



T.C  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**METFORMİN VE PİOGLİTAZON'UN *IN VITRO*  
SİTOTOKSİSİTESİ VE TAVUK EMBRİYOSU  
KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİNDE ANJİOGENEZ  
İNHİBİSYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Yasemin PEKŞEN**  
**UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**SİVAS**  
**2010**



**T.C**  
**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**METFORMİN VE PİOGLİTAZON'UN *IN VITRO***  
**SİTOTOKSİSİTESİ VE TAVUK EMBRİYOSU**  
**KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİNDE ANJİOGENEZ**  
**İNHİBİSYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Yasemin PEKŞEN**  
**UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**Prof. Dr. Mehmet ŞENCAN**  
**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**SİVAS**  
**2010**

Bu tez, Cumhuriyet Üniveristesi Tıp Fakültesi, Tez Yazın Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

### **İmza**

**Üye:** Prof.Dr. Mehmet ŞENCAN

**Üye:** Doç.Dr.N.Özlem SAYGILI YÖNEM

**Üye:** Yrd. Doç.Dr. Saadettin KILIÇKAP

Bu tez, 08/07/2010 tarih ve 2010/9 sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Mehmet ŞENCAN**

**Tıp Fakültesi Dekanı**

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 10/02/2010 tarih ve 2010/1-2 sayılı kararı ile uygun görülen Tıpta Uzmanlık Tez Yazım Yönergesi'ne göre hazırlanmıştır.

## TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince yetiŐmemde büyük katkıları bulunan Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet ŞENCAN'a, Bilim Dalımızın değerli öğretim üyelerine uzmanlık eğitimim boyunca yaptıkları akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim.

CÜTFAM laboratuvarında deneylerin gerçekleşmesinde, teknik destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli Doç. Dr. Zübeyde Akın POLAT'a, Dr. Ahmet ALTUN'a ve çalışmanın istatistiğinin yapılmasında katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım ve asistanlığım süresince özveri ile beni her konuda destekleyen değerli aileme de teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Dr. Yasemin PEKŞEN

## ÖZET

### METFORMİN VE PIOGLİTAZON'UN *IN VITRO* SİTOTOKSİSİTESİ VE TAVUK EMBRİYOSU KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİNDE ANJİOGENEZ İNHİBİSYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Yasemin PEKŞEN

Tıpta Uzmanlık

Sivas

2010

Diyabet, dünya çapında tüm yaş gruplarını etkileyen, komplikasyonlar ile seyreden, tedavi maliyeti giderek artan bir hastalıktır.

Anjiogenez yeni kapiller damar gelişimi olup, birçok fizyolojik olay yanı sıra diyabetik retinopati, tümör gelişimi ve tümör metastazında da sorumlu tutulmaktadır. Diyabette kanser insidansının ve tümör metastazının pek çok farklı mekanizma ile arttığı tespit edilmiştir. Bu mekanizmalardan birisi de anjiogenezistir.

Diyabet tedavisinde metformin ve pioglitazon uzun yıllardır kullanılan temel ilaçlardır. Metformin ve pioglitazon molekülleri farklı pek çok mekanizma ile tümör hücrelerinin büyümesini önlemektedir. Çalışmamızda metformin ve pioglitazon moleküllerinin anjiogenez üzerine olan etkisini; ucuz, güvenilir ve uygulanabilirliği kolay olan tavuk embriyosu koryoallantoik membran modelini kullanarak göstermeyi amaçladık. Sonuçta pioglitazon molekülünün metformine göre anti-anjiogenik etkinliğinin güçlü olduğunu tespit ettik. Bu etkisinden faydalanılarak diyabetik retinopatili ve kanserli olgularda yararlı etkilerinin olabileceği kanısına vardık.

Bu çalışmada ayrıca metformin ve pioglitazon moleküllerinin *in vitro*, çok sayıda örneği aynı anda, kısa sürede ve güvenilir bir şekilde değerlendirme imkânı sağlayan XTT yöntemi ile L929 fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesini de araştırdık. Bu araştırmamızın sonucunda, metformin ve pioglitazon moleküllerinin sitotoksik etkilerinin olmadığını tespit ettik.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabet, Kanser, Anjiogenez, Sitotoksosite, Anti-diyabetikler

**Proje Numarası:** T419

## ABSTRACT

### ***IN VITRO* CYTOTOXICITY OF METFORMIN AND PIOGLITASONE AND ITS EFFECT ON ANGIOGENESIS INHIBITION IN CHORIOALLANTOIC MEMBRANE OF CHICKEN EMBRYO**

**Dr. Yasemin PEKŞEN**

**Sivas**

**2010**

Diabetes mellitus is a such disease that influences all age groups worldwide, progressing with complications and its treatment cost has been gradually increasing.

Angiogenesis is new vessel development and it is held to account for diabetic retinopathy, tumour development and tumour metastasis as well as many physiological events. It is detected that carcinoma incidence and tumour metastasis in diabetes are increased due to many different mechanisms. One of these mechanisms is angiogenesis.

The metformin and pioglitazone are primary drugs used in diabetes treatment for a long time. Metformin and pioglitazone molecules prevents enlargement of tumour cell with many different mechanisms. In our study, we aimed to reveal the effects of metformin and pioglitazone molecules on the angiogenesis, using chicken embryo chorioallantoic membrane model which is cheap, reliable and practical. Ultimately, we detected that anti-angiogenic efficiency of pioglitazone molecule was more powerful than metformin. Because of this effect, we concluded that it may have useful effects in patients with diabetic retinopathy and carcinoma.

In this study, we also investigated the cytotoxicity of pioglitazone and metformin molecules on L929 mice fibroblast cells *in-vitro*, using XTT method which provides opportunity for evaluating numerous samples in a short time, simultaneously and reliably. Following this review, we detected that metformin and pioglitazone molecules do not have cytotoxic effects.

**Key words:** Diabetes, Carcinoma, Angiogenesis, Cytotoxicity, Anti-diabetics

**Project number:** T419

## İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| TEŞEKKÜR .....  | i    |
| ÖZET .....  | ii   |
| ABSTRACT .....  | iii  |
| İÇİNDEKİLER.....  | iv   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                           | vi   |
| ŞEKİLLER .....  | iiix |
| TABLolar .....  | xi   |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ.....                                    | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                 | 3    |
| 2.1. Diabetes Mellitus .....                            | 3    |
| 2.1.1. Tanım.....                                       | 3    |
| 2.1.2. Epidemiyoloji.....                               | 3    |
| 2.1.3. Diyabetin Sınıflandırılması.....                 | 4    |
| 2.1.4. Tanı.....  | 6    |
| 2.2 Tip 2 Diabetes Mellitus .....                       | 7    |
| 2.2.1 Diabetes Mellitus'un Kronik Komplikasyonları..... | 7    |
| 2.2.1.1 Makrovasküler Komplikasyonlar .....             | 8    |
| 2.2.1.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar .....            | 8    |
| 2.2.1.2.1. Retinopati .....                             | 8    |
| 2.2.1.2.2. Nefropati.....                               | 9    |
| 2.2.1.2.3. Diyabetik Nöropati.....                      | 11   |
| 2.2.2 Diabetes Mellitus'ta Oral Ajan Tedavisi .....     | 11   |
| 2.2.2.1 Metformin .....                                 | 11   |
| 2.2.2.1.1 Etki Mekanizması .....                        | 11   |
| 2.2.2.1.2 Klinik Kullanım .....                         | 12   |
| 2.2.2.1.3 Yan Etkiler.....                              | 12   |
| 2.2.2.2. Pioglitazon.....                               | 13   |
| 2.2.2.2.1 Etki mekanizması.....                         | 13   |
| 2.2.2.2.2 Yan Etkiler.....                              | 14   |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.3. Diyabet ve Kanser .....  | 14 |
| 2.3 Anjiogenezis .....  | 17 |
| 2.3.1. Anjiogenez Mekanizması.....  | 18 |
| 2.3.2. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenez.....  | 19 |
| 2.3.3. Tümör Anjiogenezi.....   | 21 |
| 2.4. Koryoallantoik Membran Modeli .....  | 22 |
| 2.5. Hücre Kültürü .....  | 25 |
| 2.5.1. Hücre Kültürlerinin Sınıflandırılması.....   | 26 |
| 2.5.2. Hücre Kültüründe Sitotoksik Etkilerin İncelenmesi.....   | 27 |
| 2.5.3. XTT Yöntemi .....  | 28 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM.....   | 30 |
| 3.1. Metformin ve Pioglitazon Molekülleri.....  | 30 |
| 3.2 KAM Deneyi.....   | 31 |
| 3.3. Hücre Kültürü .....  | 40 |
| 4. BULGULAR .....   | 46 |
| 4.1. Metformin ve Pioglitazon Moleküllerinin Anjiogenez İnhibisyonu Üzerine Etkileri.....                             | 46 |
| 4.2. Metformin ve Pioglitazon Moleküllerinin XTT Yöntemi İle <i>In vitro</i> Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi ..... | 54 |
| 5.TARTIŞMA.....   | 56 |
| 5.1. Metformin ve Pioglitazonun Anti-anjiogenik Etkileri .....  | 56 |
| 5.2. Metformin ve Pioglitazon Moleküllerinin XTT Yöntemi İle Sitotoksitesinin Gösterilmesi.....                       | 65 |
| 6.SONUÇ VE ÖNERİLER .....   | 70 |
| 7.KAYNAKLAR.....  | 71 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>ADA</b>            | : Amerikan Diyabet Derneği (American Diabetes Association)                                  |
| <b>AMP</b>            | : Adenin Mono Phosphate   |
| <b>APG</b>            | : Açlık Plazma Glukozu  |
| <b>BcL-XL</b>         | : B-cell Lymphoma-Extra Large   |
| <b>bFGF</b>           | : Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (Basic Fibroblast Growth factor)                          |
| <b>BT-474</b>         | : Breast Tumor cell line-474  |
| <b>CDKs</b>           | : Cycline Dependent Kinase  |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | : Karbondioksit   |
| <b>COX-2</b>          | : Cyclooxygenase-2  |
| <b>CXCR4</b>          | : Chemokine Receptor4   |
| <b>DMEM</b>           | : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  |
| <b>DMSO</b>           | : Dimetil Sulfoksit   |
| <b>ECM</b>            | : Extracellüler Matriks   |
| <b>EDTA</b>           | : Ethylenediaminetetraacetic Acid   |
| <b>ELİSA</b>          | : Enzyme Linked Immunosorbent Assay   |
| <b>ERK-1/2</b>        | : Extracellüler Signal Regulated Kinases-1/2  |
| <b>ETDRS</b>          | : Erken Diyabetik Retinopati Tedavi Çalışması (Early Treatment Diabetic Rethinopathy Study) |
| <b>FBS</b>            | : Fetal Bovine Serum  |
| <b>FFA</b>            | : Serbest Yağ Asidi (Free Fatty Acid)   |
| <b>GFH</b>            | : Glomerüler Filtrasyon Hızı  |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>GLUT-1-4</b> | : Glukoz Trasporter Type 1-4   |
| <b>GDM</b>      | : Gestasyonel Diyabetes Mellitus   |
| <b>HbA1c</b>    | : Hemoglobin A1-c  |
| <b>HBV</b>      | : Hepatit B Virus  |
| <b>HCC</b>      | : Hepatosellüler Kanser  |
| <b>HCV</b>      | : Hepatit C Virus  |
| <b>HDL</b>      | : High Density Lipoprotein (Yüksek Dansiteli Lipoprotein)                            |
| <b>HUVEC</b>    | : Human Umbilical Vein Endothelial Cells   |
| <b>HÜKÜK</b>    | : Hücre Kültür Koleksiyonu   |
| <b>IDF</b>      | : Uluslar arası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)              |
| <b>IFG</b>      | : Bozulmuş Açlık Glukozu (Impaired Fasting Glucose)                                  |
| <b>IGF-1</b>    | : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin Like of Growth Factor-1)                   |
| <b>IGT</b>      | : Bozulmuş Glukoz Toleransı (Impaired Glucose Tolerance)                             |
| <b>IL-1</b>     | : İnterlökin-1   |
| <b>IRMA</b>     | : İntra Retinal Mikrovasküler Anomali  |
| <b>KAM</b>      | : Koryoallantoik Membran   |
| <b>LADA</b>     | : Erişkinlerin yavaş seyirli otoimmün diyabeti (Latent Autoimmune Diabetes of Adult) |
| <b>LKB-1</b>    | : Serine/threonine kinase 11   |
| <b>MAPK</b>     | : Mitogen-Activated Kinase   |
| <b>MCF-7</b>    | : Michigan Cancer Foundation – 7   |
| <b>MI</b>       | : Myokard infarktüsü   |
| <b>MODY</b>     | : Gençlerin erişkin tip diyabeti (Maturity Onset Diabetes of the Young)              |
| <b>MTT</b>      | : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide, a                   |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
|                                 | tetrazole   |
| <b>mTOR</b>                     | : Mammalian Target of Rapamycin   |
| <b>OGTT</b>                     | : Oral Glukoz Tolerans Testi  |
| <b>PBS</b>                      | : Phosfate Buffer Sline   |
| <b>PDGF</b>                     | : Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor)   |
| <b>PIGF-1</b>                   | : Phosphatidylinositol Glycan F-1   |
| <b>PPAR-<math>\gamma</math></b> | : Peroksizom Proliferasyonunu aktive eden resptör- $\gamma$ (Peroxisome proliferatör Activated Receptör- $\gamma$ ) |
| <b>SDBY</b>                     | : Son Dönem Böbrek Yetmezliği   |
| <b>TGF-<math>\alpha</math></b>  | : Transforming Growth Factor- $\alpha$  |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>   | : Transforming Growth Factor- $\beta$   |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>  | : Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ ( Tümör Necrosis Factor- $\alpha$ )   |
| <b>TURDEP</b>                   | : Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu  |
| <b>TZD</b>                      | : Thiazolidinedion  |
| <b>XTT</b>                      | : 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide                      |
| <b>VEGF</b>                     | : Vasküler Endotelyal Faktör (Vascular Endotelial Growth Factor)  |

## ŞEKİLLER

- Şekil 2.1 :** Beş günlük embriyoda allantoik kese ve allantoik damarların görüntüsü (Ribatti, 2008)
- Şekil 2.2 :** XTT yapısında bulunan tetrazolium halkalarının mitokondrial enzimlerce parçalanarak renkli formazon kristallerini oluşturması
- Şekil 3.1 :** Metformin molekülünün şekli
- Şekil 3.2 :** Pioglitazon molekülünün şekli
- Şekil 3.3 :** Döllenmiş tavuk yumurtasının şematik görüntüsü
- Şekil 3.4 :** Döllenmiş tavuk yumurtalarının silinerek kuluçkaya alınması
- Şekil 3.5 :** Embriyolu yumurtaların 5. gününde kapaklarının açılması
- Şekil 3.6 :** Kuluçkanın 5. gününde yumurtalar açılıp 72 saat inkübasyonda bırakıldıktan sonra gruplara ayrılması
- Şekil 3.8 :** KAM üzerine etken maddeli pelletlerin konulması
- Şekil 3.9 :** KAM üzerine yerleştirilen etken maddeyi içeren pellet
- Şekil 3.10 :** Tüm grupların kontrol grupları ile birlikte mikroskopta değerlendirilip skorlanması
- Şekil 3.11 :** Skorlamada kullanılan pelletlerin steriomikroskopik görüntüsü
- Şekil 3.12 :** Koryoallantoik membran modelinin özeti
- Şekil 3.13 :** Hücre kültüründe kullanılan malzemeler
- Şekil 3.14 :** L929 fibroblast hücre serisindeki hücrelerin  $\times 200$  büyütmedeki görüntüleri
- Şekil 3.15 :** XTT solüsyonu eklendikten sonra turuncu renk almış mikropate kuyucuklarının görünümü

- Şekil 4.1 :** Grupların kendi içlerinde  $10^{-5}$  molar konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı
- Şekil 4.2 :** Gruplar arası  $10^{-5}$  molar konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı
- Şekil 4.3 :** Grupların kendi içlerinde  $10^{-6}$  molar konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı
- Şekil 4.4 :** Gruplar arası  $10^{-6}$  molar konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı
- Şekil 4.5 :** Grupların kendi içlerinde  $10^{-7}$  molar konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı
- Şekil 4.6 :** Gruplar arası  $10^{-7}$  molar konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı

## TABLULAR

- Tablo 2.1 :** Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflaması
- Tablo 2.2 :** Diabetes mellitus ve diğer glukoz metabolizma bozukluklarında tanı kriterleri
- Tablo 2.3 :** Tip 2 diyabetle ilişkili kronik komplikasyonlar
- Tablo 2.4 :** Önemli anjiogenik faktörler ve etki mekanizmaları
- Tablo 2.5 :** KAM modeli ile çalışmanın avantajları ve dezavantajları
- Tablo 3.1 :** Koryoallantoik membran üzerinde anjiogenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri
- Tablo 3.2 :** Çalışmada kullanılan ilaç gruplarında uygulama sayısı
- Tablo 3.3 :** Hücre kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan malzemeler
- Tablo 3.4 :** Test sıvılarının mikropate içindeki yerleşimleri
- Tablo 4.1 :** Gruplara ait  $10^{-5}$  molaritedeki anjiogenez inhibisyon skorlarının karşılaştırılması
- Tablo 4.2 :** Gruplara ait  $10^{-6}$  molaritedeki anjiogenez inhibisyon skorlarının karşılaştırılması
- Tablo 4.3 :** Gruplara ait  $10^{-7}$  molaritedeki anjiogenez inhibisyon skorlarının karşılaştırılması
- Tablo 4.4 :** Metformin ve pioglitazon  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarında karşılaştırılması

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM), insülin eksikliği ya da insülinin etkisindeki bozukluklar nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, sürekli tıbbi bakım gerektiren, kronik bir metabolizma hastalığıdır (1). Pankreastaki insülin sekresyonunun mutlak veya rölatif eksikliği, insülin etkisizliği ya da insülin molekülündeki yapısal bozukluklar sonucunda oluşan bu hastalık, etyolojisi, genetik ve klinik tablosu ile heterojen özellikler taşır (2).

Yaşam tarzı değişikliği ve ilaç tedavisi ile Tip 2 diyabet önlenebilirken, tip 1 diyabette bu henüz başarılammıştır. Tip 2 diyabet tanısı almış hastaların %20-50'sinde tanı anında mikrovasküler ve/veya makrovasküler komplikasyonlar gelişmiş olarak karşımıza çıkmaktadır (3). Bu nedenle kan glukoz seviyelerinin kontrolü için genellikle farmakolojik tedaviler gerekmektedir.

Tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan ve yeni tanı diyabet ile bozulmuş glukoz toleransında ilk tercih olarak kullanılan metforminin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İntestinal glukoz absorpsiyonunu azaltması, hepatik glukoz yapımını artırması, kas ve adipoz dokuda glukoz *uptake*'ni artırması ve GLUT-1 ile GLUT-4'ün plazma membranına translokasyonunu artırarak antihiperglisemik etkinlik sağladığı ileri sürülmektedir (4). Metformin etkin kan glukoz kontrolü, düşük yan etki profili ve özellikle kilolu hastalarda yararlı etkileri ile birçok hastada temel ilaç olarak kullanılmaktadır (3).

Pioglitazon, tiyazolidinedion türevidir oral antidiyabetik bir ilaçtır. PPAR- $\gamma$  yolu ile periferik dokularda insülin sensitivitesini artırır. Tip 2 diyabet tedavisinde monoterapide plazma glukoz, insülin, C-peptid ve hemoglobin A1c'de anlamlı düşüöşlere neden olur. İnsülin varlığında kas ve yağ dokusunda glukoz *uptake*'ini, GLUT-1 ve GLUT-4 reseptör ekspresyonunu, glikojen sentaz aktivitesini artırırken serbest yağ asitlerini, trigliserid klirensini, hepatik glukoneogenezi ve TNF- $\alpha$ 'yı azaltır (5-6).

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiogenez vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilir. Fizyolojik anjiogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme

sisteminde gözlenir (7). İnflamatuvar hastalıklarda (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, böbrek, pankreas, uterus, serviks kanseri, nöroblastom, melanom, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retinopati) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yara iyileşmesinde ise anjiyogenezin yetersizliği söz konusu olmaktadır (8). Son yıllarda özellikle aşırı, yetersiz veya bozuk anjiyogenezin çok sayıda hastalığın patogenezinde rol oynadığı belirlenmiştir. Bu nedenle anjiyogenezi önleyici veya başlatıcı faktörlerle tedaviler önem kazanmıştır. Ancak tek bir anjiyogenez inhibitörü ile yapılan tedavilerin özellikle kanser hücreleri tarafından oluşturulan çok sayıdaki anjiyogenik faktörler ile mücadelede yetersiz kalabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle gelecek yıllarda anjiyogenik hastalıkların moleküler temellerinin daha iyi belirlenmesi, yeni tedavi modellerinin geliştirilmesi açısından önemli olacaktır.

Bizim çalışmamızda diyabetin tedavisinde klinikte sürekli olarak kullanılan metforminin ve pioglitazon moleküllerinin uygun hücre kültürleri yapılarak hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirilmesi ve Koryoallantoik membran modeli (KAM) kullanılarak anti-anjiyogenik etkilerinin tespit edilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Bu araştırma sırasında bu ilaçların canlı hayvan kullanılmadan anti-anjiyogenik etkilerinin ortaya konulması için memeli modeline alternatif olabilen etkin ve ucuz bir yöntem olan tavuk embriyosu KAM modeli seçilmiştir. Ayrıca tavuk embriyosu KAM modeli anisotropik difüzyon özelliği ile test edilen ilaçların teröpatik etkinliğini çok iyi yansıttığı için anjiyogenez ve antianjiyogenik etkinliği göstermede iyi bir tarama aracı olarak kullanılabilir (9). Ayrıca bu çalışma ile bildiğimiz kadarıyla literatürde bu ilaçların *in vitro* olarak XTT yöntemi ile sitotoksik etkilerinin araştırıldığı ve KAM modeli kullanılarak anjiyogenez inhibisyonu üzerine etkisinin karşılaştırıldığı bir çalışma yoktur. Çalışmamızın sonuçlarının bu konu ile ilgili ileride yapılacak olan çalışmalara da ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Diabetes Mellitus**

#### **2.1.1. Tanım**

Diabetes Mellitus (DM), insülin salgısının mutlak veya göreceli eksikliği ve/veya insülin direnci ile oluşan, hiperglisemi ile kendini belli eden, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları ile karakterize kronik ve progresif bir metabolizma hastalığıdır (5).

#### **2.1.2. Epidemiyoloji**

Diyabet dünya çapında tüm yaş gruplarını etkileyen, birçok komplikasyon ile seyreden önemli bir hastalıktır. Dünya’da 1985 yılında 30 milyona yakın insan diyabet tanısı almış olup bu rakam 2000 yılında 150 milyona ulaşmıştır (10). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre 2007 yılı itibari ile dünyada 246 milyon diyabetli kişinin yaşadığı, bunların %46’sının orta (40-59) yaş grubunda olduğu ve önlem alınmazsa 2025 yılında diyabetli nüfusun 380 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (11).

Diyabet insidansı farklı etnik gruplar ve ülkeler arasında farklılık göstermekle beraber, genellikle Tip 2 diyabet ortalama %5-10, Tip 1 diyabet ise % 0.5-1 civarındadır. Bozulmuş açlık glikozu (IFG) ve bozulmuş glikoz toleransı (IGT) giderek artmakta ve genellikle yaş ilerledikçe daha fazla görülmektedir. IGT’nin 20-44 yaş grubunda %3-5 olan prevalansı, 65-74 yaş grubunda %20-30’a yükselmektedir (12).

