirilebilir (31). Diyabet ve diğer glukoz metabolizma bozukluklarında tanı kriterleri Tablo 2.3’de özetlenmiştir.

Tablo 2. 3. Diyabet ve diğer glukoz metabolizma bozukluklarında tanı kriterleri

	BAG	BGT	BAG+BGT	Aşikâr DM
APG (≥8 saat açlıkta)	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	≥126 mg/dl
OGTT 2. Saat PG (75g glukoz)	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	≥200 mg/dl
Rastgele PG	-	-	-	≥200 mg/dl+ Diyabet semptomları
A_{1c}	-	-	-	≥ % 6,5 (≥48 mmol/mol)

DM: Diyabetes mellitus**PG:** Plazma glukozu**A_{1c}:** Glikozillenmiş hemoglobin A_{1c}**BGT:** Bozulmuş glukoz toleransı**APG:** Açlık plazma glukozu**OGTT:** Oral glukoz tolerans testi**BAG:** Bozulmuş açlık glukozu

Birçok patojenik süreç diyabet gelişiminde rol almaktadır. Bunlar, pankreatik β hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanan insülin eksikliğinden insülin etkisine direnç gösteren anormalliklere kadar değişir. Diyabette karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormalliklerin temeli, hedef dokularda insülin etkisindeki yetersizliktir. İnsülin etkisindeki eksiklik, yetersiz insülin sekresyonundan ve/veya hormon etki yollarındaki bir veya daha fazla noktada insüline verilen doku yanıtının azalması sonucunda ortaya çıkar. İnsülin salgılanmasının bozulması ve insülin etkisindeki kusurlar sıklıkla aynı hastada birlikte bulunur, tek başına olsa da hangi anormalliğin hipergliseminin birincil nedeni olduğu çoğu zaman belirsizdir.

Hiperglisemi derecesi, altta yatan hastalık süresine bağlı olarak zamanla değişebilir. Hastalık süreci mevcut olabilir ancak hiperglisemiye neden olacak kadar ilerlememiş olabilir. Aynı hastalık süreci diyabetin teşhis kriterlerini yerine getirmeksizin bozulmuş açlık glukozu (BAG) ve/veya bozulmuş glukoz toleransına (BGT) neden olabilir. Bazı diyabetli bireylerde, yeterli glisemik kontrol, kilo verme, egzersiz ve/veya oral glukoz düşürücü ajanlar ile başarılabilir. Dolayısıyla

bu bireylerin insülin ihtiyacı yoktur. Yeterli glisemik kontrol için rezidüel insülin sekresyonu olan bazı bireyler ekzojen insülin gerektirmeksizin hayatta kalabilirler.

Klasik hiperglisemi belirtileri arasında poliüri, polidipsi, noktüri, bulanık görme ve nadiren kilo kaybı bulunur. Bu belirtiler, genellikle, kan glikozu değerinin yükseldiği gösterildikten sonra geriye dönük olarak gözlemlenir. Poliüri, serum glikoz konsantrasyonu 180 mg/dL'nin (10 mmol/L) üzerine belirgin bir şekilde yükseldiğinde, üriner glikoz atılımının artmasına yol açan, glikoz için renal eşik aşıldığı zaman ortaya çıkar. Glikozüri, ozmotik diürece (yani poliüriye) ve hipovolemiye neden olur ve bu da polidipsiye yol açabilir. Hacim kayıplarını, diyet içermeyen gazlı içecekler gibi konsantre şekerli içeceklerle dolduran hastalar, hiperglisemiye ve ozmotik diürece şiddetlendirir. Kontrolsüz diyabet hastalığının akut, hayatı tehdit eden sonuçları, ketoasidoz veya nonketotik hiperosmolar sendrom ile birlikte olan hiperglisemidir. Diyabetin uzun vadeli komplikasyonları arasında görme kaybı olasılığı bulunan retinopati, böbrek yetmezliğine yol açan nefropati, ayak ülserleri, amputasyonlar ve Charcot eklemleri riski olan periferik nöropati ve gastrointestinal, genitoüriner ve kardiyovasküler semptomlara ve cinsel işlev bozukluğuna neden olan otonom nöropatidir. Diyabetli hastalarda aterosklerotik, kardiyovasküler, periferik arteriyel ve serebrovasküler hastalık insidansı artmaktadır. Diyabetiklerde hipertansiyon ve lipoprotein metabolizması anormallikleri genellikle bulunur.

400 milyondan fazla insan diyabetle yaşamaktadır. 1985 yılında dünya genelinde yaklaşık 30 milyon diyabet hastası vardı (34); 1995'te bu sayı 135 milyona (dünya nüfusunun %4'ü) yükselmiştir ve 2025'e kadar diyabet insidansının % 42 artarak 300 milyon insanı (dünya nüfusunun % 5,4'ü) etkileyeceği tahmin edilmektedir. 2013 yılındaki diyabetin global istatistikleri, 382 milyon kişinin bu hastalığa yakalandığını ve tip 2 diyabetin vakaların yaklaşık % 90'ını oluşturduğunu göstermektedir (35). Bu, hem kadınlarda hem de erkeklerde eşit oranlarda olup yetişkin nüfusun % 8,3'üne eşittir (35). 2012 ve 2013 yıllarında diyabet, yılda 1,5-5,1 milyon kişinin ölümüne neden olmuş ve böylece dünyadaki sekizinci ölüm nedeni haline gelmiştir (35). 2035 yılına kadar 592 milyon insanın diyabetten öleceği tahmin edilmektedir (35). 2014'te, 18 yaş ve üzeri yetişkinlerin % 8,5'unun diyabet hastası olduğu bildirilmiştir (36). 2015 yılında, tahminen 1,6 milyon ölümün doğrudan diyabetten kaynaklandığı tahmin edilmektedir (37).

2012'de ise 2,2 milyon ölüm kan şekeri yüksekliğine bağlanmıştır (37).

Diyabet 4 genel kategoriye ayrılabilir (27):

1. Tip 1 diyabet (otoimmün β hücre hasarı, genellikle mutlak insülin eksikliğine yol açar)
2. Tip 2 diyabet (insülin direncinin arka planında sıklıkla β hücre insülin sekresyonunun ilerleyici bir şekilde kaybedilmesi nedeniyle)
3. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM) (ikinci veya üçüncü trimesterde teşhis edilen diyabet, gebelikten önce aşikâr diyabet gözlenmez)
4. Diğer nedenlere bağlı olan diyabetin spesifik türleri, örneğin monogenik diyabet sendromları (yenidoğan diyabeti ve genç yaşta ortaya çıkan tip 2 diyabet [MODY], ekzokrin pankreas hastalıkları (kistik fibroz gibi) ve ilaç veya kimyasal yollarla ortaya çıkan diyabet (HIV/AIDS tedavisinde veya organ transplantasyonundan sonra glukokortikoid kullanımı gibi).

2.1.1. Tip 1 Diyabet

Tip 1 diyabet, vücutta insülin üretiminde yetersizlik ile karakterizedir. Dünya çapındaki toplam diyabet vakalarının % 5-10'unu oluşturan (38), daha önce insüline bağımlı diyabet veya juvenil başlangıçlı diyabet terimlerini kapsayan diyabetin bu biçimi, pankreasın β hücrelerinin hücre sel aracılı otoimmün yıkımından kaynaklanmaktadır. Tip 1 diyabetin etyolojisinde geçerli olan mevcut paradigma, pankreas β hücrelerinin çevresel olarak tetiklenmiş otoimmün yıkımının, genetik riskin arka planına karşı oluştuğunu varsayar (39), ancak alternatif hipotezler mevcuttur (40,41). Pankreas β hücrelerinin otoimmün yıkım belirteçleri arasında adacık hücre otoantikorları, insülin için otoantikorlar, glutamik asit dekarboksilaza (GAD65) karşı otoantikorlar ve tirozin fosfatazları, anti-fogrin antikorlarına (IA-2 ve IA-2 β) karşı otoantikorlar yer alır. Bu otoantikorlardan bir veya daha fazlası, açlık hiperglisemi başlangıçta tespit edildiğinde bireylerin % 85-90'ında mevcuttur. Ayrıca, hastalık DQA ve DQB genleri ile bağlantılı olarak güçlü HLA birlikteliklerine sahiptir ve DRB genlerinden etkilenir. Bu HLA-DR/DQ alelleri predispozan veya koruyucu olabilir.

Bu diyabet tipinde, β hücresi yok etme hızı oldukça değişkendir; bazı kişilerde (özellikle bebeklerde ve çocuklarda) hızlıdır ve diğerlerinde (özellikle yetişkinlerde) yavaştır. Bazı hastalarda, özellikle çocuklar ve ergenlerde, hastalığın ilk bulgusu olarak ketoasidoz görülebilir. Diğerleri, enfeksiyon veya diğer stres varlığında hızla şiddetli hiperglisemiye ve/veya ketoasidoza dönüşebilen ılımlı

açlık hiperglisemisine sahiptir. Özellikle yetişkinler, yıllarca ketoasidozu önlemek için yeterli β hücre fonksiyonunu koruyabilse de bu bireyler sonunda hayatta kalmak için insüline bağımlı hale gelir ve ketoasidoz için risk altındadır. Hastalığın bu son aşamasında, plazma C-peptidinin düşük veya saptanamayan seviyeleri ile kendini gösteren insülin sekresyonu, çok az veya hiç yoktur. İmmün aracılı diyabet, çocukluk ve ergenlik döneminde sıklıkla görülmekle birlikte, yaşamın sekizinci ve altıncı on yıllarında bile herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir. B hücrelerin otoimmün yıkımı birden çok genetik yatkınlığa sahiptir ve henüz yetersiz tanımlanmış çevresel faktörlere bağlıdır. Bu tür diyabetle başvurduklarında hastalar nadiren obez olmasına rağmen, obezite varlığı teşhisle uyumsuz değildir. Bu hastalar ayrıca Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi, Addison hastalığı, vitiligo, çölyak hastalığı, otoimmün hepatit, miyastenia gravis ve pernisiyöz anemi gibi diğer otoimmün bozukluklara eğilimlidirler.

Tip 1 diyabet hastalığının bazı formlarının bilinen bir etyolojisi yoktur. Bu hastalardan bazıları kalıcı insülinopeni taşırlar ve ketoasidoza eğilimli olup otoimmünite bulguları yoktur. Tip 1 diyabetli hastaların sadece azınlıkları bu kategoriye girse de çoğunlukla Afrikalı veya Asya kökenli kişilerdir. Bu şekildeki diyabetli bireyler, epizodik ketoasidozdan muzdarip olurlar ve epizotlar arasında insülin eksikliği dereceleri değişir. Bu diyabet şekli güçlü bir şekilde kalıtsaldır, β hücre otoimmünitesi için immünolojik kanıttan yoksundur ve HLA ile bağlantılı değildir. Etkilenen hastalarda insülin replasman tedavi aralıklı olarak mutlak gerekli olabilir.

Tip 1 diyabet hastalarının % 90'ında otoimmün (Tip 1A), % 10'unda otoimmün olmayan (Tip 1B) β hücre yıkımı söz konusudur. Genetik yatkınlığı olan bireylerde çevresel faktörlerin (emosyonel stres, virüsler, toksinler) etkisiyle otoimmünite tetiklenir ve ilerleyici β hücre hasarı başlar. Klinik semptomlar β hücre rezervi % 80-90 oranında azaldığı zaman ortaya çıkar. Evre 3 başlangıcında kanda adacık otoantikörleri bulunur. Bu otoantikörler, birinci yılın sonuna doğru genellikle kaybolur. Tip 1A diyabetin klinik evreleri Tablo 2.4'de özetlenmiştir. Tip 1B diyabet mutlak insülin eksikliği ile sonuçlanan otoimmünite dışındaki nedenlere bağlı gelişir. Adacık otoantikörleri bulunmaz.

Tip 1 diyabet, plazma glukoz miktarını düzenlemek için günlük olarak insülin verilmesini gerektirir. Semptomlar aşırı idrar boşaltımı (poliüri), susuzluk (polidipsi), sürekli açlık, kilo kaybı, görme değişiklikleri ve yorgunlukları içerir. Bu semptomlar aniden ortaya çıkabilir. Tip 1 diyabetli hastalara genellikle diyabetin akut semptomlarıyla ve kan şekeri seviyelerinde belirgin yükseklik ve yaklaşık üçte birinde hayatı tehdit edici ketoasidozla tanı konur (42). Birçok çalışma, tip 1

diyabetle ilgili adacık otoantikolarlarının ölçülmesinin, tip 1 diyabet gelişme riski taşıyan bireyleri tanımlayabileceğini göstermektedir (43). Tip 1 diyabet riski, ilgili otoantikoların sayısı arttıkça artmaktadır (44-46).

Tablo 2. 4. Tip 1 Diyabet Evreleri (43,47)

	Evre 1	Evre 2	Evre 3
Fenotipik Özellikler	<ul style="list-style-type: none"> Otoimmünite Normoglisemi Preseptomatik 	<ul style="list-style-type: none"> Otoimmünite Disglisemi Preseptomatik 	<ul style="list-style-type: none"> Yeni başlamış hiperglisemi Semptomatik
Tanı Kriterleri	<p>Çoklu otoantikolar</p> <p>Normal glukoz toleransı</p>	<ul style="list-style-type: none"> Çoklu otoantikolar Disglisemi: BAG ve/ veya BGT APG 100-125 mg/dL (5,6-6,9 mmol/L) 2.saat PG 140-199 mg/dL (7,8-11,0 mmol/L) A_{1c} % 5,7-6,4 (39-47 mmol/mol) veya A_{1c}'de % 10 artış 	<ul style="list-style-type: none"> Klinik semptomlar Standart kriterlerle tanı almış diyabet

BAG: Bozulmuş açlık glukozu

BGT: Bozulmuş glukoz toleransı

APG: Açlık plazma glukozu

PG: Plazma glukozu

A_{1c}: Glikozillenmiş hemoglobin A_{1c}

Tip 1 diyabet, çocuklarda ve ergenlerde en sık görülen diyabet tipidir (48,49). Gençlerdeki başlıca diyabet tipi olan bu form dünya çapında 20 yaşın altındaki tüm diyabet vakalarının \geq % 85'ini oluşturmaktadır (48,50,51). Tip 1 diyabet insidansı ve prevalansı artmaktadır (52). Tip 1 diyabetin küresel insidansı, epidemiyolojik bir muammayı temsil eder (53); Avrupa'daki ve Kuzey Amerika'daki komşu bölgeler arasında hastalık insidansında geniş değişiklikler kaydedilmiştir. Dünyada tip 1 diyabet görülme sıklığında artış, özellikle küçük çocuklarda görülür (54,55).

2.1.2. Tip 2 Diyabet

Daha önce “insüline bağımlı olmayan diyabet” veya “yetişkin başlangıçlı diyabet” olarak anılan tip 2 diyabet, diyabetin % 90-95’ini oluşturur. Dünyada en sık rastlanan diyabet tipidir. Tip 2 diyabet obezite, insülin direnci ve insülin sekresyon bozukluğu ile karakterizedir (56-58). Bu form, görece (mutlak değil) insülin eksikliği ve periferik insülin direncine sahip olan bireyleri kapsar. En azından başlangıçta ve çoğunlukla ömürleri boyunca bu kişilerin hayatta kalabilmesi için insülin tedavisine ihtiyacı olmayabilir.

Diyabetin bu tipinin muhtemelen birçok farklı nedeni vardır. Spesifik etiyolojiler bilinmemekle birlikte, otoimmün olarak β hücrelerinin yok edilmesi meydana gelmez. Klinik özelliklerin her biri genetik veya çevresel etkilerle ortaya çıkabilir, bu da bireysel bir hastadaki kesin nedeni belirlemeyi güçleştirir. Dahası, hiperglisemi kendisi pankreatik β hücre fonksiyonunu bozabilir ve insülin direncini arttırarak hipergliseminin kötü bir döngüye girmesine yol açarak metabolik durumu kötüleştirebilir (59). Tip 2 diyabet hastalığına sahip hastaların çoğu obezdir ve obezite kendiliğinden bir miktar insülin direncine neden olur. Geleneksel obezite kriterlerine göre obez olmayan hastalar, ağırlıklı olarak karın bölgesinde dağılmasından dolayı artmış vücut yağı yüzdesine sahip olabilirler.

Semptomlar, tip 1 diyabetinkilere benzer olabilir, ancak genellikle daha az belirgindir ya da yoktur. Sonuç olarak, komplikasyonlar ortaya çıkıncaya kadar tanı konulamayabilir. Uzun yıllardır tip 2 diyabet sadece yetişkinlerde görülürken, çocuklarda da ortaya çıkmaya başlamıştır.

Nadiren tip 2 diyabetli erişkinlerde, ketoasidoz olmaksızın belirgin hiperglisemi, şiddetli dehidrasyon ve bilinçte kapanma ile karakterize hiperozmolar hiperglisemik durum görülebilir. Tip 2 diyabetin ortaya çıkış semptomu olarak diyabetik ketoasidoz (DKA) da yetişkinlerde nadirdir ancak bazı durumlarda (genellikle ciddi enfeksiyon veya başka hastalıklarla) ortaya çıkabilir.

Diyabet tanı prevalansı dünya çapında son 40 yılda çarpıcı bir biçimde artmıştır. Tüm dünyada tip 2 diyabet salgındır. Salgın gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeleri de etkilemiştir ve dünya çapında diyabet prevalansının 2025 yılında dramatik bir şekilde artması beklenmektedir (60). ABD’de, 1990 ile 2001 yılları arasında tip 2 diyabet insidansında % 61 oranında artış olmuştur (61). 2015 yılında, 18 yaş ve üzeri ABD’li yetişkinler arasında yaklaşık 1,5 milyon yeni diyabet vakası (6,7/1,000) teşhis edilmiştir (62). Tip 2 diyabetteki artış, aşırı kilo, obezite ve azalmış fiziksel aktivite düzeyleriyle sonuçlanan yaşam tarzı değişiklikleri ile ilgilidir.

2.1.3. Gestasyonel Diyabet (GDM)

Uzun yıllardır GDM, bu durumun gebeliğin öncesinde veya gebelikten sonra da devam etmesine bakılmaksızın, gebeliğin başlangıcında tanınan herhangi bir derecede glukoz intoleransı olarak tanımlanmıştır (63). GDM gebelikte ortaya çıkan geçici bir durumdur ve tip 2 diyabet açısından uzun vadede risk taşımaktadır (64). GDM, anne ve yenidoğan için risk taşır. Tüm olumsuz sonuçlar eşit klinik öneme sahip değildir. Büyük ölçekli (~25.000 hamile kadın) çok uluslu bir epidemiyolojik çalışma olan Hiperglisemi ve Olumsuz Gebelik Sonuçları (HAPO) çalışması (65), daha önce gebelik için normal kabul edilen aralıklarda bile olsa 24-28 haftada maternal glisemi fonksiyonuna bağlı olarak maternal, fetal ve neonatal olumsuz sonuçların arttığını göstermiştir. Çoğu komplikasyon için risk sınırı yoktur. Bu sonuçlar, GDM için tanısal kriterlerin dikkatli bir şekilde yeniden gözden geçirilmesine yol açmıştır. 2011 Bakım Standartları'nda (Standards of Care) (66), ilk kez ADA, önceden diyabet tanısı olmadığı bilinen tüm hamile kadınlara, Uluslararası Diyabet ve Gebelik Çalışma Grubu (IADPSG) konsensüs toplantısına dayanarak 24-28. gebelik haftasında 75 gr OGTT yapılmasını önermiştir (67). HAPO çalışmasında; ortalama glikoz düzeyleri olan kadınlarla kıyaslanarak, tanıda en az 1,75 olumsuz sonuç olasılık oranı taşıyan açlık, 1. saat ve 2. saat PG üst sınır değerleri tanımlanmıştır. Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH), IADPSG'nin bu ilk tavsiyesinden sonra, obstetrik/jinekoloji, maternal-fetal tıp, pediatri, diyabet araştırmaları, biyoistatistik ve diğer ilgili alanların temsilcileri bulunan 15 üyeli bir paneli içeren bir fikir birliği geliştirme konferansını tamamlamıştır (68). Mevcut aynı verileri gözden geçiren NIH konsensüs panelinde, 1.saat 50 g glikoz yük testi (GLT) ile taramanın "iki aşamalı" yaklaşımının devamı ve 1.saat pozitif olanlarda bunu takiben ABD'de yaygın olarak kullanılan bir strateji olan 3.saat 100 gr OGTT uygulanması önerilmiştir. NIH panelinin karar verme sürecinde bildirilen başlıca faktörler, "tek adımlı" stratejinin faydalarını gösteren klinik araştırmaların olmaması ve GDM'li geniş bir yeni kadın grubunun belirlenmesinin potansiyel olumsuz sonuçlarının bulunmamasıdır. Üstelik, 50 g'lık bir OGTT taraması, açlık gerektirmez ve bu nedenle birçok kadın için uygulanması daha kolaydır. Maternal hipergliseminin tedavisi, gebelik haftasına göre küçük doğumları arttırmaksızın neonatal makrozomi, LGA ve omuz distosisi oranlarını düşürür (69).

2.1.4. Diyabetin Spesifik Türleri

a) β hücresi genetik defektleri

Diyabetin birçok formu, β hücresi fonksiyonundaki monogenetik bozukluklarla ilişkilidir. Bu diyabet formları sıklıkla erken yaşta (genellikle 25 yaşından önce) hiperglisemi ile karakterizedir. Bebek, çocuk ve gençlerde ortaya çıkan bu diyabet tipleri Maturity-Onset Diabetes of Young (MODY) olarak adlandırılırlar ve insülin etkisinde defekt olmaksızın insülin salgılanması bozukluğu ile karakterizedirler. MODY otozomal dominant kalıtılır. Şimdiye kadar farklı kromozomlardaki altı genetik lokusta anormallikler tespit edilmiştir. En yaygın form, hepatosit nükleer faktör-1 α (HNF-1 α) olarak anılan hepatik bir transkripsiyon faktöründeki kromozom 12 mutasyonları ile ilişkilidir. İkinci bir form, kromozom 7p'deki glikokinaz genindeki mutasyonlar ile bağlantılıdır ve defektli bir glikokinaz molekülüyle sonuçlanır. Glikokinaz, glikozu, glikoz-6-fosfata dönüştürür; metabolizması, β hücresinden insülin sekresyonunu uyarır. Daha az yaygın formlar, HNF-4 α , HNF-1 β , insülin promotör faktörü (IPF) -1 ve NeuroD1 dahil olmak üzere diğer transkripsiyon faktörlerinde bulunan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.

Yaşamın ilk 6 ayında teşhis edilen diyabetin, tipik otoimmün tip 1 diyabet olmadığı gösterilmiştir. Bu sözde neonatal diyabet, geçici veya kalıcı olabilir. Geçici hastalığa neden olan en yaygın genetik kusur, ZAC/HYAMI üzerinde bir kusur iken kalıcı neonatal diyabet, en yaygın olarak β -hücresi K_{ATP} kanalının Kir6,2 alt birimini kodlayan gendeki bir defektten kaynaklanır.

