

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İSKEMİ/REPERFÜZYON ESNASINDA İNSULİN VE
METFORMİN VERİLMESİNİN KALBİ KORUYUCU ETKİSİ**

**Tezi Hazırlayan
Sinan HAMARAT**

**Danışman
Prof.Dr.Nurcan DURSUN**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL2013-4388 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Sinan HAMARAT

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Ratlarda İskemi/Reperfüzyon Esnasında İnsulin ve Metformin Verilmesinin Kalbi Koruyucu Etkisi” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Sinan HAMARAT

Danışman
Prof. Dr.Nurcan DURSUN

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ

Prof. Dr. Nurcan DURSUN danışmanlığında **Sinan HAMARAT** tarafından hazırlanan “**Ratlarda İskemi/Reperfüzyon Esnasında İnsulin ve Metformin Verilmesinin Kalbi Koruyucu Etkisi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı**’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.... / ... / 2014

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof.Dr. Nurcan DURSUN (Fizyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof.Dr. Meral AŞÇIOĞLU (Fizyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ (Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu yüksek lisans çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, yüksek lisans eğitimimin her aşamasında sabırla yol gösteren, her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve destekleyen tez danışmanım Prof. Dr. Nurcan DURSUN' a,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bana aktaran değerli Fizyoloji Anabilim Dalı hocalarıma,

Çalışmamın deneysel ve yazım aşamasında desteklerini benden esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Kalender ÖZDOĞAN' a ve Biyofizik Anabilim Dalı araştırma görevlisi Fazile CANTÜRK' e,

Değerli yüksek lisans arkadaşlarım Burak TAN, Arzu Dilek GÜLER, Melek BATAKÇI ve diğer arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında bana maddi ve manevi destek olan aileme,

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım.

RATLARDA İSKEMİ/REPERFÜZYON ESNASINDA İNSULİN VE METFORMİN VERİLMESİNİN KALBİ KORUYUCU ETKİSİ

Sinan HAMARAT

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2014

Danışman: Prof. Dr. Nurcan DURSUN

ÖZET

Metforminin adenoazin monofosfatın aktive ettiği protein kinaz (AMPK) aktivasyonu yolu ile kalp yetmezliği olan hayvanlarda ROS oluşumunu azalttığı, kardiyomyositleri oksidatif stresden koruduğu gösterilmiştir. İskemi reperfüzyon (I/R) esnasında tek başına insulin ile muamelenin myositlere glukoz girişini artırdığı, myositleri serbest yağ asitleri yerine glukozdan enerji eldesine yönlendirdiği buna bağlı mitokondrial hasarı ve apoptozu azalttığı görüşü hakimdir. Bu çalışmanın amacı DNA hasarını azaltmada insulin ve metforminin rolünü göstermek, birlikte verilmesinin sinerjik etki yapip yapmadığını ortaya koymaktır.

Çalışmamızda $\cong$ 4 aylık toplam 48 adet Sprague Dawley erkek sıçan 4 grup olarak çalışıldı. 1. grup; I/R yapılan (KONT), 2.grup; I/R + metformin verilen (MET, 2 mM/L), 3.grup; I/R+ insülin verilen (İNS 3 IU/L), 4.grup; I/R+ metformin ve insülin verilen (MET+İNS). Anestezi altında kalpler alınıp, Langendorff perfüzyon sistemine asıldı (n=6), Krebs - Henseleit ile perfüze edildi. İlk 5 dk perfüzyon, sonrasında 30 dk global iskemi ve bir saat reperfüzyon yapıldı. İnsulin ve metformin reperfüzyon esnasında perfüzata eklendi. Bu süreçler içerisinde ventrikül basınç kayıtları alındı. Ayrıca I/R yapılan ilave 4 grup hayvanda ventrikül basınç kaydı yapılmadan, reperfüzyon bitiminde myositleri izole edilerek Komet tekniği ile DNA hasarı tesbit edildi. Grupların verileri kendi içerisinde eşleştirilmiş örneklem t-testi, gruplar arası farklılıklar için ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi.