Ülkemizde yapılan en geniş çalışma Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırması (TURDEP) olup; 20 yaş ve üzerinde, %45’i erkek ve %55’i kadın; toplam 24.788 hastadan oluşan, toplum kökenli kesitsel bir alan çalışmasıdır. TURDEP’in 20 yaş üstü genel sonuçlarına göre diyabet %7,2 oranında saptanmış olup bu rakamın %67,7’si daha önce tanı almış; %32,3’ü ise yeni tanı almış vakalardan oluşmaktadır (13).

### 2.1.3. Diyabetin Sınıflandırılması

Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği'nin Diyabet Klavuzu'nda yayınlanan etiyolojik sınıflama Tablo 2.1.'de gösterilmiştir (14).

Tip 1 diyabet, pankreas beta hücrelerinin, selektif ve ilerleyici harabiyetine bağlı tüm diyabet hastalarını kapsamaktadır (15). Tip 2 diyabette ise 3 ana patolojik bozukluk mevcuttur. Bunlar; karaciğerde glukoz üretiminin artışı, bozulmuş insülin sekresyonu ve çevresel insülin direncidir (16). Diyabetin bazı formları mutlak insülin yetersizliği veya insülin sekresyonunda bozukluğa yol açan genetik bir kusur ile karakterize iken, diğer bazı formlarında insülin direnci söz konusudur (17).

Ayrıca diyabetin iki özel formu olan gençlerin erişkin tip diyabeti ve erişkinlerin geç otoimmün diyabetini de göz önünde bulundurmalıdır. Gençlerin erişkin tip diyabeti (maturity onset diabetes of the young: MODY) otozomal dominant kalıtım, erken başlayan hiperglisemi ve insülin sekresyonunda bozulma ile karakterize olan bir diyabet subtipidir (17). Latent Autoimmune Diabetes of Adult (LADA) ise klasik Tip 1 diyabet klinik manifestasyonunun aksine erişkinde yanlışlıkla tip 2 diyabet tanısı konulacak kadar yavaş seyreden otoimmün Tip 1 diyabet formudur (19).

**Tablo 2.1.** Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflaması

|   |   |
|---|---|
| <b>I. Tip 1 diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan <math>\beta</math>-hücre yıkımı vardır)</b>  |   |
| A. İmmün aracılıklı   |   |
| B. İdiopatik  |   |
| <b>II. Tip 2 diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir.)</b>   |   |
| <b>III. Diğer spesifik diyabet tipleri</b>  |   |
| <b>A. <math>\beta</math>-hücre fonksiyonlarının genetik defekti</b><br>(monogenik diyabet formları)<br>HNF-1 $\alpha$ (MODY3), Glukokinaz (MODY2),<br>HNF-4 $\alpha$ (MODY1), IPF-1 (MODY4),<br>HNF-1 $\beta$ (MODY5), NeuroD1 (MODY6),<br>Mitokondriyal DNA, vd.   | <b>E. İlaç veya kimyasal ajanlar</b><br>Vacor, Pentamidin, Nikotik asit,<br>Glukokortikoidler, Tiroid hormonu, Diazoksid,<br>Tiyazidler, $\beta$ -adrenerjik agonistler, Dilantin, $\alpha$ -<br>İnterferon, Atipik anti-psikotikler, Antiviral<br>ilaçlar vd.)   |
| <b>B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler</b><br>Tip A insülin direnci, Leprechaunism, Rabson-<br>Mendenhall sendromu, Lipoatrofik<br>diyabet vd.   | <b>F. İnfeksiyonlar</b><br>Konjenital Rubella, Sitomegalovirus vd.  |
| <b>C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları</b><br>Pankreatit, travma/pankreatektomi, neoplazi,<br>kistik fibroz, hemokromatoz,<br>fibrokalkülöz pankreatopati, vd.   | <b>G. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları</b><br>Stiff-man sendromu, Anti-insülin reseptör<br>antikorları, vd.  |
| <b>D. Endokrinopatiler</b><br>Akromegali, Cushing sendromu,<br>Glukagonoma, Feokromositoma, Hipertiroidi,<br>Aldosteronoma, Somatostatinoma vd.   | <b>H. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar</b><br>(Monogenik diyabet formları.)<br>Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner<br>sendromu, Wolfram (DIDMOAD) sendromu,<br>Friedreich tipi ataksi, Huntington Korea,<br>Laurence-Moon-Biedl sendromu, Miyotonik<br>distrofi, Porfiria, Prader-Willi sendromu.,<br>Alström sendromu vd. |
| <b>IV. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM) (Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet)</b>  |   |
| <b>HNF-1<math>\alpha</math>:</b> Hepatosit nükleer faktör-1 $\alpha$ ; <b>MODY 1-6:</b> Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları 1-6 (maturity onset diabetes of the young 1-6), <b>HNF-4<math>\alpha</math></b> Hepatosit nükleer faktör- $\alpha$ , <b>IPF-1:</b> İnsülin promotör faktör-1, <b>HNF-1<math>\beta</math>:</b> Hepatosit nükleer faktör-1 $\beta$ , <b>NeuroD1:</b> Nörojenik diferansiyasyon 1, <b>DNA:</b> Deoksi-ribonükleik asit, <b>DIDMOAD sendr.:</b> Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optik atrofi ve sağırılık (deafness) ile seyreden sendrom (Wolfram sendromu) |   |

#### 2.1.4. Tanı

Diyabet tanısı için kan glikoz ölçümü ve Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT) en sık kullanılan testlerdir (20). ADA'nın yayınladığı son kriterlere göre Hb A1c de tanı kriterlerinde yerini almıştır.

ADA'nın yayınladığı yeni tanı kriterleri Tablo 2.2.' de görülmektedir.

**Tablo 2.2.** Diabetes mellitus ve diğer glukoz metabolizma bozukluklarında tanı kriterleri

| <b>Diabetes Mellitus</b>                                    |               |
|---|---------------|
| Rasgele glukoz [ + Diyabet Semptomları ]                    | ≥200mg/dl     |
| Açlık Plazma Glukozu (APG)<br>[En az 8 saat açlığı takiben] | ≥126 mg/dl    |
| OGTT'de 2. saat Plazma Glukozu                              | ≥200 mg/dl    |
| <b>Bozulmuş Glukoz Toleransı (BGT)</b>                      |               |
| OGTT'de 2. saat Plazma Glukozu                              | 140-199 mg/dl |
| <b>Bozulmuş Açlık Glukozu (IFG) **</b>                      |               |
| Açlık Plazma Glukozu (APG)<br>[En az 8 saat açlığı takiben] | 100-125 mg/dl |

HbA1c ≥ % 6,5 olması. Yalnız bu test NGSP ve DCCT yöntemi ile standardize edilmiş bir metod kullanılarak ölçülmelidir (21).

\* Glisemi venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemi ile 'mg/dl' olarak ölçülmüştür.

\*\* 2006 yılı WHO/IDF Raporunda normal APG kesim noktasının 110mg/dl ve IFG: 110-125 mg/dl olarak korunması benimsenmiştir.

**OGTT:** Oral Glukoz Tolerans Testi (75gr ile)

## 2.2 Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 diyabet; insülin eksikliğinden çok hücresele düzeyde insülinin kullanılamamasından kaynaklanır (21). Doymuş yağdan zengin diyetle beslenme, hareketsiz yaşam, stres, obezite ve yaşlanma tip 2 diyabetin sıklığı ile yakın ilişkisi olan yaşam biçimi faktörleridir. Tip 2 diyabet etiolojisinde primer kusur hakkında tartışma varsa da, çalışmaların çoğu insülin direncinin insülin sekresyon kusurundan önce olduğu görüşünü desteklemektedir (17). İlerleyici bir hastalıktır ve değişken oranlarda insülin direnci ve ilerleyici  $\beta$ - hücre disfonksiyonu ile rölatif, bazı bireylerde ise mutlak insülin sekresyonu eksikliği ile karakterizedir. Hastaların üçte biri ile dörtte birinde hipergliseminin kontrolü için eninde sonunda insülin tedavisi gerekmektedir. Tip 2 diyabet çoğunlukla uzun yıllar boyunca belirtisiz ve bulgusuz tanı konmadan süregelmekte ve bu süreçte metabolik bozukluklar ve değişik dokularda yıpranmalar oluşmaktadır (22).

### 2.2.1 Diabetes Mellitus'un Kronik Komplikasyonları

Tip 2 diyabetik hastaların dokularında ve çeşitli organlarında bazı morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel değişiklikler oluşur. Kronik komplikasyonlar tip 2 diyabetin morbidite ve mortalitesinden esas sorumlu olan, birçok organı tutabilen, hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve erken ölüme sonuçlanabilen önemli sorunlardır. Tip 2 diyabetle ilişkili kronik komplikasyonlar Tablo 2.3.'te sınıflandırılmıştır (19).

**Tablo 2.3.** Tip 2 diyabetle ilişkili kronik komplikasyonlar

| Vasküler Komplikasyonlar   | Nöropati Sendromları  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li><i>Makrovasküler Komplikasyonlar</i><ul style="list-style-type: none"><li>-Hızlanmış koroner ateroskleroz</li><li>-Hızlanmış serebral ateroskleroz</li><li>-Hızlanmış periferik vasküler hastalık</li></ul></li><li><i>Mikrovasküler Komplikasyonlar</i><ul style="list-style-type: none"><li>-Retinopati</li><li>-Nefropati</li></ul></li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>Sensörimotor nöropati</li><li>Otonom nöropati</li></ul> |
|  | Mixt Vasküler ve Nöropatik Hastalıklar  |
|  | <ul style="list-style-type: none"><li>Ayak ve bacak ülserleri</li></ul>                       |

### **2.2.1.1 Makrovasküler Komplikasyonlar**

Makrovasküler değişikliklerin ilk adımında ateroskleroz vardır. Diyabet aterosklerotik hastalık ve özellikle koroner kalp hastalığı açısından yatkınlık oluşturmaktadır. Tip 2 diyabet hastalarının %75 kadarı kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle yaşamlarını yitirmektedir. Diyabetik hastalarda diyabetik olmayanlara göre daha fazla sıklıkta miyokard infarktüsü (MI) gelişmektedir ve bu olguların prognozları diyabetik olmayanlara göre daha kötüdür (20).

Diabetes mellitus'ta hipertansiyon da önemlidir. Bu durum, tip 2 diyabetikler arasında %70 oranında görülmüştür ve non diyabetiklere göre 2 kat daha sık olduğu bulunmuştur. Arteriyel hipertansiyon, diyabetik mikro ve makroanjyopatinin başlangıcı ve ilerlemesi için bir risk faktörüdür. Diyabeti ve hipertansiyonu olan hastalarda ciddi kardiyovasküler olay gelişme ihtimali, tek başına diyabet ya da tek başına hipertansiyonu olanların 2-3 katıdır (20).

Diyabetin bir başka makrovasküler komplikasyonu serebrovasküler hastalıklardır. Diyabette trombotik inme riski 2-6 misli artmıştır. İnmeyle bağlı ölenlerin %7'si diyabetiktir. Diyabetiklerin %25'i inmeden ölmektedirler. Kanama tipi inmeler, diyabetik hastalarda ancak %8 oranındadır (23) .

### **2.2.1.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar**

#### **2.2.1.2.1. Retinopati**

Diyabetin ciddi ve en sık komplikasyonudur, ayrıca en önemli körlük nedenlerindedir (24). Diyabetik retinopati prevalansı Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group (ETDRS) ölçütlerinde genel olarak 3-4 yıllık tip 1 diyabetiklerde yaklaşık %20 iken, tip 2 diyabetiklerde ise yaklaşık %25 düzeyindedir (25).

Diyabetik retinopati makro-mikro vasküler tutulum olarak değil, vasküler komponenti ön plana çıkmış “nöro-dejeneratif” hastalık olarak değerlendirilmektedir. Diyabetik retinopati; mikro anevrizmalar, retina içi kanamalar, yumuşak eksüdalar, sert eksüdalar, venöz kanama, intraretinal mikrovasküler anomaliler (İRMA), maküla ödemi, retinal iskemi, traksiyonel retina dekolmanı ve retinoşizisi ile seyretmektedir (25).

### ***Nonproliferatif retinopati;***

Tüm diyabet tiplerinde en sık görülen retinopati şeklidir. En erken klinik bulgusu, küçük kırmızı noktalar şeklinde görülen ve “Background Retinopathy” olarak bilinen retinal kapillerlerdeki mikroanevrizmalardır. Kapiller duvarını çevreleyen perisit kaybı, ardından damar geçirgenliğinin artmasıyla periretinal hemoraji gerçekleşir. Arterioller tıkanma, sert eksuda ve makula ödemi meydana gelir. Tip 2 diyabetiklerde görmeyi en çok bozan makula ödemi olup retinopatinin her evresinde karşımıza çıkabilir. Daha sonra kapiller ve terminal arteriollerin tıkanmasıyla oluşan iskeminin sonucunda proliferatif faz başlar (26).

### ***Proliferatif Retinopati;***

Oluşan retinal iskemi alanları, atılmış pamuk manzarası denilen yumuşak eksuda olarak adlandırılır. Karakteristik olarak neovaskülarizasyon denilen yeni damar oluşumu ve skarlar meydana gelir. Proliferatif fazın görme kaybı ile sonuçlanan iki ciddi komplikasyonu vardır. Vitreus hemorajisi ve retina dekolmanı. Diyabete bağlı görülen diğer hastalıklar; başta artmış katarakt riski ile birlikte, optik nöropati, oküler sinir paralizileri (III, IV, VI), otonomik pupiller disfonksiyon, glokom, retinal arter ve ven tıkanıklıklarıdır. Retinopati tedavisi, fotokoagülasyondur. Bu tedavi ile hemoraji ve skar gelişme insidansı azalmaktadır (26).

### **2.2.1.2.2. Nefropati**

Diabetes mellitusun kronik komplikasyonlarının kontrol altına alınmasında önemli gelişmeler kaydedilmesine rağmen vasküler komplikasyonlar, en önemli morbidite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Çoğu ülkede son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) yol açan en önemli neden diyabetik nefropatidir ve diyaliz uygulanan hastaların büyük bir bölümünü diyabetikler oluşturmaktadır. Diyabetik nefropatili hastaların %50-60'ını da yine tip 2 diyabetikler oluşturmaktadır (27).

Diyabetik nefropati, primer olarak bozulmuş glomeruler fonksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Glomeruler kapillerlerin bazal membranları kalınlaşır. Glomeruler damarları çevreleyen mezengium genişler, glomeruler damarların içine doğru ilerler. Böylece afferent ve efferent glomeruler arterler skleroze olur.

Glomeruloskleroz olarak adlandırılır. Çoğunlukla diffüz olmakla birlikte, vakaların yarısında nodüler skleroz gelişir. Kimmelstiel-Wilson nodülleri adı verilen bu komponent, diyabet için patognomoniktir (28).

***Diyabetik Nefropatinin Evreleri;***

1. Hiperfiltrasyon evresi: Glomeruler filtrasyon hızı (GFH) artmıştır. Tanı sırasında GFH>150 ml/dak ise nefropati gelişme riski yüksektir. Bu dönemde geriye dönüşümlü böbrek büyümesi olur (29).

2. Sessiz evre (normoalbuminüri evresi): Bu evrede GFH yüksekliği devam eder, fakat idrarda albümin normaldir. Böbrek glomerullerinde yapısal değişiklikler (glomerul bazal membranında kalınlaşma gibi) oluşur (29).

3. Nefropati başlangıç evresi (mikroalbuminüri evresi): Bu evrede idrarla atılan albümin miktarı artmıştır. İdrar albümini normalde 15-20 mg/dak iken bu evrede 20-200 mg/dak arasındadır. Mikroalbuminüri klinik nefropati ortaya çıkmadan önce saptanan en önemli bulgudur. Bu evrede böbrek glomerullerinde yapısal değişiklikler artar, fakat GFH'da azalma başlar (29).

4. Klinik nefropati evresi (aşıkâr nefropati=makroalbuminüri evresi): İdrarla albümin atılımı dakikada 200 mg'dan, 24 saatte ise 300 mg'dan fazladır. İdrarda albüminüri artarken GFH azalmaya devam eder (29).

5. Son dönem böbrek yetmezliği: 10-30 yıl sonra meydana gelir. Patolojik olarak progresif değişiklikler mevcuttur. İnatçı proteinüri ve progresif olarak azalmış GFH mevcuttur (29).

### **2.2.1.2.3. Diyabetik Nöropati**

Nöropati hem tip 1, hem de tip 2 diyabette sık rastlanılan bir mikroanjiopatik komplikasyondur. On yılın sonunda diyabetiklerin % 40-50'sinde nöropati saptanabilmektedir. Tip 2 diyabetli hastalar daha ilk tanı aldıklarında bile nöropatik olabilirler. Patogenezi henüz aydınlatılamamıştır (30).

*Diyabetik nöropati aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır;*

- (1).Simetrik distal polinöropati (duyusal ve sensorimotor polinöropati)
- (2).Otonom nöropati
- (3).Asimetrik mononöropati (monoropati multipleks)
  - (a).Kraniyal sinirleri tutan nöropati (3.,4.,6. kraniyal sinirler)
  - (b).Periferik sinirleri tutan nöropati

### **2.2.2 Diabetes Mellitus'ta Oral Ajan Tedavisi**

Tüm diyabetli hastaların %80-90'nını tip 2 diyabetli olgular oluşturmaktadır. Diyabetin tedavisinde optimal glisemik kontrolün sağlanması için farmakolojik tedavi zorunludur. Oral antidiyabetik ilaçlar tek başına birbirleriyle veya insülin ile kombine olarak kullanılabilirler.

#### **2.2.2.1 Metformin**

Metformin günümüzde diyabet tedavisinde kullanılan biguanid grubu tek hipoglisemik ilaçtır. Diyabeti olmayan kişilerde kan şekerini düşürmez. Bu nedenle metformini antihiperglisemik bir ajan olarak düşünmek gerekir. Diyabetli hastalarda plazma glukoz konsantrasyonunu yüksek seviyelerden normal değerlere düşürür. Sadece insülin varlığında etkilidir. Esas etkisi hepatik glukoz yapımını azaltmak ve insülinin etkisini artırmaktır (5).

##### **2.2.2.1.1 Etki Mekanizması**

Metformin hepatik glukoz yapımını suprese etmektedir. Bu etkiye ilave olarak insülin aracılıklı periferik glukoz kullanımını (kas ve karaciğerde) artırır, özellikle yemeklerden sonra antilipolitik etkisi ile serum serbest yağ asiti seviyesini düşürür ve glukoneogenesis için mevcut substratları azaltır. Serum lipid ve glukoz

düzeylerini düşürmesinde *AMP-activated protein kinase* enzim aktivasyonunun rol oynadığı ileri sürülmektedir (5). Metformin kas ve yağ dokusundaki hücrelerde glukoz taşınması üzerine insülin etkisini güçlendirir. İnsülin sinyal transmisyonunun anahtar enzimi olan tirozin kinaz aktivitesi metformin uygulamasından sonra normalleşmektedir. Metformin hücresele düzeyde insülin reseptör tirozin kinaz aktivitesini düzeltir, GLUT-4 taşıyıcılarının sayısını ve aktivitesini artırır (31).

#### **2.2.2.1.2 Klinik Kullanım**

Metformin obez ve obez olmayan tip 2 diyabetli hastalarda kullanılabilir. Özellikle obez hastalarda kilo verdirici etkisi nedeniyle oldukça etkilidir. Kilo kaybının oluşmasında ilacın direkt olarak iştah merkezini etkileyerek anoreksiye neden olduğu, gıdaların barsaktan absorpsiyonunu etkilediği veya termogenezisi artırdığı gibi nedenler ileri sürülmüştür (5).

Metformin tipik olarak açlık plazma glukozunu yaklaşık olarak %20 civarında düşürür. Metforminin sulfanilüreler ile kombine kullanımında kan glukoz düzeylerindeki düşürücü etkileri tek başlarına kullanılmalarına göre daha fazladır.

Metformin, oral alımını takiben ince barsaktan (%60) hızlı absorbe edilir. İki saatte pik plazma konsantrasyonuna ulaşır. Plazma proteinlerine bağlanmaz, vücutta metabolizma edilmez. Sadece böbreklerden atıldığı için böbrek yetmezliği olanlarda özellikle serum kreatinin değeri 1,5 mg/dl'den (kadınlarda 1,4 mg/dl) daha fazla ise metformin kullanılmamalıdır. Günlük maksimum kullanım dozu 2000 mg dır (5).

#### **2.2.2.1.3 Yan Etkiler**

Metforminin yan etkileri genellikle gastrointestinal sistemle ilgilidir. Metalik tat, anoreksi, bulantı, abdominal ve gastrik sıkıntılar, diyare görülebilir. Genellikle hafif yan etkilerdir ve tedavi başladıktan 2-3 gün sonra gerilemektedirler (5).

Metformin %30 hastada vitamin B12'nin intestinal absorpsiyonunu azaltır. Megaloblastik anemi çok nadirdir. Bu azalma vitamin B12'nin ileumda kalsiyum bağımlı absorpsiyonuna antagonizm nedeniyle ve oral kalsiyum verilmesiyle düzelir.

Metformin nadiren laktik asidoza neden olabilir. Tip 2 diyabetli hastalarda laktik asidoz insidansı oldukça düşüktür (yılda 3/100.000). Metformin alan hastalarda serum laktat düzeyi genellikle 2 mmol/L'den azdır ve bu klinik olarak önemsizdir. Bazı predispozan şartların varlığında metformin kullanımında laktik asidoz gelişir. Bu şartlar metformin tedavisinde kontrendikasyon oluşturur (32).

Metformin tedavisinde kontrendikasyon oluşturan şartlar;

- Böbrek yetmezliği (serum kreatinin değeri erkeklerde 1,5 mg/dl'den, kadınlarda 1,4 mg/dl daha fazla ise)
- Karaciğer yetmezliği
- Alkolizim
- Kalp yetmezliği
- Laktik asidoz hikâyesi
- Ağır akciğer hastalığı
- Ağır travma doku perfüzyonunu bozan ciddi enfeksiyon
- Hipoksik durumlar, şok
- Hamilelik
- Vitamin B12 yetmezliği

Metformin kan glukoz konsantrasyonunu etkin bir şekilde düşürmesi, kilo kaybını stimüle etmesi, plazma lipid profilini iyileştirmesi, karaciğerde ve kaslarda insülin sensitivitesini artırması, obez ve dislipidemik tip 2 diyabetiklerde ilk seçilecek ilaç olması gerektiğini göstermektedir.

#### **2.2.2.2. Pioglitazon**

Thiazolidinedionlar grubundaki oral antidiyabetik bir ilaçtır.

##### **2.2.2.2.1 Etki mekanizması**

Thiazolidinedionlar Peroxisome Proliferatör Activated Receptör Gamma (PPAR-  $\gamma$ ) için ligand görevi görürler. PPAR-  $\gamma$  yağ dokusunda çok yüksek oranda eksprese edilir, ayrıca adiposit farklılaşmasında rol oynadığı gösterilmiştir. PPAR- $\gamma$

yalnızca lipid ve glukoz metabolizmasında değil, fizyolojik etkileri de olan bir nükleer reseptördür. Olası etkileri arasında GLUT-1 ve GLUT-4'te artış, insülin sinyalizasyonunda güçlenme, tümör nekroz faktör-alfa etkisinde azalma, plazma serbest yağ asitlerinde (FFA) azalma sayılabilir (33).

Pioglitazon'un plazma yarılanma ömrü 5-6 saattir. Fakat aktif metabolitleri nedeniyle glukoz düşürücü etkisi 16-23 saatte oluşmaktadır. Günde 15-45 mg dozlarında tek doz olarak ve öğünlerle ilişkisi olmadan kullanılır. Tek başına dahi plazma glukoz ve HbA1c düzeylerinde anlamlı düşmeler elde edilir.

Pioglitazon'un lipidler üzerine etkileri; HDL-kolseterolde artış, trigliserid ve serbest yağ asitlerinde düşme şeklindedir. Fakat total kolesterol ve LDL-kolesterolde belirgin değişiklik elde edilmemiştir (34).