Mitokondriyal DNA'daki nokta mutasyonlarının diyabet ve sağrlık ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Birkaç ailede, proinsülinin insüline dönüştürülememesi ile sonuçlanan genetik anormallikler tanımlanmıştır ve bu tür özellikler otozomal dominant geçiş göstermiştir.

b) İnsülin aktivitesindeki genetik defektler

Genetik olarak belirlenen insülin anormalliklerinden kaynaklanan nadir diyabet nedenleri vardır. İnsülin reseptörünün mutasyonları ile ilişkili metabolik anormallikler, hiperinsülinemi ve ılımlı hiperglisemiyle şiddetli diyabet arasında değişebilir.

c) Ekzokrin pankreas hastalıkları

Pankreasın aşırı derecede yaralanmasına neden olan herhangi bir süreç diyabete neden olabilir. Bunlar arasında pankreatit, travma, enfeksiyon, pankreatektomi ve pankreatik karsinom yer alır.

d) Endokrinopatiler

Birçok hormon (örn: Büyüme hormonu, kortizol, glukagon, epinefrin) insülin etkisini antagonize eder. Bu hormonların fazla miktarları (örn., Akromegali, Cushing sendromu, glukagonoma, feokromasitoma) diyabete neden olabilir. Bu genellikle insülin sekresyonunda daha önce var olan kusurları olan bireylerde görülür ve hiperglisemi genellikle hormon fazlalığı tedavi edildiğinde düzelir.

e) İlaç veya kimyasallarla indüklenen diyabet

Birçok ilaç insülin salgısını azaltabilir. Bu ilaçlar kendiliğinden diyabete neden olmayabilir, ancak insülin direnci olan bireylerde diyabet ortaya çıkışını hızlandırabilirler. Vacor (sıçan zehiri) ve intravenöz pentamidin gibi belirli toksinler kalıcı olarak pankreatik β hücrelerini yok edebilir. Ayrıca insülin etkisini azaltabilecek birçok ilaç ve hormon vardır. Örneğin; nikotinik asit ve glukokortikoidler.

f) Enfeksiyonlar

Bazı virüsler β hücre tahribatı ile ilişkilendirilmiştir. Konjenital kızamıkçık hastalarında diyabet görülmekle birlikte, bu hastaların çoğunda tip 1 diyabet ile ilişkili HLA ve immün belirteçler bulunmaktadır. Ek olarak, koksakivirus B, sitomegalovirüs, adenovirüs ve kabakulak da diyabete neden olabilir.

g) Nadiren diyabetle birliktelik gösteren diğer genetik sendromlar

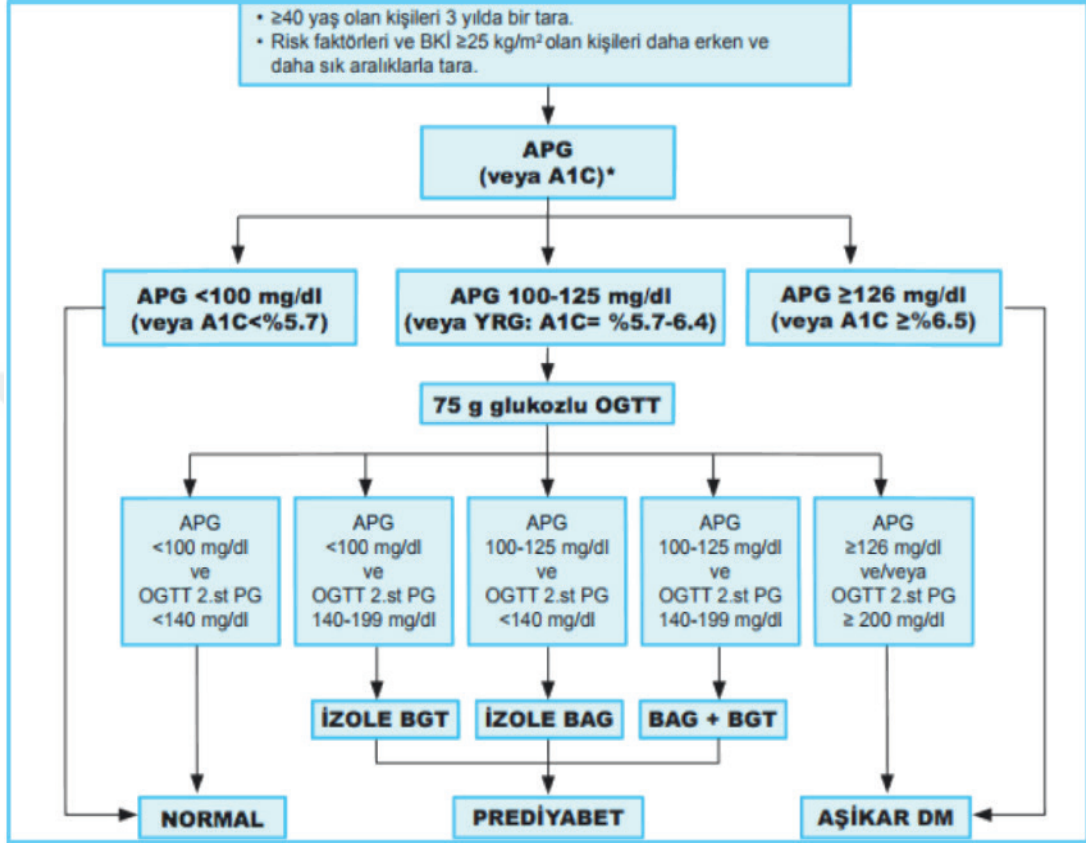
Birçok genetik sendroma diyabet insidansı artışı eşlik eder. Bunlara Down sendromu, Klinefelter sendromu ve Turner sendromunun kromozomal anomalileri dahildir.

2.2. Diyabet Tanı ve Tarama Testleri

2.2.1. Tip 1 Diyabet Taraması

“Rutin tarama endikasyonu yoktur.

2.2.2. Tip 2 Diyabet Taraması



Şekil 2.1. Tip 2 Diyabet Tanı ve Tarama (194)

*A_{1C} ölçümleri uluslararası standartlara uygun bir yöntemle kullanılarak yapılmalıdır.

BKİ: Beden kitle indeksi

APG: Açlık plazma glukozu

A_{1C}: Glikozillenmiş hemoglobin A_{1c}

YRG: Yüksek risk grubu

OGTT: Oral glukoz tolerans testi

2.stPG: 2.saat plazma glukozu

BGT: Bozulmuş glukoz toleransı

BAG: Bozulmuş açlık glukozu

DM: Diabetes mellitus

2.2.3. Gestasyonel Diyabet Taraması

Gebeliğin 24-28. Haftasındaki tüm gebeler taramaya alınmalıdır.

Tablo 2. 5. Gestasyonel Diyabet Tarama

Tek adımlı strateji			
Daha önce aşikar diyabet tanısı almayan kadınlarda 24-28. Gebelik haftalarında 1. ve 2. saatte 75 g OGTT gerçekleştirilmelidir.			
OGTT, bir gecede en az 8 saatlik açlık sonrası sabah yapılmalıdır.			
GDM tanısı, aşağıdaki plazma glikoz değerlerinden herhangi biri karşılandığında veya aşıldığında konulur:			
• Açlık: 92 mg/dL (5,1 mmol/L)			
• 1 saat: 180 mg/dL (10,0 mmol/L)			
• 2 saat: 153 mg/dL (8,5 mmol/L)			
İki adımlı strateji			
Adım 1: Daha önce aşikâr diyabet tanısı konmamış kadınlarda gebeliğin 24-28. haftalarında 50 gr'lık glukoz yükleme sonrası 1. saatte plazma glikoz ölçümü yapılmalıdır.			
Yüklemeden 1 saat sonra ölçülen plazma glikoz seviyesi ≥ 140 mg/dL * (7,8 mmol/L) ise 100 gr OGTT'ye geçilir.			
2. Adım: Hasta açken 100 gr OGTT uygulanmalıdır.			
GDM tanısı, aşağıdaki dört plazma glikoz düzeyinden en az ikisi (açlık, OGTT'den sonra 1. saat, 2. saat ve 3. saat) ölçülür veya aşırsa konur:			
	Carpenter / Coustan (70)		NDDG (71)
• Açlık	95 mg/dL (5,3 mmol/L)	Veya	105 mg/dL (5,8 mmol/L)
• 1 saat	180 mg/dL (10,0 mmol/L)		190 mg/dL (10,6 mmol/L)
• 2 saat	155 mg/dL (8,6 mmol/L)		165 mg/dL (9,2 mmol/L)
• 3 saat	140 mg / dL (7,8 mmol/L)		145 dL (8,0 mmol/L)

2.2.4. C Peptid Düzeyi

Pankreas β hücresi endojen insülin rezervini gösterir. Tip 1 diyabette rutin olarak ölçülmez. Otoimmün diyabet formlarının tip 2 diyabetten ayrılmasında kullanılır. İnsülin tedavisi başlanacak tip 2 diyabetli bireylerin tespitinde açlık ve uyarılmış C peptid düzeyleri ölçülebilir. Ancak, çok yüksek kan glukoz değerlerinde glukoz toksisitesinin pankreas β hücrelerine etkisi sebebiyle, C peptid ölçümleri gerçek insülin rezervini yansıtmayabilir.

2.2.5. Adacık Otoantikoları

Tip 1 diyabette otoantikör ölçümüne rutinde gerek yoktur. Ancak otoimmün diyabet formların tespitinde kullanılabilir.

2.3. Diyabet Tedavisi

Diyabet tedavisinin ana unsurları eğitim, tıbbi beslenme tedavisi, egzersiz ve medikal tedavidir.

2.3.1. Eğitim

Diyabetli bireylere diyabet hastalığının ne olduğu, ne tür belirti ve bulgular ortaya çıkabileceği; kullanılacak tedaviler ve uygulamaları anlatılmalı, yetersiz tedavide hangi sorunlarla karşılaşabileceği ve nasıl önlenebileceği ile ilgili bilgilerle birlikte diyabetle baş edebilmenin yolları öğretilmelidir.

Diyabetli hastalar öncelikle beslenme, egzersiz ve ilaç tedavisi üçgeni arasındaki dengeyi iyi kurabilmelidir. Sağlık ekibiyle iletişimde olmalı, hangi durumlarda hastaneye başvurulması gerektiğini bilmelidir.

Eğitimde esas olan, diyabetli bireylerin evde kendi kendine glukoz ölçümünü yapabilmesini sağlamaktır.

2.3.2. Tıbbi Beslenme Tedavisi

Diyabetli birçok birey için, tedavi planının en zor kısmı, yemek planını takip etmek ve ne yiyeceğini belirlemektir. Diyabeti olan bireyler için herkese uyan bir yeme düzeni yoktur. Beslenme tedavisi, genel diyabet yönetiminde ayrılmaz bir role sahiptir ve diyabetli her kişi, kendi sağlık ekibi ile bireyselleştirilmiş bir yemek planının birlikte geliştirilmesi de dahil olmak üzere aktif olarak eğitim, kendi kendine yönetim ve tedavi planlaması ile meşgul olmalıdır (72,73). Diyabeti olan tüm bireylere, tercihen diyabete özgü tıbbi beslenme tedavisi verme konusunda bilgili ve deneyimli bir diyetisyen tarafından oluşturulan bireyselleştirilmiş tıbbi beslenme terapisi verilmelidir.

2.3.3. Egzersiz

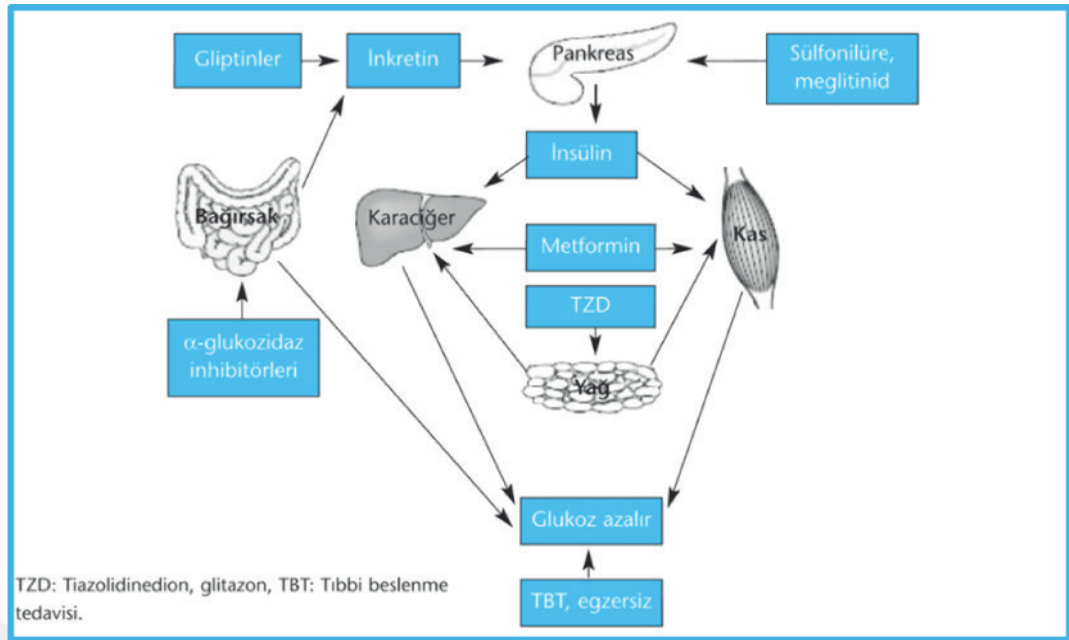
Fiziksel aktivite, enerji kullanımını arttıran tüm hareketleri içeren genel bir terimdir ve diyabet yönetim planının önemli bir parçasıdır. Egzersiz, fiziksel uygunluğu artırmak için yapılandırılmış ve tasarlanmış daha spesifik bir fiziksel aktivite şeklindedir. Hem fiziksel aktivite hem de egzersiz önemlidir. Egzersizin kan şekeri kontrolünü iyileştirdiği, kardiyovasküler risk faktörlerini azalttığı, kilo kaybına katkıda bulunduğu ve sağlık düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. Fiziksel aktivite, genel popülasyonda olduğu gibi tip 1 diyabetliler için de önemlidir, ancak diyabet komplikasyonlarının önlenmesindeki ve kan şekeri yönetimindeki spesifik rolü, tip 2 diyabetli olanlar kadar net değildir.

2.3.4. Medikal Tedaviler

A) Oral Antidiyabetikler

Oral antidiyabetiklerin fizyopatolojik etki mekanizmaları Şekil 2.2' de gösterilmiştir. Etkinliklerini karaciğer, kas, yağ dokusu ve bağırsaklar üzerinden gösterirler. Oral antidiyabetik ilaçlar dört gruptur.

- a) Karbonhidrat emilimini azaltanlar; α -glukozidaz inhibitörleri,
- b) İnsülin duyarlılığını artıran ilaçlar; metformin, tiazolidinedionlar,
- c) İnsülin sekresyonunu artıran ilaçlar; sülfonilüreler, meglitinid analogları,
- d) İncretin bazlı tedaviler; gliptinler: Glukagon-likepeptid-1 reseptör agonistleri (GLP-1RA) ve dipeptidil Peptidaz-4 inhibitörleri (DPP-4 Inh).



Şekil 2.2. Oral Antidiyabetiklerin Etkinliğindeki Hedef Organlar (195)

B) İnsülin

İnsülin, 11. kromozomda yerleşmiş, pankreas hücrelerinde sentezlenen protein yapısında, anabolik bir hormondur. İnsülin sekresyonunu gastrointestinal peptidler, aminoasitler, ketonlar ve nörotransmitterler etkiler. Ancak pankreas β hücrelerinden insülin sekresyonunun asıl düzenleyicisi glukozdur.

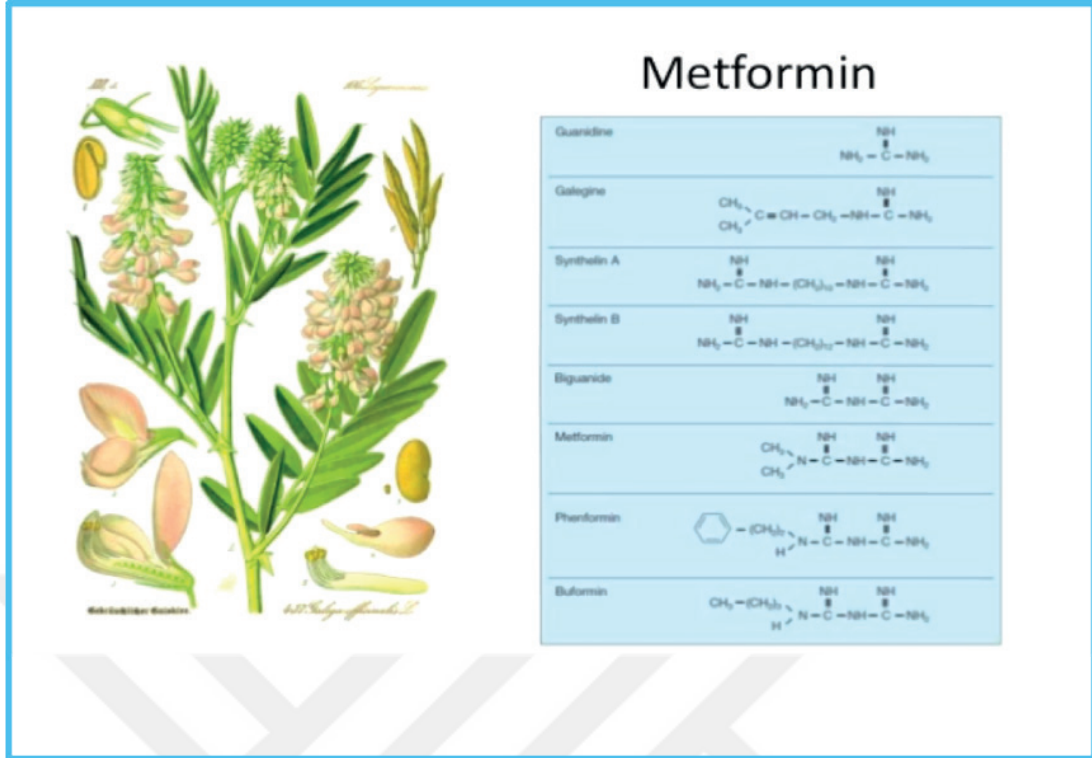
2.4. Metformin

Metformin, insülin duyarlaştırıcı biguanid grubu bir ilaçtır. Oral antihiperglisemik ajan olarak en çok kullanılan ve yeni tanı konan tip 2 diyabet hastalarının tümünde ilk seçenek olarak önerilen ilaçtır (74). Metformin (N, N-dimetilbiguanid), esas olarak galeginden (izoamilen guanidin) türetilen antidiyabetik ilaçların (iki bağlı guanidin halkası içeren) biguanidin sınıfına aittir ve Galega officinalis'de bulunan guanidinden türetilmiştir (Şekil 2.3). (75). Kan şekerinin düşürülmesini sağlayan G. officinalis'deki aktif bileşenin, galegin veya izoamilen guanidin olduğu gösterilmiştir (76). Guanidin bazlı hipoglisemik ajanlar tarihinde merak uyandırıcı bir dönemde, hipoparatiroidizme bağlı tetaninin sebebinin paratiroidektomiye takiben artan guanidin üretiminden kaynaklandığı yanlış inanışının ve guanidin infüzyonunun kan şekerinin düşmesine neden olduğunun ortaya konmasıdır (77). Guanidin'in kendisi ve bazı türevleri diabetes mellitus tedavisi için çok toksik olsa da biguanidlerin yararlı oldukları kanıtlanmıştır. 1950'li yıllarda diyabet tedavisi için üç tane biguanid bulunmaktaydı. Fenformin ve buformin, 1960'larda oldukça popüler hale geldi, sık laktik asidoz ve artmış kardiyak mortalitenin ortaya çıkması nedeniyle 1970'lerin

başında farmakopediden çıkarıldılar (76). Daha az lipofilik bir biguanid olan metforminin daha güvenli olduğu kanıtlandı ve Avrupa'da 20 yıl kullanıldıktan sonra 1995 yılında ABD'de kullanımı onaylandı. Terapötik dozlarda metformin ile laktik asidoz insidansının nadir olduğu ve metformin olmayan tedavilere kıyasla daha fazla olmadığı bildirilmiştir.

Metformin, tip 2 diyabet tedavisinin başlıca dayanağıdır ve Diyabet Önleme Programında da belirtildiği gibi, hastalığın gelişim riskini azaltmak için de etkili bir ajandır (76,78,79). Birleşik Krallık Prospektif Diyabet Çalışması'nda, metforminin diyabetle ilgili ölüm, miyokard enfarktüsü ve inmeyi azaltmada etkili olduğu kanıtlanmıştır (80). Metformin, kan şekerini düşürmekle kalmaz aynı zamanda yağ dokusu lipolizini inhibe eder, dolaşımdaki serbest yağ asitlerini ve VLDL üretimini azaltır (76,78,79). Bilinen metformin etkileri arasında kas ve karaciğerdeki insülin duyarlılığında artış, glikoneogenez yoluyla hepatik glikoz üretiminde bir azalma, periferik glikoz kullanımında artış (ağırlıklı olarak insülin aracılı kas glikozu alımının uyarılması ve glikojen sentezi yoluyla) ve insülin reseptörü ekspresyonu ve tirozin kinaz aktivitesi üzerine pozitif etkiler sayılabilir (76). Buna ek olarak, metforminin, glukagonun glukoneojenik etkilerini baskıladığı ve glikoz taşıyıcılarının hücre yüzeyine translokasyonunu arttırdığı görülmektedir (79).

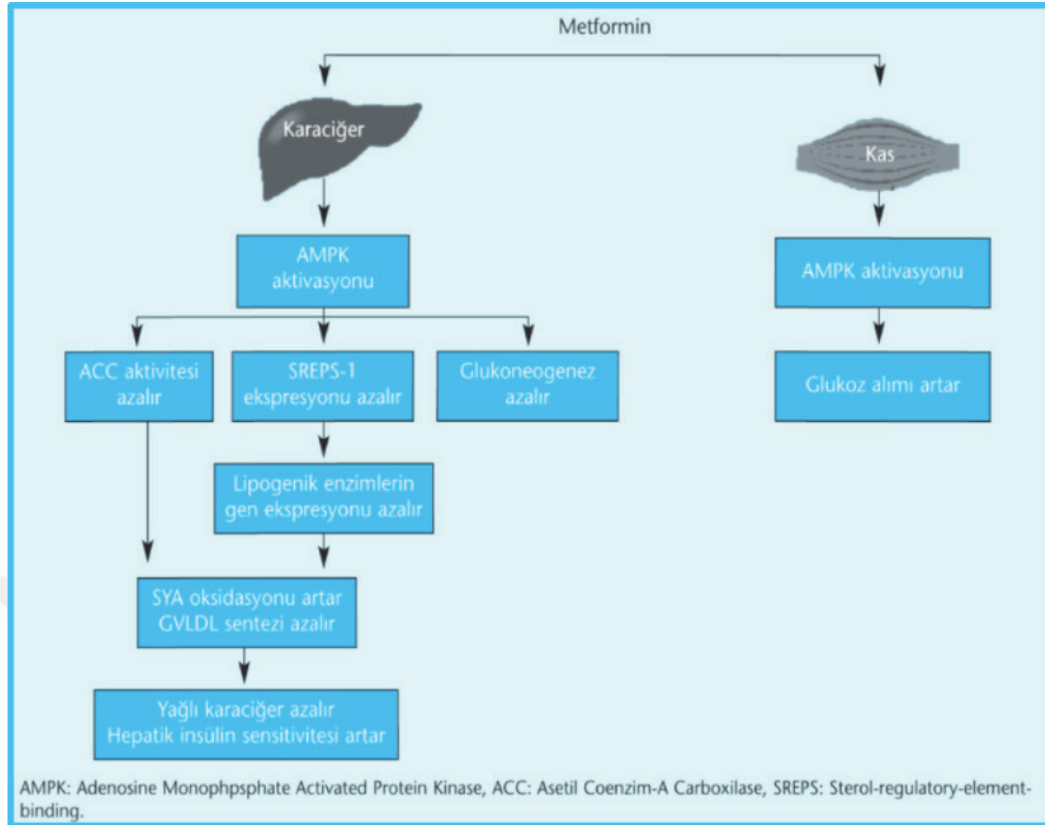
Metformin, tip 2 diyabet tedavisinde 50 yıldan fazla süredir kullanılmaktadır ve hem monoterapi hem de diğer oral antidiyabetik ajanlar ve insülin ile kombinasyonları güvenli ve etkilidir. Hipoglisemiye veya kilo kaybına neden olmadığı için önemli klinik avantaj sağlar ve kardiyovasküler sistemi koruyarak hiperglisemiye düzeltir. Tip 2 diyabette kullanılmasının yanında, polikistik over sendromu, diyabetik nefropati ve gestasyonel diyabet tedavisinde de metformin kullanımı ilgi çekicidir (81). Metformin kullanımının bir diğer avantajı, kanser riskinin azalması ve kanser prognozunun iyileşmesi ile ilişkilendirilmesidir (82).