Ventrikül fonksiyon verileri karşılaştırıldığında iskemi öncesi sol ventrikül sistolik, diyastolik basınçlarında ve basınç gelişiminde gruplar arasında önemli farklılık gelişmemiştir. Reperfüzyon esnasında metformin ve insulin verilen grupların basınç değerlerinde anlamlı değişiklikler bulunmuştur. DNA hasarı kontrole göre diğer üç grupta önemli derecede azalmıştır (MET $p<0,003$, İNS $p<0,02$, MET+İNS $p<0,005$).

Bu çalışmada DNA hasarını azaltmada hem insulin hem de metforminin etkili olduğu ilk defa gösterilmiştir. Birlikte verilmesinin DNA hasarı azaltmada ekstra etkisi bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: İskemi/Reperfüzyon, DNA hasar, İnsulin, Metformin, Langendorff

The Cardioprotective Effect Of Insulin And Metformin Administration in acute Ischemia / Reperfusion in rats

Sinan HAMARAT

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Physiology

Master Thesis, August 2014

Supervisor: Prof. Dr. Nurcan DURSUN

ABSTRACT

Many studies have shown that metformin reduces the formation of ROS by AMP-activated protein kinase (AMPK), it protects myocytes from oxidative stress. During I / R, the treatment with insulin alone increases the entry of glucose into the myocyte, energy production of myocytes was supplied from glucose rather than free fatty acids, consequently reduces mitochondrial damage and apoptosis. This study aimed to show that insulin and metformin reduce DNA damage.

In our study, 4-month, total 48 Sprague Dawley male rats were used in four groups. Group 1; I / R (CONT), Group 2; I / R + given metformin (MET, 2 mM/L added to the perfusion fluid, Group 3; I / R + given insulin (INS 3 IU/L, as group 2), Group 4; I / R given metformin and insulin (INS + MET, as group 2 and 3)(n=6). Hearts taken under anesthesia were hanged up Langendorff perfusion system, perfused with Krebs – Henseleit. After 5 minutes perfusion, global ischemia were created for 30 minutes and reperfusion for one hour. In these processes, the ventricular pressures were recorded. In addition, four groups of animals were created the I / R in the hearts but without ventricular pressures were recorded, after I / R, myocytes were isolated and used DNA damage determination by comet technique.

When ventricular function data were compared to each other, there are no significant differences between groups in left ventricular systolic and diastolic pressures and pressure development before ischemia. During administration of metformin and insulin to groups, blood pressure parameters were found significantly changes. DNA damage was significantly decreased in the three groups compared to the control group (MET $p < 0.003$, INS $p < 0.02$, MET+INS $p < 0.005$).

In this study showed first time that both metformin and insulin administration during reperfusion reduced DNA damage in hearts. Metformin and insulin of co-administration haven't extra effect on DNA damage reducing.

Keywords: Ischemia / reperfusion, DNA damage, Insulin, Metformin, Langendorff

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xi
 1.GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. İNSULİN	4
2.1.1. İnsulin Ve Kardiyovasküler Metabolizma	6
2.1.2. Proksimal İnsulin Sinyalizasyonu	9
2.1.3. Glukoz Ve Uzun Zincirli Yağ Asit Metabolizma Regülasyonu	10
2.1.4. İskemide İnsulin Etkisi, İnsulin Ve Amp-Activated Protein Kinase Sinyalizasyonu Arasındaki Etkileşim.....	13
2.1.5. İnsulin İskemi-Reperfüzyonda Koruyucu Mudur?.....	14
2.2. METFORMİN	14
2.2.1. Bulunuşu	15
2.2.2. Kimyasal Yapısı	16
2.2.3. Absorbsiyonu.....	16
2.2.4. Dağılımı.....	17
2.2.5. Metabolizma	17
2.2.6. Atılım	17
2.2.7. Etki Mekanizması Adenosine Monosphate-Activated Protein Kinase (AMPK).....	18
2.2.8. Metforminin Kullanım Alanları	21
2.2.9. Metformin Ve Kardiyovasküler Sistem	22
2.2.9.1. Kalp.....	22
2.2.9.2. Damarlar	23
2.3. KOMET (TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ) TEKNİĞİ	24
2.4.1. Tarihçe	24