#### **2.2.2.2.2 Yan Etkiler**

Thiazolidinedionların hepsi doza ve zamana bağımlı olarak belirgin ağırlık artışına neden olabilmektedirler. Kilo alma yeni adipositlerin proliferasyonuna bağlıdır (5).

Hepatotoksisite rosiglitazon kadar olmamakla birlikte karaciğer enzim yüksekliği açısından takip edilmesi önerilmektedir (5).

Sıvı birikimi bir diğer yan etki olup insülin ile birlikte kullanımları sırasında görülmektedir. Periferik ödem ve kalp yetmezliğinin kötüleşmesi veya presipite olması hastaların % 2-5 kadarında gelişmektedir. Bazı hastalarda pulmoner ödem gelişimi dahi bildirilmiştir. Thiazolidinedionlar ile oluşan sıvı birikimi diüretiklere dirençli olup, oluşum mekanizması bilinmemektedir (5).

#### **2.2.3. Diyabet ve Kanser**

Diyabette kanser insidansının arttığına dair literatürde pekçok epidemiyolojik çalışma bulunmaktadır (35-38). Karaciğer, pankreas, meme, kolorektal kanserleri ile diyabet arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (39).

Diyabet ve kanser arasındaki ilişki metabolik, hormonal etkiler ile insülin düzeyi ve insülin like growth faktör-1 (IGF-1) ile ilişkili olabilir. IGF-1 bağlayan protein düzeyinin downregülasyonu da indirekt olarak kanser gelişimi ile

ilişkilendirilmiştir. Ayrıca obezite ve fiziksel aktiviteye bağlı hiperinsülineminin de kansere neden olduğu bazı çalışmalarda vurgulanmıştır (39).

Yüksek insülin düzeyinin tümör büyümesine neden olduğu ileri sürülmüştür. Bazı epidemiyolojik çalışmalarda IGF-1 düzeylerindeki artışın kolorektal, meme, prostat kanseri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Henüz tam olarak kanıtlanmamış olmakla birlikte IGF-1 ile akciğer kanseri arasında da bağ olduğu ileri sürülmüştür (40).

Diyabette kolorektal kanser insidansının diyabetik olmayanlara göre %30 oranında daha fazla olduğu gösterilmiştir (41). Diyabette kolon kanserinin artışı ile ilgili öne sürülen teorilerden biri barsak hareketlerinin diyabette yavaşlaması ve karsinogenik safra asidinin artmasıdır. Ayrıca obezite ve fiziksel aktivitede yetersizlik de suçlanmıştır (40).

Meme kanseri ve diyabet arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalara göre özellikle tip 2 diyabette meme kanserinin arttığı belirtilmiştir. Bu ilişki insülin sekresyonundaki artışa ve IGF-1 düzeylerindeki artışa bağlanmıştır. İnsülinin meme hücrelerindeki mitojenik etkisine bağlanmıştır. IGF-1 artışının ise özellikle premenapozal kadınlarda meme kanseri açısından risk oluşturduğu gösterilmiştir (42).

Tip 2 diyabetli hastalarda yapılan büyük bir kohort çalışmada pankreas ve biliyer kanser riski araştırılmıştır. Sonuçta her iki kanserin de insidansının arttığı tespit edilmiştir (43). Yine Amerika'da yapılan geniş kohort bir çalışmada, artmış açlık kan glukoz düzeyi ile meme kanserinin yanı sıra karaciğer, kolon ve pankreas kanserleri gibi gastrointestinal malignansilerin de diyabet ile sıklıklarının arttığı tespit edilmiştir (44). Pankreas kanseri Amerika'da kansere bağlı ölüm nedenleri arasında 5. sırada yer almaktadır. Pankreas kanserinin nedenlerini ve sıklığını araştıran kohort çalışmada, pankreas kanserinin risk faktörleri içinde sigara, genetik, kronik pankreatit ile birlikte diyabet de suçlanmıştır (45). Safra kesesi kanserleri Amerika Birleşik Devleti'nde gastrointestinal sistem tümörleri içinde 5. sırada yer almaktadır. Her yıl 5000-6000 erişkin safra kesesi kanseri tanısı almaktadır ve tanı aldıktan sonra bir yıl içinde kaybedilmektedirler. Etiyoloji tam olarak bilinmemekle

birlikte birçok faktör suçlanmıştır. Bu risk faktörleri safra taşı, obezite, kadın cinsiyet, sigara kullanımı, pankreatikobilyer duktus anomalileri ve diyabettir (46-47).

Yapılan birçok çalışmada diyabetin tedavisi ile kanser riskinin ve kanser mortalitesinin azaldığı gösterilmiştir (48,49). Metformin kullanan ve kullanmayan hastalar karşılaştırıldığında metformin kullananlarda kanser riskinin azaldığı gösterilmiştir (48). Fakat bazı çalışmalarda bu etki gösterilememiştir. Bazı çalışmalarda ise sadece pankreas ve kolon kanseri riskini azalttığı ama prostat ve meme kanserine etkisi olmadığı gösterilmiştir (49).

Diyabet ve obezitenin endometrial kanser oluşumunda yüksek risk oluşturduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda metformin kullanan kişilerde kanser riskinin azaldığının gösterilmesi üzerine endometrial kanser üzerine etkisini araştıran bir çalışmada; metforminin endometrial kanser hücrelerinin proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etkisini AMP protein kinazı aktive ederek ve mTOR yolunun inhibisyonu ile göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçlarının, metforminin endometrial kanserin tedavisinde ve önlenmesinde gelecekteki çalışmalar için de yol gösterici olabileceği ileri sürülmüştür (50). Bir başka çalışmada metforminin prostat kanserinde antiproliferatif etkisi gösterilmiş. Fakat bu etkisini AMP protein kinazı aktive ederek değil, hücre siklusunu G0 ve G1 fazında durdurarak yaptığı belirtilmiştir (48).

Tip 2 diyabetin tedavisi ile kanser gelişimi ve mortalitesindeki azalmayı araştıran çalışmalarda antidiyabetik tedaviler arasında farklılıklar bulunmuştur. İnsulin resistansı üzerine olan tedaviler (biguanidler ve tiyazolidinedionlar) ile insulin analogları, insulin sekretogogları (sülfanilüreler ve meglitinidler) karşılaştırılmıştır. Yapılan iki epidemiyolojik çalışmada metformin ile tedavi sonucu kanser gelişiminin azaldığı fakat insülin veya sülfanilüre ile tedavi sonrasında kanser nedeniyle ölümlerin arttığı gösterilmiştir (51,52). Texas Üniversitesinde yapılan vaka-kontrol çalışmasında metforminin bu yararlı etkisi AMP protein kinaz aktivasyonuna bağlanmıştır (53).

Thiazolidinedionlar (TZD), PPAR- $\gamma$  aktivasyonu yaparak etki etmektedirler. PPAR- $\gamma$  glukoz ve lipid metabolizması yanısıra tümörögeneziste de rol

oynamaktadır. TZD'ler ile yapılan bir çalışmada xenograf modellerde ve kanser hücre kültürlerinde PPAR- $\gamma$  aktivasyonu yaparak kanser hücresinin büyümesini önlediği gösterilmiştir. Rektal kanserli fare modelinde TZD'lerin etkisini araştıran çalışmada akciğer ve lenf nodu metastazını inhibe ettikleri tespit edilmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada TZD'ler tarafından kanser metastazında suçlanan kemokin olan CXCR4'ün azaltıldığı gösterilmiştir (54). Bu etkiyi ise PPAR- $\gamma$  aktivasyonu ile yaptıkları belirtilmiştir.

Pioglitazone molekülünün PPAR- $\gamma$  aktivasyonu ile COX-2 ve Cyclin D1 down-regülasyonu ve kolon kanser proliferasyonu ve karaciğer metastazını inhibe ettiği ileri sürülmüştür (55).

### 2.3 Anjiogenezis

Anjiogenezis yeni kapiller damar gelişimi olup embriyonik gelişme, yara iyileşmesi ve organ hipertrofisi gibi fizyolojik olaylarda rol oynamaktadır. Ancak kontrolsüz anjiogenezis birçok patolojik durumun varlığında; diyabetik retinopati, ateroskleroz, kronik inflamasyon, tümör büyümesi ve metastazından sorumlu tutulmaktadır. Anjiogenezis ekstraselüler matriks ve *soluble* faktör ve hücreler arasındaki etkileşim sonucu endotel hücrelerin differansiasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile seyreden kompleks bir işlemdir (56).

Anjiogenezis birçok neoplastik ve non-neoplastik hastalığın ilerlemesinden ve etiopatogenezinden; özellikle solid tümörlerin büyüme ve metastaz yapmasından sorumlu tutulmaktadır. Anjiogenezisi düzenleyen, pozitif ve negatif regülatör mevcuttur. Tümör hücreleri bir veya daha çok pozitif regülatör ile uyarıldığında anjiogenik protein ekstraselüler matrikse geçer ve anjiogenezisi başlatır. Kanserli hastaların biyopsilerinde anjiogenezisin saptanması metastaz veya rekkürens tahminini sağlar (56).

Normal koşullarda anjiogenezis endotel hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonunu sağlayan faktörler ile buna karşı gelen anti-anjiogenik faktörler arasında oluşan bir denge ile gerçekleşir. Fizyolojik neovaskülarizasyon kendi kendini sınırlayan bir olay olmasına rağmen patolojik anjiogenezis uzun dönem

devam eder. Bu durum romatoid artrit, psöriazis, retinopati gibi farklı hastalıklarda görülmektedir (56).

Vaskülojeniz terimi anjioblast olarak adlandırılan kök hücrelerden kaynaklanan endotelial hücrelerin primer kapiller pleksusu oluşturmak üzere farklılaşmış bir araya gelmesini tanımlar. Bu primitif ağ oluşumunun tomurcuklanma, dallanma ve intuseptif büyüme şeklindeki farklılaşmasına anjiogeniz denir ve böylelikle yeni kapiller damarlar oluşur. Arteriyogeniz bu damar tomurcuklarının sonraki dönemde damar duvarının diğer elemanları ile birlikte stabilizasyonu ve geniş damar oluşumunu ifade eder (7).

### 2.3.1. Anjiogeniz Mekanizması

Anjiogeniz süreci pozitif ve negatif etkili moleküller arasındaki denge ile kontrol edilir. Pozitif etkili proanjiogenik moleküller, eğer baskınsa anjiogeniz süreci tetiklenir ve yeni damar oluşumu meydana gelir. Bu kavram “anjiogenik anahtar (switch)” olarak adlandırılır (57).

Anjiogeniz çok farklı süreçleri içerir. Dokudan endotel aktivasyonu yapmak üzere salınan tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), VEGF, temel fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) ile başlar. Bunu bazal membranın proteolitik enzimler ile yıkılması takip eder. Endotel hücrelerinden salınan anjiogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon ile geçerler. Bu faktörler endotel hücrelerindeki özgün reseptörlere bağlanırlar. Hücre içi sinyal kaskadının başlamasıyla serin proteazları ve proteolitik enzimler salınır. Sonuçta endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü meydana gelir, bu süreçte en etkili olan VEGF’dir (58).

Bu olayları özetleyecek olursak, b-FGF ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin aktivasyonu, hücrelerin çoğalmasını ve *ekstracellüler matriks* (ECM) içine göç etmesini uyarır. Aynı zamanda, büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ECM bileşenlerinin yıkılmasına neden olur. Mitojenik endotel hücreleri kapiller filizleri oluşturur. İntegrinler gibi membran proteinleri de bu süreç içinde yer alır ve endotel hücrelerinin birbirine ve ECM’ye tutunmalarına yardımcı olurlar, böylece yeni kapillerler oluşur. Büyüme faktörlerinin inhibisyonu veya büyüme faktör

inhibitörlerinin varlığı ile anjiyogenezi azaltır. ECM'nin proteolitik yıkımı da inhibe olur ve yeni oluşmuş kapillerler etrafında matriks bileşenleri sentez edilir (58).

Yeni damar yapımı tamamlandıktan sonra anjiyogenik faktörler azalır, anjiyogenez inhibitörleri artar. Endotel hücreleri yeniden stabil hale gelirler. Ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelirler. Yeni damarların tam olarak oluşmaları yaklaşık yedi gün sürer (59).

### **2.3.2. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenez**

Anjiogenez yara iyileşmesi ve epitelizasyonu için önemli bir basamaktır. Yaralanan dokunun iyi beslenmesi ve yeterli kan akımının sağlanması iyileşmeyi etkileyen önemli bir parametredir. Yara yerinde oksijen basıncının düşmesi, laktik asit birikimine, trombosit ve makrofajların salgıladığı, transforme edici büyüme faktörü alfa ( TGF- $\alpha$ ), transforme edici faktör beta ( TGF- $\beta$ ), TNF $\alpha$  gibi anjiogenik faktörleri stimüle eder (60). Tablo 2.4.'te anjiogenik faktörler ve etki mekanizmaları gösterilmektedir.

**Tablo 2.4.** Önemli anjiogenik faktörler ve etki mekanizmaları

| FAKTÖR   | ETKİ MEKANİZMASI   |
|--|--|
| Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF)              | Endotelyal mitojen,<br>Survival faktör,<br>Permeabilite indükleyici                              |
| Basic Fibroblast Growth Faktör (bFGF / FGF-2)          | Endotelyal mitojen,<br>Anjiogenez indükleyici<br>Survival faktör<br>Flk-1 Ekspresyon indükleyici |
| FGF-1, FGF-3, FGF-4                                    | Endotelyal mitojen<br>Anjiogenez indükleyici   |
| Transforming Growth Faktör - $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ) | Endotelyal mitojen<br>Anjiogenez indükleyici<br>VEGF ekspresyonu indükleyici                     |
| Epidermal Growth Faktör                                | Zayıf endotelyal mitojen<br>VEGF ekspresyonu indükleyici   |
| Hepotocyte Growth Faktör / Scatter Faktör ( HGF/SF )   | Endotelyal mitojen, mitojen<br>Anjiogenez indükleyici  |
| Transforming Growth Faktör - $\beta$ (TGF- $\beta$ )   | Endotelyal büyüme inhibisyonu<br>Anjiogenez indükleyici<br>VEGF ekspresyonu indükleyici          |
| Tumor Necrosis Faktör - $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )      | Endotelyal mitojen<br>Anjiogenez indükleyici<br>VEGF ekspresyonu indükleyici                     |
| Platelet Derived Growth Faktör (PDGF)                  | Endotelyal mitojen<br>Endotelyal motilite faktörü<br>Anjiogenez indükleyici                      |

Anjiogenez diabetes mellitustaki komplikasyonların patogenezinde de suçlanmıştır. Diyabetli hastalarda; retina ve böbrek vaskülopatisi, yetersiz yara iyileşmesi, transplante edilen organın rejeksiyon riskinin artması ve koroner kollateral oluşumunda yetersizlik gibi durumlar gözlenir. Diyabetteki bozulmuş anjiogenezi açıklayan mekanizmalardan birincisi; endotelyal ve vasküler düz kas bozuklukları ile karakterize vasküler disfonksiyonun varlığı, ikincisi; proteinlerin nonenzimatik glikolizasyonuna ve yeni kan damarlarının bozulmuş yapılanmasına neden olan kronik hiperglisemi ve son olarak; diyabetin büyüme faktörü sinyali ve

ekspresyonunu etkileyerek vasküler büyüme faktörlerinin lokal dengesini bozmasıdır. VEGF diyabetik retinopatide esas rolü oynar. VEGF ekspresyonu bFGF, plasenta büyüme faktörü 1 (PIGF-1), TNF, TGF- $\beta$ , İnterlökin-1 (IL-1), gibi birçok faktör tarafından artırılır (61). Anormal anjiogenezin eşlik ettiği diyabetik nefropatide VEGF lokal düzeyinin çok yükseldiği ve anjiotensin II ekspresyonunun artmış olduğu tespit edilmiştir (62). Diyabetik ayak ülserleri, bası yaraları gibi kronik yaraların bulunduğu durumlarda kan akımındaki bozulma yara iyileşmesinde gecikmeye neden olabilir. Son dönemde yeni kan dolaşımını indüklemek ve lokal iskeminin dokularda neden olduğu olumsuz etkilerden kaçınmak amacıyla anjiogenez ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (63-64).

Romatoid artrit patogeneğinde de anjiogenez suçlanmıştır. İnflamasyon alanında lökositlerde ekstrasvazasyon gelişerek sinoviyumda hasar oluşmaktadır. Anjiogenik faktörlerin aşırı salınımı ile sinovit oluşmaktadır. Yine VEGF, TNF, TGF- $\beta$ , IL-1 ve anjiopoetinler bu hastalığın patogeneğinde de rol oynamaktadır (56).

### **2.3.3. Tümör Anjiogenezi**

Anjiyogenez kavramının tarihçesine bakıldığında yaklaşık 100 yıl önce tümör içerisinde yeni damar gelişimlerinden bahsedildiği görülmektedir. Ancak bu dönemde tümör hiperemisi olarak adlandırılan bu durumun, tümör metabolitlerine bağlı basit bir dilatasyon olduğu düşünülmüştür. Daha sonraki dönemde, tümörün mevcut damarlarla mı beslendiği, yoksa yeniden damarlanmanın mı olduğu tartışılmış, yeniden damarlanmayı kabul edenler bile bunun tümör gelişimi için gerekli olmadığını, basit bir reaksiyon olduğunu ileri sürmüşlerdir (58).

Tümörler yeni damar yapımını gerçekleştiremedikleri takdirde etraf damarlarından difüzyonla beslenir ve en fazla 0,5 – 1 cm<sup>3</sup>'lük hacme kadar büyüebilirler. Bu hacimden sonra çoğalmaları ve metastaz yapabilmeleri için anjiogenez gereklidir. Tümör anjiogenezi; spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile buna hizmet eden hücre dışı matriks komponentlerine bağlıdır (65).

Tümörün büyümesi sırasında mikrodamarlar, tümöre besin, oksijen ve büyüme faktörleri sağlamak amacıyla sayıca büyük oranda artış gösterirler. Tümör

anjyogenezinin düzenlenmesi normal fizyolojik anjyogeneze göre farklılık göstermektedir. Uyarıcılar ve inhibe ediciler arasındaki dinamik denge bozulmakta, bu dengenin bozulmasında ise tümör ve endotel hücreleri temel bir rol oynamaktadırlar. Bir ya da birden fazla anjiogenik büyüme faktörleri belirgin olarak aşırı eksprese olmadıkça, tümör büyümesinin olmayacağı gösterilmiştir. Anjyogenezi uyarmak için yalnızca anjiyogenik faktörlerin artması yeterli olmayıp, tümörün anjiyogenik özellik kazanması için anjyogenez inhibitörlerinin de azalması gereklidir (58).

Anjyogenezin tümörün yayılmasındaki rolünün yanı sıra metastazi kolaylaştırdığı varsayımını destekleyici, deneysel ve klinik kanıtlar bulunmaktadır. Bir tümör hücresi metastaz yapabilmek için, damar sistemine girmek, dolaşımda canlı kalabilmek, damar sisteminden dışarı çıkabilmek, hedef organda büyüebilmek ve anjyogenezi uyarmak gibi çeşitli bariyerleri aşabilmelidir. Klinik veriler metastatik özelliğin anjyogenezin şiddetine bağlı olduğunu göstermektedir (58). 1971 yılında Folkman “tümör gelişimi anjyogeneze bağımlıdır” diyerek anjyogenez konusunda asıl gelişimi başlatmıştır. Tümör hücresi anjiyogenik iken metastaz yaparsa saptanabilir tümör oluşturma ihtimali daha fazladır. Ayrıca metastatik kaskadın başında olduğu kadar sonunda da anjyogeneze ihtiyaç vardır. Tümör hücresi hedef organda damarlanmayabilir ve mikroskopik kalabilir (66).

#### **2.4. Koryoallantoik Membran Modeli**

Anjyogeneze kullanılan başlıca yöntemler; *in vivo* tavuk embriyosu KAM modeli, tavşan kornea modeli, rodent mezenter modeli, rodent gözünde iris ve avasküler kornea modelidir (63). Ayrıca sünger (sponge) implant modeli, matrijel ve klasik tümör modeli ile zebra balık modeli de kullanılan diğer *in vivo* anjyogenez yöntemleridir. KAM modeli uygulanabilirliği en kolay ve anjiyogenik yanıtın kantitatif ölçümüne imkan veren basit ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (Tablo 2.5) (67). Anjyogeneze tarama amaçlı ve en çok kullanılan modellerin KAM, tavşan kornea ve matrijel modelleri olduğu bildirilmektedir (68).

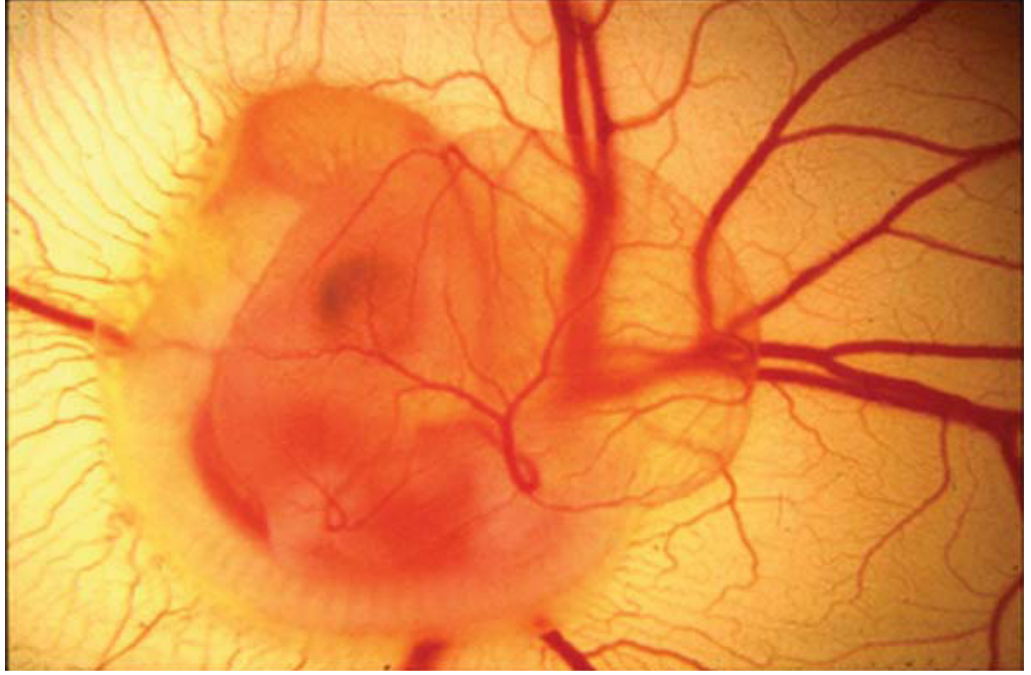
İdeal anjyogenez çalışma modelleri aşağıdaki ihtiyaçları karşılamalıdır:

1. Anjiyogenik/anti-anjiyojenik ajanın salıverilme oranı “*release rate*” tahmin edilebilmelidir.
2. Model, yeni damar oluşumunun kantitatif ölçümüne imkan sağlamalıdır (vasküler uzunluk, volüm, damar ağındaki damarların sayısı, bazal membranın genişliği gibi).
3. Model, yeni damarın fonksiyonel karakteristiklerinin ölçümünü sağlamalıdır (Endotel hücresi migrasyon, proliferasyon oranı, tüp oluşum oranı, kan akım oranı ve vasküler permabilite gibi).
4. Yeni oluşan damarlarla var olan damarlar kolayca ayırt edilebilmelidir.
5. Yeni damar oluşumuna neden olabileceği için doku hasarlanmasından kaçınılabilmelidir.
6. Herhangi bir *in vitro* yanıt, modelde *in vivo* olarak gösterilebilmelidir.
7. Model, uzun süreli ve noninvaziv monitörizasyona izin vermelidir.
8. Aynı zamanda yöntem, maliyet uygun, hızlı, kolay uygulanabilir, tekrarlanabilir ve güvenilir olmalıdır.