Şekil 2.3. Galega Officinalis

2.4.1. Metforminin Farmakokinetik Etkinliği

Birçok diyabetik hasta için optimal oral metformin dozu ~2 g/gün' dür. Tek bir oral dozdan sonra, metformin incebağırsak tarafından kısmi emildikten sonra hızla birçok dokuda dağılır, ancak gastrointestinal sistemdeki luminal konsantrasyon yüksek kalır. Zirve plazma konsantrasyonu, yaklaşık 20 saatlik plazma yarılanma ömrüyle (0,5 g dozdan sonra 1,0-1,6 µg/ml [yaklaşık 6-10 µM] ve 1,5 g dozdan sonra ~3 µg/ml [yaklaşık 18 µM] artışı ile) ortalama 3 saat içinde ortaya çıkar (83). İnsanlarda ağızdan alınan 20 mg/kg/gün metformin dozu, vücut yüzey alanı normalizasyonuna göre 250 mg/kg/gün fare eşdeğer dozu olarak çevrildiğinde, metforminin sıçandaki 1,7 mg/ml'ye (yaklaşık 10 µM) kadar olan plazma seviyeleri elde edilir (84). Bu seviyeler, insanlarda kullanılan geleneksel antidiyabetik dozlar ile elde edilen aralıktadır (83). ¹⁴C etiketli metformin kullanan farelerde biyolojik dağılım çalışmaları ağırlıklı olarak gastrointestinal sistem, böbrek ve karaciğerde biriktiğini göstermiştir (85). Karaciğer doğrudan portal damardan gelen kan yoluyla beslendiğinden, oral alınan metformin konsantrasyonu genel sirkülasyondan ve diğer organlardan çok daha fazla metformin konsantrasyonunu içerebilir (85). Metforminin karaciğer ve kas dokusundaki etkileri Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Metforminin Etki Mekanizması (196)

2.4.2. Metforminin Hücre İçine Alımı

Metformin, fizyolojik koşullar altında çoğunlukla protonla pozitif yüklü bir formda bulunan hidrofilik ilaçtır. Bu fiziko-kimyasal özellikler nedeniyle, hücre membranlarından pasif difüzyon olasılığı düşüktür. Aslında, metforminin taşınması, organik taşıyıcılarda çözünen taşıyıcı yoluyla aktif bir alım sürecini gerektirir. Metforminin bağırsaktan emilimi, öncelikle enterositlerin luminal tarafında lokalize olan plazma membran monoamin taşıyıcı (PMAT, SLC29A4 geni) aracılıdır. Organik katyon taşıyıcı 1 (Oct1, SLC22A1 geni), enterositlerin bazolateral zarında eksprese edilir ve metforminin interstisyel sıvı içine taşınmasından sorumlu olabilir (86). Hepatik metformin alımının birincil mediatörü hepatositlerin bazolateral zarında ifade edilen OCT1 ve muhtemelen OCT3 (SLC22A3 geni)'tür (86). Metformin karaciğerde biyotransformasyona uğramaz, vücudun metforminden temizlenmesi renal eliminasyona bağlıdır. Böbrekte metformin, bazolateral membranda eksprese edilen OCT2 (SLC22A2) geni ile renal epitel hücrelerine alınır ve MATE1 (SLC47A1), MATE2 (SLC47A2) genleri yoluyla idrara atılır.

2.4.3. Metformin ve Mitokondriyal Oksidatif Fosforilasyon

Genel olarak, metforminin (ve diğer biguanidlerin) mitokondrideki etkileri, ilacın pleiotropik etkilerinin temeli kabul edilmektedir. Bu fikir, metforminin mitokondriyal mekanizmaların herhangi bir basamağını etkilemeden solunum zincir kompleksi 1'in (NADH: ubikinon oksidoredüktaz) hafif ve spesifik bir inhibisyonuyla hücre solunumu azalttığını bildiren iki makaleden kaynaklanmaktadır (87,88). Bununla birlikte, biguanid türevlerinin mitokondriyal oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) üzerindeki etkilerini inceleyen ilk gözlem raporunda da bu sınıf moleküllerin yol açtığı glikoliz artışı hücre solunumunun inhibisyonuna bağlanmıştır (89). Daha sonra, çeşitli biguanid türevlerinin yüksek konsantrasyonlarının, NADH'yi spesifik olarak azalttığı fakat submitokondriyal parçacıklarda süksinat oksidasyonunu azaltmadığı, bu bileşiklerin OXPHOS üzerindeki inhibitör etkisinin mitokondriyal elektron taşıma zincirinin 1 kompleksi üzerinden olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, mitokondriyal enerjinin modülasyonu yeni bir öneri olmamakla birlikte, fenformin ve metformin de dahil olmak üzere biguanid ailesinin üyelerinin etkilerinin birçoğuna uygun bir kavramdır. Son on yılda, mitokondriyal solunum zinciri kompleksinin metformin ile spesifik inhibisyonu sıçan, fare, insan primer hepatositleri (87,88,90), hepatoma ve adrenokortikal karsinoma ölümsüzleştirilen hücre hatları (91-93), iskelet kası homojenatları (94), endotel hücreleri (95), pankreas β hücreleri (96), nöronlar (87), periferik kan mononükleer hücreleri ve trombositleri (97) ve daha yakın zamanlarda kanser hücreleri de dahil olmak üzere pek çok hücre modelde doğrulanmıştır. Bu geçici kompleks 1 inhibisyonunun, $([ATP]+0,5[ADP]) / ([ATP]+[ADP]+[AMP])$ olarak tanımlanan hücrenin enerji durumunun ölçüsü olan hücrenin enerji yükünde bir düşüşe yol açtığı raporlanmıştır (90,98). Hücre ATP konsantrasyonundaki düşme ve hem ADP/ATP hem de AMP/ATP oranlarındaki artış, hücre enerji homeostazının kritik bir enerji sensörü olan, AMP ile aktive olan protein kinazı (AMPK) aktive eder ve geniş bir dizi telafi edici, koruyucu ve enerji tasarruflu yanıtlar için çok sayıda sinyal ağı birleşir (99).

Metforminin kompleks 1'i inhibe ettiği kesin mekanizma(lar) bilinmemekle birlikte, bazı çalışmalar çok yüksek konsantrasyonlar haricinde izole edilmiş mitokondri üzerinde direkt bir etki tespit edemediğinden, ilacın mitokondriyal etkisinin sağlam hücreler gerektirdiğini düşündürmektedir (87,91). Öte yandan metforminin (ve diğer biguanidlerin), ilacın çok yüksek konsantrasyonlarını (2-10 mM) kullanan çalışmalarla uyumlu şekilde (88,102), saflaştırılmış solunum zincir kompleksi 1'in işlevini, ayrıca sığır kalbinden izole mitokondri ve submitokondriyal partiküllerin fonksiyonunu doğrudan inhibe ettiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (100,101).

Metforminin kompleks 1 üzerindeki önleyici etkisinin, nitrik oksit (NO) sentaz inhibitörleri veya reaktif oksijen türü (ROS) temizleyicileri tarafından engellenmediği (87) ve en azından primer fare hepatositlerinde AMPK'dan bağımsız olduğu (90) gösterilmiştir.

2.4.4. Metforminin Antineoplastik Etkinliği

Farmako-epidemiolojik kanıtlar, metforminin kanser önleme ve/veya tedavisinde fayda sağladığı hipotezinin oluşturulmasında önemli bir rol oynamıştır. 2005 yılında yayımlanan seminal bir raporda (9), metformin ile tedavi edilen diyabetiklerin, diğer ajanlarla tedavi edilen diyabetiklere kıyasla kanser hastalığı oranlarının önemli derecede düşük olduğunu bildiren kanıtlar sunulmuştur ve diğer pek çok çalışma benzer sonuçlara ulaşmıştır (103). Bununla birlikte, bazı çalışmaların sonuçları cesaretlendirici olmakla birlikte, mevcut verilerde çelişkiler ve hipotezde tartışma vardır (104). Açıkçası, araştırılmakta olan popülasyon tip 2 diyabetik hastalarıdır ve diyabetik hastalar için sonuçlar geçerli olsa bile, diyabetik olmayan kişiler için bu sonuçlar geçerli olmayabilir. Daha da önemlisi, tüm bu çalışmalar tıbbi kayıtların geriye dönük incelemelerine dayanmaktadır ve çeşitli potansiyel önyargılar taşımaktadır. Öte yandan, yakın tarihli bazı raporlar metformin kullanıcıları arasında kanser sıklığının azaldığına dair kanıt sağlayan daha önceki farmako-epidemiolojik veriyle uyumludur. Metformin kullanıcıları arasında kanser sıklığının azaldığını bildiren çalışmalar arasında bir multipl miyelom çalışması (105), Danimarka kanser kayıtlarını temel alan prostat kanser risk çalışması (106) ve prostat kanseri prognozu üzerine yapılan bir çalışma (107) bulunmaktadır. Bu nedenle, farmako-epidemiolojik veriler, metforminin kanser önleme veya tedavisinde yararlı olabileceği ancak bunu destekleyen yeterli veri bulunmadığı hipotezinin oluşmasında önemli bir rol oynamıştır.

Metforminin kanser hücreleri üzerinde dolaylı ve doğrudan olmak üzere iki ana etki mekanizması ile antikanser etki gösterdiği bildirilmektedir (82). Pollak'ın (2012) belirtildiği gibi metformin, karaciğer üzerindeki doğrudan etkisini karaciğer glikoz üretimini inhibe ederek gösterir ve bu olay kanser biyolojisini etkileyebilecek sistemik, metabolik ve endokrin etkilerle sonuçlanır. Metformin hiperinsülinemi azaltmaktadır (108). Metforminin indüklediği insülin düzeylerindeki düşüş tip 2 diyabetiklerde metabolik olarak normal olanlardan daha fazladır ve özellikle diyabetik olmayanlarda plazma insülin düzeyinde metforminin neden olduğu değişikliklerin, tümör biyolojisini bozmak için yeterli olup olmadığı net değildir. Ancak, bir sıçan modelinde, metformin uygulamasının diyetle indüklenen obezite ve hiperinsülinemi mevcut olduğunda tümör büyüme inhibisyonuna daha etkili olduğu bildirilmiştir ve bu çalışmada kanserli ksenograftlarda insülin reseptör

aktivasyonunun azaldığı bulunmuştur (109). Ayrıca, onkolojiyle ilgili birkaç çalışma metforminin immünolojik veya anti-inflamatuar etkilerini öne sürmüştür (110,111) ancak bu gözlemleri desteklemek veya çürütmek için hiçbir klinik veri bulunmamaktadır. Bu nedenle, metforminin “dolaylı” eylemlerinin rolü aktif bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

İn vitro ve in vivo incelemeler sonrasında, Kourelis ve arkadaşları metforminin anti-kanser etkilerini açıklayabilecek en az yedi mekanizma olduğunu öne sürmüştür (112). Bunlar; metforminin fosforilasyon yoluyla memelilerin karaciğer kinazı B1/AMPK yolunun harekete geçirilmesi, bir tümör baskılayıcı gen olan TSC2 dengelenmesi (113), hücre döngüsü durdurulması ve/veya apoptozun indüklenmesi; protein sentezinin inhibisyonu, dolaşımdaki insülin seviyelerinin azaltılması, yayılmış protein cevabının inhibisyonu, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve kanser kök hücrelerinin ortadan kaldırılmasıdır (112).

Düzinelerce in vivo ve in vitro çalışmalar, örnek evrenlerinde biguanidlerin doğrudan antineoplastik aktivitesini göstermiştir, ancak bunların çoğu etki mekanizmasını aydınlatmamıştır ve klinik uygulamalara ilişkin doz-cevap verilerini içermemektedir (82,99). Bu çalışmalardan biri AMPK aktivasyonunun, doğrudan AMPK aktivatörü A-769662'nin (OXPHOS'u inhibe etmeyen) in vivo antineoplastik etkinliğe sahip olduğunu göstererek, biguanidlerin hareketinde önemli olduğuna dair kanıt sağlamıştır (114). Diğer gözlemler, metforminin in vivo terapötik etkisinin temelinde, tümörlerde solunum zincir kompleksi 1'in inhibisyonu olduğunu düşündürmektedir (115) (116). Maruz kalmış kanser hücrelerindeki metabolizma değişikliklerinin, metforminin neden olduğu OXPHOS indirgenmesinde önemli sonuçları vardır (17). Bu durum, akılcı ilaç kombinasyonları kullanımının yararlı olduğunu düşündürmektedir (117). Özellikle ilginç bir çalışma, biguanidlerin, glikolizi tetikleyen, onkojenik kinazları inhibe eden küçük moleküllü ilaçlarla kombinasyonu için ön ayak olmuştur (118). Bu çalışmalar, kanserli hücrelerin, onkojenik kinaz inhibisyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan azalmış glikolizi telafi etmek için, geçici olarak OXPHOS'u artırma eğilimini desteklemektedir. Biguanidlerin mevcudiyetinde bu telafi edici artış zayıflar ve kinaz inhibitörünün antineoplastik aktivitesinin artmasına neden olur (119). İzositrat dehidrogenaz-1'in (IDH-1) mutasyonu, kanser metabolizması için önemli bir konudur ve bir biguanid ile mutasyona uğramış IDH-1 inhibisyonunu doğrulayan prelinik kombinasyon çalışması vardır (120). Ayrıca, biguanidlerin konvansiyonel kemoterapi, radyoterapi ve hormonal terapilerle birleştirilmesinin yararlı olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (82).

Bununla birlikte, enerji stresi koşulları altında AMPK aktivasyonunun, düşük besin sunumuyla baş edebilmek için metabolizmanın ayarlanmasında, enerji tüketimini azaltmak amacıyla hücresel enerji metabolizmasını ayarlayarak hücre sağ kalımını temin edebileceği bilinmektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde AMPK aktivasyonunun anti-proliferatif fakat sağ kalım sağlayıcı sonuçlarının klinik yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

AMPK aktivasyonu bozuk olan kanser hücrelerinde biguanid kaynaklı enerji stresi sonuçlarının göz önüne alınması özellikle önemlidir. Ksenograft (109) ve transgenik (121) modeller, LKB1'in fonksiyon kaybına sahip kanserlerin, biguanidlere aşırı duyarlı olduğunu göstermiştir. Solunum zincir kompleksi 1 bileşenlerini kodlayan genlerde mutasyon bulunan kanserlerin de biguanidlere aşırı duyarlı olduğu gösterilmiştir (115).

2.5. Diyabet ve Kanser

Diabetes mellitus ve kanser yaygın hastalıklardır ve aynı kişide birlikte bulunması nadir değildir. 1932 yılının başlarında, tip 2 diyabet ve artan kanser riski arasında belirgin bir ilişki fark edilmiştir (122), ancak son on yılda diyabet ve kanserin bir arada bulunduğu konusunda önemli epidemiyolojik bulgular toplanmış ve iki hastalık arasında nedensel bağlantı olarak ortaya çıkmıştır (123). Artan kanıtlar, glikoz metabolizması anormalliklerinin kanser gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olabileceğini ve prognozlarını etkileyebileceğini düşündürmektedir (124,125). Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, diyabet hastalarında karaciğer (126), safra yolları (127), pankreas (128), mide (129), kolorektal (130), böbrek (131), mesane (132), meme (133) ve endometriyum (134) gibi çeşitli kanser türlerinin sıklığında artış olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, diyabet ve kanser arasındaki ilişkide rol oynayan nedensel mekanizmalar net değildir. Hiperinsülinemi, insülin direnci ve anormal büyüme hormonu üretimi gibi bazı metabolik değişikliklerin karsinogenezi indükleyebildiği bildirilmiştir. Ek olarak, obezite, ilaçlar ve diyet gibi çeşitli olası değişkenler bu ilişkiye katkıda bulunabilir.

Diyabet ve kanser arasındaki ilişkinin altında yatan biyolojik mekanizmalar henüz kesinleşmiş olmasa da, hiperinsülinemi, hiperglisemi ve inflamasyon gibi çeşitli olası mekanizmalar ileri sürülmüştür. Tip 2 diyabet insülin direnci ve sekonder hiperinsülinemiyle karakterizedir. Kanser büyümesini desteklemede insülinin rolü ilk olarak deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda fark edilmiştir. İnsülin eksikliği sıçanlarda alloksan ile indüklendiğinde, bu hayvanlara verilen insülinin, susam yağı içinde çözülmüş 7,12-dimetilbenz (a) antrasene bağlı meme tümör dokusunda intrinsik büyüme uyarıcı etkiler sergilediği görülmüştür (135). Çoğu

kanser hücresi insülin reseptörleri eksprese eder, bu nedenle hiperinsülineminin, insülin reseptörlerinin proliferasyonunu doğrudan uyararak karsinogenezi teşvik ettiği düşünülmektedir (136). Artan insülin seviyeleri, diyabetin doğal seyrinde erken ortaya çıkabilir ve diyabet ilerledikçe azalabilir. Hiperinsülinemi, kanser başlangıcını ve/veya ilerlemeyi teşvik etmede bir role sahipse, bu görüş diyabet hastalarının kanser geliştirme riski tahmininde dikkate alınmalıdır. Bu hipotez, diyabet hastalarında insülin duyarlılığını arttıran ve hiperinsülinemiyi düşüren metformin ile yapılan tedavinin, insülin veya sülfonilüre ile tedavi edilene göre daha düşük kanser insidansı ile ilişkili olduğunu bildiren bulgular ile desteklenmektedir (137,138).

İnsülinin kanser hücrelerine doğrudan etkileri dışında, hiperinsülineminin, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1'in etkisi yoluyla dolaylı olarak karsinogenezi teşvik etmesi mümkündür. İnsülin, IGF bağlayıcı protein-1 üretimini azaltır ve dolayısıyla biyoaktif IGF-1'i artırır. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1, insülininden daha güçlü mitojenik ve anti-apoptotik etkinliklere sahiptir ve büyüyen preneoplastik ve neoplastik hücreler için bir uyarıcı olarak görev yapabilir (139-141).

Hipergliseminin kendisinin de tip 2 diyabette tümör hücresi çoğalması ve metastazını desteklediği bildirilmiştir (142). Diyabet hastaları ve sağlıklı gönüllülerin katıldığı klinik bir çalışmada, diyabetin reaktif oksijen türlerinin artan üretimi ve DNA'ya karşı daha fazla oksidatif hasar ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir; buda, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonel değişikliğe ve dolayısıyla kanser gelişimine neden olabilir (143).

Diyabetin karakteristik metabolik anormallikleri, özellikle zayıf metabolik kontrol koşulları altında kalıcı bir pro-inflamatuar duruma neden olur. İnterlökin-6, monosit kemoatraktan proteini ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 gibi yağ dokuları tarafından üretilen inflamasyon sitokinleri, kanserojen süreç, kanser progresyonu veya kötü prognozda önemli roller oynayabilir. Ek olarak, artmış leptin ve azalmış adiponektin seviyeleri, obez ve tip 2 diyabetli kişilerde kanser riskinin artmasına da katkıda bulunabilir (144). Bu kronik pro-inflamatuar durum hücre içi antioksidan kapasitesini düşürür ve duyarlı hücrelerde malign transformasyona yatkınlık yaratır. Aslında, yüksek serbest radikal ve oksidan konsantrasyonları, direkt oksidasyon veya DNA tamir mekanizmalarına müdahale ederek hücre DNA'sına zarar verebilecek güçlü reaktif oksijen türevleri üretir.

2.5.1 Diyabet ve Hepatosellüler Karsinom

Bazı epidemiyolojik kanıtlar, önemli değişken faktörler; özellikle alkol tüketimi ve hepatit B veya C virüsü enfeksiyonu da göz önüne alındığında, diyabet ve karaciğer kanseri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (126,145,146). ABD’de 2061 hepatosellüler karsinom vakası ve 6183 kontrol grubundan oluşan bir vaka-kontrol çalışmasında, hepatit B veya C virüsü enfeksiyonu, alkolik karaciğer hastalığı veya hemokromatozis olan bireyler çalışma popülasyonundan çıkarıldıktan sonra bile, diyabet ile karaciğer kanseri riskinde 2,87 kat (% 95 GA, 2,49-3,30) artış olduğu bulunmuştur (145). Benzer sonuçlar, Yunanistan’da 333 hepatoselüler karsinom vakası ve 363 kontrol üzerinde yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında da elde edilmiştir. Diyabet hastaları, risk faktörlerine göre ayrıldıktan sonra karaciğer kanseri riskinde 1,86 kat (% 95 GA, 0,99-3,51) artış gözlenmiştir (146). 18 kohort çalışmasının yakın tarihli bir derlemesinde de diyabet ile hepatoselüler karsinom riskinde artış arasında anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir; diyabetli bireylerde hepatoselüler karsinom insidansında diyabetik olmayanlara kıyasla % 101 (% 95 GA, % 61-151) ve mortalite % 56 (% 95 GA, % 30-87) oranında artış göstermiştir (126). Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya genelinde en sık görülen altıncı malignite ve üçüncü kanser kaynaklı ölüm nedenidir (147).

2.5.2 Diyabet ve Serviks Kanseri

Diyabet ve serviks kanseri riski arasındaki ilişki hala değerlendirilmeye birlikte, serviks kanseri mortalitesi obez kadınlarda daha yüksektir ve diyabetle kuvvetli bir şekilde ilişkilendirilmektedir (148,149). Tip 2 diyabet gibi kronik hastalıklar, kadınların Pap smear ve mamografi tarama prosedürüne tabi tutulması için engel oluşturmaktadır. Bu tür kronik hastalıkların, invaziv kanseri önlemeye yönelik erken taramaya uyumda olumsuz katkıda bulunduğu düşünülmektedir (150).

2.6. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Özellikleri

İnsan hepatoselüler karsinoma hücreleri (HepG2)

HepG2, iyi diferansiye hepatosellüler karsinomu bulunan, beyaz ırktan 15 yaşında bir erkek karaciğer dokusundan kültüre edilmiş insan karaciğer karsinom hücrelerinden oluşan, ölümsüzleştirilmiş bir hücre dizisidir. Hepatosellüler karsinom dünya çapında beşinci en yaygın kanserdir. HepG2 hücrelerinin morfolojisi epiteldir ve 55 kromozom çiftini içerir. HepG2 hücreleri büyük ölçüde başarılı bir şekilde yetiştirilebilir ve transferrin, fibrinojen, plazminojen ve albumin gibi birçok plazma proteini salgılar. Bunlar insan büyüme hormonu ile uyarılabilir. HepG2 hücreleri yapışkandır, epitel benzeri hücreler tek tabaka halinde ve küçük agregatlar olarak büyürler.