	<u>Sayfa No</u>
2.3.2. Kullanım Alanları.....	25
2.3.3. Uygulama Protokolü.....	26
2.3.4. Komet Tekniğini Etkileyen Faktörler.....	27
2.3.5. Komet Tekniğinin Avantajları.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	29
3.2. DENEY GRUPLARI	29
3.3. LANGENDORFF DÜZENEGİ İLE HEMODİNAMİK PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ	30
3.4. KARDİYOMİYOSİTLERDE KOMET TEKNİĞİ İLE DNA HASARININ GÖSTERİLMESİ.....	32
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	33
4.BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
6.KAYNAKLAR	44
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL VE RESİMLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. Global iskemi öncesi basınç kaydı.....	34
Tablo 4.2. Reperfüzyon esnasında izole kalpten kaydedilen basınç kaydı	36
Tablo 4.3. Global iskemi öncesi basınç geşim hızı.....	37
Tablo 4.4. Reperfüzyon esnasında izole kalpten kaydedilen basınç geşim hızı.....	38
Tablo 4.5. Reperfüzyon esnasında kalp dokusundaki DNA hasarı.....	39
Şekil 2.1. İnsulin olmadığında	8
Şekil 2.2. Kardiyovasküler yolağı düzenleyen insulin sinyal yolağı	11
Şekil 2.3. Metforminin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.4. AMPK aktivasyonunun moleküler yapısı ve işleyişi.....	19
Şekil 2.5. AMPK nın organlarda ki başlıca etkileri	20
Şekil 2.6. Metformin ve damarlar arasındaki ilişki.....	24
Şekil 4.1. İskemi öncesi sol ventrikül basınç parametreleri.....	35
Şekil 4.2. Reperfüzyon sırasında sol ventrikül basınç parametreleri	36
Şekil 4.3. İskemi öncesi maksimum ve minimum ventrikül içi değışim hızları	37
Şekil 4.4. Reperfüzyon sırasında maksimum ve minimum ventrikül içi değışim hızı.....	38
Şekil 4.5. Kalp doku hücreleri	39
Şekil 4.6. Reperfüzyon esnasında kalp doku hücrelerinde tail DNA % oranları	40
Resim 3.1. Laboratuvarımızdaki Langendorff reperfüzyon sisteminde sol ventrikül fonksiyon değerlendirilmesi	31
Resim 3.2. Elektroforez sisteminin görünümü.....	33

KISALTMALAR

ACC	: Asetil-CoA karboksilaz
ADA	: American Diabetes Association
AMI	: Akut miyokard enfartüsü
AMP	: Adenosine monophosphate
AMPK	: Adenosine monophosphate-activated protein kinase
aPKC	: Atipik protein kinaz C
AS160	: Akt substrate 160
ATP	: Adenozintrifosfat
ATPase	: Adenozintrifosfat ase
CaMKK	: Ca /kalmodulin bağımlı protein kinazın
CASP	: Cometassaysoftwareproject
DM2	: Tip 2 diyabet
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EASD	: European Association for the Study of Diabetes
EDTA	: Etilen diamintetraasetik asit
eNOS	: Endothelial nitrik oksit sentez
ET-1	: Endothelin-1
FFA	: Serbest yağ asitleri
GAP	: GTPase-activating protein
GIK	: Glukoz, insulin ve potasyum
GLUT1	: Glucose transporter1
GLUT4	: Glucose transporter4
H	: Hidrojen
HCl	: Hidroklorik asit
Hg	: Civa
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-isoprenoid
I/R _{ins}	: İskemi/reperfüzyon + İnsulin
I/R _{met}	: İskemi/reperfüzyon + Metformin
IGF-1	: İnsulin-like growth faktör
IRS-1	: İnsülin reseptör substrat-1
IRS-2	: İnsülin reseptör substrat-2