Yukarıda sayılan nedenler dikkate alındığında, KAM modeli, kanser davranışlarının ortaya konmasında, biyomateryallerin etkilerinin incelenmesinde, fotodinamik tedavi yaklaşımlarında ve en son olarak anjiyogenezde sıklıkla kullanılan uygun bir *in-vivo* model olarak karşımıza çıkmaktadır (69).

KAM modeli ilk olarak 1956 yılında kanser ve metastaz konularında, sonrasında ise 1976 yılında Folkman tarafından anjiogenez çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (70).

KAM ekstraembriyonik bir membran olup, hem anjiyogenez hem de anti-anjiyogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.1). KAM'nin civciv için fizyolojik önemi, gaz alışverişinde majör solunumsal organ olması ve atık ürünler için mesane görevi görmesidir (71).



**Şekil 2.1.** Beş günlük embriyoda allantoik kese ve allantoik damarların görüntüsü (Ribatti, 2008)

KAM'de anjiyogenez, gelişimsel olarak 3 safhadan oluşur:

- Erken faz (5. günden 7. güne kadar)
- Ara faz (8. günden 12. güne kadar)
- Geç faz (12. veya 13. günden itibaren)

Erken fazda, kapiller ağ filizlenmeye başlar. Ara fazda, mikrovasküler ağda gelişim öne çıkar, filizlenme bu aşamada sona erer. Son fazda, koriyoallantoik ögeler tam bir koruyucu membrana dönüşür ve genişlemesi tamamlanır. KAM modelinde, uygulamaların 5. günden itibaren yapılabileceğini savunanlar olduğu gibi (72), damarlanmanın olgunlaştığı 12. günden sonraki dönemin uygulamalar açısından daha iyi bir zamanlama olduğunu ifade edenler de vardır (69). Uygulamaların 18. güne kadar yapılabilmesi mümkündür ancak, bu günden sonra embriyonun yeterince büyümesi ve hareketlerinin artması, uygulamaları olumsuz etkilemektedir.

**Tablo 2.5** KAM modeli ile çalışmanın avantajları ve dezavantajları (73)

| <b>Avantajları</b>                           | <b>Dezavantajları</b>  |
|--|--|
| Teknik olarak basittir                       | Oksijen değişikliklerine hassastır                                       |
| Ucuzdur                                      | Yeni damar oluşumunun ayırt edilmesi zordur                              |
| Temini kolaydır                              | Memeli olmayan bir modeldir  |
| Geniş taramalar için uygundur                | Embriyoniktir  |
| Noninvaziv gözleme uygundur                  | Nonspesifik inflamatuvar reaksiyonlar yaygındır                          |
| Sonuçları kolay ve çabuk değerlendirilebilir | Metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan ilaç çalışmaları için uygun değildir |
| Memeli ksenograflarla uyumludur              |  |
| Cerrahi girişimler için oldukça uygundur     |  |

### **2.5. Hücre Kültürü**

Çeşitli hayvan, insan ve tümör doku hücrelerinden, uygun koşulların sağlanması ve bunların *in vitro* üretilmesi ile hazırlanan doku kültürlerinin esası, canlı dokudan alınan parçaların *in vitro* koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Bir başka deyişle uygun canlıdan alınmış hücrelerle bunların yaşamasını ve üremesini sağlayan fizyolojik bir sıvıdan ibarettir. Hücre kültürleri genetik, viroloji, immünoloji, parazitoloji, fizyoloji ve farmakoloji gibi pek çok alanda, çeşitli amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde doku olarak başlıca üreme özelliği fazla olan insan veya bazı hayvan embriyosuna ait veya habis tümör hücreleri tercih edilmekte ve 3 farklı tipte hücre kültür yöntemi kullanılmaktadır (74).

### 2.5.1. Hücre Kültürlerinin Sınıflandırılması

Hücre kültürleri primer, diploid ve heteroploid olmak üzere 3 sınıfa ayrılır.

#### ***Primer hücre kültürü;***

Orijinal olarak hayvan ve insan dokusundan, özellikle de bunların böbrek ya da akciğer dokularından elde edilirler. Primer hücre kültüründeki hücreler orijinal doku ile aynı karyotiptedir. Primer hücre kültürü elde edebilmek için dokular tripsin gibi proteolitik enzimler ile muamele edilir ve süpansiyon filtre edildikten sonra kültüre edilir (74).

#### ***Diploid hücre kültürü;***

Diploid hücreler, primer kültürdeki predominant hücrelerin seleksiyona uğraması ile seri olarak birkaç kez (en çok 50 kez) kültüre olabilirler. Böylece primer kültürden orjin alan "***cell strain***" da denilen "***diploid hücre zinciri***" oluşur.

Diploid yapıdaki bu hücrelerin morfolojileri ve büyüme özellikleri değişmez, hücre zincirlerinin transfer olma yeteneği sınırlı kalır. Yaklaşık 50 dublikasyondan sonra, çoğalma oranı giderek azalır ve zincirin yaşamı biter. Bu nedenle bu zincirlere "***sınırlı hücre zincirleri***" de denir. En az 70 kez transfer olabilen hücre zincirinin artık bir "***cell line***" olduğu düşünülmelidir (75).

#### ***Heteroploid hücre kültürü;***

2n yapısında olan bu diploid hücre zincirlerinin tekrarlanan seri transferleri esnasında, farklı seleksiyonlar sonucunda bazı hücrelerde değişim başlar, morfolojileri farklılaşır, büyümeleri hızlanır ve sonunda tamamen farklı hücre zinciri oluşur. Bu transforme hücre zincirlerinin saturasyon dansitesi artar ve hücreler aşırı olarak birbirleri üzerine binerler. Birbirlerine göre düzensiz olarak gelişigüzel yönelen bu hücreler yüzeye daha az yapışır. Subkültüre edilen bu hücrelerin ancak %25'inden daha azı normal hücreler gibi olup, çoğu köken aldığı hücrelerin özelliklerini taşımayan ve yaşamı sınırsız olan heteroploid karyotipe sahip hücrelerdir. Bu yeni zincire "***heteroploid hücre zinciri***" veya "***sürekli hücre zinciri***" adı verilir (74).

### 2.5.2. Hücre Kültüründe Sitotoksik Etkilerin İncelenmesi

Sitotoksosite testi, test malzemesinin uygun hücre kültüründeki büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği yöntemdir (76-77).

Hayvanların kullanıldığı testlerin yanı sıra hücre kültür testlerinin kullanılması ile elde edilen veriler, moleküllerin toksik etkisi ya da farklı polimerizasyon derecelerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi gibi temel biyolojik özelliklere de açıklık getirirler (78).

Sitotoksosite testleri genellikle malzemelerin,

- 1- Hücre sayısı veya büyümesi
- 2- Hücre membran bütünlüğü
- 3- Biosentez veya enzim aktivitesi
- 4- Hücre genetik malzemesi üzerine etkilerini ölçer.

Sitotoksosite testlerinin avantajları;

- 1- Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasında spesifik bir fonksiyonun değerlendirilmesi
- 2- Çok sayıda örneğin kısa zamanda ve ekonomik olarak değerlendirilebilmesi
- 3- Kantitatif sonuçlara ulaşılabilmesi
- 4- Kullanım testlerine oranla toksik maddenin daha hassas değerlendirilebilmesi
- 5- Test yöntemlerinin stabilize edilebilmesidir.

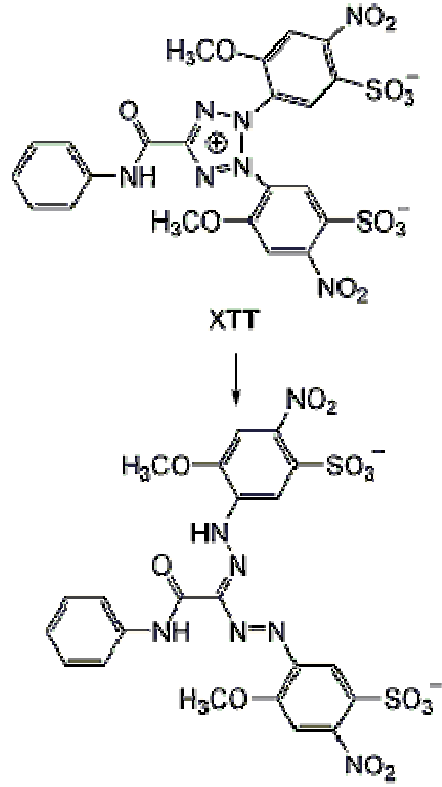
*In vitro* sitotoksosite testlerinin dezavantajları ise;

- 1- Her test için bir tür hücre kullanılması
- 2- Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması
- 3- Kültür ortamında enflamatuvar ve diğer doku koruyucu mekanizmaların olmamasıdır.

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] testidir. Bu test MTT'yi mavi, çözünmeyen formazon bileşine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçer. Sitotoksik etki nedeniyle dehidrogenaz enzim aktivitesi aktif olmadığında mavi formazon oluşmayacaktır. Optik yoğunluk ölçülerek formazon oluşumu saptanabilir. Alternatif olarak test örneği çevresindeki formazon ışık veya elektron mikroskopuyla belirlenebilir. Biz çalışmamızda XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) testini kullandık. Bu testte radyoaktif izotoplar kullanılmaması nedeniyle MTT'ye göre daha üstündür.

### **2.5.3. XTT Yöntemi**

XTT; hücre biyolojisinde büyüme faktörleri, sitokinler, media komponentleri, sitotoksik ajanlar ve lenfosit aktivasyonunun incelenmesi amacıyla yapılan hücre proliferasyon yöntemidir. XTT yönteminde temel prensip, canlı veya apoptozisin erken evresindeki hücrelerin, mitokondrileri aracılığıyla XTT solüsyonu ile oluşturduğu reaksiyonda; XTT solüsyonu bulunan tetrazolium halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazon kristalleri oluşturur (Şekil 2.2). Reaksiyon sonucu oluşan rengin yoğunluğu mitokondrial aktiviyetle doğrudan ilişkilidir. Ölü hücrelerin varlığında formazol halkası oluşmaz.



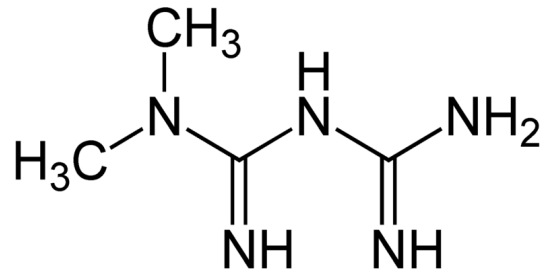
**Şekil 2.2.** XTT yapısında bulunan tetrazolium halkalarının mitokondrial enzimlerce parçalanarak renkli formazon kristallerini oluşturması

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada öncelikle metformin ve pioglitazon moleküllerinin tavuk embriyosu koryoallantoik membran modelinde anjiogenez inhibisyonu üzerine etkisi ile bu ilaçların XTT yöntemiyle hücre kültürlerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

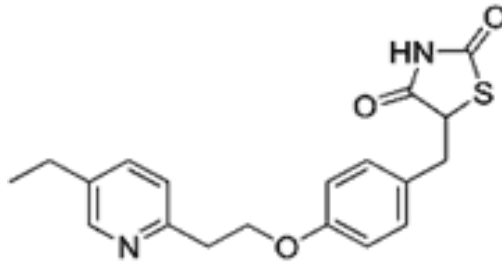
#### 3.1. Metformin ve Pioglitazon Molekülleri

Çalışmada kullanılan metformin; (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride) SIGMA-Aldrich, Europe, aracılığı ile temin edilmiştir. Metforminin molekül şekli Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Metformin molekülünün şekli

Pioglitazon (2,4-Thiazolidinedione) da SIGMA-Aldrich, Europe tarafından temin edilmiştir. Molekül şekli Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Pioglitazon molekülünün şekli

## 3.2 KAM Deneyi

### Pelletlerin Hazırlanması

Anjiyogenez üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere çalışmamızda diyabette sık kullanılan oral antidiyabetikler olan metformin ve pioglitazon kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan ilaçlar steril distile suda çözülmüş ve uygun hacimde olacak şekilde %2'lik agarda dilüe edilmiştir. İlaçların uygulamasında üç farklı konsantrasyon ( $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  M) kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar klinikte reçete edilen ilaçların vücutta ulaşmış oldukları etkin konsantrasyon olan  $10^{-6}$  konsantrasyonunu ve bu konsantrasyonun bir alt ve bir üst konsantrasyonları tercih edilmiştir. İlaçların önce  $10^{-4}$  M konsantrasyonları hazırlanmıştır. Daha dilüe konsantrasyonlar  $10^{-4}$  M'lık stok solüsyonun seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Diskin 10 µL'lik final hacminde  $10^{-6}$  M'lık ilaç konsantrasyonunu sağlayacak ilaç miktarını bulabilmek için klasik molarite formülü kullanılmıştır ( $M=m/V$ ). Her çalışma setinde kayıplar da göz önüne alınarak yaklaşık olarak 90 disk hazırlanarak uygulanmıştır. Bu nedenle, her ilaç için yaklaşık 1 mL'lik agar ve ilaç karışımı hazırlanmıştır ( $10 \mu L \times 100 = 1 \text{ mL}$ ).

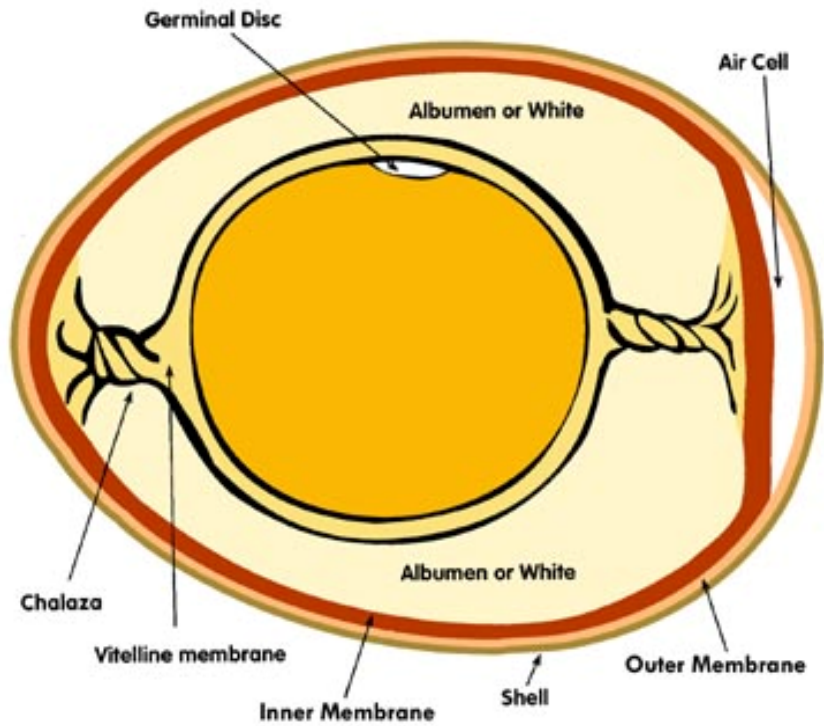
Kolay uygulama için, solüsyonların pelletleri 5 mm çaplı sirküler paslanmaz çelik yüzeyde 10 µl'lik damlalar şeklinde hazırlanmış ve oda ısısında katılaşması beklendikten sonra uygulanmıştır.

### KAM Deneyi

Ross 308 cinsi döllenmiş 1100 adet tavuk yumurtası Yemsel Tavukçuluk Hayvancılık Yem Ham maddeleri Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'nden (Kayseri) edinilmiştir. Çalışmamız için Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul'undan 24.11.2009 tarihli ve 177 sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

Döllenmiş tavuk yumurtaları 37,5 °C'de %80 rölatif nemli ortamda horizontal pozisyonda inkübe edilmiştir (Şekil 3.3 ve 3.4). Kuluçkanın beşinci gününde yumurtanın künt tarafından enjektör yardımıyla 5-10 mL albumin alındı ve yumurtanın diğer ucundan 2-3 cm çapında kabuk kesilerek çıkarılmıştır (Şekil 3.5).

Kabuktaki bu açıklık laboratuvar filmi ile kapatılarak 72 saat daha inkübe edilmiştir (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). KAM yaklaşık 2 cm çapa ulaştığında her bir yumurtaya bir pellet olacak şekilde koryoallantoik membran üzerine etken madde içeren pelletler yerleştirilmiştir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). İlaç uygulamasından sonra 24 saatlik ek inkübasyon süresi tanınmıştır. Stereoskopik mikroskop altında skorlama sistemi (Tablo 3.1 ve Şekil 3.11) kullanılarak pellet uygulama bölgesindeki damar yapısı değerlendirilmiştir (Şekil 3.10 ve Şekil 3.12).



Şekil 3.3. Dölleniş tavuk yumurtasının şematik görüntüsü



**Şekil 3.4.** Dölllenmiş tavuk yumurtalarının silinerek kuluçkaya alınması



**Şekil 3.5.** Embriyolu yumurtaların 5. gününde kapaklarının açılması



Şekil 3.6. Kuluçkanın 5. gününde yumurtalar açılıp 72 saat inkübasyonda bırakıldıktan sonra gruplara ayrılması



Şekil 3.7. İnkübasyonun 8. gününde ilaç uygulaması öncesindeki tavuk embriyosunun görüntüsü



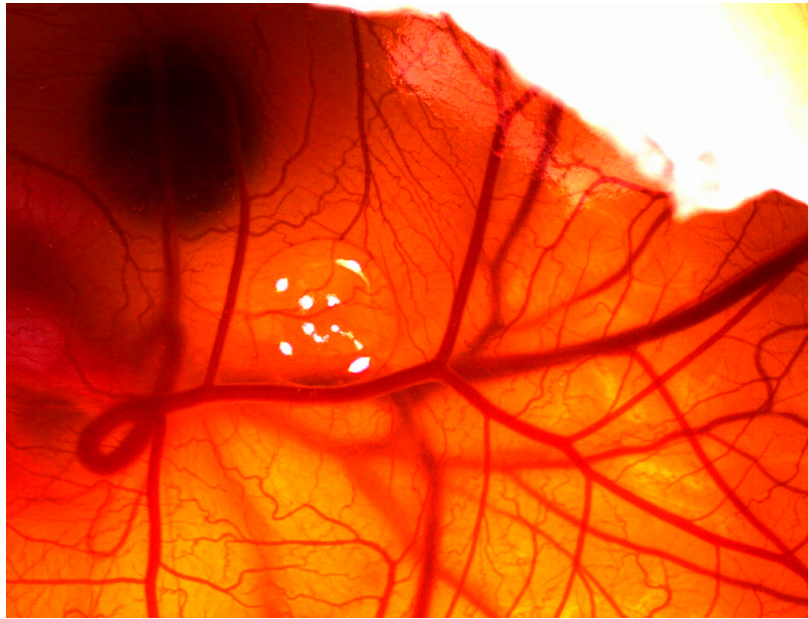
**Şekil 3.8.** KAM üzerine etken maddeli pelletlerin konulması



**Şekil 3.9.** KAM üzerine yerleştirilen etken maddeyi içeren pellet (ok).

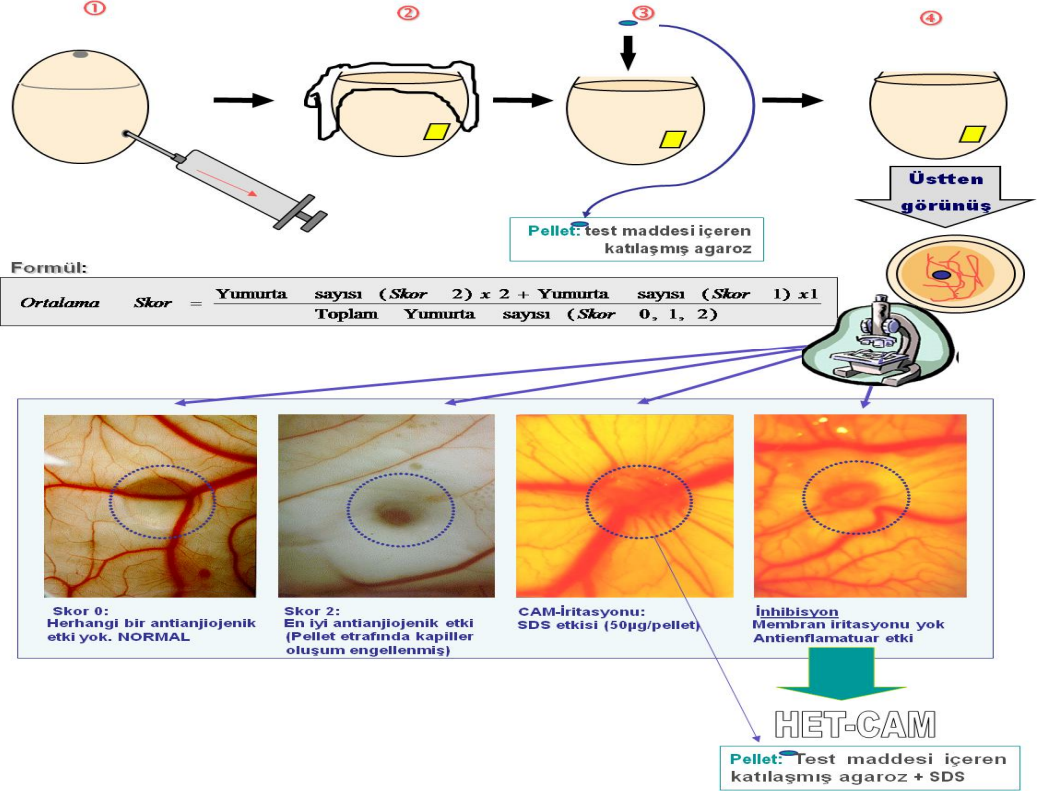


**Şekil 3.10.** Tüm grupların kontrol grupları ile birlikte mikroskopta değerlendirilip skorlanması



**Şekil 3.11.** Skorlamada kullanılan pelletlerin steriomikroskopik görüntüsü

### ChorioAllantoicMembrane (CAM) Testi



Şekil 3.12. Koryoallantoik membran modelinin özeti

**Tablo 3.1.** Koryoallantoik membran üzerinde anjiogenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri

| <b>Skor</b> | <b>Etki</b> | <b>İzlenim/Açıklama</b>   |
|-------------|-------------|---|
| 0           | Yok         | Normal embriyo oluşumu, çevre kapillere göre değişiklik yok   |
| 0.5         | Zayıf       | Kapiller damarsız alan yok. Kapillerin yoğunluğu azalmış ancak pelletten çok daha geniş değil                         |
| 1           | Orta        | Kapillersiz alan az veya kapiller yoğunluk belirli bir alanda azalmış. Etkiler pellet alanının 2 katından fazla değil |
| 2           | Kuvvetli    | Pelletin etrafında en az iki kat mesafe olacak şekilde kapillersiz alan mevcut  |

KAM deneyi sırasında toplamda 1100 yumurta kullanılmıştır. İşlem sırasında embriyosuz yumurtalar, albümin çekilmesi sırasında yumurtanın sarı kısmı ile temas edilen yumurtalar, ölmüş embriyolar deneyden çıkarılmıştır. Her bir test bileşiği için 40 yumurtaya ilaç uygulaması yapılmıştır. Her deney grubu için sadece agar içeren pelletlerin uygulandığı kontrol yumurtaları da değerlendirmeye alınmıştır. Tüm testler üç kez tekrarlanmıştır. Sonuç olarak toplam 240 uygulama değerlendirmeye alınmıştır. İlaç gruplarına göre yapılan uygulama sayısı Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan ilaç gruplarında uygulama sayısı

|                    | <b>10<sup>-5</sup> M</b> | <b>10<sup>-6</sup> M</b> | <b>10<sup>-7</sup> M</b> |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Metformin</b>   | 40                       | 40                       | 40                       |
| <b>Pioglitazon</b> | 40                       | 40                       | 40                       |
| <b>Toplam</b>      | 240                      |                          |                          |

Uygulama sonrası koryoallantoik membran dışına çıkan ve irritasyon gözlenen yumurtalar değerlendirme dışı bırakılmıştır.