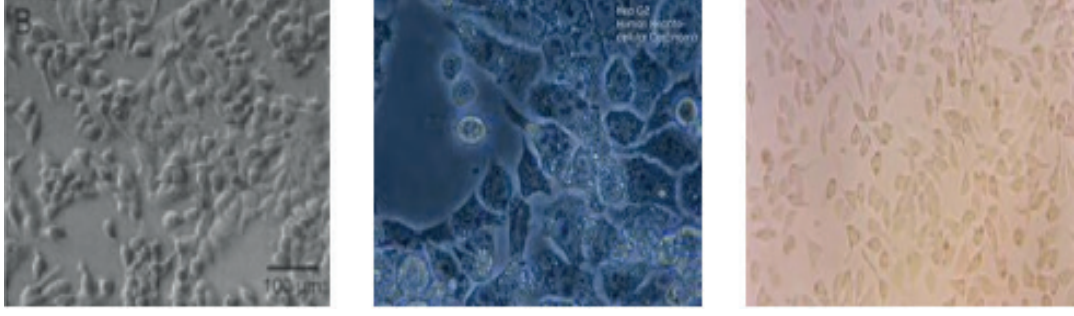
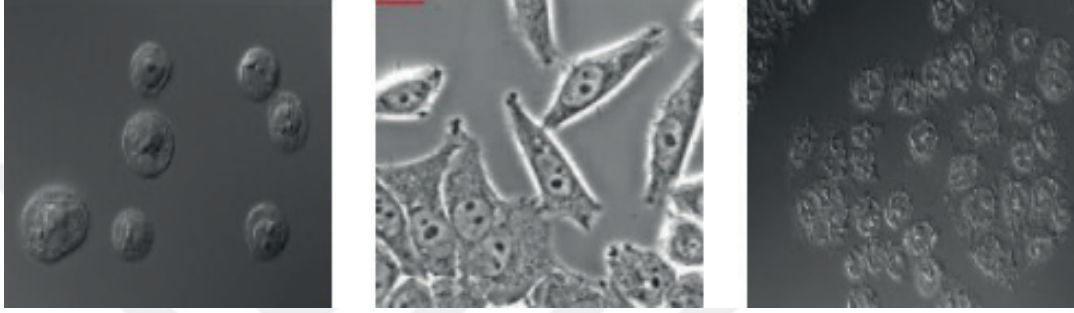
Hepatoma hücre hatları, birincil insan hepatositlerine in vitro alternatifler olarak sıklıkla kullanılırlar. Hücre hatları, sınırsız ömür, sabit fenotip, yüksek kullanılabilirlik ve kolay kullanım özellikleri ile karakterizedir. Bununla birlikte, ana kısıtlamaları, hepatositlere kıyasla, bazı metabolik aktivitelerin düşük ekspresyonudur. HepG2, ilaç metabolizması ve hepatotoksosite çalışmalarında en çok kullanılan insan hepatomudur (151,152). HepG2 hücreleri yüksek proliferasyon oranları olan tümörejenik olmayan hücrelerdir ve epitel benzeri bir morfolojidedirler ve birçok farklılaşmış karaciğer fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Hücre hattı özellikleri Tablo 2.6'da ve mikroskopik görünümüleri Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

İnsan serviks (rahim ağzı) kanseri hücreleri (HeLa)

HeLa hücresi, bilimsel araştırmalarda kullanılan ölümsüz bir hücre dizisinde hücre türü sınıflandırmasıdır. En eski ve en yaygın olarak kullanılan insan hücre dizisidir. Bu hücre hattı, 8 Şubat 1951'de Henrietta Lacks'ten alınmış servikal kanser hücrelerinden türetilmiştir. Henrietta Lacks, 4 Ekim 1951'de kanserden ölmüştür. Araştırmada kullanılan diğer birçok hücre hattının bulaşmasıyla hücre hattının inanılmaz derecede dayanıklı ve üretken olduğu bulunmuştur. HeLa hücreleri, östradiol, östrojen ve östrojen reseptörleri gibi cinsiyet steroidi hormonlarını içeren ve östrojen benzeri bir bileşik olan kersetinin kanser azaltıcı özellikleri de dahil olmak üzere bir dizi kanser araştırmasında kullanılmıştır. HeLa hücreleriyle, flavonoidlerin ve antioksidanların östradiol ile kanser hücresi çoğalmasına etkileri üzerine de çalışmalar yapılmıştır. HeLa hücre hattı, kanser araştırmasında kullanılmak üzere türetilmiştir (153,154). Bu hücreler, diğer kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında bile, anormal hızla çoğalırlar. Hücre hattı özellikleri Tablo 2.6'da ve mikroskopik görünümüleri Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2. 6. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri.

	HeLa Hücre Hattı	HepG2 Hücre Hattı
Elde edildiği organizma	İnsan	İnsan
Kaynak Doku	Serviks	Karaciğer
Yaş/cinsiyet/ırk	31 yaş / Kadın / Siyah	15 yaş / Erkek / Beyaz
Tümör tipi	Adenokarsinom	Hepatoselüler karsinom
Hücre tipi	Epitel	Epitel
Hücre Özelliği	Adheran	Adheran
Saklama koşulları	Sıvı nitrojen buharı	Sıvı nitrojen buharı

HeLa Hücresi**HepG2 Hücresi**

Şekil 2.5. HepG2 ve HeLa hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (196)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA)	Boehringer Mannheim
Etil Alkol	Sigma-Aldrich
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS)	Sigma
Fötal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS)	Sigma
HeLa (İnsan Serviks Adenokarsinom) Hücre Hattı	Americal Type Culture Collection
HepG2 (İnsan Hepatosellüler Karsinom) Hücre Hattı	Americal Type Culture Collection
Hidrojen Peroksit (% 30)	Merck
Metformin	Sigma
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma
Normal Erime Noktalı Agar (NMPA)	Sigma
Penisilin-Streptomisin	PAA
Propidyum iodid (PI)	Sigma-Aldrich
Sisplatin	Koçak Farma®
Tripan Mavisi	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Buzdolabı	Hotpoint
Cam pastör pipeti	Interlab
Derin Dondurucu (-20°C)	Ariston
Derin Dondurucu (-80°C)	Revco
Etüv	Dedeoğlu
Floresan Mikroskop	Leica
Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm ²), 6-/96-kuyucuklu plaka, pipet (1- 25 ml), santrifüj tüpü (15, 50 mL)	Corning
Isıtıcı	Multi-Blok, Lab-Line
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments
Karıştırıcı-Isıtıcı	Jankel&Kunkel, Ikamag
Lam (26x76mm)	Marienfeld
Lamel (24x60mm)	Marienfeld
Laminar akımlı kabin	Heraeus
Mikrofiltre	Millipore® Merck
Mikropipet, 8 kanallı (5-300 µl)	Eppendorf
Mikropipetler (0,5-1 µl, 1-5 µl, 5-10 µl, 10-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml)	Finnpipette, Gilson, Discovery Confort
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 12-24
Mikrosantrifüj tüpü (1,5ml)	Eppendorf
Neubauer Camı (Hücre sayım camı)	Marienfeld
Otoklav	Rodwell Monarch MP 24
Pipet ucu, 0,5-10, 10-200, 100-1000µl'lik	Eppendorf
Santrifüj	Heraeus, Hettich
Spektrofotometre	SpektraMax M2

Su Banyosu	Termal® Laboratory Tools
Terazi	Schimadzu Libror
Vakum Pompası	Welch Vacuum
Yatay çalkalayıcı	Edmund Bühler
Comet Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi	Comet Analysis Software, version 3.0 Kinetic Imaging
Elektroforez	Biometra Analitik
Elektroforez Güç Kaynağı	Power Pack 25
Floresan Mikroskop	Leica
Inverted Mikroskop	Leica
Flow sitometri cihazı	Facscalibur

3.3. Çalışma Çözeltileri

HeLa besiyeri

HeLa hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak vasat için; 500 ml RPMI 1640 (L-Glutamin içeren RPMI 1640 vasatı) ve 50 ml FBS (% 10) ve 5 ml penisilin/streptomisin (% 1) eklendi. Besiyeri +4°C’de saklandı.

HepG2 besiyeri

HepG2 hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak vasat için; 500 ml Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (L-Glutamin ve 5mM (1g/l) glukoz içeren DMEM vasatı) üzerine 50 ml FBS (% 10) ve 5 ml penisilin/streptomisin (% 1) eklendi. Besiyeri +4°C’de saklandı.

MTT stok çözeltisi (5 mg/ml)

5 mg MTT, 1 ml PBS içinde çözüldü. Elde edilen MTT stok çözeltisi Millipore (0,2 µm) filtresi kullanılarak sterilize edildi ve ışık geçirmeyen steril bir tüpe aktarıldı. 4° C’de saklandı (en fazla 4 gün). Uzun süre saklanması gerektiğinde -20°C’de saklandı.

Sisplatin çözeltisi

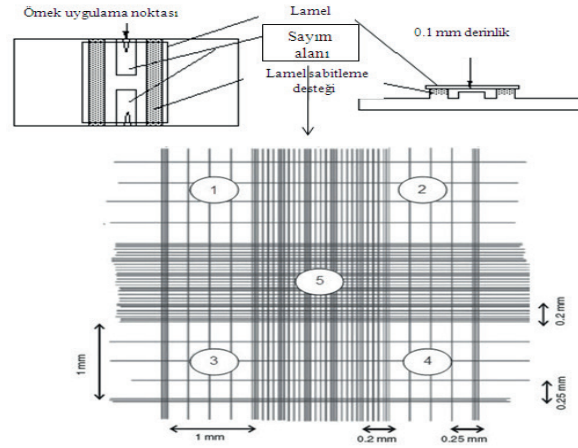
10 mg sisplatin 20 ml enjektabl preparat içinde (Koçak Farma®) çözülmüş halde ve steril olarak bulunmaktadır. Bu preparattan 600,6 µl alınarak üzerine 1 ml’ye tamamlayacak şekilde hücre kültür vasatı eklendi. 1 mM’lık elde edilen çözeltiden 20 µl alındı ve 1 ml’ye vasat ile tamamlanarak 20 µM sisplatin çözeltisi hazırlandı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. HepG2 ve HeLa Hücre Hatlarında MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

1. -80°C'de, % 10 DMSO içeren besiyerinde saklanan HeLa ve HepG2 hücreleri oda sıcaklığına 37°C'lik su banyosunda 1 dakika bekletilerek getirildi. Hücre kültürü süresince yapılan tüm işlemlerin hava akışlı hücre kültür kabini içerisinde ve steril koşullarda olmasına dikkat edildi.
2. Çözdürülen hücreler steril bir tüp içerisinde 9 ml besiyeri ve 1 ml hücre olacak şekilde karıştırıldıktan sonra 5 dakika 1200 rpm'de santrifüjleme yapılarak süpernatant kısmı atıldı.
3. Tüpte kalan hücre pelleti, 25 cm²'lik yatay kültür kapları içerisine uygun hacimdeki besiyeri ile karıştırılarak aktarıldı.
4. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde hücre besiyeri uygun aralıklarla değiştirilerek yeterli doygunluğa ulaşmaları sağlandı.
5. Yeterli doygunluğa ulaşan hücreler, tüm kültür ortamını kapladıklarında 2-3 kez 5 ml 37°C'lik PBS ile yıkanarak besiyeri uzaklaştırıldı.
6. Hücrelerin üzerine 2 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 3-5 dakika inkübasyondan sonra hücrelerin tutundukları kültür kabının zemininden uzaklaşmaları sağlandı. Tutundukları yerden ayrılan hücrelerin ortamına 4 ml besiyeri ilave edildi ve oluşan hücre süspansiyonu steril bir tüpe aktarıldı.
7. Steril tüp içindeki hücre süspansiyonu 5 dakika boyunca 25°C'de 1200 devir/dk hızda santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Dipte toplanan hücre pelleti 2 ml besiyeri ile nazikçe süspansiyon edildi.
8. Besiyeri ile süspansiyon edilen hücreler pelletinin 10 µl alınarak steril bir eppendorf tüpe koyuldu ve üzerine 90 µl tripan mavisi çözeltisi (% 0,4) eklenerek süspansiyon edildi.
9. 10 µl hücre süspansiyonu Neubauer hücre sayım lamı (hemasitometre) üzerine yayıldı ve ışık mikroskobuyla incelendi. Hücre sayımı; Neubauer hücre sayım lamını oluşturan dört kare kenar çizgileri hariç soldan sağa ve yukardan aşağıya, parlak ve renksiz görüntülü canlı hücreler sayılarak yapıldı. Doğru ve kesin sayım için ideal olarak her işlemde 200 ve üzeri hücre sayıldı. Canlı hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$ml'deki hücre sayısı = (\text{Toplam hücre sayısı}/4) \times 10.000 \times 10$$



Şekil 3.1. Neubauer hücre sayım lamı.

10. Canlı hücre konsantrasyonu hesaplandı, sonra hücre süspansiyonu yeterli miktarda besiyeri kullanılarak seyreltildi.
11. Her kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa hücre ekimi yapıldı.
12. 48 saat inkübasyon sürecinde hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları sağlandı.
13. Besiyeri steril koşullarda uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 0,5-64 mM konsantrasyon aralığında metformin ile 48 saat inkübe edildi.
14. Negatif kontrol olarak besiyeri ve pozitif kontrol olarak 20 μ M sisplatin içeren besiyeri kullanılarak 48 saat inkübasyon yapıldı.
15. Madde çözeltileri inkübasyon süresi sonunda atılarak her bir kuyucuğa 90 μ l besiyeri ve hazırlanan 5 mg/ml MTT çözeltisinden 10 μ l eklendi (son MTT konsantrasyonu 0,5 mg/ml) ve 4 saat inkübasyona bırakıldı.
16. MTT çözeltisi inkübasyon süresi sonunda uzaklaştırıldı. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 100 μ l DMSO (çözme çözeltisi) eklendi. Plak yatay çalkalayıcıda 1-2 dakika süreyle çalkalandı.
17. Spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değerleri ölçüldü.
18. Boya ışığa duyarlı olduğu için deneyin her aşaması mümkün olduğunca karanlık ortamda gerçekleştirildi.
19. Metforminin her bir konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve IC_{50} değerleri hesaplandı.
20. Çalışmalar 3 kez tekrarlandı ve sonuçlar çalışmaların ortalaması olarak hesaplandı.

3.4.2. HepG2 ve HeLa Hücre Hatlarında COMET (Tek Hücre Jel Elektrophorez) Yöntemi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi

1. Hücreler sayıldıktan sonra 12 kuyucuklu plağa her kuyucukta 40.000 hücre olacak şekilde ekilip 24 saat süreyle 37°C ve % 5 CO₂ koşullarında kültür ortamına uyum sağlamaları için inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuğa metforminin 5-1000 µM konsantrasyonları HeLa ve HepG2 hücrelerinin DNA'sı üzerine etkilerini incelemek için suda hazırlanmış metformin çözeltilerinden uygun hacimler eklenerek son hacim besiyeri ile 2 ml'ye tamamlandı.
3. Negatif kontrol olarak besiyeri ve pozitif kontrol olarak 50 µM H₂O₂ kullanıldı.
4. Hücre süspansiyonları incelenen bileşiklerin çözeltileriyle (37°C ve % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren) inkübatörde 48 saat süreyle inkübe edildi.
5. Maddelerle inkübasyonu takiben hücreler 2 ml soğuk PBS ile 2 defa yıkandı. Her bir kuyucuğa 400 µl tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi.
6. 12 kuyucuklu plaklar inkübatörde 3-5 dakika süreyle bekletilerek hücrelerin kuyucuk zemininden ayrılmaları sağlandı. Kuyucuklara 600 µl besiyeri ilave edildi. Bu aşamada tripsinin etkisi durdurulmuş oldu.
7. 1000 µl hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alındı. Hücre süspansiyonları mikrosantrifüjde 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
8. Pozitif kontrol olarak 50 µM H₂O₂ uygulanacak HeLa ve HepG2 hücrelerine, plakta 950 µl PBS ve 50 µl 1 mM H₂O₂ çözeltisinden ilave edildi. Hücreler 5 dakika buz banyosunda bekletildi. Bu sürenin sonunda hücre süspansiyonu +4°C'de 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. +4°C'de 1 ml PBS ile 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Süpernatant atıldı.
9. Hücreler tripsin ilavesiyle eppendorflara alındı ve aynı işlemler uygulandı.
10. Elde edilen hücre süspansiyonundan bir eppendorf tüpe 100 µl aktarıldı ve üzerine 900 µl tripan mavisi çözeltisi (% 0,4 a/h) eklenerek karışması sağlandı (Dilüsyon faktörü:10).
11. Neubauer sayım lamı üzerine lamel kapatıldı. Beklenmeden yaklaşık 10 µl hücre süspansiyonu tripan mavisi karışımı sayım lamına yayıldı.

12. Işık mikroskobu altında Neubauer hücre sayım lamına (hemasitometre) yayılan hücreler incelendi. Hücre sayımı; Neubauer hücre sayım lamını oluşturan dört kare kenar çizgileri hariç soldan sağa ve yukardan aşağıya, parlak ve renksiz görüntülü canlı hücreler sayılarak yapıldı. Doğru ve kesin sayım için ideal olarak her işlemde 200 ve üzeri hücre sayıldı. Canlı hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$ml'deki hücre sayısı = (\text{Toplam hücre sayısı}/4) \times 10.000 \times 10$$

13. Sayılan HeLa ve HepG2 hücreleri her bir lamda 10.000-20.000 arasında hücre olacak şekilde hesaplanarak 37°C±0,5°C de eritilmiş 100 µl % 5 LMPA, 50 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı.

14. HeLa ve HepG2 hücrelerinde maddelerin DNA hasarına etkileri tek hücre jel elektroforez (COMET) yöntemi ile incelendi.

15. Çalışmalar dört kez tekrar edildi.

3.4.3. HepG2 ve HeLa Hücre Hatlarında Apoptotik Etkilerin Flow(Akış) Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi

- 1.** Hücreler sayıldıktan sonra 12 kuyucuklu plağa her kuyucukta 40.000 hücre olacak şekilde ekilip 24 saat süreyle 37°C ve % 5 CO₂ koşullarında kültür ortamına uyum sağlamaları için inkübasyona bırakıldı.
- 2.** İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuğa metforminin 0,5-64 mM konsantrasyonlarına suda hazırlanmış çözeltilerinden uygun hacimler eklendi.
- 3.** Negatif kontrol olarak besiyeri kullanıldı.
- 4.** Hücre süspansiyonları incelenen bileşiklerin çözeltileriyle (37°C ve % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren) inkübatörde 48 saat süreyle inkübe edildi.
- 5.** Maddelerle inkübasyonu takiben hücreler 2 ml soğuk PBS ile 2 defa yıkandı. Her bir kuyucuğa 400 µl tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi.
- 6.** 12 kuyucuklu plaklar inkübatörde 3-5 dakika süreyle bekletilerek hücrelerin kuyucuk zemininden ayrılmalari sağlandı. Kuyucuklara 600 µl besiyeri ilave edildi. Bu aşamada tripsinin etkisi durdurulmuş oldu.

7. Daha sonra, 50 µl RNase ve 70 µl propidyum iodid (PI), HepG2 ve HeLa hücrelerine ilave edildi, ardından 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Boyanan HepG2 ve HeLa hücreleri, akış sitometrisi ile analiz edildi.

3.5. İstatistiksel Yöntemler

Çalışma boyunca elde edilen tüm veriler SPSS 16.0 (Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verilmiştir. Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı *Kolmogorov-Smirnov* testi ve *histogramlarla* değerlendirildi. Grup arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA), LSD test ile belirlendi. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Metformin Sitotoksitesinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

4.1.1. HepG2 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Metformin Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Metforminin 0,5-64 mM konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerinde MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.1. ve Şekil 4.1’de verilmiştir.

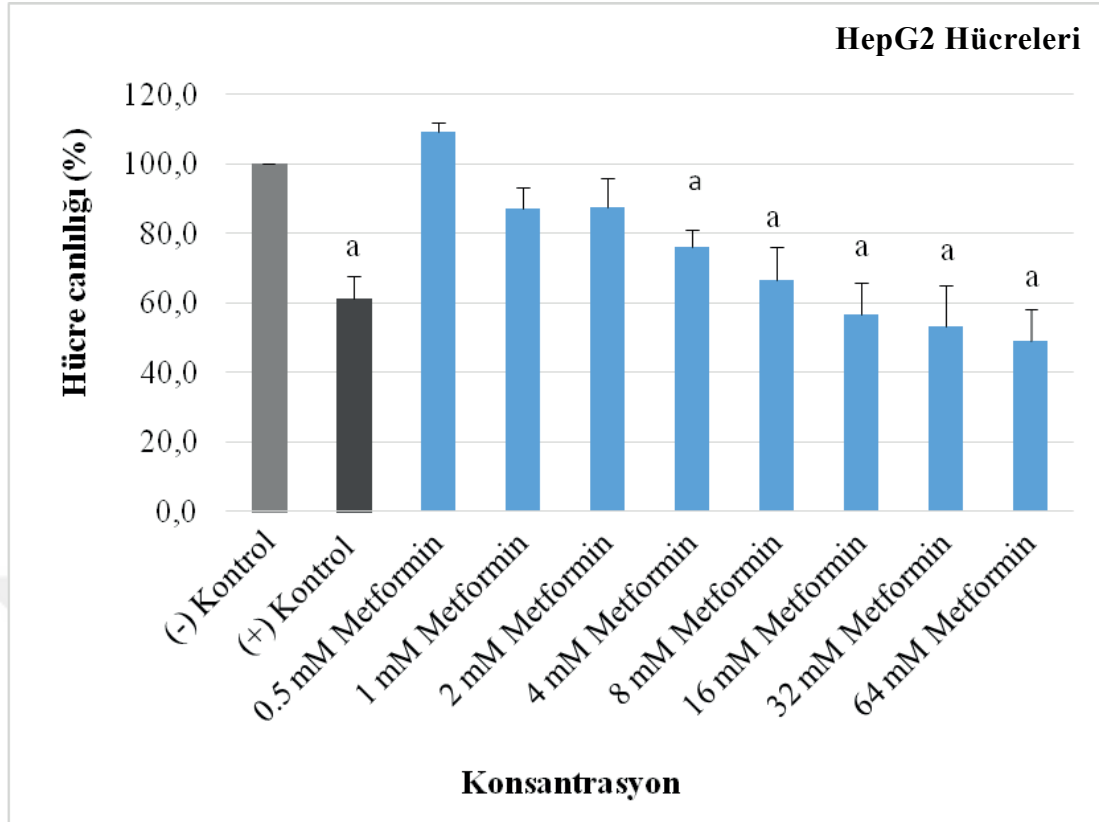
Metforminin 48 saatlik inkübasyon sonrası 0,5-2 mM konsantrasyon aralığında HepG2 hücrelerinde negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırıldığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 4 mM ve üzeri konsantrasyonlarda doz bağımlı olarak hücre canlılığında istatistiksel anlamlı azalma oluşturduğu görülmüştür ($p < 0,05$). HepG2 hücrelerinde metformine 48 saatlik maruziyette IC_{50} değeri 57,3 mM bulunmuştur.

Tablo 4. 1. Metforminin 48 saat maruziyette HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi. *

No	Çalışma Grupları	1.deney	2.deney	3.deney	Hücre Canlılığı (%)
1	(-) Kontrol	100	100	100	100,0±0
2	(+) Kontrol	67,70	64,21	54,78	61,2±6,7 ^a
3	0,5 mM Metformin	110,26	106,19	111,44	109,3±2,8
4	1 mM Metformin	92,26	89,17	80,35	87,3±6,2
5	2 mM Metformin	82,99	97,17	82,67	87,6±8,3
6	4 mM Metformin	78,99	79,13	69,90	76,0±5,3 ^a
7	8 mM Metformin	76,48	65,70	57,24	66,5±9,6 ^a
8	16 mM Metformin	59,20	64,19	46,77	56,7±9,0 ^a
9	32 mM Metformin	58,23	61,73	39,79	53,3±11,8 ^a
10	64 mM Metformin	57,45	50,59	39,37	49,1±9,1 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak PBS, pozitif kontrol olarak 20 µM sisplatin uygulandı.

^a $p < 0,05$ negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.1. Metforminin 48 saat maruziyette HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisi*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak PBS, pozitif kontrol olarak 20 μ M sisplatin uygulandı.