### **İstatistiksel Değerlendirme**

Çalışmamız verileri SPSS (ver: 14.0) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde Ki-kare testi kullanılmıştır. Verilerimiz bulgular bölümünde tablolarda denek sayısı ve yüzdesi şeklinde birleştirilip yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

### 3.3. Hücre Kültürü

Çalışmada ŞAP Enstitüsü Hücre Kültür Koleksiyonuna (HÜKÜK) ait L929 fare fibroblast hücre serisi kullanıldı.

#### Besiyeri hazırlığı:

Hücre kültüründe kullanılacak besiyeri, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine penicilin-streptomisin, L-glutamin ve fetal bovine serum (FBS) ilave edilerek hazırlandı (Tablo 3.3, Şekil 3.13)

**Tablo 3.3.** Hücre kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan malzemeler

| <b>Hücre Kültür Besiyeri</b>                 | <b>Kullanılan Miktar</b> | <b>Firma</b>                               | <b>Lot. No.</b> |
|--|--------------------------|--|-----------------|
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)    | 100ml                    | WISENT Inc<br>St. Bruno, Quebec,<br>Canada | 22K2314         |
| Penicilin-Streptomisin (10000 U/10000 mg/ml) | 1ml                      | Biological Industries,<br>Berlin           | 644U            |
| L-glutamin                                   | 1ml                      | Biochrom KG, Berlin                        | 243A            |
| Fetal Bovine Serum (FBS)                     | 4ml                      | WISENT Inc<br>St. Bruno, Quebec,<br>Canada | 633A            |



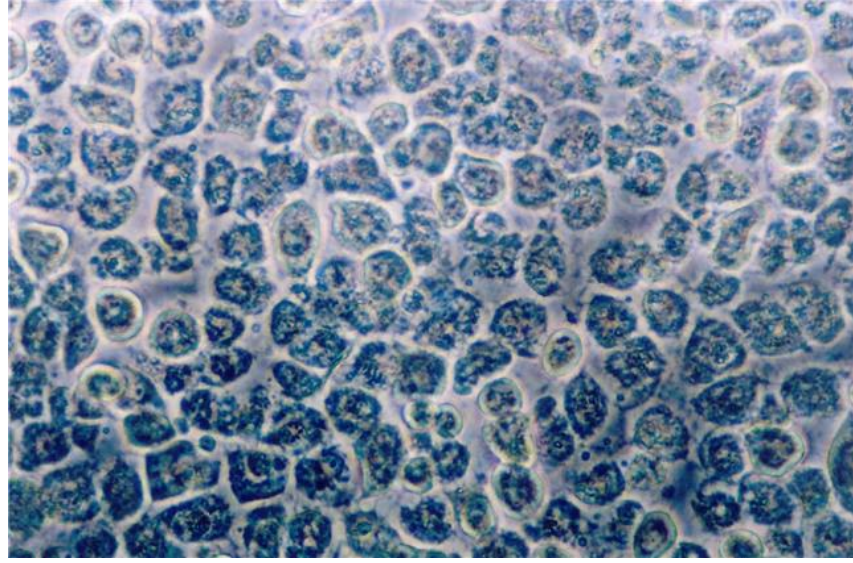
**Şekil 3.13.** Hücre kültüründe kullanılan malzemeler

Çalışma süresince kullanılacak L929 hücre serisinin devamının sağlanması ve çoğaltılması için pasajlar yapıldı.

### **Pasaj Yapılması:**

Hücrelerin yapışarak çoğaldığı hücre kültür kabındaki (flask) besiyeri aspire edildi. Fosfat buffer saline (PBS) ile hücreler yıkandıktan sonra Tripsin/EDTA solüsyonu (0,05 trypsin+%0,02 EDTA, WISENT Inc St. Bruno, Quebec, Canada) hücreler üzerine eklendi ve 37 °C'de 5 dakika etüvde bekletilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. FBS içermeyen DMEM ilave edilerek tripsin aktivasyonu durduruldu ve hücre süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonu ikiye bölünerek pasajlandı. Hücre kültür kaplarındaki hücre çoğalması izlenerek bu işlem tekrarlandı ve hücre kültür serisinin devamlılığı sağlandı.

Çalışmada L929 fibroblast hücre serisinin 6 ile 11. pasajlar arasındaki hücreleri kullanıldı (Şekil 3.14).



**Şekil 3.14.** L929 fibroblast hücre serisindeki hücrelerin  $\times 200$  büyütmedeki görünümleri

### **XTT Testi;**

XTT;(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) testi ile diyabette sık kullanılan metformin ve pioglitazon moleküllerinin hücreler üzerine toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Toksik etkinin belirlenmesinde, bu ilaçları hazırlandığı solüsyonlar ISO 10993-5 numaralı protokolünde belirtildiği üzere fenolred içermeyen DMEM içerisine, FBS, L-glutamin ve Peniciline-Streptomycine ilave edilerek hazırlandı.

### *XTT çalışma öncesi yapılan işlemler;*

1. Hücre pasaj yapılmadan önce 100  $\mu$ l süpernatant kısmı ayrıldı. Bu testlerde 'kontrol' kısmını oluşturdu.
2. Hücreler Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 2 kez yıkandıp Tripsin/EDTA ilave edildi.
3. 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 5-10 dk bekletildi.

4. Mikroskopta hücrelerin kalktığı görüldüğünde reaksiyonu durdurmak için besiyeri ilave edildi.
5. 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatat kısmı atıldı ve süspansiyondaki hücre sayısı  $2 \times 10^{-5}$  hücre/mL olacak şekilde besiyeri eklendi.

*XTT çalışma yönteminin prosedürü;*

Kullanılan temel ekipmanlar; 96 kuyucuklu mikropate, mikropate okuyucu (spektrofotometre), %5 CO<sub>2</sub> inkübatör ve multikanal pipettir.,

1. Mikropate kuyucuklarına 100 µl hücre pipetlendi ve hücrelerin yapışmasını sağlamak için 24 saat 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.
2. Hücrelerin yapışması sağlandıktan sonra mikropate kuyucuklarına her ilaç konsantrasyonu için 8 kuyucuk olacak şekilde ilaçları içeren DMEM'den 100 µl ilave edildi. Tekrar 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. Test sıvılarının mikropate içinde yerleşimleri tablo 3.4'te gösterilmiştir.
3. Kullanımdan hemen önce XTT ayracı ve aktivasyon solüsyonu 37°C'lik su banyosunda çözüldü. Berrak solüsyon oluncaya dek hafifçe karıştırıldı.
4. Reaksiyon solüsyonu oluşturmak için 0,1 ml aktivasyon solüsyonu 5 ml XTT ayracına eklendi.
5. Her kuyucuğa 50 µl reaksiyon solüsyonu eklendi ve inkübatörde 2-24 saat bekletildi.
6. Oluşan turuncu renkli formazol kristallerinin absorbansı mikropate okuyucuda (Thermo scientific, multiskan FC) 450-500 nanometrede referans olarakta 620 nanometrede okundu.

Şekil 3.15'te mikropate turuncu renk almış kuyucuklar görülmektedir.

**Tablo 3.4.** Test sıvılarının mikropate içindeki yerleşimleri

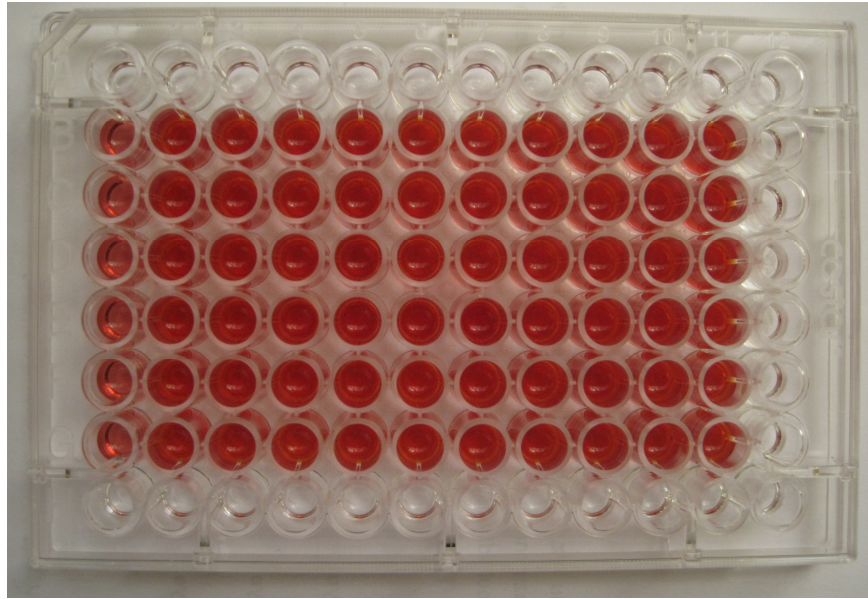
|   | 01 | 02 | 03 | 04   | 05   | 06   | 07   | 08   | 09   | 10   | 11   | 12 |
|---|----|----|----|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| A | SF | SF | SF | SF   | SF   | SF   | SF   | SF   | SF   | SF   | SF   | SF |
| B | B  | K  | K  | Met5 | Met5 | Met5 | Met5 | Met5 | Met5 | Met5 | Met5 | SF |
| C | B  | K  | K  | Met6 | Met6 | Met6 | Met6 | Met6 | Met6 | Met6 | Met6 | SF |
| D | B  | K  | K  | Met7 | Met7 | Met7 | Met7 | Met7 | Met7 | Met7 | Met7 | SF |
| E | B  | K  | K  | Pio5 | Pio5 | Pio5 | Pio5 | Pio5 | Pio5 | Pio5 | Pio5 | SF |
| F | B  | K  | K  | Pio6 | Pio6 | Pio6 | Pio6 | Pio6 | Pio6 | Pio6 | Pio6 | SF |
| G | B  | K  | K  | Pio7 | Pio7 | Pio7 | Pio7 | Pio7 | Pio7 | Pio7 | Pio7 | SF |
| H | SF | SF | SF | SF   | SF   | SF   | SF   | SF   | SF   | SF   | SF   | SF |

**SF:** Serum Fizyolojik

**Met 5,6,7 :** Metformin  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M

**B:** Blank (kör alan)

**Pio 5,6,7 :** Pioglitazon  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M



**Şekil 3.15.** XTT solüsyonu eklendikten sonra turuncu renk almış mikropate kuyucuklarının görünümü

Çalışmamızda elde edilen veriler SPSS (ver: 14.0) programına yüklenerek tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Verilerimiz bulgular bölümünde tablolarda denek sayısı ve yüzdesi şeklinde birleştirilip yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Metformin ve Pioglitazon Moleküllerinin Anjiogenez İnhibisyonu Üzerine Etkileri

Çalışmamızda her iki ilaç grubu için  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonları için gruplar oluşturuldu. Her gruba, 40 adet embriyolu yumurta alındı. Testlerin doğruluğunu değerlendirmek amacıyla deneyler 3 kez tekrarlandı.

Metforminin  $10^{-5}$  M konsantrasyonundaki pelletlerin kullanıldığı 40 embriyolu yumurtanın değerlendirilmesi sırasında; 4'ünde pelletin KAM dışı olması, 2 embriyonun ölü olması ve 2'sinde ise irritasyon olması üzerine bu yumurtalar değerlendirme dışı bırakıldılar. Pioglitazone  $10^{-5}$  M konsantrasyonundaki pelletlerin kullanıldığı 40 embriyolu yumurtanın değerlendirilmesi sırasında; 4'ünde pelletin KAM dışı olduğu, 2'sinin ölü olduğu ve 1'inde de irritasyon olduğu saptandı ve bu yumurtalar da değerlendirme dışı bırakıldılar. Metformin ve pioglitazon moleküllerinin  $10^{-5}$  M konsantrasyonundaki anjiogenez skorlarının karşılaştırılması Tablo 4.1 ve Şekil 4.1 ve 4.2'de verildi.

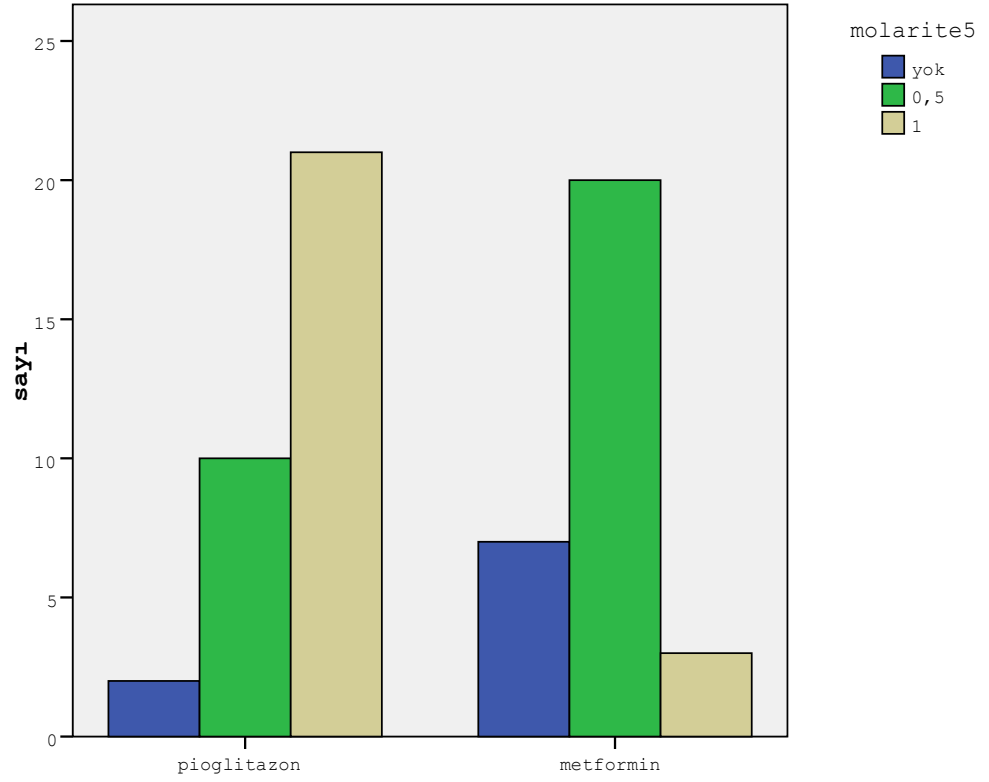
**Tablo 4.1.** Gruplara ait  $10^{-5}$  molaritedeki anjiogenez inhibisyon skorlarının karşılaştırılması

| Gruplar     |   | Molarite $10^{-5}$ |      |      | Toplam |
|-------------|---|--------------------|------|------|--------|
|             |   | 0                  | 0.5  | 1    |        |
| Pioglitazon | S | 2                  | 10   | 21   | 33     |
|             | % | 6.1                | 30.3 | 63.6 | 100.0  |
| Metformin   | S | 7                  | 20   | 3    | 30     |
|             | % | 23.3               | 66.7 | 10.0 | 100.0  |
| Toplam      | S | 9                  | 30   | 24   | 63     |
|             | % | 14.3               | 47.6 | 38.1 | 100.0  |

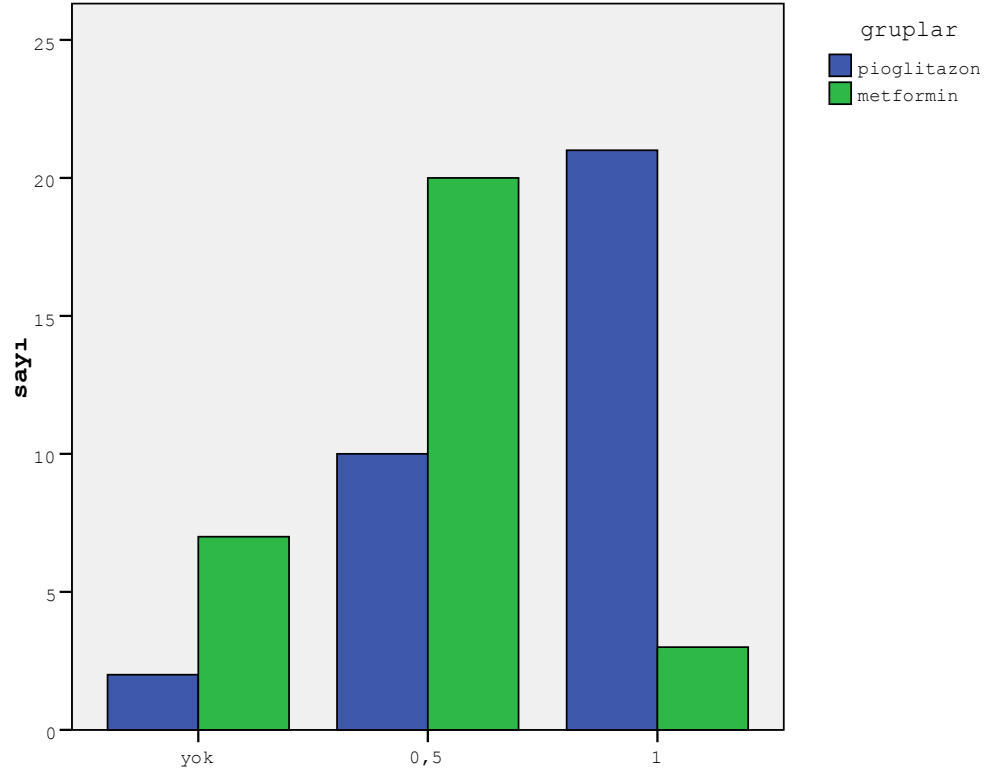
X<sup>2</sup> = 19.51

p ≤ 0.001

p < 0.05 önemli



**Şekil 4.1.** Grupların kendi içlerinde  $10^{-5}$  M konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı



**Şekil 4.2.** Gruplar arası  $10^{-5}$  M konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı

Sonuçta  $10^{-5}$  M konsantrasyonunda her iki grupta farklılık anlamlı bulundu ( $p \leq 0.001$ ). Bu bulgulara göre metformin grubundaki KAM incelemesinde; büyük bir bölümünde anjiogenez inhibisyon skoru 0 (anti-anjiogenik etki yok) olarak saptanırken (% 23.3), %66.7'sinde anjiogenez inhibisyon skoru 0.5 (zayıf anti-anjiogenik etki) olarak saptandı. Pioglitazon grubunda ise % 63.6'sında anjiogenez inhibisyon skoru 1 (orta anti-anjiogenik etki) olarak saptandı. İki grup arasındaki istatistiksel farklılık pioglitazon kolunda orta düzeydeki antianjiogenik etkinin daha yüksek oranda olmasından kaynaklanmaktadır (% 63 vs %10;  $p \leq 0.001$ ).

Metforminin  $10^{-6}$  M konsantrasyonundaki pelletlerin kullanıldığı 40 embriyolu yumurtanın değerlendirme sırasında; 5'inde pelletin KAM dışı olduğu, 3'ünün ölü olduğu ve 4'ünde ise irritasyon olduğu saptanmıştır ve değerlendirme dışı bırakılmıştır. Pioglitazone  $10^{-6}$  M konsantrasyonundaki pelletlerin kullanıldığı 40 embriyolu yumurtanın değerlendirmesi sırasında; 5'inde pelletin KAM dışı olması, 3

embriyonun ölü olması ve 1'inde de irritasyon olması nedeniyle bu yumurtalar değerlendirme dışı bırakıldı. Metformin ve pioglitazon moleküllerinin  $10^{-6}$  M konsantrasyonundaki anjiogenez skorlarının karşılaştırılması Tablo 4.2.'de ve Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te belirtildi.

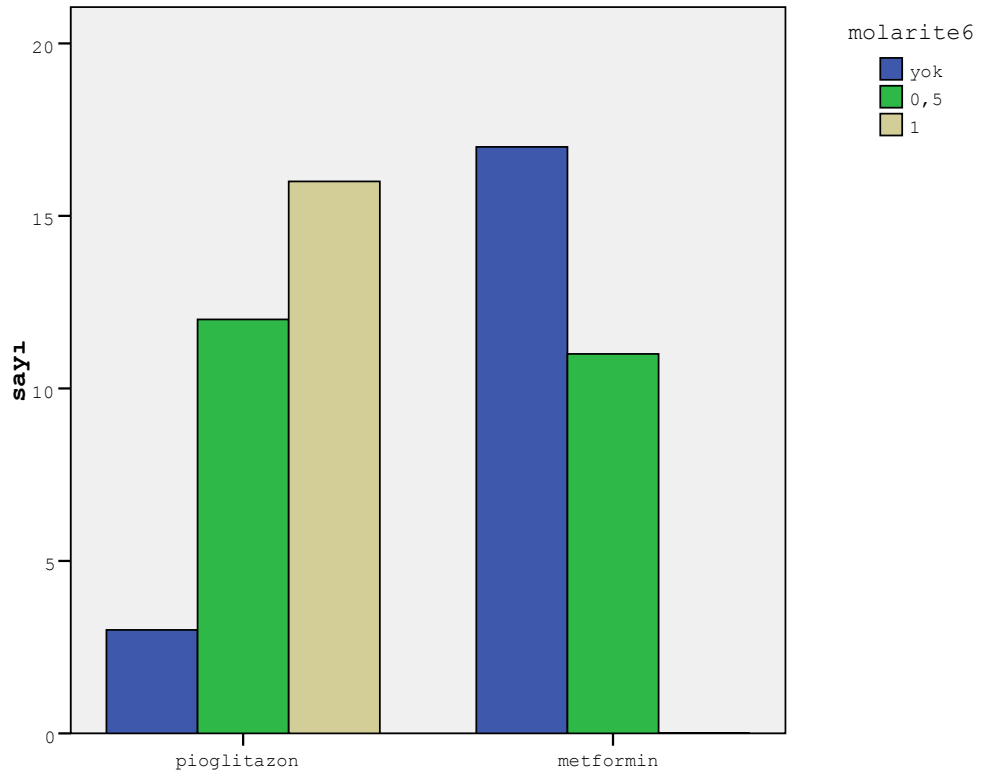
**Tablo 4.2.** Gruplara ait  $10^{-6}$  molaritedeki anjiogenez inhibisyon skorlarının karşılaştırılması

| Gruplar     |   | Molarite $10^{-6}$ |      |      | Toplam |
|-------------|---|--------------------|------|------|--------|
|             |   | 0                  | 0,5  | 1    |        |
| Pioglitazon | S | 3                  | 12   | 16   | 31     |
|             | % | 9.7                | 38.7 | 51.6 | 100.0  |
| Metformin   | S | 17                 | 11   | 0    | 28     |
|             | % | 60.7               | 39.3 | 0    | 100.0  |
| Toplam      | S | 20                 | 23   | 16   | 59     |
|             | % | 33.9               | 39.0 | 27.1 | 100.0  |

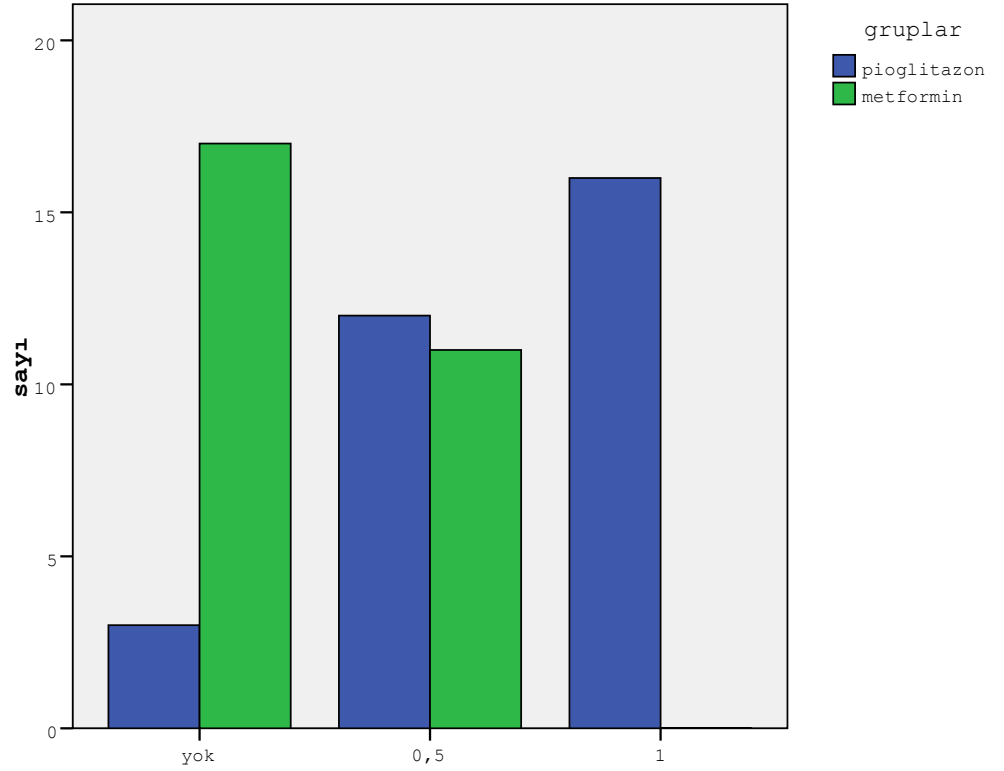
$X^2 = 25.78$

$p \leq 0.001$

$p < 0.05$  önemli



**Şekil 4.3** Grupların kendi içlerinde  $10^{-6}$  M konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı



**Şekil 4.4.** Gruplar arası  $10^{-6}$  M konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı

Sonuçta  $10^{-6}$  M konsantrasyonunda her iki grupta farklılık anlamlı bulundu ( $p \leq 0.001$ ). Bu bulgulara göre metformin grubundaki KAM incelemesinde; büyük bir bölümünde anjiogenez inhibisyon skoru 0 (anti-anjiogenik etki yok) olarak saptanırken (% 60.7), %39.3'ünde anjiogenez inhibisyon skoru 0.5 (zayıf anti-anjiogenik etki) olarak saptandı. Pioglitazon grubunda ise % 51.6'sında anjiogenez inhibisyon skoru 1 (orta anti-anjiogenik etki) olarak saptandı. İki grup arasındaki istatistiksel farklılık pioglitazon kolunda orta düzeydeki anti-anjiogenik etkinin daha yüksek oranda olmasından kaynaklanmaktadır (% 51.6 vs %0;  $p \leq 0.001$ )

Metforminin  $10^{-7}$  M konsantrasyonundaki pelletlerin kullanıldığı 40 embriyolu yumurtanın değerlendirilmesi sırasında; 3'ünde pelletin KAM dışı olması, 4 embriyonun ölü olması ve 1'inde ise irritasyon olması nedeniyle bu yumurtalar değerlendirme dışı bırakıldı. Pioglitazone  $10^{-7}$  M konsantrasyonundaki pelletlerin kullanıldığı 40 embriyolu yumurtanın değerlendirilmesi sırasında; 4'ünde pelletin

KAM dışı olması, 3 embriyonun ölü olması ve 1'inde de irritasyon olması nedeniyle değerlendirme dışı bırakıldı. Metformin ve Pioglitazon moleküllerinin  $10^{-7}$  M konsantrasyonundaki anjiogenez skorlarının karşılaştırılması Tablo 4.3'te ve Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da belirtilmiştir.

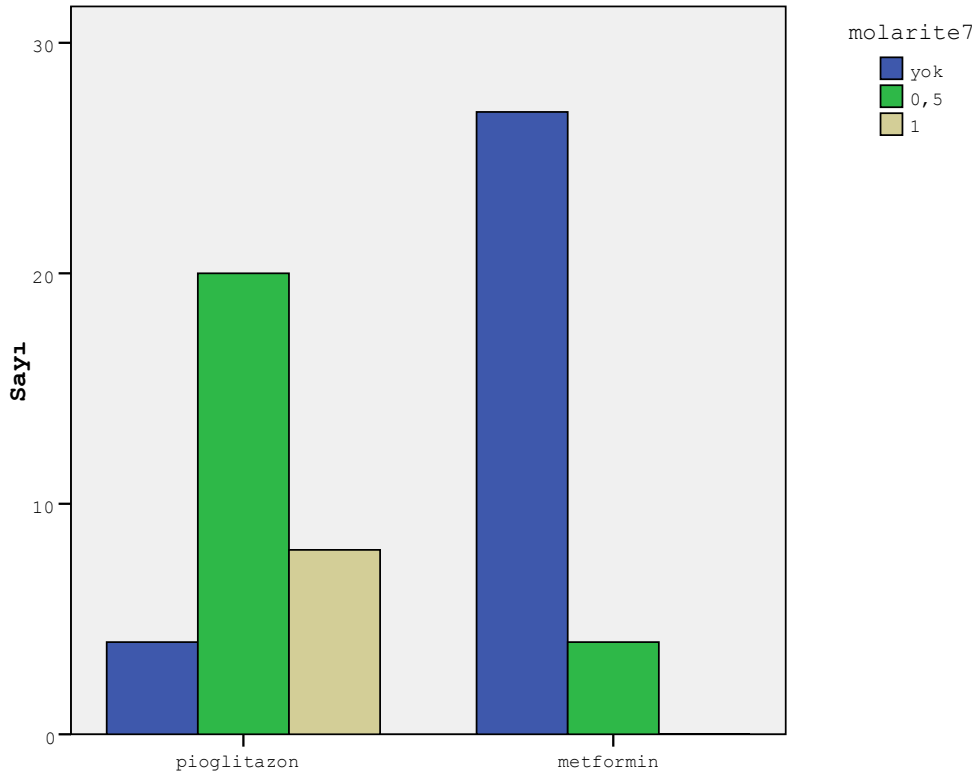
**Tablo 4.3.** Gruplara ait  $10^{-7}$  molaritedeki anjiogenez inhibisyon skorlarının karşılaştırılması

| Gruplar     |   | Molarite $10^{-7}$ |      |      | Toplam |
|-------------|---|--------------------|------|------|--------|
|             |   | 0                  | 0.5  | 1    |        |
| Pioglitazon | S | 4                  | 20   | 8    | 32     |
|             | % | 12.5               | 62.5 | 25.0 | 100.0  |
| Metformin   | S | 27                 | 4    | 0    | 31     |
|             | % | 87.1               | 12.9 | 0    | 100.0  |
| Toplam      | S | 31                 | 24   | 8    | 63     |
|             | % | 49.2               | 38.1 | 12.7 | 100.0  |

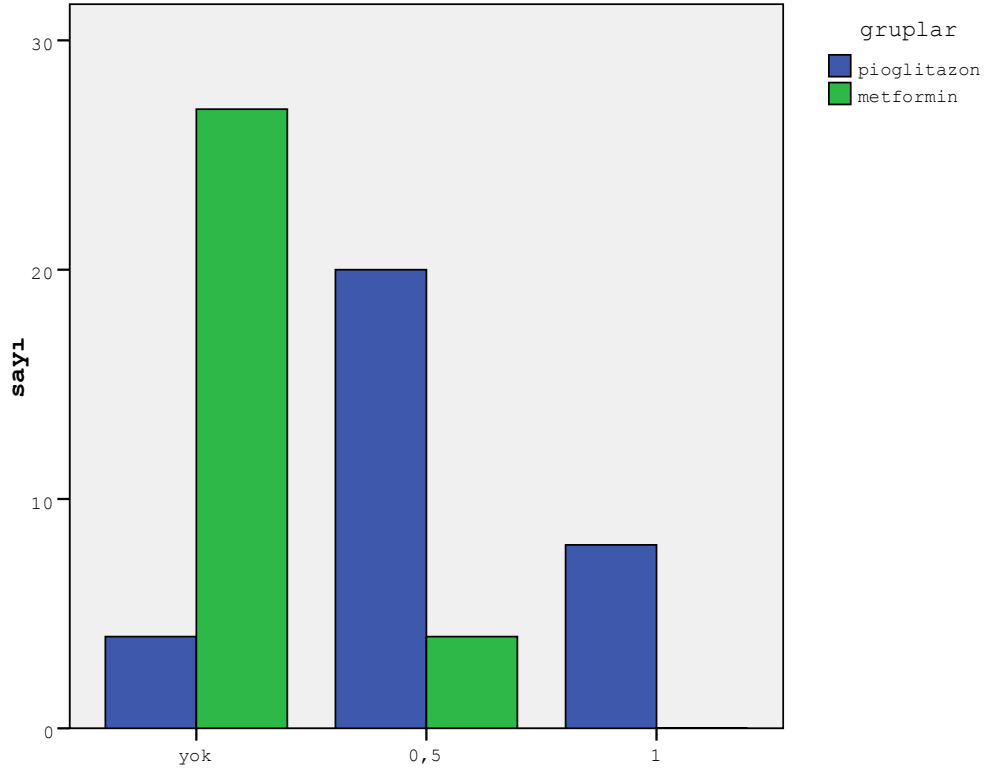
$X^2 = 35.72$

$p \leq 0.001$

$p < 0.05$  önemli



**Şekil 4.5.** Grupların kendi içlerinde  $10^{-7}$  M konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı



**Şekil 4.6.** Gruplar arası  $10^{-7}$  M konsantrasyonunda anjiogenez inhibisyon skorlarının dağılımı

Sonuçta  $10^{-7}$  M konsantrasyonunda her iki grupta farklılık anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.001$ ). Bu bulgulara göre metformin grubundaki KAM incelemesinde; büyük bir bölümünde anjiogenez inhibisyon skoru 0 (anti-anjiogenik etki yok) olarak saptanırken (% 87.1), %12.9'nda anjiogenez inhibisyon skoru 0.5 (zayıf anti-anjiogenik etki) olarak saptanmıştır. Pioglitazon grubunda ise % 62.5'inde anjiogenez inhibisyon skoru 0.5 (zayıf anti-anjiogenik etki) olarak ve % 25'inde ise Skor 1 (orta anti-anjiogenik etki) olarak saptanmıştır. İki grup arasındaki istatistiksel farklılık pioglitazon kolunda düşük ve orta düzeydeki antianjiogenik etkinin metformin koluna göre daha yüksek oranda olmasından kaynaklanmaktadır (sırasıyla; % 62.5-% 25 vs % 12.9-%0 ;  $p \leq 0.001$ ).

**Tablo 4.4.** Metformin ve pioglitazon  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarında karşılaştırılması

|                    | Skor   |                      | Gruplar     |           |        |
|--------------------|--------|----------------------|-------------|-----------|--------|
|                    |        |                      | Pioglitazon | Metformin | Toplam |
| Molarite $10^{-5}$ | 0-0,5  | Sayı                 | 12          | 27        | 39     |
|                    |        | % Molarite $10^{-5}$ | 30.8        | 69.2      | 100.0  |
|                    |        | % Gruplar            | 36.4        | 90.0      | 61.9   |
|                    |        | % Toplam             | 19.0        | 42.9      | 61.9   |
|                    | 1      | Sayı                 | 21          | 3         | 24     |
|                    |        | % Molarite $10^{-5}$ | 87.5        | 12.5      | 100.0  |
|                    |        | % Gruplar            | 63.6        | 10.0      | 38.1   |
|                    |        | % Toplam             | 33.3        | 4.8       | 38.1   |
|                    | Toplam | Sayı                 | 33          | 30        | 63     |
|                    |        | % Molarite $10^{-5}$ | 52,4        | 47,6      | 100,0  |
| % Gruplar          |        | 100,0                | 100,0       | 100,0     |        |
| % Toplam           |        | 52,4                 | 47,6        | 100,0     |        |
| Molarite $10^{-6}$ | 0-0,5  | Sayı                 | 15          | 28        | 43     |
|                    |        | % Molarite $10^{-6}$ | 34.9        | 65.1      | 100.0  |
|                    |        | % Gruplar            | 48.4        | 100.0     | 72.9   |
|                    |        | % Toplam             | 25.4        | 47.5      | 72.9   |
|                    | 1      | Sayı                 | 16          | 0         | 16     |
|                    |        | % Molarite $10^{-6}$ | 100.0       | 0         | 100.0  |
|                    |        | % Gruplar            | 51.6        | 0         | 27.1   |
|                    |        | % Toplam             | 27.1        | 0         | 27.1   |
|                    | Toplam | Sayı                 | 31          | 28        | 59     |
|                    |        | % Molarite $10^{-6}$ | 52.5        | 47.5      | 100.0  |
| % Gruplar          |        | 100.0                | 100.0       | 100.0     |        |
| % Toplam           |        | 52.5                 | 47.5        | 100.0     |        |
| Molarite $10^{-7}$ | 0-0,5  | Sayı                 | 24          | 31        | 55     |
|                    |        | % Molarite $10^{-7}$ | 43.6        | 56.4      | 100.0  |
|                    |        | % Gruplar            | 75.0        | 100.0     | 87.3   |
|                    |        | % Toplam             | 38.1        | 49.2      | 87.3   |
|                    | 1      | Sayı                 | 8           | 0         | 8      |
|                    |        | % Molarite $10^{-7}$ | 100.0       | 0         | 100.0  |
|                    |        | % Gruplar            | 25.0        | 0         | 12.7   |
|                    |        | % Toplam             | 12.7        | 0         | 12.7   |
|                    | Toplam | Sayı                 | 32          | 31        | 63     |
|                    |        | % Molarite $10^{-7}$ | 50.8        | 49.2      | 100.0  |
| % Gruplar          |        | 100.0                | 100.0       | 100.0     |        |
| % Toplam           |        | 50.8                 | 49.2        | 100.0     |        |

#### 4.2. Metformin ve Pioglitazon Moleküllerinin XTT Yöntemi ile *In vitro* Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

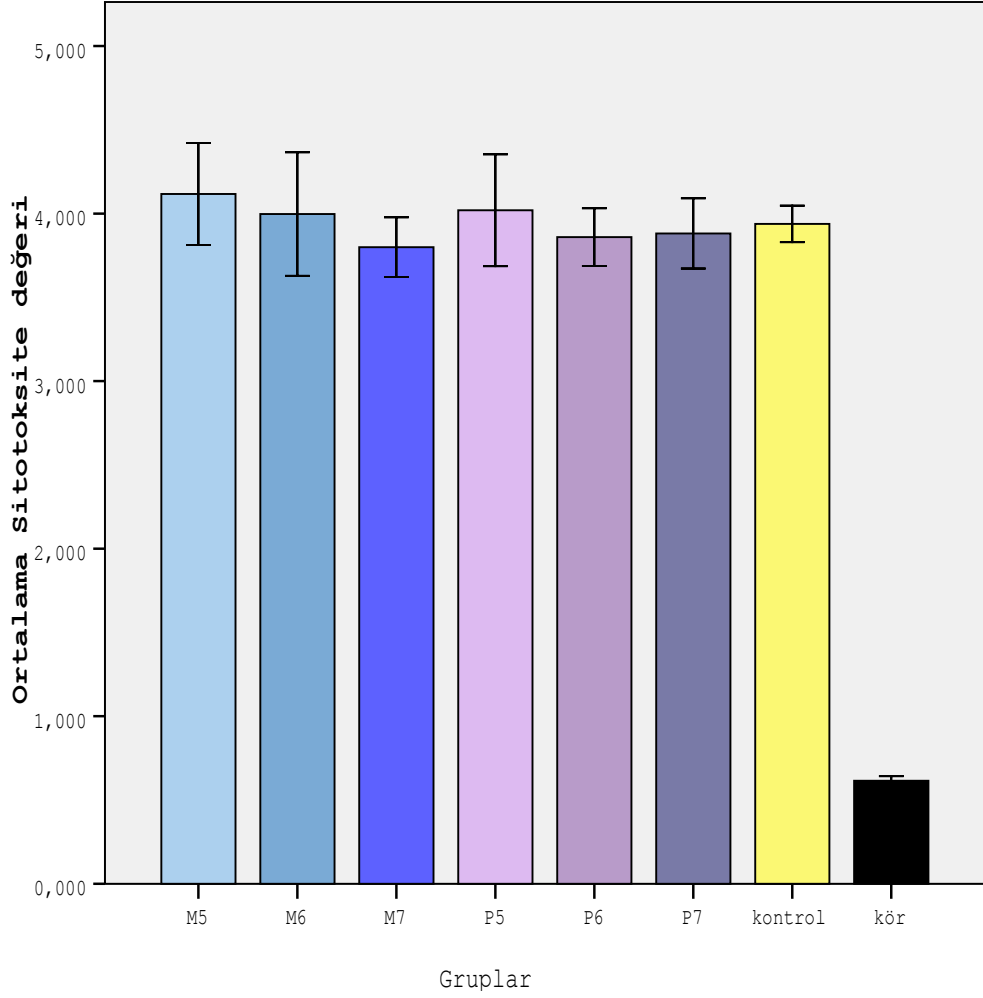
Metformin ve pioglitazon moleküllerinin farklı konsantrasyonlarının L929 fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri XTT yöntemiyle araştırıldı. Mikroplaterin mikroplate okuyucusunda 450 ve 620 nm’de okunması sonucu elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Grupların sitotoksosite değerleri Tablo 4.5’te ve Şekil 4.7’de verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Grupların sitotoksosite değerlerinin karşılaştırılması

| Gruplar                      | Sitotoksosite değerleri X±S        |
|------------------------------|------------------------------------|
| Metformin 10 <sup>-5</sup>   | 4.117±0.363                        |
| Metformin 10 <sup>-6</sup>   | 3.99±0.441                         |
| Metformin 10 <sup>-7</sup>   | 3.799±0.213                        |
| Pioglitazon 10 <sup>-5</sup> | 4.020±0.399                        |
| Pioglitazon 10 <sup>-6</sup> | 3.859±0.206                        |
| Pioglitazon 10 <sup>-7</sup> | 3.881±0.250                        |
| Kontrol                      | 3.938±0.171                        |
| Kör                          | 0.614±0.026                        |
| SONUÇ                        | F= 105.61 p=0.001<br>P<0.05 önemli |

Sitotoksosite yönünden yapılan analizde metformin, pioglitazon ve sadece hücrelerin yer aldığı kontrol grubu ile hiçbir hücrenin olmadığı kör grupları arasında fark anlamlı bulundu (p=0.001). Ancak bu fark kör grubunda hücre

bulunmamasından kaynaklanmakta idi. Hücrelerin bulunduğu 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşan fark izlenmedi ( $p>0.05$ ).



**Met 5,6,7 :** *Metformin*  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M

**Pio 5,6,7 :** *Pioglitazon*  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M

**Şekil 4.7.** Gruplar arası ortalama sitotoksite değerlerinin karşılaştırılması

## 5.TARTIŞMA

### 5.1. Metformin ve Pioglitazonun Anti-anjiogenik Etkileri

Anjiyogenez veya yeni damar oluşumu, embriyogenez sırasında temel olaylardan birisidir. Embriyogenez dışında yetişkinlerde anjiyogenez çok sınırlı olaylarda; yaralanma sonrası doku tamiri ve menstrual siklus sırasında görülmektedir (79). Ancak kontrolsüz anjiogenez diyabetik retinopati, ateroskleroz, kronik inflamasyon, tümör büyümesi ve metastazı gibi birçok patolojik durumda sorumlu tutulmaktadır. Anjiogenez, ekstraselüler matriks, soluble faktör ve hücreler etkileşimi sonucu endotelial hücrelerin differansiasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile seyreden kompleks bir işlemdir (80). Tümör oluşumu ve metastazında da anjiogenez suçlanmaktadır. Anjiogenez sadece büyümekte olan tümöre oksijen, besinler ve büyüme faktörlerini sağlayan kritik bir süreç değildir. Aynı zamanda göç eden tümör hücrelerinin sistemik dolaşıma geçmesi ve uzak metastaz yapmalarını da sağlar. Mikrometastatik odakların da varlıklarını sürdürebilmeleri için anjiogenez gereklidir (80). Günümüzün ilerleyen teknolojisiyle birlikte, anjiogenez mekanizmaları anlaşılma çalışılmış ve anti-anjiogenik tedavi yaklaşımları geliştirilmeye başlanmıştır. Açık ki; kanserli bir hastaya anti-anjiogenik tedavi uygulamak suretiyle; yara iyileşmesi, gebelik vb. gibi bir durumun olmadığı ortamda hastaya hiçbir yan etki olmadan, sadece tümörün etrafındaki damar yapısını bloke edilerek etkili ve spesifik bir tedavi yaklaşımı yapılmış olacaktır (64,81).

Sadece kanser değil, artrit ve psöriazis gibi birçok hastalığın patogenezi de suçlanan anjiyogenezi, başlatan faktörler ve önleyici tedavi yöntemleri de giderek önem kazanmaktadır. Ancak tek bir anjiyogenez inhibitörü ile yapılan tedavilerin, özellikle kanser hücreleri tarafından oluşturulan çok sayıdaki anjiogenik faktörler ile mücadelede yetersiz kalabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle gelecek yıllarda anjiogenik hastalıkların moleküler temellerinin daha iyi belirlenmesi yeni tedavi modellerinin geliştirilmesi açısından önemli olabilecektir. Bu nedenle, anjiyogenez konusu aktif bir araştırma alanıdır. *In vitro* modeller bu süreçle ilgili önemli bilgiler sunmakla birlikte, *in vivo* etkinin ne olacağını tam olarak gösterememektedir.

Anjiyogenez araştırmalarında çok yaygın olarak kullanılan ve oldukça faydalı bir *in vivo* model ise tavuk embriyosu koryoallantoik membran (KAM) modelidir. Biz de çalışmamızda diyabetin tedavisinde kullanılan metformin ve pioglitazon moleküllerinin, anti-anjiogenik etkilerini araştırmak üzere; uygulanabilirliği kolay olan, ucuz ve memeli hayvan modeline uygun sonuçlar verebilen KAM modelini seçtik.

KAM modeli uygun bir *in vivo* model olarak kanser davranışlarının ortaya konmasında biyomateryallerin etkilerinin incelenmesinde, fotodinamik tedavi yaklaşımlarında ve en son olarak anjiogeneziste sıklıkla kullanılan uygun bir model olarak karşımıza çıkmaktadır. KAM ekstraembriyonik bir membran olup, hem anjiogenezis hem de anti-anjiogenezis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu modelde çalışmanın en temel avantajı çalışma yapılacak dölleniş yumurtanın temininin ucuz ve kolay oluşudur. Bu modelle yapılan çalışmalarda sonuçlara çok kısa sürede ulaşmak mümkündür. Çalışma sonuçları gözle rahatlıkla saptanabildiği gibi ışık veya elektron mikroskobu ile de histokimyasal veya immünohistokimyasal olarak da değerlendirilebilme özelliğine sahiptir. Ayrıca fiske edilemeyen örneklerde, DNA ve kollajen ölçülmesine de imkân sağlayabilmektedir. İstenirse bu yöntem ile gen ekspresyonunun gösterilmesi amacıyla ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) da çalışılabilmektedir (73).

Anjiogenez konusunda birçok farklı *in vivo* model bulunmaktadır. Bunlar içinde KAM modelinin ucuz oluşu, hızla sonuca ulaşılabilmesi, çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinin kolaylığı, güvenilirliği ve tekrarlanabilir olması nedeniyle çalışmamızda bu yöntemi kullandık. Ülkemizin araştırma olanakları da göz önüne alındığında KAM modeli anjiogenez çalışmalarında kullanılabilecek en uygun yöntemdir. Üniversitemizde bu yöntemi kullanarak yaptığımız ve halen deneyleri devam etmekte olan henüz yayınlanmamış birçok çalışmamız da bulunmaktadır (Birlikte çalıştığımız; aynı yöntemi kullanarak yaptığımız alışmalar: T. Doğan ve ark. ile Düşük moleköl ağırlıklı heparinlerin karşılaştırılması, F. Kılıçlı ve ark. ile İnsan ve Analog insülinlerin karşılaştırılması, Vitamin D'nin anjiogenik etkinliğinin araştırılması M. şencan ile Ankaferd'in anjiogenezis üzerine etkisinin araştırılması).