^a $p < 0,05$ negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.1.2. HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Metformin Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

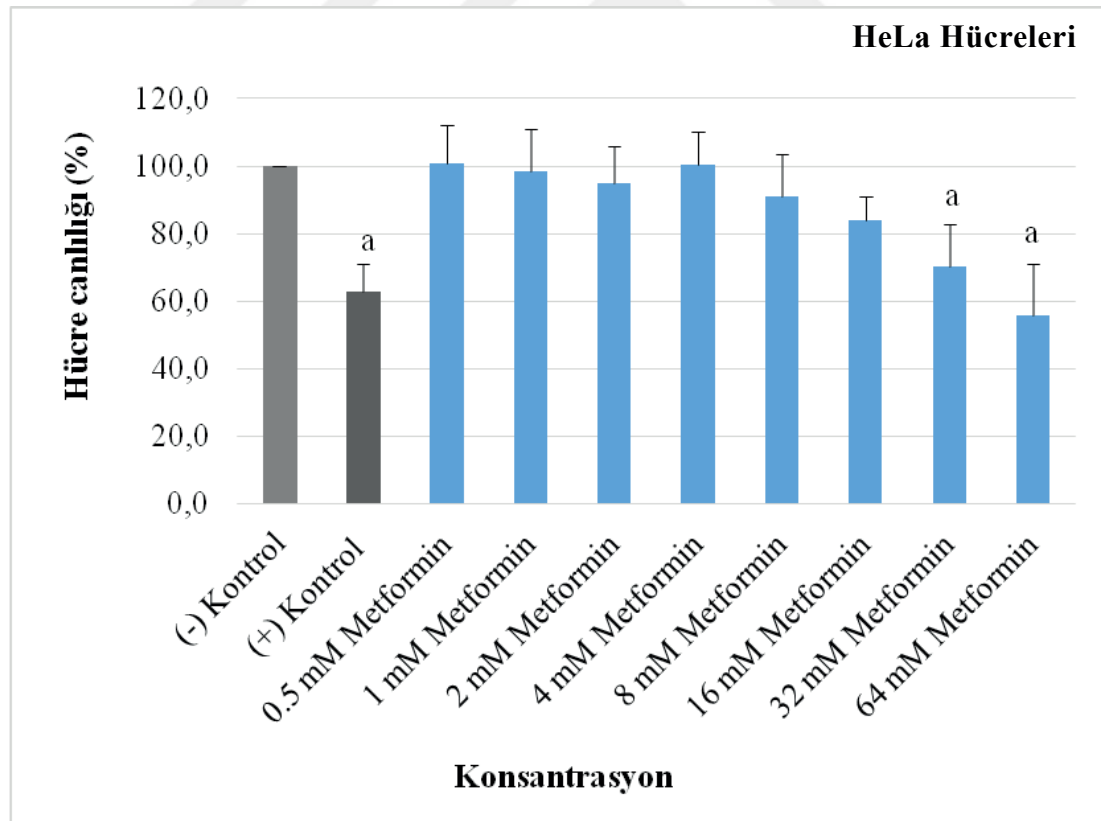
Metforminin 0,5-64 mM konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerinde MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.2. ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Metforminin 48 saatlik inkübasyon sonrası 0,5-16 mM konsantrasyon aralığında, HeLa hücreleri negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırıldığında, önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak doza bağımlı olarak 32-64 mM konsantrasyonlarında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı azalttığı görülmüştür ($p < 0,05$).

Tablo 4. 2. Metforminin 48 saat maruziyette HeLa hücre canlılığı üzerine etkisi. *

No	Çalışma Grupları	1.deney	2.deney	3.deney	Hücre Canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100,0±0
2	(+) Kontrol	70,73	65,24	54,93	62,8±8,0 ^a
3	0,5 mM Metformin	88,76	111,27	102,88	101,0±11,4
4	1 mM Metformin	84,56	106,71	104,59	98,6±12,2
5	2 mM Metformin	86,96	107,27	90,51	94,9±10,8
6	4 mM Metformin	88,54	106,30	105,83	100,2±10,1
7	8 mM Metformin	82,41	105,43	85,43	91,1±12,5
8	16 mM Metformin	80,06	92,16	79,26	83,8±7,2
9	32 mM Metformin	70,01	82,98	57,23	70,1±12,9 ^a
10	64 mM Metformin	49,66	73,02	44,67	55,8±15,1 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak PBS, pozitif kontrol olarak 20 µM sisplatin uygulandı. ^a $p<0,05$ negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.2.** Metforminin 48 saat maruziyette HeLa hücre canlılığı üzerine etkisi*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak PBS, Pozitif kontrol olarak 20 µM sisplatin uygulandı.

^a $p<0,05$ negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.2. Metformin Genotoksisitesinin Comet Yöntemi ile Belirlenmesi

4.2.1. Metforminin HepG2 Hücrelerinde 48 saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Genotoksisitesinin ve H₂O₂ ile indüklenen DNA Hasarına Karşı Etkisinin Comet Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Bulgular

48 saatlik inkübasyon süresi sonunda metforminin genotoksik etki göstermediği saptanmıştır. Metforminin 5, 10, 25, 50, 100, 1000 µM konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin 4 ayrı deneyin sonuçları Tablo 4.3.'de gösterilmiştir. Tabloda ortalama kuyruk yoğunluğu/ kuyruk momenti/ kuyruk göçü ± standart sapmaları verilmiştir. Aynı verilerin kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçüne ait ayrı ayrı grafiksel gösterimi Şekil 4.3.'de yer almaktadır.

Metformin negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 5-1000 µM arasındaki tüm konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarında anlamlı değişikliğe neden olmadığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Metforminin uygulanan tüm konsantrasyonlarda oluşan kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarını pozitif kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Metformin H₂O₂ kombinasyonu pozitif kontrol ile kıyaslandığında ise HepG2 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarında anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.

HepG2 hücrelerindeki kuyruk momenti cinsinden DNA hasarı değerlendirildiğinde ise yine tüm konsantrasyonlarda negatif kontrol ile kıyaslandığında kuyruk momenti cinsinden DNA hasarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Metformin H₂O₂ kombinasyonunda ise kuyruk momenti cinsinden DNA hasarında negatif kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Metformin pozitif kontrolle kıyaslandığında ise tüm konsantrasyonlarında oluşan kuyruk momenti cinsinden DNA hasarında istatistiksel anlamlı azalma saptanmıştır ($p < 0,05$). 10 µM metformin H₂O₂ kombinasyonunda da pozitif kontrolle kıyaslandığında anlamlı azalma gözlenmiş ($p < 0,05$) olup diğer konsantrasyonlarda anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir.

Kuyruk göçü açısından değerlendirmede, negatif kontrolle karşılaştırıldığında uygulanan tüm metformin konsantrasyonlarında anlamlı değişiklik gözlenmezken, metformin H₂O₂ kombinasyonu tüm konsantrasyonlarında kuyruk göçü cinsinden

DNA hasarında anlamlı artış saptanmıştır ($p<0,05$). Pozitif kontrolle kıyaslamada kuyruk göçü cinsinden DNA hasarında tüm metformin konsantrasyonlarında anlamlı azalma tespit edilirken ($p<0,05$), metformin H_2O_2 kombinasyonunun tüm konsantrasyonlarında anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir.

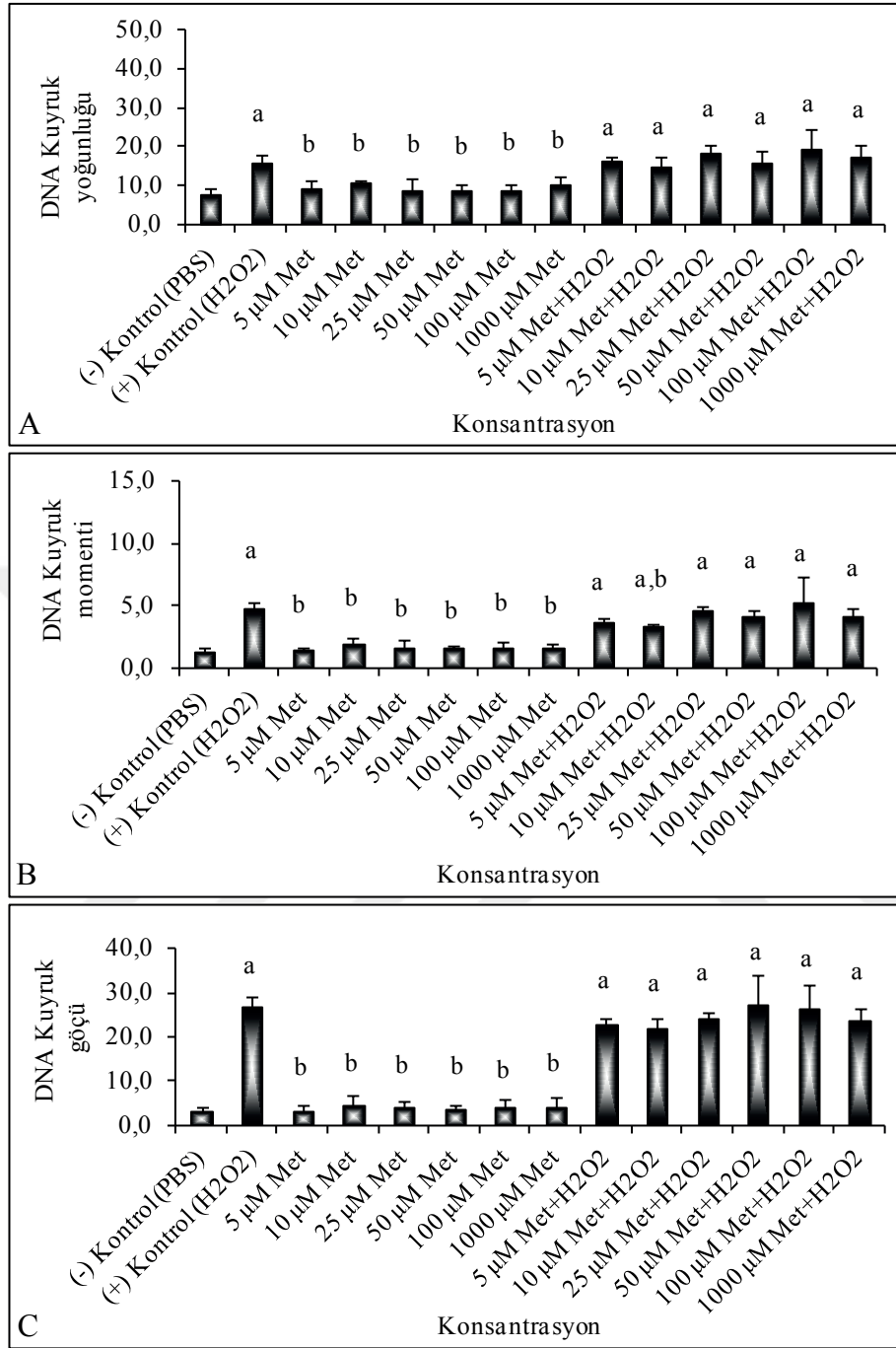
Tablo 4. 3. Metforminin HepG2 hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisine dair bulgular. *

No	Çalışma Grupları	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü
1	(-) Kontrol (PBS)	7,89±1,61	1,28±0,28	3,09±0,98
2	(+) Kontrol (50 μ M H_2O_2)	15,79±2,02 ^a	4,68±0,54 ^a	26,70±2,47 ^a
3	5 μ M Metformin	9,47±1,99 ^b	1,44±0,21 ^b	3,36±1,07 ^b
4	10 μ M Metformin	10,78±0,76 ^b	1,87±0,45 ^b	4,79±2,05 ^b
5	25 μ M Metformin	9,00±2,73 ^b	1,61±0,64 ^b	3,95±1,35 ^b
6	50 μ M Metformin	8,96±1,11 ^b	1,52±0,23 ^b	3,70±1,07 ^b
7	100 μ M Metformin	8,99±1,22 ^b	1,57±0,43 ^b	4,09±1,96 ^b
8	1000 μ M Metformin	10,05±2,08 ^b	1,57±0,39 ^b	4,25±1,96 ^b
9	5 μ M Metformin+ H_2O_2	16,39±0,99 ^a	3,60±0,3 ^a	22,84±1,27 ^a
10	10 μ M Metformin+ H_2O_2	15,05±2,17 ^a	3,26±0,26 ^{ab}	21,86±2,22 ^a
11	25 μ M Metformin+ H_2O_2	18,58±1,89 ^a	4,64±0,28 ^a	24,24±1,03 ^a
12	50 μ M Metformin+ H_2O_2	16,06±2,77 ^a	4,04±0,49 ^a	27,29±6,63 ^a
13	100 μ M Metformin+ H_2O_2	19,31±5,04 ^a	5,31±1,95 ^a	26,59±4,89 ^a
14	1000 μ M Metformin+ H_2O_2	17,23±3,0 ^a	4,12±0,7 ^a	23,49±2,8 ^a

*Sonnular dört çalışmanın ortalama değerleri \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p<0,05$ negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırıldı.

^b $p<0,05$ pozitif kontrol (50 μ M H_2O_2) ile karşılaştırıldı.

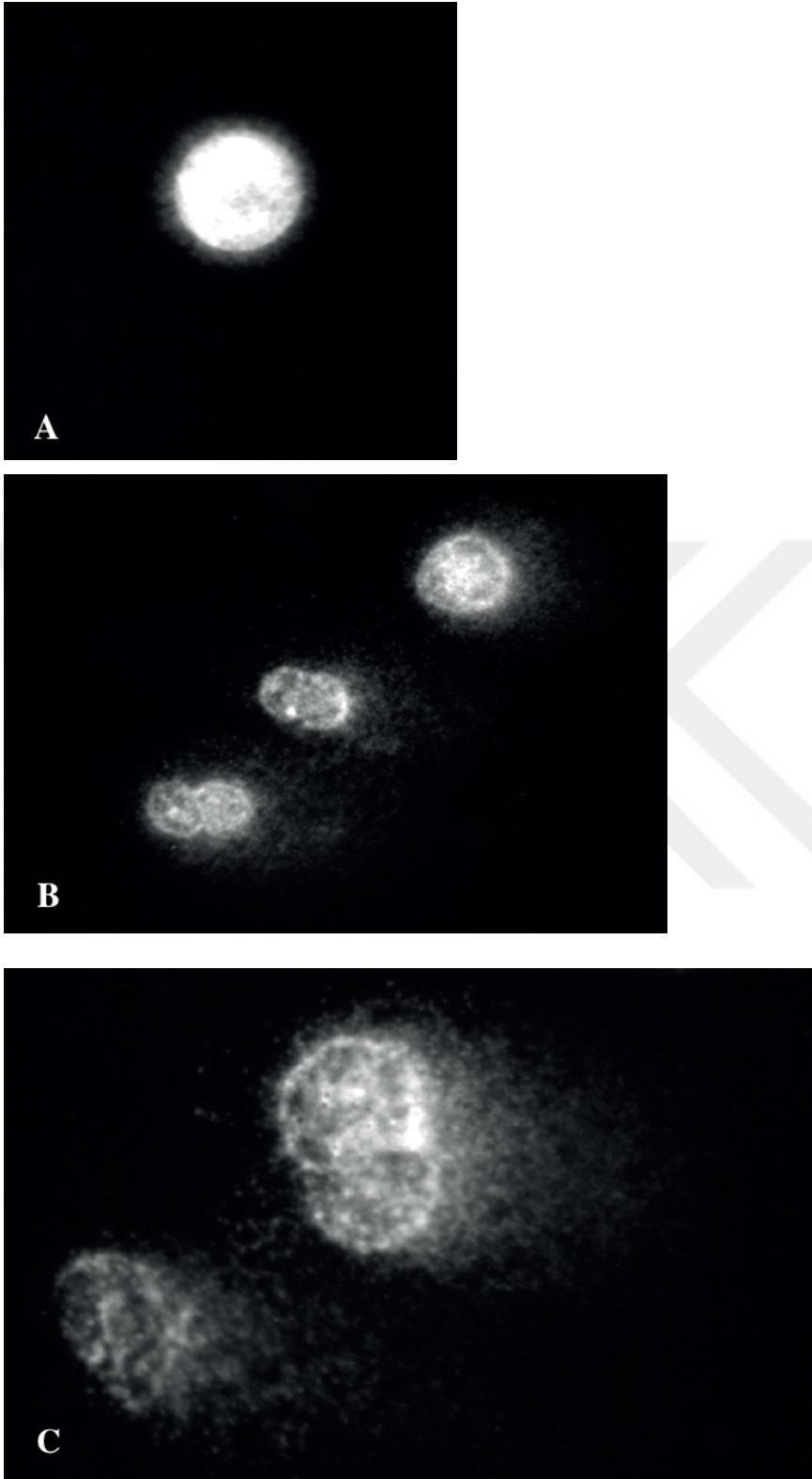


Şekil 4.3. Metforminin HepG2 hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisine dair bulgular**

*DNA hasarı: (A) DNA kuyruk yoğunluğu, (B) DNA kuyruk momenti, (C) DNA kuyruk göçü olarak verilmiştir.

^a $p < 0,05$ negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırıldı.

^b $p < 0,05$ pozitif kontrol ($50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.4. Metforminle 48 saat inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerindeki DNA hasarı görüntüleri A) Hasarsız DNA, B) Az hasarlı DNA, C) Çok hasarlı DNA.

4.2.2. Metforminin HeLa Hücrelerinde 48 saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Genotoksisitesinin ve H₂O₂ ile indüklenen DNA Hasarına Karşı Etkisinin Comet Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Bulgular

48 saatlik inkübasyon süresi sonunda metforminin genotoksik etki göstermediği saptanmıştır. 5, 10, 25, 50, 100, 1000 µM konsantrasyonlarda HeLa hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin 4 ayrı deneyin sonuçları Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Tabloda ortalama kuyruk yoğunluğu/ kuyruk momenti/ kuyruk göçü ± standart sapmaları verilmiştir. Aynı verilerin kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçüne ait ayrı ayrı grafiksel gösterimi Şekil 4.5'te yer almaktadır.

Metformin negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 5-1000 µM arasındaki tüm konsantrasyonlarda HeLa hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarında anlamlı değişikliğe neden olmazken metformin H₂O₂ kombinasyonunun uygulandığı tüm konsantrasyonlarda DNA hasarında anlamlı artış görülmüştür ($p<0,05$). Metforminin uygulanan tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrol ile kıyaslandığında oluşan kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarını anlamlı bir şekilde azalttığı ve metformin H₂O₂ kombinasyonunun uygulanan tüm konsantrasyonlarda DNA hasarında anlamlı artışa yol açtığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

HeLa hücrelerindeki kuyruk momenti cinsinden DNA hasarı değerlendirildiğinde ise yine metforminin tüm konsantrasyonlarda negatif kontrol ile kıyaslandığında kuyruk momenti cinsinden DNA hasarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Metformin H₂O₂ kombinasyonunda ise kuyruk momenti cinsinden DNA hasarında negatif kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Metformin pozitif kontrolle kıyaslandığında ise tüm konsantrasyonlarında oluşan kuyruk momenti cinsinden DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır ($p<0,05$). 50 ve 1000 µM metformin H₂O₂ kombinasyonunda da pozitif kontrolle kıyaslandığında anlamlı artış gözlenmiş ($p<0,05$) olup diğer konsantrasyonlarında anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir.

Kuyruk göçü açısından değerlendirmede, negatif kontrolle karşılaştırıldığında uygulanan tüm metformin konsantrasyonlarında anlamlı değişiklik gözlenmezken, metformin H₂O₂ kombinasyonunun tüm konsantrasyonlarında kuyruk göçü cinsinden DNA hasarında anlamlı artış saptanmıştır ($p<0,05$). Pozitif kontrolle kıyaslamada kuyruk göçü cinsinden DNA hasarında tüm metformin konsantrasyonlarında anlamlı azalma ve metformin H₂O₂ kombinasyonu konsantrasyonlarında anlamlı artış tespit edilmiştir ($p<0,05$).

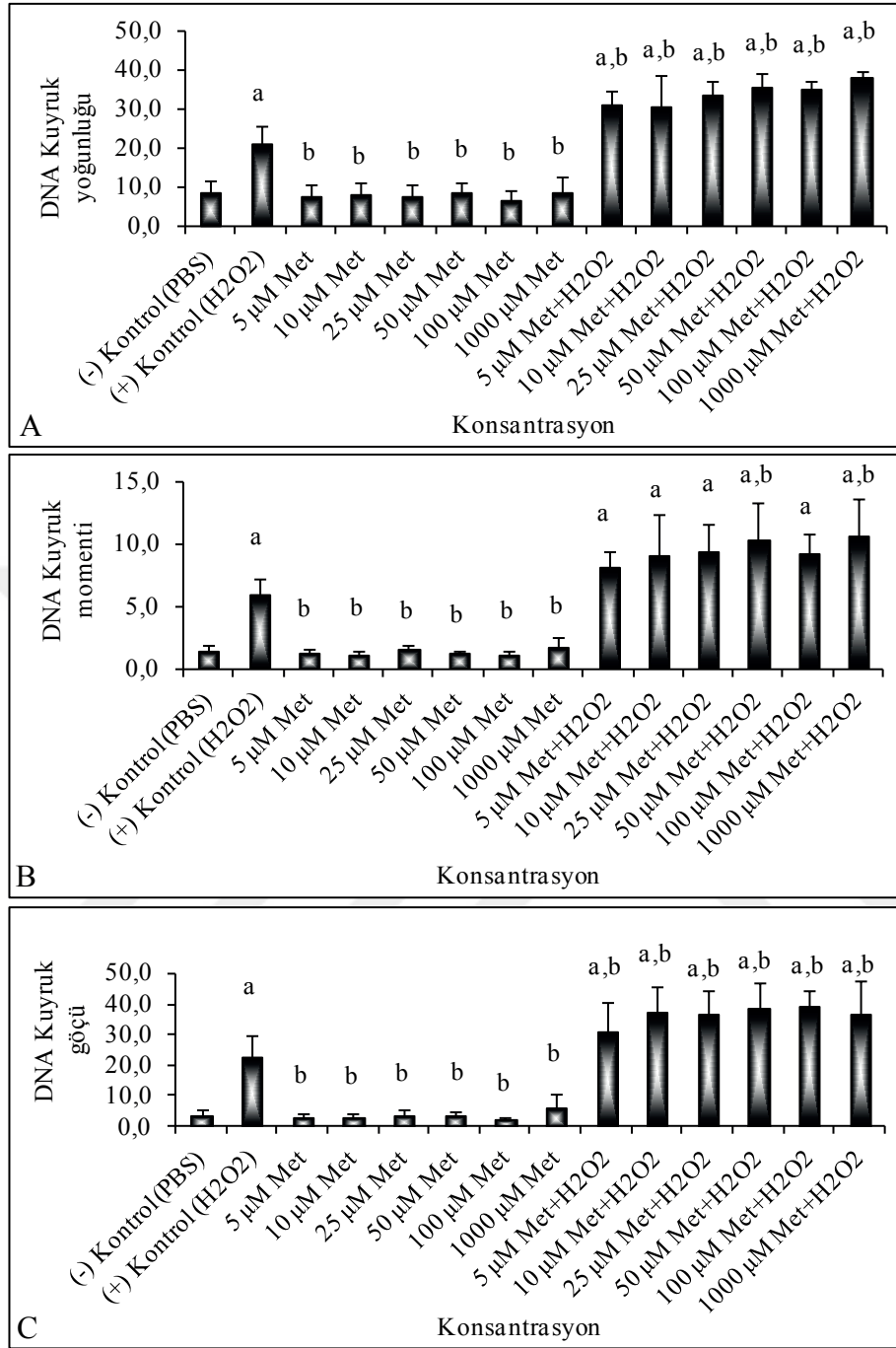
Tablo 4. 4. Metforminin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisine dair bulgular. *

No	Çalışma Grupları	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü
1	(-) Kontrol (PBS)	8,66±3,04	1,48±0,49	3,61±2,33
2	(+) Kontrol (50 µM H ₂ O ₂)	21,35±4,13 ^a	5,91±1,35 ^a	22,71±6,91 ^a
3	5 µM Metformin	7,79±2,75 ^b	1,24±0,32 ^b	3,03±1,50 ^b
4	10 µM Metformin	7,98±3,16 ^b	1,20±0,29 ^b	3,28±1,14 ^b
5	25 µM Metformin	7,45±2,97 ^b	1,55±0,38 ^b	3,59±2,06 ^b
6	50 µM Metformin	8,68±2,44 ^b	1,34±0,14 ^b	3,98±1,29 ^b
7	100 µM Metformin	6,69±2,38 ^b	1,06±0,32 ^b	2,47±0,58 ^b
8	1000 µM Metformin	8,77±3,63 ^b	1,72±0,79 ^b	6,55±3,92 ^b
9	5 µM Metformin+H ₂ O ₂	31,28±3,55 ^{a,b}	8,19±1,21 ^a	31,18±9,26 ^{a,b}
10	10 µM Metformin+H ₂ O ₂	30,37±8,41 ^{a,b}	9,10±3,22 ^a	37,36±8,19 ^{a,b}
11	25 µM Metformin+H ₂ O ₂	33,40±3,60 ^{a,b}	9,37±2,28 ^a	36,73±7,69 ^{a,b}
12	50 µM Metformin+H ₂ O ₂	35,47±3,85 ^{a,b}	10,34±2,93 ^{a,b}	38,77±8,38 ^{a,b}
13	100 µM Metformin+H ₂ O ₂	34,89±2,47 ^{a,b}	9,26±1,57 ^a	38,99±5,63 ^{a,b}
14	1000 µM Metformin+H ₂ O ₂	37,9±1,81 ^{a,b}	10,74±2,97 ^{a,b}	36,7±10,53 ^{a,b}

*Sonnular dört çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p < 0,05$ negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırıldı.

^b $p < 0,05$ pozitif kontrol (50 µM H₂O₂) ile karşılaştırıldı.

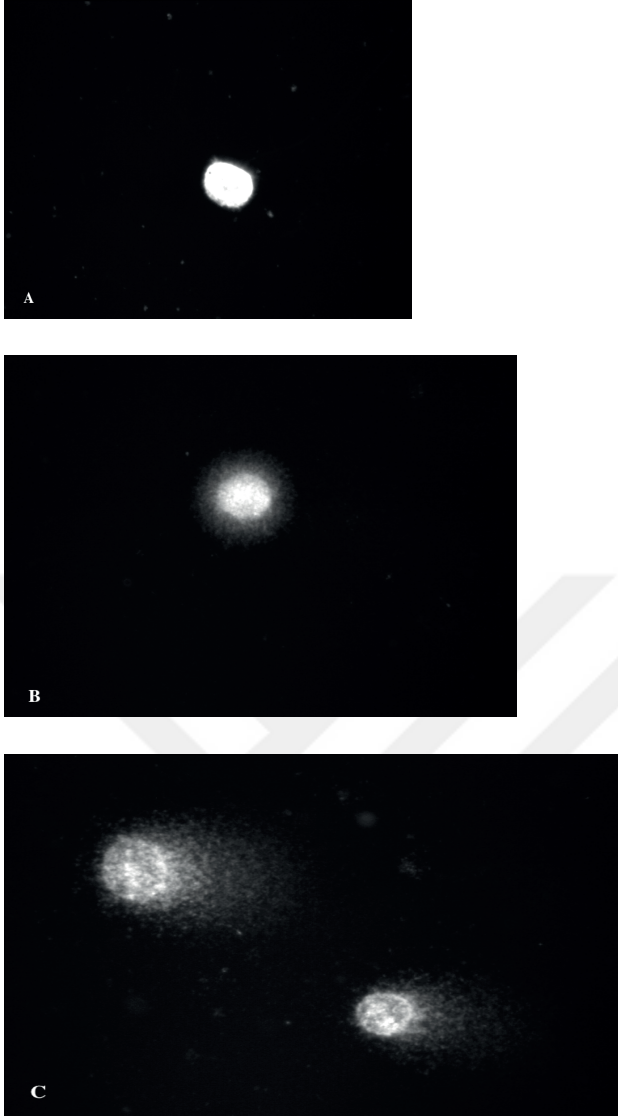


Şekil 4.5. Metforminin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda DNA hasarına etkisine dair bulgular*

*DNA hasarı: (A) DNA kuyruk yoğunluğu, (B) DNA kuyruk momenti, (C) DNA kuyruk göçü olarak verilmiştir.

^a $p < 0,05$ negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırıldı.

^b $p < 0,05$ pozitif kontrol ($50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.6. Metforminle 48 saat inkübasyon sonrası HeLa hücrelerindeki DNA hasarı görüntüleri A) Hasarsız DNA, B) Az hasarlı DNA, C) Çok hasarlı DNA.

4.3. Metforminin Apoptotik Etkilerinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi

4.3.1. Metforminin HepG2 Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

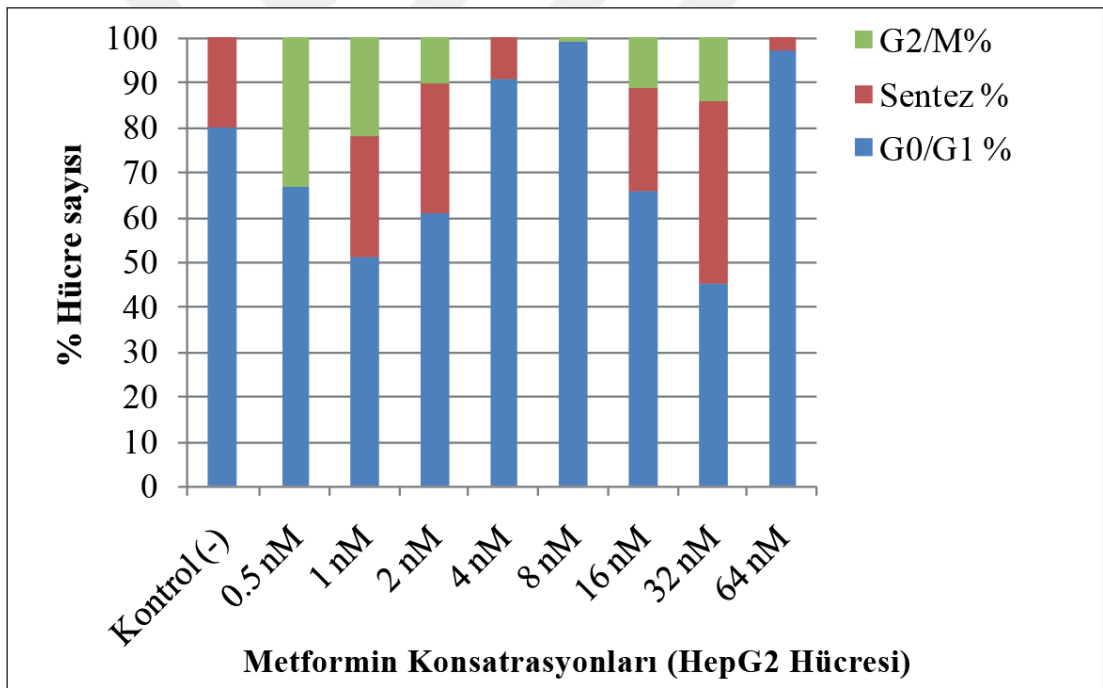
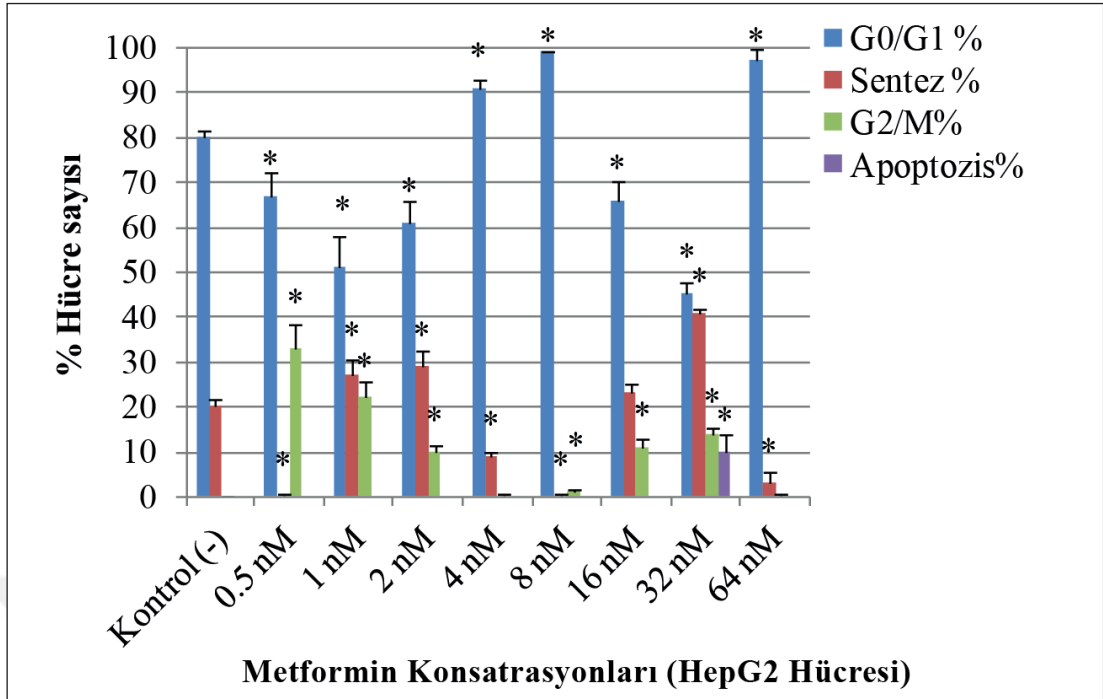
Metformin kaynaklı HepG2 hücrelerindeki büyüme inhibisyonunu çalışmak için, flow sitometri yöntemi kullanarak hücre döngüsü ilerlemesindeki değişiklikleri değerlendirilmiştir. Metforminin apoptotik etkilerinin ve hücre siklus analizlerinin değerlendirildiği 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mM konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerindeki sonuçlar Tablo 4.5'te gösterilmiştir. HepG2 hücreleri ile yapılan hücre siklusu analizinde hücre popülasyonunda sadece 32 mM'lik konsantrasyonda % 10 oranında apoptoz gözlenmiştir (Şekil 4.7). HepG2

hücrelerinde hücre siklusuna metformin etkisi (-) kontrol ile kıyaslandığında 4, 8 ve 64 mM konsantrasyonlarında G0/G1 fazında birikimde artış gözlenmiş olup (-) kontrole (% 80) göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla % 91, % 99, % 97). Diğer konsantrasyonlarda (0,5, 1, 2, 16, 32 mM) ise S fazındaki birikim (% 18), (-) kontrole kıyaslandığında daha yüksek tespit edilmiştir (sırasıyla % 27, % 29, % 23, % 41). G2/M fazındaki birikim ise en yüksek 0,5 mM metformin konsantrasyonunda gözlenmiş olup 0,5, 1, 2, 16 ve 32 mM konsantrasyonlarda (-) kontrole göre yüksek bulunmuştur.

Tablo 4. 5. Metforminin HepG2 Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Siklus Analizleri. *

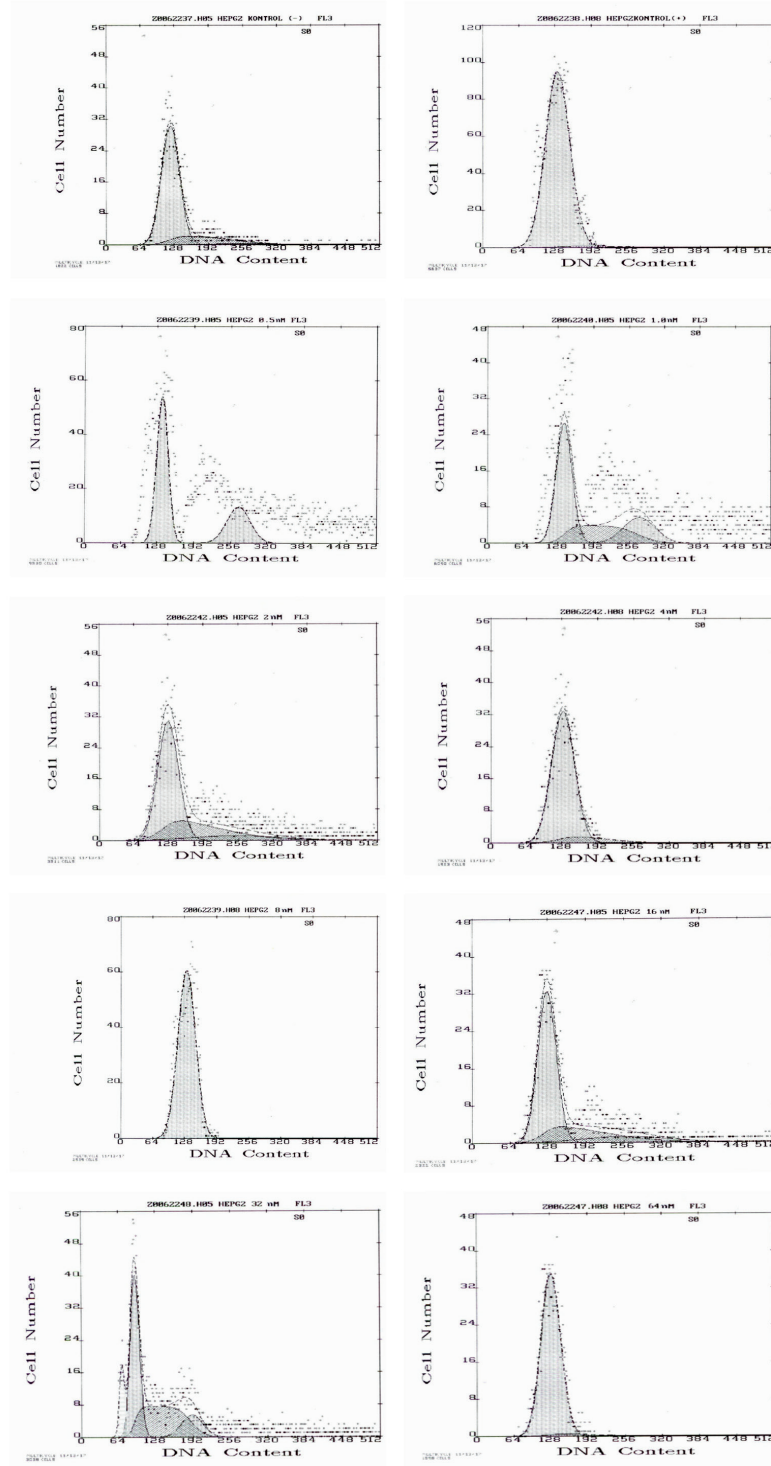
No	Konsantrasyon	G0/G1 %	Sentez %	G2/M %	Apoptozis %
1	(-) Kontrol	80±1,5	20±1,5	0	0
2	0,5 mM Metformin	67±5,0	0±0,6	33±5,5	0
3	1 mM Metformin	51±7,0	27±3,5	22±3,5	0
4	2 mM Metformin	61±5,0	29±3,5	10±1,5	0
5	4 mM Metformin	91±1,5	9±1,0	0±0,6	0
6	8 mM Metformin	99±0,0	0±0,6	1±0,6	0
7	16 mM Metformin	66±4,0	23±2,0	11±2,0	0
8	32 mM Metformin	45±2,5	41±1,0	14±1,5	10±4,0
9	64 mM Metformin	97±2,5	3±2,5	0±0,6	0

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.7. Metforminin HepG2 Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Siklus Analizleri.

* $p < 0,05$ negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.8. Metforminin HepG2 hücrelerindeki flow sitometri sonuçları

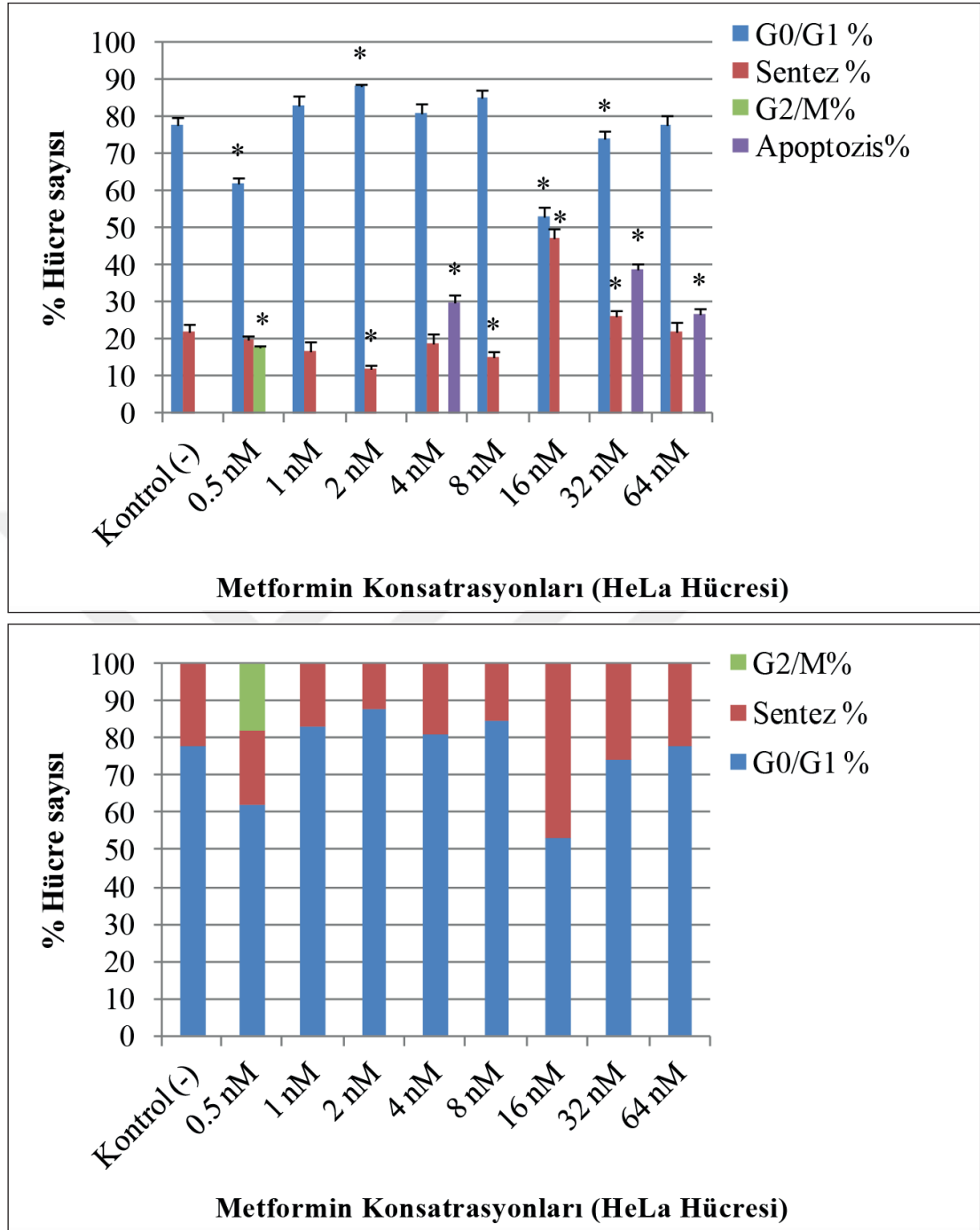
4.3.2. Metforminin HeLa Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Metformin kaynaklı HeLa hücrelerindeki büyüme inhibisyonunu çalışmak için, flow sitometri yöntemi kullanarak hücre döngüsü ilerlemesindeki değişiklikleri değerlendirilmiştir. Metforminin apoptotik etkilerinin ve hücre siklus analizlerinin değerlendirildiği 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mM konsantrasyonlarda HeLa hücrelerindeki sonuçlar Tablo 4.6'da gösterilmiştir. HeLa hücreleri ile yapılan hücre siklus analizinde hücre popülasyonunda 4, 32 ve 64 mM'lik konsantrasyonlarda sırasıyla % 30, % 39, % 27 oranında apoptoz gözlenmiştir (Şekil 4.9). HeLa hücrelerinde hücre siklusuna metformin etkisi (-) kontrol ile kıyaslandığında 1, 2, 4 ve 8 mM'lik düşük konsantrasyonlarda G0/G1 fazında birikimde artış gözlenmiş olup (-) kontrole (% 78) göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla % 83, % 88, % 81, % 85). 16, 32 mM konsantrasyonlarda ise S fazındaki birikim (% 22), (-) kontrole kıyaslandığında daha yüksek tespit edilmiştir (sırasıyla % 46, % 26). G2/M fazındaki birikim ise en yüksek 0,5 mM metformin konsantrasyonunda % 18 gözlenmiş olup (-) kontrole göre yüksek bulunmuştur.

Tablo 4. 6. Metforminin HeLa Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Siklus Analizleri. *

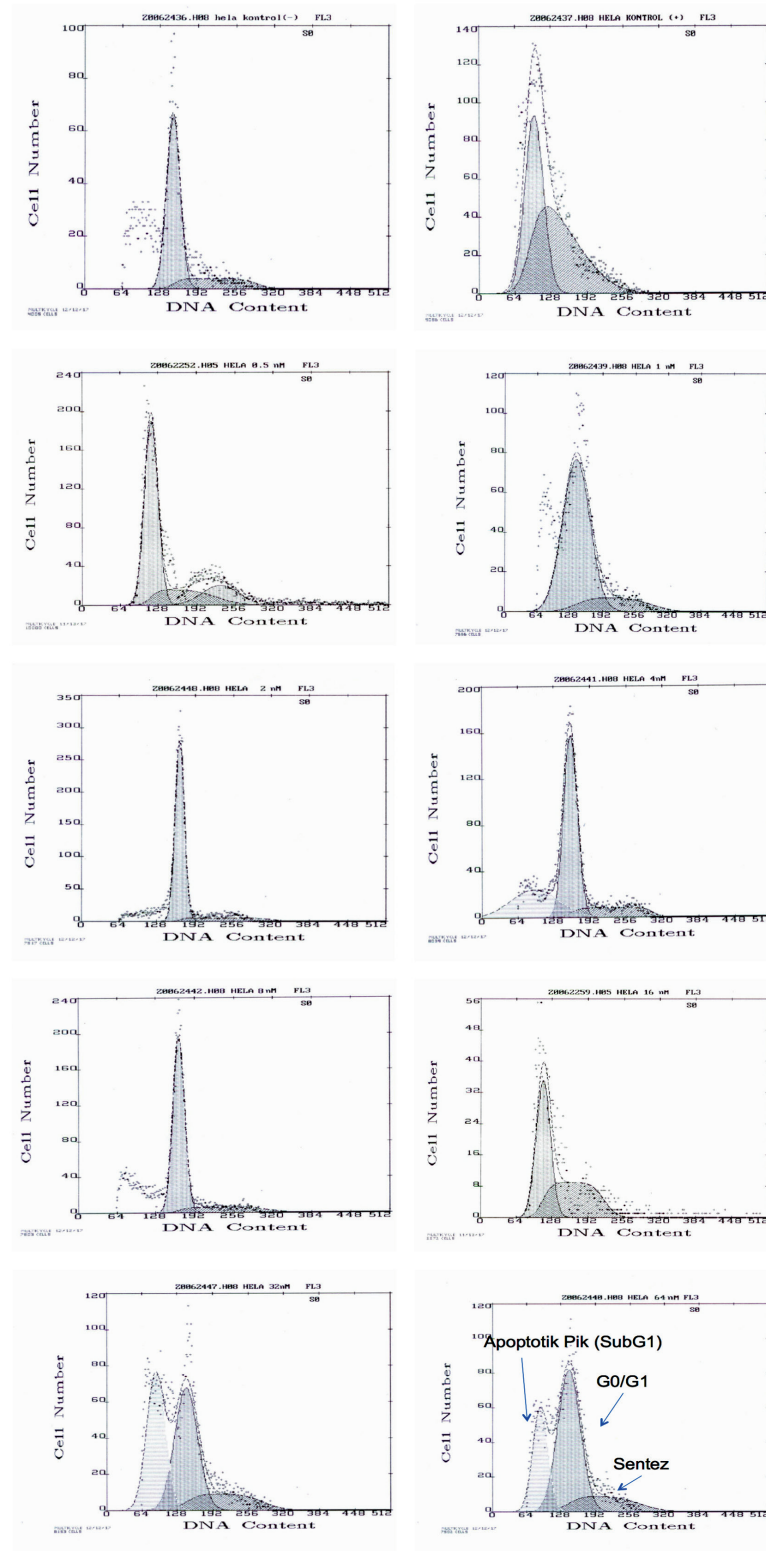
No	Konsantrasyon	G0/G1 %	Sentez %	G2/M %	Apoptozis%
1	(-) Kontrol	78±2,0	22±2,0	0	0
2	0,5 mM Metformin	62±1,5	20±1,0	18±0,6	0
3	1 mM Metformin	83±2,5	17±2,5	0	0
4	2 mM Metformin	88±1,0	12±1,0	0	0
5	4 mM Metformin	81±2,5	19±2,5	0	30±2,0
6	8 mM Metformin	85±2,0	15±2,0	0	0
7	16 mM Metformin	53±2,5	47±3,0	0	0
8	32 mM Metformin	74±2,0	26±2,0	0	39±1,5
9	64 mM Metformin	78±2,5	22±2,5	0	27±1,5

*Sonaçlar üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.9. Metforminin HeLa Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Siklus Analizleri.