Diyabet giderek artan hatta “epidemi” olarak nitlendirebileceğimiz önemli komplikasyonları olan bir hastalıktır. Patolojik anjiogenez, diyabetin birçok komplikasyonunda suçlanmaktadır. Biz de bu amaçla diyabette kullanılan metformin ve pioglitazon moleküllerinin anjiogenez üzerine olan etkilerini oldukça deneyimli olduğumuz KAM modeli yöntemini kullanarak göstermeyi amaçladık.

Diabetes mellitus küresel bir sorundur ve kontrolsüz diyabet ise kardiyovasküler hastalık, nöropati, son dönem böbrek yetmezliği yanı sıra retinopati gibi birçok vasküler komplikasyon ile kendini göstermektedir. Nonproliferatif retinopati retinal kanama, ödem ve hatta görme kaybına neden olabilmektedir. Bu da ilerleyen dönemlerde vitreal hemoraji ile proliferatif retinopatiye dönüşebilmektedir. Yeni damar oluşumunun artması ile bu sürecin sonunda skar ve retina dekolmanı da gelişebilmektedir. Diyabet bu vasküler komplikasyonlar yanı sıra yapılan birçok çalışmada kanser insidansındaki artışlar ile de ilişkilendirilmiştir. Prospektif olarak yapılan “*Cancer Norfolk Study*” çalışmasında HbA1c ve kolorektal kanser gelişme riski arasında ilişki bulunmuştur (82).

Birçok meta-analiz ve yeni yapılan çalışmalar göstermiştir ki; diyabette birçok solid organ ile hematolojik malignansilerin sıklığı artmaktadır (Karaciğer, pankreas, böbrek, kan, meme, endometriyum kanserleri ile non-Hodgin lenfoma gibi.) (41-45,83). Fakat Kasper ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada pek çok farklı mekanizma ile diyabette prostat kanseri insidansının azaldığı tespit edilmiştir (84).

Davila ve arkadaşlarının yaptığı, diyabet ile hepatosellüler kanser (HCC) insidansı arasındaki ilişkiyi araştıran bir başka çalışmada ise; diyabetik hastalarda HCC sıklığının arttığı gösterilmiştir. Sıklıktaki bu artış, diyabette artan hepatosteatoz ve nonalkolik steatohepatit ile artmış HCV ve HBV enfeksiyonuna bağlanmıştır. Sayılan bu durumların hepsi HCC gelişiminde temel rol oynayan faktörler olarak vurgulanmıştır (85).

Yapılan bazı çalışmalarda diyabetik hastalarda böbrek kanserinin de arttığı gösterilmiştir. Bunun etyopatogenezinde suçlanan temel mekanizma, hem hiperinsülinemi ve obezite hem de spesifik bazı faktörlerdir (86,87).

Paolo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; reproduktif dönemdeki kanserlerin özellikle de meme ve endometriyal kanserin diyabet ile birlikte insidansının arttığı gösterilmiştir. Bu risk artışının temel sebepleri arasında özellikle obezite suçlanmıştır (83).

Mitri ve arkadaşlarının yaptığı diyabet ve non-hodgin lenfoma arasındaki ilişkiyi gösteren geniş prospektif kohort çalışmada; diyabetli hastalarda Non-Hodgkin lenfoma riskinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Bu risk artışında nötrofil aktivasyonundaki bozukluk ile diyabetteki anormal humoral aktivite suçlanmıştır (88).

Birçok çalışmada diyabette kolorektal kanserlerin insidansındaki artış da vurgulanmaktadır. Suçlanan temel mekanizmlar ise; hiperinsülinemi, azalmış barsak transit zamanı ve artmış fekal safra asit konsantrasyonu olarak belirtilmektedir (85-93). Yine Japonya'da Inoue ve arkadaşları tarafından, geniş bir populasyon seçilerek yapılan kohort bir çalışmada da, diyabet ve kanser riskinde artış anlamlı bulunmuştur (39).

Avrupalı ve Kanadalı kronik hepatit C'li 541 olguda yapılan bir çalışmada ise diyabetli olgularda karaciğer kanserinin arttığı gösterilmiştir (92). Yine aynı çalışmada tip 2 diyabet ile birçok farklı kanser (karaciğer, pankreas, kolon, endometriyum, böbrek ve meme kanseri) arasında da ilişki tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yapılan pek çok çalışma göstermiştir ki diyabette birçok kanserin insidansı artmaktadır. Ayrıca diyabetli kanser olgularının mortalitelerinde de anlamlı artışlar tespit edilmiştir. Biz de çalışmamızda diyabette kullanılan metformin ve pioglitazon moleküllerinin kanser üzerine etkilerinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bu amaçla pek çok literatürü gözden geçirdik. Kanser oluşumunda anjiogenezin güçlü bir şekilde suçlandığını gözlemledik. Bu amaçla metformin ve pioglitazon moleküllerinin anjiogenez inhibisyonu üzerine etkilerini ucuz ve diğer anjiogenezis yöntemlerine göre daha avantajlı olan KAM modelini seçtik.

Metformin molekülü, 30 yıldan daha uzun bir süredir diyabetin tedavisinde kullanılmaktadır. Tip 2 diyabette birinci basamak tedavi seçeneklerinden biridir.

Metforminin birçok faydalı metabolik etkisinin yanı sıra diyabetli olgularda kanser insidansını azalttığına dair çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin Evans ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; metformin tedavisi alan ve almayan hastalar karşılaştırıldığında kanser riskinin metformin kullanan grupta azaldığı gösterilmiştir (51).

Metforminin anti-kanser etkinliğinin, AMP protein kinaz stimülasyonu sonucu aktive olan LKB-1 tümör supressör genine bağlı olduğu belirtilmiştir (93). Ayrıca AMP kinaz aktivatörleri insülin reseptörlerine sinyal akışını azaltır ve insülinin proliferasyonu aktive edici etkisini inhibe eder (94-95).

Alimova ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; MCF-7, BT-474, SKBR-3 insan meme kanser hücrelerinde *in vitro* olarak metforminin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (96). Cazzaniga ve arkadaşlarının yaptığı epidemiyolojik bir çalışmada ise metforminin meme kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (97). Bir başka çalışmada ise metforminin antikanser etkinliğinin MAPK, AKT, mTOR inhibisyonu yoluyla ve erbB2 overekspresyonundaki artış ile olduğu ileri sürülmektedir (83).

Sonuç olarak metformin molekülü sayılan birçok mekanizma ile kanser oluşumunu ve kanserli dokunun proliferasyonunu azaltmaktadır. Biz de çalışmamızda metforminin anti-kanser etkinliğinde, anjiogenez inhibisyonunda rolü olup olmadığını göstermek amacıyla tercih ettiğimiz KAM modeli verilerine göre  $10^{-5}$  M konsantrasyonunda metforminin zayıf anti-anjiogenik etkinlik gösterdiğini tespit ettik. Buna karşılık  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarında anti-anjiogenik etkinlik skorunun sıfır olduğunu gösterdik. Daha önceki birçok çalışmada anti-anjiogenik etkinliği gösterilmiş olan pioglitazon molekülü ile de karşılaştırıldığında metforminin pioglitazona göre yüksek konsantrasyonlarda çok zayıf anti-anjiogenik etkinlik gösterdiğini tespit ettik. Sonuç olarak metforminin anti-kanser etkinliğinde, anjiogenez inhibisyonu üzerine olan etkisinin etkili olmadığı kanaatine vardık.

Kanser tedavisinde geleneksel kemoterapi ve radyoterapi protokollerinin yanı sıra yenilikçi terapötik modalitelerin de kullanımı sözkonusudur. Bu amaçla yapılan pek çok çalışmada IGF-1 reseptör sistemi de araştırılmış ve birçok antikanser

stratejisi de bu yolaklar üzerinden dizayn edilmiştir. Bu amaçla IGF-1 R monoklonal antikorları, tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir. Ayrıca kanser tedavisinde PPAR- $\gamma$  agonistlerinin de yenilikçi tedavi yaklaşımları içerisinde kullanılabilceği belirtilmektedir (98).

Thiazolidinedionlar, PPAR- $\gamma$  reseptörünü aktive edici özelliğe sahip molekülerdir. Dokularda insulin duyarlılığı üzerine etki ederek kan şekeri regülasyonunda görev alırlar. TZD'ler de diğer PPAR- $\gamma$  agonistleri gibi birçok malignitede tümörün büyümesini engelleyici apoptozisi artırıcı etkilere sahiplerdir. Ayrıca liposarkom, meme kanseri, kolon ve prostat kanserinde kısmi rediferansiasyona neden oldukları da gösterilmiştir (99-100).

PPAR- $\gamma$  reseptörü, pankreas beta hücrelerinde, adipoz dokuda, vasküler endotelde ve ayrıca makrofajlarda bulunmaktadır. PPAR-  $\gamma$  1 ve 2 özellikle adipoz dokuda ve kolonda bulunurken az miktarda da ince barsak, karaciğer ve böbrekte de bulunmaktadır. PPAR- $\gamma$  4 ve 5 sadece makrofajlarda bulunmaktadır. PPAR- $\gamma$  6 ve 7 ise adipoz dokuda bulunmaktadır. TZD'ler gibi birçok molekülde PPAR- $\gamma$  ligandı üzerinden etki göstermektedir (101). Günümüzde yapılan pek çok çalışmada TZD'lerin anti-hiperglisemik etkinlikleri yanı sıra PPAR- $\gamma$  aktivitesi üzerinden antitümöral etkinliklerinin de olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle TZD'lerin kemoterapotik ajanlar ile kombine kullanımlarının malignitelerin tedavisinde ümit vaat edici olabileceği belirtilmektedir (98).

PPAR- $\gamma$  moleküllerinin antitümöral etkinlikleri tam olarak aydınlatılmamıştır. Bir kısım çalışmada antitümöral etkinliklerinin apoptozisi indükleyerek gerçekleştiği belirtilmiştir (102). Örneğin tiroglitazon ile yapılan bir çalışmada; akciğer kanser hücrelerinde PPAR- $\gamma$  ve ERK1/2 üzerinden apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir. Tiroglitazon, antiapoptotik protein olan Bcl-1 ve 2'yi azaltarak PPAR-  $\gamma$  ve ERK1/2'nin nükleer birikimine neden olur (103).

Bir diğer TZD olan roziglitazon ile yapılan bir çalışmada; roziglitazonun anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde apoptozisi indüklediği de gösterilmiştir. Bu etkisini ise Bcl-XL ekspresyonunu azaltarak ve caspase-3 ve 7'yi aktive ederek

yaptığı belirtilmektedir. Yine aynı çalışmada roziglitazonun p21 ve P27 düzeylerini artırarak tümör büyümesini inhibe ettiği de gösterilmiştir (104).

PPAR- $\gamma$  aktivasyonu kanser hücre proliferasyonunu bloke ederek de tümör gelişimini önlemektedir. Bilinen mekanizma, hücre siklusunu durdurmasıdır. Siklinler *cyclin-dependent kinases* (CDKs)'ı aktive eden potansiyel onkogenlerdir. Siklin D1 kanser hücrelerinin amplifikasyonu ve overekspresyonuna neden olur. TZD'ler hücre siklusunu G0/G1'de bloke eder. TZD tedavisi ile yalnızca Siklin D1 düzeyi azalmaz. Aynı zamanda hücrenin nükleer faktörleri olan pRb ve CdK4'ün de proliferasyonu azalır. CDK inhibitörlerini ( p21 ve p27 ) de artırır (98).

PPAR-  $\gamma$  aktivasyonunun tümör süpressör özelliğini gösteren bir diğer mekanizma ise; hücrel diferansiyasyonun artırılmasıdır. Meme kanser kültürlerinde PPAR-  $\gamma$  ligandlarının yaygın lipid birikimine ve epitelyal gen ekspresyonuna neden olarak malign durumu azalttıkları gösterilmiştir (105).

Antitümöral etkinliği araştıran bir başka çalışmada ise PPAR- $\gamma$  agonistlerinin tümör dokusunda anjiogenezisi inhibe ettikleri ve tümörün mikroçevresel infiltrasyonunu azalttıkları tespit edilmiştir. Primer tümör ve metastazlar anjiogenez bağımlı olduklarından tümör endoteli TZD'ler için potansiyel hedef olarak gösterilmiştir. PPAR- $\gamma$  üzerinden antiproliferatif etkinlik gösterirler. Ayrıca TZD'ler bu yol ile koroidal neovaskülarizasyonu da inhibe ederler. PPAR- $\gamma$  agonistleri direk ve indirek mekanizmalar ile tümör anjiogenezisi inhibe edebilir. Anti-anjiogenik etkinlikleri ile ilgili bir diğer mekanizma da makrofaj aktivasyonu ile invazyonun önlenmesidir (106).

PPAR- $\gamma$  ligandının antianjiogenik etkinliğini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada ise; hem *in-vivo* hem de *in vitro* yöntemler kullanılarak anjiogenezi etkili şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. *In vivo* olarak "**human umbilical vein endothelial cells**" (HUVEC) diferansiyasyonunun PPAR- $\gamma$  aktivasyonu ile diferansiyasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir. *In vivo* yapılan çalışmalarda ise PPAR- $\gamma$  aktivasyonu ile VEGF inhibisyonu ile anjiogenezin inhibe edildiği gösterilmiştir. Sonuç olarak ise PPAR- $\gamma$  agonistlerinin kanser ve diğer

vasküloproliferatif bozukluklarda anti-anjiogenik etkinliklerinden faydalanılarak kullanılabilecekleri belirtilmiştir (107).

Biz de çalışmamızda bu bilgiler ışığında PPAR- $\gamma$  agonisti olan ve pek çok çalışmada anjiogenezi inhibe ettiği gösterilen pioglitazon molekülünün anti-anjiogenik etkinliğini KAM modeli ile göstermeyi amaçladık.

KAM modeli kullanılarak literatürde roziglitazon, pioglitazon moleküllerinin anjiogenez inhibisyonu yaptıkları gösterilmiştir (108). Bu çalışmada; PPAR- $\gamma$  agonisti olan pioglitazon ve roziglitazon moleküllerinin endotel hücre migrasyonu üzerine etkisi ve VEGF ile b-FGF molekül indüksiyonu ile anjiogenez üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla KAM modeli kullanılarak anjiogenez üzerine olan etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. KAM deneyinin sonucunda, pioglitazon ve roziglitazon moleküllerinin VEGF ve b-FGF'nin pro-anjiogenik etkilerini anlamlı bir şekilde inhibe ettikleri gösterilmiştir. İki molekül karşılaştırıldığında anti-anjiogenik etkilerinin benzer olduğu tespit edilmiştir.

Panigrahy ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise; PPAR- $\gamma$  agonisti olan roziglitazon molekülünün yapılan tümör büyümesi ve metastazı üzerine inhibitör etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır (106). Bu çalışma da *in vitro* ve *in vivo* yöntemler kullanılarak Roziglitazon molekülünün indirek ve direk etkiler ile anjiogenezi inhibe ettiği ve primer tümör büyümesini ve metastazı azalttığı gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde VEGF düzeyini azaltarak anjiogenezi azalttığı fakat *in vitro* olarak düşük dozlarda tümör hücre proliferasyonuna etkisiz olduğu gösterilmiştir. Sonuçta PPAR- $\gamma$  agonistlerinin kanser gibi anjiogenezin ön planda olduğu hastalıklarda anti-anjiogenik etkilerinden faydalanılarak kullanılabileceğine karar verilmiştir.

Biz de çalışmamızda pioglitazon molekülünün KAM modelini kullanarak anjiogenez inhibisyonu yapıcı etkisini farklı doz konsantrasyonları ile göstermek istedik. İnsanda kullandığımız etkin konsantrasyon olan  $10^{-6}$  M konsantrasyonu ile bir üst ve bir alt konsantrasyon olan  $10^{-5}$  M ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarda pioglitazon molekülünü KAM modeline uyguladık ve sonuçları kendi aralarında ve metformin molekülü ile karşılaştırmak istedik. Pioglitazon molekülünün özellikle yüksek doz

konsantrasyonlarında anlamlı olarak anjiogenezi inhibe ettiğini tespit ettik. Fakat Panighary ve arkadaşlarının rosiglitazon ile yaptıkları çalışmada ilginç olarak yüksek doz rosiglitazon molekülünün (400mg/kg/gün) düşük dozdan (50mg/kg/gün) daha az anjiogenik etkinlik gösterdiği gösterilmiştir (106). Fakat bu bifazik etkinin alışılmamış olduğu, çünkü diğer anti-anjiogenik moleküllerinin özellikle anjiogenezi yüksek doz konsantrasyonlarında inhibe ettikleri vurgulanmıştır (IFN- $\alpha$  gibi). Bu bifazik yanıt yüksek dozlarda görülebilen negatif *feed-back* etkiye bağlanmıştır.

Daha önceki çalışmalarda anti-anjiogenik etkinliği gösterilen pioglitazon molekülü ile metformin molekülünü çalışmamızda karşılaştırdık. Metformine göre pioglitazon molekülünün anjiogenezi daha güçlü inhibe ettiğini tespit ettik.

Tüm bu yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamız doğrultusunda pioglitazon molekülünün antianjiogenik etkinliği ile kanser tedavisinde ve diğer vasküloproliferatif hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği kanısına vardık. Çünkü diyabetin vasküler komplikasyonlarının oluşumunda temel mekanizma endotelial disfonksiyon ve anormal anjiogenezistir. Özellikle de diyabetik proliferatif retinopati gelişiminde artmış anjiogenezis suçlanmaktadır. Böylece TZD'lerin kullanımı ile diyabette artan kanser insidansını ve vasküler komplikasyonları hem kan şekeri regülasyonu hem de antianjiogenik etkinlikleri sayesinde azaltabileceğimiz sonucuna vardık.

Metforminin de güçlü anti-anjiogenik etkisi olmasa da gözden geçirilen literatürler doğrultusunda farklı pek çok mekanizma yoluyla aynı amaçlar ile kullanılabileceği kanısına vardık.

## **5.2 Metformin ve Pioglitazon Moleküllerinin XTT Yöntemi İle Sitotoksitesinin Gösterilmesi**

Toksitesisi bilinmeyen bir ajanın insanlarda kullanımı etik açıdan mümkün değildir. Bu nedenle, insanlarda kullanılması düşünülen materyallerin toksitesisinin *in vivo* koşullarda değerlendirilmesi amacıyla hayvan deneyleri yapılmaktadır. Ancak hayvanlar ve insanlardaki fizyolojik reaksiyonlar birbirinden farklı olabilmektedir. Deneyler sırasında hayvanlara bağlı yapısal faktörler deney sonuçlarını ve çalışmanın

güvenilirliğini etkileyebilmekte, ortaya çıkabilecek biyolojik etkileşimler sonucunda anlamlı sonuçlar elde edilmesi engellenebilmektedir. Bunların yanı sıra, hayvan deneyleri pahalı ve zaman alıcı olup, hayvanların beslenme ve bakımıyla ilgili sorunlarla karşılaşılabilen, bilimsel araştırmalarda hayvan deneklerin kullanımı, hayvan hakları açısından sorgulanarak sınırlandırılmaktadır (109). Bu nedenle *in vivo* şartlarda uygulanması planlanan materyallerin vücut dokuları üzerindeki toksik etkilerini değerlendirmek ve oluşturabilecekleri biyolojik reaksiyonları taklit ve tahmin edebilmek için *in vitro* biyouyumluluk testleri geliştirilmiştir (110).

*In vitro* koşullarda yürütülen test yöntemleri, kontrol edilebilen koşullarda yürütülen ve hücrel toksisitenin mekanizmasını açıklayan, uygulanması kolay araştırmalardır. Bu testlerde hücrel olaylar, karmaşık hücreler arası ilişkilerden bağımsız olarak değerlendirilmektedirler (111).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda sitotoksitenin belirlenmesinde, genellikle, hücre kültürü test yöntemlerinin kullanıldığı görülmektedir (112-114). Hücre kültürü test yöntemleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları, tekrarlanabilme özellikleri ve çalışma koşullarının standardize edilebilmesi nedeniyle tercih edilmektedirler (115-117). Bu nedenle, sunulan çalışmada da metformin ve pioglitazon moleküllerinin sitotoksiteleri, hücre kültürü yöntemi ile *in vitro* koşullarda değerlendirilmiştir.

Materyallerin sitotoksitesini belirlemeye yönelik, güvenilir bir diğer yöntem olan agar difüzyon testinde toksik elemanların yayıldığı bölgelerin sınırları belirgin olmadığından, canlı hücre sayımı yorucu ve zaman alıcı olup, yanılı payı yüksektir (118). Buna karşın, hücre canlılığını belirlemeye yönelik XTT kolorimetrik testinde aynı anda ve çok sayıda örnek, kısa sürede ve güvenilir şekilde değerlendirildiğinden, çalışmamızda agar difüzyon testi yerine XTT testi tercih edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında, hangi hücre tipinin seçilmesi gerektiğiyle ilgili kesin bir cevap bulunmamaktadır. Diploid hücrelerin kullanılması, laboratuvarlararası karşılaştırmaların yapılmasında güçlükler çıkartmaktadır. Bu karşılaştırmaların

yapılması, bütün dünyada kullanılabilecek devamlı hücre hatlarının kullanılması ile daha kolay hale gelmektedir. Devamlı hücre hatları aneuploid kromozoma sahiptirler, hızlı üremektedirler ve doğru pasajlandıklarında çok uzun süreyle yaşatılmaları mümkündür (121). Elde edilmeleri de primer hücre kültürüne oranla daha kolaydır. Çok uzun bir dönem boyunca fenotipik özelliklerinde kayıp söz konusu değildir. Devamlı hücre hatları ile primer hücre kültürlerinden daha hızlı sonuç elde edilmektedir (122). Bu nedenlerden dolayı bu tez çalışmasında da devamlı hücre hatları kullanılmıştır.

ISO 10993-5 “Sitotoksosite Testleri-*In Vitro* Yöntemler” standardına göre; *in vitro* çalışmalarda sitotoksitesini araştırılan materyallerin sitotoksik etkilerinin araştırılmasında, standart olarak L929 ya da Balbc3T3 fibroblast kültürlerinin kullanılması önerilmektedir (119).

Schedle ve arkadaşları, metal alaşımlarının toksik etkilerini karşılaştırmak amacıyla, materyalleri 7 gün süre ile L929 hücreleri, dişeti fibroblast hücreleri ve mast hücreleri ile inkübe ederek, direkt temas yöntemi ile hücre proliferasyonundaki değişiklikleri değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda, *in vitro* sitotoksosite testlerinde L929 fibroblastlarının, primer dişeti fibroblast ve mast hücre kültürlerine oranla, üreme yeteneklerinin gelişmiş olması nedeniyle kullanımlarının daha uygun olacağını belirtmişlerdir (120).

Thonemann ve arkadaşları, primer sığır dental papilla hücreleri (CPC), SV40T antijeniyle transforme edilen CPC hücreleri (tCPC B), E6/E7 onkojeni ile transforme edilen CPC hücreleri (tCPC E) ve L929 fare fibroblast hücrelerini 24 saat süreyle dental resin bileşikleriyle temasta bırakarak, MTT analizi ile sitotoksosite değerlendirmesi yaptıkları çalışmalarında; bu hücrelerden hangisi ile daha hassas sonuçlar elde edilebileceğinin tespitini amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda kullanılan hücrelerin en iyi sonuçlarının L929 fare fibroblastları ile elde edildiğini belirtmişlerdir (121).