* $p < 0,05$ negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.10. Metforminin HeLa hücrelerindeki flow sitometri sonuçları

5. TARTIŞMA

Metformin tip 2 Diyabetes mellitus tedavisinde yaygın olarak kullanılan ayrıca insülin direnci, bozulmuş açlık glukozu, bozulmuş glukoz toleransı ve polikistik over sendromu gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan antidiyabetik bir ilaçtır (1). Son yıllarda diyabet kanser ilişkisi çok fazla dikkat çekmiş özellikle metformin kullanan tip 2 diyabetik hastalarda metformin ilişkisi araştırılmıştır.

Mevcut kemoterapötik ilaçlar, tümör ilerlemesini etkili bir şekilde kontrol edememektedir ve terapiyi engelleyen, ilaca direnç yaygındır. Bu nedenle, kanserli hastaların genel sağkalım oranını arttırmak için yeni yaklaşımlar gerekmektedir. Son zamanlarda, bazı çalışmalar, metforminin diyabetik hastalarda kanser riskini azaltabileceği ve prognozu iyileştirebileceğine dair ön kanıtlar sağlamıştır. Bu amaçla metforminle ilgili çeşitli kanser tiplerinde in vitro ve in vivo çalışmalar yaygınlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda sonuçlar çelişkilidir. Bazı çalışmalar, metforminin, çeşitli insan kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bu büyüme engelleyici etkilerin tek başına hücre döngüsünü durdurma veya hücre döngüsünü durdurma ile birlikte hücre apoptozuna neden olup olmaması ile ilgili veriler değişmektedir. Bu çalışmaların bazıları birkaç olası mekanizma önermesine rağmen, detaylı moleküler temel büyük ölçüde bilinmemektedir. Diğer taraftan çok sayıda araştırmada metforminin apoptoza neden olarak hücre proliferasyonunu engellediğini ve hücreyi ölüme götürebildiğini göstermiştir (155-157)

Çalışmamız açısından da asıl dikkat çekici konu, metformin - kanser ilişkisidir. Biz de bu çalışmada HCC ve serviks Ca hücrelerinde in vitro olarak metforminin sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

Bu tez çalışmasında, metforminin 0,5-64 mM konsantrasyon aralığında HepG2 ve HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir.

48 saatlik maruziyette IC_{50} değeri HepG2 hücreleri için 57,3 mM olarak belirlenmiştir. Metforminin 48 saatlik inkübasyon sonrası 0,5-2 mM konsantrasyon aralığında HepG2 hücreleri negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırıldığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 4 mM ve üzeri konsantrasyonlarda doz bağımlı olarak hücre canlılığında istatistiksel anlamlı azalma oluşturduğu görülmüştür.

HepG2 hücreleriyle yapılan bir çalışmada, metforminin 2,5, 5, 10, 20 mM konsantrasyonları ile 72 saat inkübasyon sonrası yapılan değerlendirilmede çalışmamıza benzer olarak hücre canlılığında doz bağımlı azalma gözlenmiştir (158).

Cai ve arkadaşlarının HepG2 hücreleriyle yaptığı başka bir çalışmada, 5, 10, 20 µM konsantrasyonlardaki metformin ile 72 saat inkübasyon sonrası yapılan hücre canlılığı analizinde de çalışmamıza benzer, hücre canlılığında doz bağımlı azalma tespit edilmiştir (159).

Sliwinska ve arkadaşlarının HepG2 hücrelerinde antidiyabetik ilaçlar olan metformin ve sitagliptin ile yaptığı çalışmada ise metforminin ≥ 15 mM konsantrasyonlarında, hücre canlılığında önemli bir azalmaya neden olduğu gösterilmiş ve IC_{50} değeri 21 ± 3 mM bulunmuştur (160).

Zhang ve arkadaşlarının HCC hücrelerinde (HepG2 ve PLC/PRF/5) metformin ve kurkuminle yaptığı çalışmada metforminin hücre canlılığı üzerine doz bağımlı azalma oluşturduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada metforminin IC_{50} değerleri sırasıyla 24, 48, 72 saatlik inkübasyonlarda $53,72 \pm 3,40$, $23,46 \pm 3,45$, $8,52 \pm 0,93$ mM olarak bulunmuştur (161).

HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine yapılan araştırmalar da çalışmamıza benzer olarak metforminin doz bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığını göstermiştir.

Çalışmamızda 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda metforminin 5, 10, 25, 50, 100, 1000 µM konsantrasyonlarında HepG2 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı comet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Metformin negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 5-1000 µM arasındaki tüm konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarında anlamlı değişikliğe neden olmadığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Metforminin uygulanan tüm konsantrasyonlarda oluşan kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarını pozitif kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu sonuçlar metforminin HepG2 hücrelerinde DNA hasarını engellediğini düşündürmektedir.

Algire ve arkadaşlarının metforminin endojen reaktif oksijen türleri ve ilişkili DNA hasarı ile ilgili yapmış oldukları çalışmada; metforminin, mitokondriyal toksinleri içeren deney sistemlerinde ROS birikimini, DNA hasarı ve mutasyonlarını azalttığını ortaya koymuşlardır (162).

Halicka ve arkadaşlarının insan akciğer adenokarsinom hücreleri A549 ve lenfoblast hücreleri TK6 hücre hatlarında yaptığı çalışmada veriler, normal, mitojenik olarak aktive edilmiş lenfositlerin veya tümör hücre dizilerinin (A549, TK6) metformine maruz kalmasının, Ser139 üzerinde H2AX'ın yapısal fosforilasyon seviyesinde ve ATM'nin (Ataksi Telanjiektazi mutasyona uğramış

protein kinazı) konstitütif aktivasyonunda bir azalmaya yol açtığını göstermiştir. Gözlenen azalma, 0,1 mM metformin kadar düşük bir konsantrasyonda bile belirgin bulunmuştur (163). Farmakokinetik veriler, metforminin bu konsantrasyonunun farmakolojik açıdan anlamlı olduğunu göstermiştir (164). H2AX ve ATM-S1981P'nin yapısal ekspresyon düzeyi, büyük ölçüde, aerobik solunum sırasında oluşan endojen oksidanların DNA hasarına yanıt olarak DNA hasar sinyalini rapor ettiği için (165-171), bu çalışmadaki bulgular, metforminin oksidatif hasara karşı nükleer DNA üzerinde koruyucu etki oluşturduğu düşüncesi ile tutarlı bulunmuştur. Ayrıca, metformin ile tedavi edilen hücrelerde yapılan birçok çalışma ile uyumlu olarak bu çalışmada da ROS düzeyinde azalma gözlenmiştir (172-177). Antioksidan tioredoksin upregülasyonu (177) ve/veya NAD(P)H oksidaz aktivitesinin bastırılması (172) gibi ROS'un nötralize edilmesi için metformin tarafından aktive edilen mekanizmaların, mitokondriyal solunum kompleksi 1 üzerinde ROS-oluşturucu inhibitör etki veya AMPK tarafından aktive edilen katabolik süreçler üzerinde etkili olabileceği görülmüştür (94,178).

Literatürde metforminle yapılan farklı hücre hatlarındaki çalışmalarda çalışmamıza benzer olarak metforminin DNA hasarını azalttığını göstermiştir. Literatürde metforminin DNA hasarını azaltmada hangi yollarla etkili olduğuna dair farklı veriler mevcuttur.

DNA hasarı, transkripsiyon ve/veya replikasyon inhibisyonu gibi nihayetinde hücre ölümüne yol açan biyolojik sonuçlar doğurabilir (179,180). DNA hasarı ve onarılmamış DNA lezyonlarının birikmesi, hücre ölümüne veya kalıcı hücre döngüsü blokajına neden olabilir (181). İlaç maruziyeti ile DNA hasarı (ve sonunda apoptoz indüksiyonu) arasında ilişki kurulmuştur. Bizim çalışmamızda metforminin apoptoz ve hücre siklusu üzerine etkileri akım sitometri yöntemi ile değerlendirilmiş olup metforminin HepG2 hücre popülasyonunda sadece 32 mM'lik konsantrasyonunda % 10 oranında apoptoza neden olduğu görülmüştür. Hücre siklusuna metformin etkisi (-) kontrol ile kıyaslandığında 4, 8 ve 64 mM metformin konsantrasyonlarında G0/G1 fazında birikim (-) kontrole (% 80) göre yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla % 91, % 99, % 97). Her ne kadar G0/G1 fazında birikim tespit edilmiş olsa da hücrelerde proliferasyon gözlenmiştir.

Kefas ve arkadaşları daha uzun metformin maruziyetinin (> 24 saat) sıçan apoptotik β -hücrelerinde progresif bir artışa yol açtığını, metforminin etkilerinin hem doz hem de zamana bağlı olduğunu göstermiştir (182). Aslında, düşük metformin konsantrasyonlarının, β -hücrelerinde AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) aracılı değişikliklere neden olabileceği tespit edilmiştir (182).

Diğer taraftan Ben Sahra ve arkadaşları yaptıkları çalışmada apoptoz indüktif olmasa da, metforminin G0/G1'de hücre döngüsünü bloke etmede etkili olduğunu göstermişlerdir (183).

Sun ve arkadaşları HCC hücre hatları HepG2 ve Hep3B hücrelerinde metforminle yaptıkları çalışmada, apoptozda kritik moleküllerin ekspresyon düzeyini değerlendirmişler ve kaspaz substratı PARP'ın doza bağımlı bir şekilde ayrıldığını bulmuşlardır. Apoptoz başlangıcında iki önemli molekül olan BAX ve BCL-2'den proapoptotik BAX'in kademeli olarak arttığını ve antiapoptotik BCL-2'nin metformin dozu artışı ile azaldığını göstermişler ve bu sonuçlarla, metforminin HCC hücre hattı HepG2'de apoptozu indüklediğini savunmuşlardır. Ayrıca metformin tedavisi ile apoptoz düzeyinin ve miR-23a'nın ekspresyonunun HepG2 hücrelerinde önemli ölçüde arttığını ve miR-23a seviyelerindeki modülasyonunun apoptoz üzerinde kritik bir etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir (158).

Saito ve arkadaşlarının HCC hücre hatları Huh1 ve Huh7 hücrelerinde metforminle yaptıkları çalışmada, bu hücre hatlarında aktif kaspaz 3 (CASP3) immün boyama ile değerlendirilmiş ve metforminin, doza bağımlı bir şekilde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Metformin (5 mM) ile muamele edilmiş Huh1 hücrelerinde, Huh7 hücrelerinde ve normal hepatositlerde apoptotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla, kontrol hücrelerinden yaklaşık beş kat, on kat ve yedi kat daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçla uyumlu olarak, Annexin V ve propidyum iyodür (PI) ile işaretlenerek flow sitometrik analiz ile değerlendirmede, metforminin doza bağımlı bir şekilde apoptozu neden olduğunu ortaya koymuşlardır (184).

Cai ve arkadaşlarının metforminle HCC hücre hatları HepG2 ve PLC/PRF/5 hücrelerinde yaptığı çalışmada, metformin ile in vitro tedavinin, doza bağımlı bir şekilde HCC hücre canlılığını azalttığını göstermişler. İn vitro metformin tedavisinin, apoptoz ve G1/G0 fazında HCC hücre döngüsü tutulmasını indüklediğini tespit etmişlerdir (159). Önceki çalışmalar metforminin, AMPK'ya bağımlı yolun regülasyonu yoluyla G1 fazında tümör hücre döngüsünü durdurarak HCC gelişimini inhibe edebildiğini ortaya koymuştur (185). Bununla birlikte, Xiong ve arkadaşları, HCC hücre döngüsü durdurma ve apoptozun metformin ile indüklenmesinin AMPK'den bağımsız bir yoldan olduğunu göstermişlerdir (186).

Literatürde metforminle yapılan HepG2 ve farklı hücre hatlarındaki çalışmalarda metforminin apoptozu indüklediği gözlenmiş olsa da bizim çalışmamızda apoptoz tek dozda tespit edilmiştir. Çalışmamızda flow sitometri yöntemiyle sadece apoptoz hakkında bilgi elde edilebilirken literatürde metforminin apoptozu indüklemesinde hangi yolların etkin olduğuna dair veriler mevcuttur.

Çalışmamızda 48 saatlik maruziyette IC_{50} değeri HeLa hücreleri için 76,97 mM olarak belirlenmiştir. Metforminin 48 saatlik inkübasyon sonrası 0,5-16 mM konsantrasyon aralığında, HeLa hücreleri negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırıldığında, önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak doza bağımlı olarak 32-64 mM konsantrasyonlarında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı azalttığı görülmüştür ($p<0,05$).

5-1000 μ M arasındaki tüm konsantrasyonlarda negatif kontrol ile karşılaştırıldığında metforminin HeLa hücrelerindeki kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarında anlamlı değişikliğe neden olmadığı görülmüştür ($p<0,05$). Metforminin uygulanan tüm konsantrasyonlarda, kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarını, pozitif kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). HeLa hücreleri ile yapılan hücre siklusu analizinde hücre popülasyonunda 4, 32 ve 64 mM'lik konsantrasyonlarda sırasıyla % 30, % 39, % 27 oranında apoptoz gözlenmiştir. HeLa hücrelerinde hücre siklusuna metformin etkisi (-) kontrol ile kıyaslandığında 1, 2, 4 ve 8 mM'lık düşük konsantrasyonlarda G0/G1 fazında birikimde artış gözlenmiş olup (-) kontrole (% 78) göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla % 83, % 88, % 81, % 85). 16 ve 32 mM konsantrasyonlarda ise S fazındaki birikim (% 22), (-) kontrolle kıyaslandığında daha yüksek tespit edilmiştir (sırasıyla % 46, % 26). G2/M fazındaki birikim ise en yüksek 0,5 mM metformin konsantrasyonunda % 18 gözlenmiş olup (-) kontrole göre yüksek bulunmuştur. Lüteratürde serviks kanserinde metforminin rolünü inceleyen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (187-190)

Xia ve arkadaşlarının serviks kanser hücre hatları HeLa, SiHa ve CaSki hücrelerinde metformin ve nelfinavir ile yaptıkları çalışmada metforminin IC_{50} değeri 223,23 mM bulunmuş olup hücre büyümesini baskıladığı gözlenmiştir (187). Bu çalışmada metformin veya nelfinavir ile tedavi edilen CaSki hücrelerindeki apoptotik hücrelerin oranı, % $28,45 \pm 0,35$ veya % $19,00 \pm 9,48$ bulunmuş. Bu da, metforminin tek başına apoptozu indükleyebildiğini düşündürmüştür. Benzer sonuçlar SiHa ve HeLa hücre hatlarında da gözlenmiştir.

Tyszka-Czochara ve arkadaşlarının metastatik servikal kanser hücre hattı HTB-34 hücrelerinde kafeik asit ve metforminle yaptığı çalışmada kültür ortamında 10 mM metformin varlığının kanser hücrelerinin yaşayabilirliğini önemli ölçüde azalttığı ve sitotoksitede artış olduğu gözlenmiştir (188). Ayrıca bu çalışma, HTB-34 hücrelerinin metformine maruz kalmasının G0/G1 fazındaki hücre popülasyonunu arttırdığını ortaya koymuştur (188).

Tyszka-Czochara ve arkadaşlarının servikal kanser hücre hatları SiHa/HTB-35 hücrelerinde yaptıkları başka bir çalışmada SiHa hücrelerinin sayısının, 24 saat metformin maruziyeti sonrası kontrolle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha düşük olduğu gözlenmiştir (189).

Xiao ve arkadaşlarının servikal kanser hücre hatları HeLa, C33A, CaSki, HT-3, Me180 ve MS751 hücrelerinde metforminle yaptıkları çalışmada IC_{50} değeri C33A, CaSki ve Me180 için 2,5 mM ila 10 mM arasındayken, HeLa, MS751 ve HT-3 için 20 mM'den daha yüksek bulunmuştur. Metforminin servikal kanser hücre canlılığını zamana bağlı olarak azalttığı gözlenmiş olup C33A, CaSki ve Me180 hücrelerinin, HeLa, MS751 ve HT-3 hücrelerinden daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (190). Ayrıca metforminin, servikal kanser hücrelerinde hem apoptozu hem de otofajiyi indükleyerek LKB1 intakt servikal kanser hücrelerinin yaşayabilirliğini bozduğu tespit edilmiştir (190).

Metforminin HeLa hücrelerindeki etkilerine yönelik yapılan çok az çalışmada çalışmamıza benzer olarak göstermiştir ki metformin hücre canlılığını azaltmakta ve apoptozu indüklemektedir.

In vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen veriler, metforminin birçok kanser hücresi türü üzerine doğrudan etkisini göstermiştir ve IC_{50} değeri yaklaşık 50 mM bulunmuştur (191).

Farklı çalışmalar Metforminin antikanser etkisinin, özellikle G0/G1 ve G2/M fazlarında, apoptozun indüksiyonu ile hücre döngüsünün modifikasyonunu içerebildiğini ve nihai hücre içi etkilerin çeşitli kanser türlerine göre değişebileceğini göstermiştir (192,193).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Metformin, diabetes mellitus tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir biguanid türevidir. Son zamanlardaki epidemiyolojik, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda metforminin umut verici bir antikanser ilacı olduğu gösterilmiştir. Özellikle metforminin çeşitli antikanser ilaçlarla kombinasyonları ve etkileri üzerine yapılan çalışmaların sayıları girerek artmaktadır. Bizim çalışmamız da metforminin HepG2 hücrelerinde (doz bağımlı olarak) hücre canlılığını ve DNA hasarını azalttığını, ancak apoptozda belirgin bir değişikliğe yol açmadığını göstermiştir. HeLa hücrelerinde ise hücre canlılığı ve DNA hasarı azalırken apoptotik etkide artış tespit edilmiştir. Literatürde metforminin bu etkileri hangi yollar üzerinden yaptığına dair çeşitli çalışmalar yer alsa da henüz kesinlik kazanmamıştır. Bu sebeple bu yolların açıklık kazanması açısından ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Witters LA. The blooming of the French lilac. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;108:1105-7.
2. Holland W, Morrison T, Chang Y, Wiernsperger N, Stith BJ. Metformin (Glucophage) inhibits tyrosine phosphatase activity to stimulate the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemical Pharmacology*. 2004;67(11):2081-91.
3. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005;310(5754):1642-46.
4. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(8):1167-74.
5. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hebrard S, Lantier L, Mounier R, et al. Amp-Activated Protein Kinase In The Regulation Of Hepatic Energy Metabolism: From Physiology To Therapeutic Perspectives. *Acta Physiologica*. 2009;196(1):81-98.
6. Miller RA, Birnbaum MJ. An Energetic Tale of Ampk-Independent Effects of Metformin. *Jornal of Clinical Investigation*. 2010;120(7):2267-70.
7. Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, et al. Amp-Activated Protein Kinase Is Required For The Lipid-Lowering Effect Of Metformin in Insulin-Resistant Human HepG2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;279(46):47898-905.
8. Winder WW, Hardie DG. Amp-Activated Protein Kinase, A Metabolic Master Switch: Possible Roles in Type 2 Diabetes. *American Journal of Physiology*. 1999;277(1):E1-10.
9. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin And Reduced Risk of Cancer in Diabetic Patients. *British Medical Journal*. 2005;330(7503):1304-5.
10. Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA. Increased Cancer Related Mortality for Patients with Type 2 Diabetes who use Sulfonylureas or Insulin. *Diabetes Care*. 2006;29(2):254-8.
11. Dowling RJO, Niraula S, Stambolic V, Goodwin PJ. Metformin in cancer: translational challenges. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2012;48(3):31-43.
12. Zhang ZJ, Bi Y, Li S, Zhang Q, Zhao G, Guo Y, et al. Reduced risk of lung cancer with metformin therapy in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*. 2014;180(1):11-14.
13. Tsai MJ, Yang CJ, Kung YT, Sheu CC, Shen YT, Chang PY, et al. Metformin decreases lung cancer risk in diabetic patients in a dose-dependent manner. *Lung Cancer*. 2014;86(2):137-43.
14. Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F. Metformin In Cancer Therapy: A New Perspective for An Old Antidiabetic Drug?. *Molecular Cancer Theraphy*. 2010;9(5):1092-9.
15. Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, Osorio-Costa F, Rossato FA, Vercesi AE, et al. Metformin Amplifies Chemotherapy-Induced Ampk Activation And Antitumoral Growth. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(12):3993-4005.

16. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP Kinase-Dependent Growth Inhibitor. *Cancer Research*. 2006;66(21):10269-73.
17. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ., DeBerardinis RJ, Zhao F, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Research*. 2007;67(14):6745-52.
18. Zakikhani M, Blouin MJ, Piura E, Pollak MN. Metformin and Rapamycin Have Distinct Effects On The Akt pathway And Proliferation In Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;123(1):271-9.
19. Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:23977-80.
20. Motoshima H, Goldstein BJ, Igata M, Araki E. AMPK and cell proliferation-AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *Journal of Physiology*. 2006;574:63-71.
21. Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Research*. 2007;67(22):10804-12.
22. Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, et al. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2008;110(2):246-50.
23. Hadad SM, Fleming S, Thompson AM. Targeting AMPK: A new therapeutic opportunity in breast cancer. *Critical Review on Oncologic Hematology*. 2008;67(1):1-7.
24. Sankari SL, Masthan KMK, Aravindha Babu N, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer-An update. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(10):4873-8.
25. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. 2000;21(3):485-95.
26. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: report of WHO consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabet Med*. 1998;15(7):539-53.
27. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35(suppl 1):64-71.
28. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Geneva: World Health Organization; 2006.
29. Report of a World Health Organization Consultation. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;93:299-309.
30. Santaguida PL, Balion C, Hunt D, Morrison K, Gerstein H, et al. Diagnosis, prognosis, and treatment of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*. 2005;(128):1-11.

31. Zhang X, Gregg EW, Williamson DF, Barker LE, Thomas W, Bullard KM, et al. A_{1c} level and future risk of diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*. 2010;33:1665-73.
32. Shaw JE, Zimmet PZ, Alberti KG. Point: impaired fasting glucose: the case for the new American Diabetes Association criterion. *Diabetes Care*. 2006;29:1170-2.
33. Forouhi NG, Balkau B, Borch-Johnsen K, Dekker J, Glumer C, Qiao Q, et al. The threshold for diagnosing impaired fasting glucose: a position statement by the European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetologia*. 2006;49:822-7.
34. International Diabetes Federation Task Force on Diabetes Health Economics: Facts, Figures and Forecasts. Brussels: International Diabetes Federation, 1997.
35. Tao Z, Shi A, Zhao J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochem Biophys*. 2015;73(1):181-5.
36. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):e442.
37. Diabetes [internet]. 2017 [Erişim Tarihi 31 Aralık 2017] Erişim adresi: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
38. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab care*. 2009;32(Suppl 1):62-7.
39. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314:1360-8.
40. Wilkin TJ. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes. *Diabetol*. 2006;44:914-22.
41. Gale EA. Declassifying diabetes. *Diabetol*. 2006;49:1989-95.
42. Dabelea D, Rewers A, Stafford JM, Standiford DA, Lawrence JM, Saydah S, et al. Trends in the prevalence of ketoacidosis at diabetes diagnosis: the Search for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*. 2014;133:938-45.
43. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2015;38:1964-74.
44. Sosenko JM, Skyler JS, Palmer JP, Krischer JP, Yu L, Mahon J, et al. The prediction of type 1 diabetes by multiple autoantibody levels and their incorporation into an autoantibody risk score in relatives of type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2013;36:2615-20.
45. Steck AK, Vehik K, Bonifacio E, Lernmark A, Ziegler AG, Hagopian WA, et al. Predictors of progression from the appearance of islet autoantibodies to early childhood diabetes: The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY). *Diabetes Care*. 2015;38:808-13.
46. Orban T, Sosenko JM, Cuthbertson D, Krischer JP, Skyler JS, Jackson R, et al. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care*. 2009;32:2269-74.

47. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. 2017;66(2):241-55.
48. Liese AD, D'Agostino RB Jr, Hamman RF, Kilgo PD, Lawrence JM, Liu LL, et al. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*. 2006;118:1510-8.
49. Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB Jr, Imperatore G, Johansen JM, Linder B, et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. *JAMA*. 2007;297:2716-24.
50. Vandewalle CL, Coeckelberghs MI, De Leeuw IH, Du Caju MV, Schuit FC, Pipeleers DG, et al. Epidemiology, clinical aspects, and biology of IDDM patients under age 40 years. Comparison of data from Antwerp with complete ascertainment with data from Belgium with 40% ascertainment. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetes care*. 1997;20:1556-61.
51. Thunander M, Petersson C, Jonzon K, Fornander J, Ossiansson B, Torn C, et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;82:247-55.
52. Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, et al. SEARCH for Diabetes in Youth Study. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *JAMA*. 2014;311:1778-86.
53. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39:481-97.
54. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med*. 2006;23:857-66.
55. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009;373:2027-33.
56. Chen KW, Boyko EJ, Bergstrom RW, Leonetti DL, Newell-Morris L, Wahl PW, et al. Earlier appearance of impaired insulin secretion than of visceral adiposity in the pathogenesis of NIDDM. 5-Year follow-up of initially nondiabetic Japanese-American men. *Diabetes Care*. 1995;18(6):747-53.
57. Haffner SM, Miettinen H, Gaskill SP, Stern MP. Decreased insulin secretion and increased insulin resistance are independently related to the 7-year risk of NIDDM in Mexican-Americans. *Diabetes*. 1995;44:1386.
58. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1999;104:787.
59. Li Y, Xu W, Liao Z, Yao B, Chen X, Huang Z, et al. Induction of long-term glycemic control in newly diagnosed type 2 diabetic patients is associated with improvement of beta-cell function. *Diabetes Care*. 2004;27:2597-602.
60. International Diabetes Federation: Diabetes Atlas. 2017 Erişim Tarihi 7 Ocak 2018] Erişim adresi: <http://www.eatlas.idf.org>.

61. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA*. 2003;289:76-9.
62. CDC: National Diabetes Fact Sheet, 2005. Erişim Tarihi 7 Ocak 2018] Erişim adresi: <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/factsheet05.htm>.
63. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20:1183-97.
64. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2009;373:1773-9.
65. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991-2002.
66. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2011. *Diabetes Care*. 2011;34 (Suppl. 1):11-61.
67. Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, et al. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33:676-82.
68. Vandorsten JP, Dodson WC, Espeland MA, Grobman WA, Guise JM, Mercer BM, et al. NIH consensus development conference: diagnosing gestational diabetes mellitus. *NIH Consens State Sci Statements*. 2013;29:1-31.
69. Horvath K, Koch K, Jeitler K, Matyas E, Bender R, Bastian H, et al. Effects of treatment in women with gestational diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010;340:c1395.
70. Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*. 1982;144:768-73.
71. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. 1979;28:1039-57.
72. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38:140-9.
73. Evert AB, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ, et al. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37(Suppl. 1):120-43.
74. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2014. *Diabetes Care*. 2014;37:14-80.
75. Witters LA. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest*. 2001;108:1105-7.

76. Cusi K, DeFronzo RA. Metformin: a review of its metabolic effects. *Diabetes Reviews*. 1998;6:89-131.
77. Watanabe CK. Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases. I. Influence of injected guanidine hydrochloride upon blood sugar content. *J Biol Chem*. 1918;33:253-65.
78. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med*. 1996;334:574-9.
79. Wiernsperger NF, Bailey CJ. The antihyperglycemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. *Drugs*. 1999;58:31-9.
80. UKPDS Group. Effects of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. *Lancet*. 1998;352:854-65.
81. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci*. 2012;122:253-70.
82. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. *Cancer Discov*. 2012;2:778-90.
83. Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF, et al. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Clin. Pharmacol*. 1981;12:235-46.
84. Memmott RM, Mercado JR, Maier CR, Kawabata S, Fox SD, Dennis PA. Metformin prevents tobacco carcinogen—induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev. Res. (Phila.)*. 2010;3:1066-76.
85. Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica*. 1994;24:49-57.
86. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genomics*. 2012;22:820-7.
87. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem*. 2000;275:223-8.
88. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J*. 2000;348:607-14.
89. Hollunger G. Guanidines and oxidative phosphorylations. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*. 1955;11:1-84.
90. Stephenne X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, et al. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia*. 2011;54:3101-10.
91. Guigas B, Detaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E, et al. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem. J*. 2004;382:877-84.

92. Hirsch A, Hahn D, Kempná P, Hofer G, Nuoffer JM, Mullis PE, et al. Metformin inhibits human androgen production by regulating steroidogenic enzymes HSD3B2 and CYP17A1 and complex I activity of the respiratory chain. *Endocrinology*. 2012;153:4354-66.
93. Kim KH, Jeong YT, Kim SH, Jung HS, Park KS, Lee HY, et al. Metformin-induced inhibition of the mitochondrial respiratory chain increases FGF21 expression via ATF4 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013;440:76-81.
94. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?. *Diabetes*. 2004;53:1052-59.
95. Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N, et al. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes*. 2005;54:2179-87.
96. Hinke SA, Martens GA, Cai Y, Finsi J, Heimberg H, Pipeleers D, et al. Methyl succinate antagonises biguanide-induced AMPK-activation and death of pancreatic beta-cells through restoration of mitochondrial electron transfer. *Br. J. Pharmacol.* 2007;150:1031-43.
97. Piel S, Ehinger JK, Elmér E, Hansson MJ. Metformin induces lactate production in peripheral blood mononuclear cells and platelets through specific mitochondrial complex I inhibition. *Acta Physiol. (Oxf.)*. 2014; 213(1):171-80.
98. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, 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;120:2355-69.
99. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci.* 2012;122:253-70.
100. Andrzejewski S, Gravel SP, Pollak M, St-Pierre J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab.* 2014;2:12.
101. Bridges HR, Jones AJ, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem. J.* 2014;462:475-87.
102. Dykens JA, Jamieson J, Marroquin L, Nadanaciva S, Billis PA, Will Y. Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008;233:203-10.
103. Gandini S, Puntoni M, Heckman-Stoddard BM, Dunn BK, Ford L, DeCensi A, et al. Metformin and cancer risk and mortality: A systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 2014;7:867-85.
104. Tsilidis KK, Capothanassi D, Allen NE, Rizos EC, Lopez DS, van Veldhoven K, et al. Metformin Does Not Affect Cancer Risk: A Cohort Study in the U.K. Clinical Practice Research Datalink Analyzed Like an Intention-to-Treat Trial. *Diabetes Care*. 2014;37:2522-32.

105. Wu W, Merriman K, Nabaah A, Seval N, Seval D, Lin H, et al. The association of diabetes and anti-diabetic medications with clinical outcomes in multiple myeloma. *Br. J. Cancer.* 2014;111:628-36.
106. Preston MA, Riis AH, Ehrenstein V, Breau RH, Batista JL, Olumi A, et al. Metformin Use and Prostate Cancer Risk. *Eur. Urol.* 2014;66(6):1012-20.
107. Margel D, Urbach DR, Lipscombe LL, Bell CM, Kulkarni G, Austin PC, et al. Metformin use and all-cause and prostate cancer-specific mortality among men with diabetes. *J. Clin. Oncol.* 2013;31:3069-75.
108. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat. Rev. Cancer.* 2012;12:159-69.
109. Algire C, Amrein L, Bazile M, David S, Zakikhani M, Pollak M. Diet and tumor LKB1 expression interact to determine sensitivity to anti-neoplastic effects of metformin in vivo. *Oncogene.* 2011;30:1174-82.
110. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell.* 2013;12:489-98.
111. Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, Harms GM, Shen H, Wang LS, et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature.* 2009;460:103-7.
112. Kourelis TV, Siegel RD. Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Med Oncol.* 2012;29(2):1314-27.
113. Kordes S, Pollak MN, Zwinderman AH, Mathôt RA, Weterman MJ, Beeker A, et al. Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(7):839-47.
114. Huang X, Wullschleger S, Shpiro N, McGuire VA, Sakamoto K, Woods YL, et al. Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. *Biochem. J.* 2008;412:211-21.
115. Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, Yucel B, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature.* 2014;508:108-12.
116. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife.* 2014;3:e02242.
117. Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P, et al. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2010;70:2465-75.
118. Pollak M. Targeting oxidative phosphorylation: why, when, and how. *Cancer Cell.* 2013;23:263-4.
119. Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell.* 2013;23:302-15.

120. Grassian AR, Parker SJ, Davidson SM, Divakaruni AS, Green CR, Zhang X, et al. IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism. *Cancer Res.* 2014;74:3317-31.
121. Shackelford DB, Abt E, Gerken L, Vasquez DS, Seki A, Leblanc M, et al. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer Cell.* 2013;23:143-58.
122. Wilson EB, Maher HC. Cancer and tuberculosis with some comments on cancer and other diseases. *Am J Cancer* 1932;16:227-50.
123. Simon D, Balkau B. Diabetes mellitus, hyperglycaemia and cancer. *Diabetes Metab* 2010;36(3):182-91.
124. Lam EK, Batty GD, Huxley RR, Martiniuk AL, Barzi F, Lam TH, et al. Associations of diabetes mellitus with site-specific cancer mortality in the Asia-Pacific region. *Ann Oncol.* 2011;22:730-8.
125. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009;16:1103-23.
126. Wang C, Wang X, Gong G, Ben Q, Qiu W, Chen Y, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer.* 2012;130:1639-48.
127. Ren HB, Yu T, Liu C, Li YQ. Diabetes mellitus and increased risk of biliary tract cancer: systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control.* 2011;22:837-47.
128. Ben Q, Xu M, Ning X, Wang Y, Li Y. Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer.* 2011;47:1928-37.
129. Ge Z, Ben Q, Qian J, Wang Y, Li Y. Diabetes mellitus and risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23:1127-35.
130. Jiang Y, Ben Q, Shen H, Lu W, Zhang Y, Zhu J. Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol.* 2011;26:863-76.
131. Larsson SC, Wolk A. Diabetes mellitus and incidence of kidney cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia.* 2011;54:1013-8.
132. Larsson SC, Orsini N, Brismar K, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis. *Diabetologia.* 2006;49:2819-23.
133. Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2007;121:856-62.
134. Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia.* 2007;50:1365-74.
135. Heuson JC, Legros N, Heimann R. Influence of insulin administration on growth of the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in intact, oophorectomized, and hypophysectomized rats. *Cancer Res.* 1972;32:233-8.
136. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care.* 2010;33:1674-85.

137. Currie CJ, Poole CD, Gale EA. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52:1766-77.
138. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32:1620-5.
139. Bruning PF, Bonfrer JM, van Noord PA, Hart AA, de Jong-Bakker M, Nooijen WJ. Insulin resistance and breast-cancer risk. *Int J Cancer*. 1992;52:511-6.
140. Giovannucci E. Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control*. 1995;6:164-79.
141. Hu FB, Manson JE, Liu S, Hunter D, Colditz GA, Michels KB, et al. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(6):542-7.
142. Richardson LC, Pollack LA. Therapy insight: influence of type 2 diabetes on the development, treatment and outcomes of cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2:48-53.
143. Lorenzi M, Montisano DF, Toledo S, Barrioux A. High glucose induces DNA damage in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1986;77:322-5.
144. Vona-Davis L, Howard-McNatt M, Rose DP. Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obes Rev*. 2007;8:395-408.
145. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut*. 2005;54:533-9.
146. Laggiou P, Kuper H, Stuver SO, Tzonou A, Trichopoulos D, Adami HO. Role of diabetes mellitus in the etiology of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1096-9.
147. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:74-108.
148. Calle E, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun M. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348:1625-38.
149. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes: 2009. *Diabetes Care*. 2009;32(Suppl. 1):S13- S61.
150. Kiefe CI, Funkhouser E, Fouad MN, May DS. Chronic disease as a barrier to breast and cervical cancer screening. *J Gen Intern Med*. 1998;13(6):357-65.
151. Dehn PF, White CM, Connors DE, Shipkey G, Cumbo TA. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In vitro Cell Dev Biol*. 2004;40:172-182.
152. Terrada DL, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. HepG2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol*. 2009;40(10):1512-5.
153. Akçalı A. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2010;25(3):119-23.

154. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:315-9.
155. 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;9(5):603-15.
156. Will MA, Palaniappan M, Peegel H, Kayampilly P, Menon KM. Metformin: direct inhibition of rat ovarian theca-interstitial cell proliferation. *Fertil Steril*. 2012;98(1):207-14.
157. Colquhoun AJ, Venier NA, Vandersluis AD, Besla R, Sugar LM, Kiss A, et al. Metformin enhances the antiproliferative and apoptotic effect of bicalutamide in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2012;15(4):346-52.
158. Sun Y, Tao C, Huang X, He H, Shi H, Zhang Q, et al. Metformin induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by activating an AMPK/p53/miR-23a/FOXA1 pathway. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:2845.
159. Cai X, Hu X, Cai B, Wang Q, Li Y, Tan X, et al. Metformin suppresses hepatocellular carcinoma cell growth through induction of cell cycle G1/G0 phase arrest and p21CIP and p27KIP expression and downregulation of cyclin D1 in vitro and in vivo. *Oncology reports*. 2013;30.5:2449-57.
160. Sliwinska A, Rogalska A, Marczak A, Kasznicki J, Drzewoski J. Metformin, but not sitagliptin, enhances WP 631-induced apoptotic HepG2 cell death. *Toxicology in Vitro*. 2015;29.5:1116-23.
161. Zhang HH, Zhang Y, Cheng YN, Gong FL, Cao ZQ, Yu LG, et al. Metformin in combination with curcumin inhibits the growth, metastasis, and angiogenesis of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Molecular carcinogenesis*. 2018;57.1:44-56.
162. Algire C, Moiseeva O, Deschênes-Simard X, Amrein L, Petruccelli L, Birman E, et al. Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prevention Research*. 2012;5.4:536-43.
163. Halicka HD, Zhao H, Li J, Traganos F, Zhang S, Lee M, et al. Genome protective effect of metformin as revealed by reduced level of constitutive DNA damage signaling. *Aging (Albany NY)*. 2011;3.10:1028.
164. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50:81-98.
165. Tanaka T, Halicka HD, Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle*. 2006;5:1940-5.
166. Zhao H, Tanaka T, Halicka HD, Traganos F, Zarebski M, Dobrucki J, et al. Cytometric assessment of DNA damage by exogenous and endogenous oxidants reports the aging-related processes. *Cytometry A*. 2007;71A:905-14.
167. Tanaka T, Kajstura M, Halicka HD, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation are strongly amplified during mitogenic stimulation of lymphocytes. *Cell Prolif*. 2007;40:1-13.

168. Tanaka T, Kurose A, Halicka HD, Traganos F, Darzynkiewicz Z. 2-Deoxy-D-glucose reduces the level of constitutive activation of ATM and phosphorylation of histone H2AX. *Cell Cycle*. 2006;5:878-82.
169. Zhao H, Tanaka T, Mitlitski V, Heeter J, Balazs EA, Darzynkiewicz Z. Protective effect of hyaluronate on oxidative DNA damage in WI-38 and A549 cells. *Int J Oncol*. 2008;32:1159-69.
170. Halicka HD, Darzynkiewicz Z, Teodori L. Attenuation of constitutive ATM activation and H2AX phosphorylation in human leukemic TK6 cells by their exposure to static magnetic field. *Cell Cycle*. 2009;8:3236-8.
171. Halicka HD, Ita M, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z. The biscochlorine alkaloid cepharanthine protects DNA in TK6 lymphoblastoid cells from constitutive oxidative damage. *Pharmacol Rep*. 2008;60:93-100.
172. Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, Dominiczak MH, Stepinski JK, Angielski S. Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393:268-73.
173. 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. *Metabolism*. 2005;54:829-34.
174. Kane DA, Andersen EJ, Price JW III, Woodlief TL, Lin C-T, Bikman BT, et al. Metformin selectively attenuates mitochondrial H₂O₂ emission without affecting respiratory capacity in skeletal muscle of obese rats. *Free Radical Biol Med*. 2010;49:1082-7.
175. Piro S, Rabuazzo AM, Renis M, Purrello F. Effects of metformin on oxidative stress, adenine nucleotides balance and glucose-induced insulin release impaired by chronic FFA exposure in rat pancreatic islets. *J Endocrinol Invest*. 2012;35(5):504-10.
176. Bellin C, de Wiza DH, Wiernsperger NF, Rosen P. Generation of reactive oxygen species by endothelial and smooth muscle cells: Influence of hyperglycemia and metformin. *Horm Metab Res*. 2006;38:732-9.
177. Hou X, Song J, Li X-N, Zhang L, Wang XL, Chen L, et al. Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396:199-205.
178. Drose S, Hanley PJ, Brandt U. Ambivalent effects of diazoxide on mitochondrial ROS production at respiratory chain complexes I and II. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:558-65.
179. Olsen AK, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;207:521-31.
180. Hales BF. DNA repair disorders causing malformations. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15:234-40.
181. Hassa PO, Hottiger MO. An epigenetic code for DNA damage repair pathways? *Biochem Cell Biol*. 2005;83:270-85.

182. Kefas BA, Cai Y, Kerckhofs K, Ling Z, Marten G, Heimberg H, et al. Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:409-16.
183. Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auburger P, et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene.* 2008;27:3576-86.
184. Saito T, Chiba T, Yuki K, Zen Y, Oshima M, Koide S, et al. Metformin, a diabetes drug, eliminates tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *PloS one.* 2013;8.7:e70010.
185. Chen HP, Shieh JJ, Chang CC, Chen TT, Lin JT, Wu MS, et al: Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and in vitro studies. *Gut.* 2013;62(4):606-15.
186. Xiong Y, Lu QJ, Zhao J, Wu GY: Metformin inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells by inducing apoptosis via mitochondrion-mediated pathway. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13:3275-9.
187. Xia C, Chen R, Chen J, Qi Q, Pan Y, Du L, et al. Combining metformin and nelfinavir exhibits synergistic effects against the growth of human cervical cancer cells and xenograft in nude mice. *Scientific Reports.* 2017;7:43373.
188. Tyszka-Czochara M, Konieczny P, Majka M. Caffeic acid expands anti-tumor effect of metformin in human metastatic cervical carcinoma HTB-34 cells: implications of AMPK activation and impairment of fatty acids de novo biosynthesis. *International journal of molecular sciences.* 2017;18.2:462.
189. Tyszka-Czochara M, Bukowska-Strakova K, Majka M. Metformin and caffeic acid regulate metabolic reprogramming in human cervical carcinoma SiHa/HTB-35 cells and augment anticancer activity of Cisplatin via cell cycle regulation. *Food and Chemical Toxicology.* 2017;106:260-72.
190. Xiao X, He Q, Lu C, Werle KD, Zhao RX, Chen J, et al. Metformin impairs the growth of liver kinase B1-intact cervical cancer cells. *Gynecologic oncology.* 2012;127.1:249-55.
191. Heckman-Stoddard BM, Gandini S, Puntoni M, Dunn BK, DeCensi A, Szabo E. Repurposing old drugs to chemoprevention: the case of metformin. *Semin. Oncol.* 2016;43(1):123-33.
192. Guo Q, Liu Z, Jiang L, Liu M, Ma J, Yang C, et al. Metformin inhibits growth of human non-small cell lung cancer cells via liver kinase B-1-independent activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Mol Med Rep.* 2016;13(3):2590-6.
193. Sacco F, Calderone A, Castagnoli L, Cesareni G. The cell-autonomous mechanisms underlying the activity of metformin as an anticancer drug. *Br J Cancer.* 2016;115(12):1451-6.
194. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. *Diabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu-2017.* 9. baskı. ANKARA. 2017.

- 195.**Dinççağ N. Diabetes Mellitus Tanı ve Tedavisinde Güncel Durum. Türk İç hastalıkları Dergisi.2011;18:181-223.
- 196.**Celeromics. [Erişim tarihi 14 Ocak 2018] Erişim adresi: <http://www.celeromics.com/en/about-us/company.php>.



ÖZGEÇMİŞ

1. Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı : Tuba SARIAYDIN
Doğum Tarihi ve Yeri : 10/01/1985 Osmaniye
Halen Görevi : Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Yazışma Adresi : Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp Kliniği Merkez – Çorum
Telefon : 0507 218 39 28
E-Mail : drtubasariaydin@gmail.com

2. Eğitim

Yılı	Üniversite	Öğrenim Alanı
2012 - 2018	Hacettepe Üniversitesi	Farmasötik Toksikoloji (Doktora)
2012 - 2016	Ankara Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Acil Tıp Uzmanlığı
2002 - 2009	Ankara Üniversitesi	Tıp Fakültesi

3. Görevler

Görev Dönemi	Ünvan	Bölüm	Üniversite
2016 - Halen	Uzm. Dr.	Acil Tıp	Hitit Üniversitesi Erol Olçok EAH
2012 - 2016	Asistan Dr.	Acil Tıp	Ankara Keçiören EAH
2011 - 2012	Asistan Dr.	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Konya Meram Tıp Fakültesi
2009 - 2010	Pratisyen Dr.	Halk Sağlığı	Sultanbeyli Erguvan Sağlık Ocağı

4. Seminer ve Sertifikalar

Tarih	Seminer ve Sertifika	Kurum
2017	Kapatoks Toksikoloji Sempozyumu	ATUDER
2016	KVS ne Solunum Acilleri	ATUDER - ATOK
2016	USG Kursu	ATUDER
2016	İstatistik Kursu	ATUDER
2014	Acil Servis Personeli Hukuki Sorumlulukları	Sağlık Bakanlığı
2014	4. Avrasya Acil Tıp Kongresi	TATD
2013	9. Acil Tıp Kongresi	TATD
2013	Acilde Sık Karşılaşılan Vakalar	ATUDER - ATOK
2013	Temel Acil Ultrason Eğitimi	TATD
2010	Aile Hekimliği 1. Aşama Uyum Eğitimi	Sağlık Bakanlığı
2009	RIA kursu	Sağlık Bakanlığı