Bu çalışmada da, yukarıda belirtilen çalışma sonuçlarının ışığında ve ISO 10993-5 numaralı standarda uygun olması amacıyla, metformin ve pioglitazon sitotoksitesini L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Hücrelerin enzimatik ve metabolik aktivitesini değerlendirerek yapılan *in vitro* sitotoksosite deneylerinde en sık kullanılan test yöntemi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyumbromid (MTT) kullanımudur (123-126). İlk olarak Mosman T. tarafından bildirilen bu test yönteminde (127); bir tetrazolium tuzu olan MTT'yi mavi çözünmez formazan bileşiklerine indirgeyen mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesi ölçülerek hücre canlılığı diğer yöntemlere oranla daha hassas bir şekilde belirlenmektedir. Sitotoksik etkilere bağlı olarak ölü hücrelerde dehidrogenazlar aktif olmadığından formazan bileşikleri de oluşmamaktadır (127,128). Canlı (metabolik olarak aktif) hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenazlar sarı renkteki MTT tetrazolyum tuzunu mavi renkteki MTT formazana indirgerler ve mavi MTT formazan hücre içerisinde tutulur. Oluşan formazan miktarı solüsyonunun çözüldükten sonra elde edilen optik yaygınlığının ve yoğunluğunun kolorimetrik olarak ölçümü ile değerlendirilmektedir (129).

Hücrelerin enzimatik ve metabolik aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan MTT'nin yanısıra diğer bir tetrazolium tuzu olan sodyum 3'-[1-[(fenilamino)-karbonil]-3, 4-tetrazolyum]-bis (4-methoksi-6-nitro) benzen-sulfonik asithidrat (XTT) (128,130) kullanımı ilk olarak 1988 yılında Scudierove ark. (131) tarafından bildirilmektedir. XTT'nin metabolik olarak aktif hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından indirgenmesi sonucunda suda çözünen yoğun renkli formazan oluşur. XTT kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksosite deneyleri de MTT yöntemi gibi kolorimetrik olarak değerlendirilmektedir. İlave olarak, XTT yönteminin MTT yöntemine göre deney süresini kısaltması, uygulama kolaylığı ve hassasiyet gibi önemli avantajlar sağladığı belirtilmektedir (128,130).

Memeli hücresinden hazırlanan sistemlerde hücresel parametrelerin değerlendirilmesine yönelik birçok test sistemi bulunmaktadır. Tetrazolium tuzlarının mitokondriyal enzimler tarafından mavi formazon bileşiğine indirgenmesi prensibine dayanan kolorimetrik yöntemler arasında bulunan ve hücre proliferasyonunun kantitatif ölçümü için çalışmamızda kullanılan XTT kolorimetrik yöntemi veya benzer yapıları tetrazolyum tuzlarının kullanıldığı diğer kolorimetrik yöntemler son yıllarda popülerlik kazanmıştır (128,130). Biz de çalışmamızda güncel bir yöntem olan XTT yöntemini kullanmayı tercih ettik.

Literatürde metformin ve pioglitazon moleküllerinin XTT yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bizim bulgularımız bu iki ilaç ve diyabette kullanılan diğer anti-diyabetik ilaçlar ile yapılacak olan yeni çalışmalara ışık tutacaktır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre; metformin ve pioglitazon moleküllerinin  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarında XTT yöntemi ile sitotoksite değerleri anlamlı bulunmamıştır. Aynı şekilde metformin ve pioglitazon molekülleri karşılaştırıldığında gruplar arasında da farklılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak, diyabet sıklığı giderek artan ve pek çok komplikasyon ile seyreden kronik bir hastalıktır. Makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların yanı sıra kanser sıklığı da diyabette giderek artmaktadır. Diyabetin birçok komplikasyonunda anjiogenez suçlanmaktadır. Diyabetin tedavisinde kan şekerinin düzenlenmesi değil komplikasyonları önleyici tedaviler de öne çıkmaktadır. Son zamanlarda kanserin tedavisinde kemoterapötik ilaçlar yanı sıra anjiogenezini inhibe eden ilaçların da kullanılabileceği konusunda görüşler öne sürülmektedir. Diyabetin tedavisinde yıllardır kullanılan iki önemli ilaç olan metformin ve pioglitazonun literatürde kanser metastazı ve sıklığını azalttığına dair pek çok çalışma mevcuttur. PPAR- $\gamma$  agonistlerinin özellikle anjiogenezini inhibe ederek, proliferatif retinopati ve kanser metastazı ile tümör büyümesinin önlenmesinde faydalı olduğu da gösterilmiştir. Metforminin ise anti-anjiogenezik etkinliği pioglitazona göre zayıf olarak tespit edilmiştir.

Anjiogenez yalnızca diyabette retinopati ve kanser metastazında değil, pek çok hastalıkta rol oynamaktadır. Anjiogenezin ve inhibisyonunun *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmesini sağlayan birçok yöntem bulunmaktadır. Ancak KAM modeli pek çok yönetime göre daha ucuz, güvenilir ve uygulanabilirliği kolay bir yöntemdir. Memeli hayvan modeline bir alternatiftir. Birçok molekülün değerlendirilmesine imkân sağlar. Biz de çalışmamızda oldukça deneyimli olduğumuz bu yöntemi kullanmayı tercih ettik.

Metformin ve pioglitazon molekülleri yıllardır güvenle kullanılan ilaçlardır. Literatürde yeni ama güvenilir bir yöntem olan XTT yöntemi ile bu moleküllerin *in*

*vitro* olarak sitotoksik etkilerini göstermeyi amaçladık. Çalışmamızın sonunda sitotoksitelerine rastlamadık. Uzun yıllar daha bu iki molekülün faydalı etkilerinden yararlanabileceğimiz kanısındayız.

Biz bu çalışma ile pioglitazon molekülünün güçlü anti-anjiogenik etkinliğe sahip olduğunu tespit ettik. Fakat metforminin bu etkisinin zayıf olduğunu bulduk. Çalışmamızın sonuçlarının ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## 6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

- Pioglitazon molekülü metformine göre güçlü anti-anjiogenik etkinliğe sahiptir.
- Metforminin anti-anjiogenik etkinliği zayıftır.
- Diyabetin anjiogeneze bağlı gelişebilecek komplikasyonlarının önlenmesinde pioglitazon molekülü iyi bir seçenektir.
- XTT yöntemi ile metformin ve pioglitazon moleküllerinin sitotoksik etkilerine rastlanılmamıştır.

Çalışmamızın sonuçlarının ve kullanılan yöntemlerin ilerde anjiogenez ve sitotoksitate ile ilgili yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*,30: 42-47,2007.
2. Altuntaş Y. Diabetes Mellitus'un Tanımı Tanısı ve Sınıflaması, Her Yönüyle Diabetes Mellitus, Yenigün M.,2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 51-62, 2001.
3. The Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New Engl J Med*,393-403, 2002.
4. United Kingdom Prospective Diabetes Study group. United Kingdom prospective diabetes study group (UKPDS) 13: Relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonylureas, insulin or metformin in patients with newly diagnosed followed for three years. *BMJ*,310: 83-88, 1995.
5. Yılmaz MT, Bahçeci M,Büyükbeşe MA. Diabetes mellitusun modern tedavisi,1. Baskı, Türk Diyabet Vakfı, İstanbul, 35-54, 2003.
6. Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton HS. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*; 108:2941-2948, 2003.
7. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*,653- 660, 2003.
8. Issa R, Krupinski J, Bujny T, Kumar S, Kaluza J, Kumar P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest*,417-425, 1999.
9. Peng CC, Hsieh CL, Lin LY, Chyau CC, Cheng YT, Chen KC, Peng RY. Anisotropic diffusion deviates chicken embryo chorioallantoic membrane assay (CAM) to reflect inherent therapeutic behaviors. *Colloids Surf B Biointerfaces*; 70:29-34, 2009.
10. Clinical Guidelines Task Force. Guide for Guidelines: A Guide for Clinical Guideline Development. Brussels, Belgium: International Diabetes

Federation; 2003. Available at: <http://www.idf.org/webdata/docs/Guide%20for%20Guidelines.pdf>. Accessed September 1, 2008.

11. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. 3rd ed. Brussels: International Diabetes Federation Publ,2006.

12. The DECODE Study Group. Glucose tolerance and mortality: Comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The Lancet; 354: 617-62. Editör: (Charles F.Burant, MD, PhD), (Türkçe Editör: Prof.Dr. Metin Özata), 1999.

13. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, Salman S, Uygur S, Bastar I. The TURDEP group: Population- based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: Result of the Turkish Diabetes Epidemiology Study. Diabetes Care,25; 1551-1556, 2002.

14. TEMD (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği) <http://www.turkendokrin.org/grup/Diyabet.pdf>, s 20.

15. Orhan Y. Diabetes Mellitus, Endokrinoloji Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları. Ed: Sencer E, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul: 247-286,2001.

16. Powers AC, Diabetes mellitus. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15'th edition, McGraw-Hill Company USA; 2119-2130, 2001.

17. Yahya S. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri, cilt 2, Nobel Kitabevleri,2109-2137,2004.

19. Burant CF. Medical Management of Type Two Diabetes, 5 th. Ed. American Diabetes Association 2004.

20. İnci H. Tip 2 Diyabet hastalarında kan ürik asit düzeyi ile idrar albümin atılımı düzeyi arasındaki ilişki. Uzmanlık tezi. Sivas 2007.

21. Unger RH, Foster DW, Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. 16th Ed, Williams textbook of endocrinology Philedelphia: WB Saunders company: 973-1059, 1998.

22. Özata M. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet İstanbul Medikal Yayıncılık 1.Baskı, 284-290, 2006.

23. Biberöglü K, İliçin G, Ünal S, Süleymanlar G. Temel İç Hastalıkları: Güneş Kitabevi, 2321-2323, 2003.

24. Rohrschneider K, Greim S. Epidemiology of blindness of Baden, Germany. *Klin. Monatsbl Augenheilkd.* 221: 116-21, 2004.
25. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL, The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol*, 102: 527-32, 1984.
26. Bayraktar MZ. Diyabetik Retinopatinin Epidemiyolojisi, Editörler: Özkan Ş, Akar S, Diyabetik Retinopati; bölüm 1, 1–9. İstanbul, 2000.
27. Parving HH. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int.*; 60: 2041-55, 2001.
28. Almdal T, Norgaard K, Feldt-Rasmussen B, Deckert T. Predictive value of microalbuminuria in IDDM. A five-year follow-up study, *Diabetes Care* 17, 120–125, 1994.
29. Parving HH. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int.* 60:2041-2045, 2001.
30. Boulton AJ. Treatment of symptomatic diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev*, 1: 16–21, 2003.
31. Bahçeli M. Oral antidiyabetik ilaçlar ve yeni uygulamalar, *Diabetes mellitusun modern tedavisi*, Yılmaz MT, Bahçeci M, Büyükbeşe MA, 1. Baskı, Türk Diyabet Vakfı, İstanbul, 35-54, 2003.
32. Gan SC, Barr J, Arieff AI, Pearl RG. Biguanide-associated lactic acidosis: case report and review of the literature. *Arch Intern Med*, 152: 2333-2336, 1993.
33. Johansen OE, Jorgensen AP. Glitazone treatment of type 2 diabetes mellitus, *Diabetes Care*, 29: 1928-1930, 2006.
34. Khan MA, St. Peter JV, Xue JL. A prospective, randomized comparison of the metabolic effect of pioglitazone or rosiglitazone in patient with type 2 diabetes who were previously treated with troglitazone. *Diabetes Care*, 2002; 25: 708-11.
35. Jee SH, Ohrr H, Sull JW, Yun JE, Ji M, Samet JM. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *JAMA*, 293:194-202, 2005.
36. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, D'Avanzo B, Boyle P. A case-control study of diabetes mellitus and cancer risk. *Br J Cancer*. 70:950-953, 1994.

37. Rousseau MC, Parent ME, Pollak MN, Siemiatycki J. Diabetes mellitus and cancer risk in a population-based case-control study among men from Montreal, Canada. *Int J Cancer*. 118:2105-2109, 2006.
38. Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J, Thun MJ. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *Am J Epidemiol*. 159:1160-1167, 2004.
39. Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Sasazuki S, Noda M, Tsugane S. Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Arch Intern Med* 166:1871–1877, 2006.
40. Cughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J and Thun MJ, Diabetes Mellitus as a Predictor of Cancer Mortality in a Large Cohort of US Adults. *Am J Epidemiol*, 159:1160–1167, 2004.
41. Larsson SC, Orsini N, Wolk A, Diabetes Mellitus and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *JNCI*, 97:1679-1687, 2005.
42. Larsson SC, Christos S, Wolk A, Diabetes mellitus and risk of breast cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer*: 121:856–862, 2005.
43. M. Mazen Jamal, Eugene J. Yoon, Kenneth J. Vega, Mehrdash Hashemzadeh, Kenneth J. Chang. Diabetes mellitus as a risk factor for gastrointestinal cancer among American veterans. *World J Gastroenterol*, 15:5274-5278, 2009.
44. Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J, Thun MJ. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *Am J Epidemiol*. 159:1160-1167. 2004.
45. Calle EE, Murphy TK, Rodriguez C, Thun MJ, Heath CW Jr. Diabetes mellitus and pancreatic cancer mortality in a prospective cohort of United States adults. *Cancer Causes Control*, 9:403-410, 1998.
46. Jones RS. Carcinoma of the gallbladder. *Surg Clin North Am*. 70:1419-1428, 1990.
47. El-Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol*, 96:2462-2467, 2001.

48. Smith U & Gale EAM, *Diabetologia*. 52: 1699–1708 Does diabetes therapy influence the risk of cancer?, 2009.
49. Currie CJ, Poole CD, Gale EAM. The influence of glucoselowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 52:1766-1777, 2009.
50. Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Gehrig PA, Bae-Jump VL. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation-implications for a novel treatment strategy. *Gynecol Oncol*. 116:92-98, 2010.
51. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*, 330: 1304–1305, 2005.
52. Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P. Increased cancerrelated mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care*, 29: 254–258, 2006.
53. Donghui Li, SC Yeung, Manal M. Hassan, Marina K, James L. Antidiabetic Therapies Affect Risk of Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 137:482-488, 2009.
54. Cynthia Lee R, Jonathan B. Thiazolidinedione drugs down-regulate CXCR4 expression on human colorectal cancer cells in a peroxisome proliferator activated receptor -  $\gamma$  dependent manner. *Int J Oncol*, 30:1215-1222, 2007.
55. Takano S, Kubota T, Nishibori H, Hasegawa H, Ishii Y, Nitori NI. Pioglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma acts as an inhibitor of colon cancer liver metastasis. *Anticancer Res*,28:3593-3599, 2008.
56. Şeref Olgar, Sevgi Yetgin, *Anjiogenezis, ÇSHD*,46:139-147, 2003.
57. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol*, 35:227-231, 2000.
58. Konukoğlu D, Turhan MS, *Anjiogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiogenezini*. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi*,36:42-48, 2005.
59. Greenberg DA, Jin K. From angiogenesis to neuropathology. *Nature*, 438:954-959, 2005.
60. Townsend CM, Beauchamp DR, Evers MB, Mattox KL. *Sabiston textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice*. 17th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2004.

61. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54:1615-1625, 2005.
62. Staton CA, Lewis C, Bicknell R. *Angiogenesis Assay-A Critical Appraisal of Current Techniques*. West Sussex, England, 2006.
63. Ribatti D. *The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis*. Springer Science; Business Media B.V. Italy, 124 s., 2010.
64. Buemi M, Galeano M, Struale A. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock*. 22:169-173, 2004.
65. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Eng J Med*, 285:1182-1186, 1978.
66. Nicolson GL. Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev*, 7:143-188, 1988.
67. Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assay for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther*. 51:1-11, 1991.
68. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*. 49:32-40, 2003.
69. Leng T, Miller JM, Bilbao V, Palanker DV, Huie P, Blumenkranz MS. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina*. 24:427-434, 2004.
70. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo*. *Anat Rec*. 264: 317-324, 2001.
71. Melkonian G, Munoz N, Chung J, Tong C, Marr R, Talbot P. Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by Clofazimine D and Suramin. *J Exp Zool*. 292: 241-254, 2002.
72. Hazel SJ. A novel early chorioallantoic membrane assay demonstrates quantitative and qualitative changes caused by antiangiogenic substances. *J Lab Clin Med*. 141:217-228, 2003.

73. Özgürtaş T, Anjiogenezde bir invivo model: civciv koryoallantoik membran. *Gülhane Tıp Dergisi*. 51:67-69, 2009.
74. Howard BJ, Klas J, Rubin SJ, Weissfled AS, St. Louis. *Clinical and Pathogenic Microbiology*, The C.V. Mosby Co. Philedelphia, 755-774, 1987.
75. Koneman EW, Schreckenberger PC, Allen SD, Winn WC. *Color Atlas and Texbook of Diagnostic Microbiology*. Forth Edition, J.B. Lippincott Company. Philedelphia, 1009-1018, 1992.
76. International Organization for Standardization. *Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity*. ISO Standard 10993-5, 1997.
77. International Organization for Standardization. *Denistry-preclinical Evaluation of Medical Devices used in dentistry-test methods for dental materials*. ISO Standart 7405, 1997.
78. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Sammorapoompichit P, Leutmezer F, Spittler A. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater*. 14:429-440, 1998.
79. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS*. 112: 402-412, 2004.
80. Nie D, Tang K, Diglio C, Kennth VH. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood*. 95: 2304-2311, 2000.
81. Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: The role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res*. 79: 1-38, 2000.
82. Khaw KT, Wareham N, Bingham S, Luben R, Welch A, Day N. Preliminary communication; glycated hemoglobin, diabetes, and incident colorectal cancer in men and women a prospective analysis from the European prospective investigation into cancer-Norfolk study. *CEBP*. 13:915-919, 2004.
83. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Giuseppe P, Vigneri R, Diabetes and canser. *Endocr Relat Cancer*. 16:1103-1123, 2009.

84. Kasper JS & Giovannucci E, A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15:2056–2062, 2006.
85. 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*. 54:533–539, 2005.
86. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF Jr, Jarvholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *New Eng J Med*, 343:1305–1311, 2000.
87. Zucchetto A, Dal Maso L, Tavani A, Montella M, Ramazzotti V, Talamini R. History of treated hypertension and diabetes mellitus and risk of renal cell cancer. *Ann Onc*. 18:596–600, 2007.
88. Mitri J, Castillo J, Pittas AG. Diabetes and risk of non- Hodgkin’s lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Diabetes Care*. 31:2391–2397, 2008.
89. Elwing JE, Gao F, Davidson NO, Early DS. Type 2 diabetes mellitus: the impact on colorectal adenoma risk in women. *Am J Gastroenterol*, 101:1866–1871, 2006.
90. Limburg PJ, Vierkant RA, Fredericksen ZS, Leibson CL, Rizza RA, Gupta AK. Diabetes mellitus and subsitespecific colorectal cancer risks in the Iowa Women’s Health Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14:133-137, 2005.
91. Sellers TA & Cerhan JR. Clinically confirmed type 2 diabetes mellitus and colorectal cancer risk: a populationbased, retrospective cohort study. *Am J Gastroenterol*, 101:1872–1879, 2006.
92. Veldt BJ, Chen W, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP. Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus. *Hepatology*. 47:1856–1862, 2008.
93. Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 26:69–76, 2005.
94. Mc Carty MF. Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging. *Medical Hypotheses*. 63:334–339, 2004.

95. Ruderman N & Prentki M. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 3:340–351, 2004.
96. Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, Thor AD. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest *in vitro*. *Cell Cycle*. 8:909–915, 2009.
97. Cazzaniga M, Bonanni B, Guerrieri-Gonzaga A, Decensi A. Is it time to test metformin in breast cancer clinical trials?. *CEBP*. 18:701–705, 2009.
98. Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R. PPAR- $\gamma$  Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. *PPAR Research*. Article ID 830501, p 18, 2009.
99. Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman PM and Winer EP, Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Research and Treatment*. 3:391–397, 2003.
100. Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H, Terano A Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut*. 5:658–664, 2002.
101. Zhou J, Wilson KM, Medh JD. Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  splice variants in monkey macrophages. *BBRC*. 1:274–283, 2002.
102. Clay CE, Namen AM, Atsumi GI, Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 10:1905–1911, 1999.
103. Li M, Lee TW, Yim APC, Mok TSK, Chen GG. Apoptosis induced by troglitazone is both peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ - and ERK-dependent in human non-small lung cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2: 428–438, 2006.
104. Aiello A, Pandini G, Frasca F. Peroxisomal proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists induce partial reversion of epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology*. 9:4463–4475, 2006.

105. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR $\gamma$ . *Molecular Cell*. 3: 465–470, 1998.
106. Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, PPAR $\gamma$  ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis; *J Clin Invest*, 7:923–932, 2002.
107. Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands are potent inhibitors of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, 13:9116–9121, 1999.
108. Ahmad A, Laura OC, Yu-Yen F, Shaker AM. PPAR  $\gamma$  ligands, rosiglitazone and pioglitazone, inhibit bFGF and VEGF mediated angiogenesis. *Angiogenesis*. 11:361–367,2008.
109. Rollin BE. The Regulation of Animal Research and the Emergence of Animal Ethics: a Conceptual History. *Theor Med Bioeth*. 27: 285–304, 2006.
110. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. *In Vitro* Models of Biocompatibility: A Review. *Dent Mater*. 12: 186-193, 1996.
111. Tai KW, Chang YC. Cytotoxicity Evaluation of Perforation Repair Materials on Human Periodontal Ligament Cells *In Vitro*. *J Endod*. 26:395–397, 2000.
112. Abe Y, Ueshige M, Takeuchi M, Ishii M, Akagawa Y. Cytotoxicity of Antimicrobial Tissue Conditioners Containing Silver-Zeolite. *Int J Prosthodont*. 16: 141-144, 2003.
113. Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. *In Vitro* Biocompatibility of Denture Relining Materials. *Gerodontology*. 23: 17-22, 2006.
114. Nishijima M, Hashimoto Y, Nakamura M. Cytocompatibility of New Phthalate Ester-Free Tissue Conditioners *In Vitro*. *Dent Mater J*. 21:118-132, 2002.
115. Browne RM. The *In Vitro* Assessment of the Cytotoxicity of Dental Materials-Does It Have a Role? *Int Endod J*. 21:50-58, 1988.
116. Schmalz G. Use of Cell Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials-Advantages and Limitations. *J Dent*. 2:6-11, 1994.
117. Nahid M, Bottenberg P. Importance of Cell Cultures in Biocompatible Dental Materials Research. *Rev Belge Med Dent*. 58:189–196, 2003.

118. Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of Dental Alloys, Metals, and Ceramics Assessed by Millipore Filter, Agar Overlay, and MTT Tests. *J Prosthet Dent.* 84:229-236, 2000.
119. International Organization for Standardization. Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity. ISO Standard 10993-5, 1999.
120. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Boltz-Nitulescu G. Response of L-929 Fibroblasts, Human Gingival Fibroblasts, and Human Tissue Mast Cells to Various Metal Cations. *J Dent Res.* 74:1513-1520, 1995.
121. Wataha JC, Lockwood PE, Nelson SK, Bouillaguet S. Long-Term Cytotoxicity of Dental Casting Alloys. *Int J Prosthodont.* 12:242-248, 1999.
122. Spangberg LSW. The Study of Biological Properties of Endodontic Biomaterials in Experimental Endodontics, CRC Pres, Baco Raton, Florida, 1990.
123. Gioka C, Bourauel C, Hiskia A, Kleetsas D, Eliades T, Eliades G. Light-cured or chemically cured orthodontic adhesive resins? A selection based on the degree of cure, monomer leaching, and cytotoxicity. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 127:413-419, 2005.
124. Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts *in vitro*. *Int J Prosthodont.* 14:439-443, 2001.
125. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AI, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: Effect of water bath and microwavepostpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 17:340-344, 2004.
126. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 14:203-207, 2006.
127. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Met.* 65:55-63, 1983.
128. Masters JR. *Animal Cell Culture*. 3rd ed, Oxford University Press, New York, USA, 2000.
129. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J, Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblast. *Int J Prosthodont.* 13:311-315, 2000.

130. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL, An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Met.* 142:257–265, 1991.

131. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48:4827-4833, 1988.