İ/R	: İskemi/ reperfüzyon
K	: Potasyum
KONT	: Kontrol
LCFA	: Uzun zincirli serbest yağ asitleri
LCFAs	: Long-chain fatty acids
LKB1	: Liver Kinase B1
M	: Molar
M _I /R _{ins}	: İskemi/reperfüzyon +İnsulin+Metformin
mA	: Miliamper
Maks dP/dt	:Sol ventrikül maksimum basınç gelişim hızı
MAPK	: Mitojen aktiveli protein kinaz
Mg	: Miligram
Min dP/dt	: Sol ventrikül minimum basınç gelişim hızı
mL	: Mililitre
mM	:Milimolar
mmHg	:Milimetre civa
MO25	: Mouse protein 25
mRNA	: mesajRibonükleikasit
Na	: Sodyum
NO	: Nitrik oksit
OCTs	: Organic Cation Transporters
PBS	: Fosfat tampon tuzu
PDH	: Pyruvate dehydrogenase
PDK1	: Fosfoinositid-bağımlı kinaz-1
PFK-1	: 6-phosphofructo-1-kinase
PFK-2	: 6-fosfofruktoz -2 kinaz
PI3K	: Fosfotidilinositol 3 kinaz
PI3k/Akt	: Fosfoinosit 3 kinase aktivasyonu
PIK5	: Fosfoinositid 5 kinaz
PKB	: Protein kinaz B
PMAT	: Plasma Membrane Monoamine Transporter
PPAR-1a	: Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptor-y Koaktivator
ROS	: Reaktif oksijen türlerinin
SD	: Standart Sapma
SDS	: Sodyum dodesil sülfat

SREBP-1	: Sterol regulatory element-binding proteins
STRAD	: Ste20-bağımlı adaptör
SVDSB	: Sol ventrikül diyastol sonu basınç
SVSB	: Sol ventrikül sistolik basınç
TBE	: Tris, borik asit ve etilendiaminetra asetik asit
TCA cycle	: Tricarboxylic acid cycle
Thr	: Threonin 172
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
μL	: Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glukoz, insulin ve potasyumdan (GIK) oluşan metabolik kokteylin kardiyomyositleri iskemide koruyabileceğini ilk defa Sodi-Pallares 1962 yılında ortaya attı [1]. Opie [2] bu metabolik terapinin kullanımı için etki mekanizmalarını daha mantıklı açıklama yoluna gitti.

1. Mekanizma olarak kardiyak glikolizin promosyonu

2. Mekanizma olarak ise serbest yağ asitlerinin (FFA) adipositlere gönderilmesi ve kardiyak FFA metabolizmasını azaltması.

GIK terapisi akut miyokard enfarktüsü (AMI) sonrası mortaliteyi azaltmada önemli rol oynadığı düşüncesi kabul gördü [3]. Bu etki göz önüne alınarak “stabil koroner hastalığı” tedavisinde glukoz kullanımını optimize etme terapötik yaklaşımı ileri sürüldü. Bu amaçla stabil anjinada serbest yağ asit inhibitörleri kullanılarak glukozu oksidasyon yoluna yönlendirme umut verici olarak bildirildi [4]. Yüksek doz GIK ile beslenme ile FFA seviyesinin maksimal seviyede baskılandığı myokardiyal glukoz alımının ise maksimal seviyede arttığı tespit edildi [5] Daha sonra bu konu ile ilgili 2 çalışma daha yapıldı. AMI’lı aynı zamanda insulin alan diyabetik hastalarda glukoz ve insulin yararlı etkisi test edildi [6]. İnsulin bağımsız diyabet hastalarına akut enfarksiyon esnasında sadece subakut insulin tedavisi yapıldı, insulin ve glukoz tedavisini birlikte alanlar ile kıyaslaması yapıldığında, insulin ve glukozu birlikte alanlarda mortalitede

azalma % 29 kadardı . İkinci çalışma Ceremuzynski ve arkadaşları [7] tarafından yapıldı ve düşük doz GIK tedavisinin yararlı etki oluşturmadığı yüksek doz ya da yüksek insulin dozunun daha yararlı olduğu belirtildi.

ECLA klinik çalışmasında Jonassen ve arkadaşları [8], in vivo MI oluşturulmuş sıçanlarda GIK verilmesi (İ/R başlangıcında, ya da sadece reperfüzyon esnasında) etkilerini inceledi, GIK verilmeyenlere göre insanlarda yaptığı gibi etkiye benzer şekilde infarkt alanını azalttı. Fakat reperfüzyon ve erken reperfüzyon dönemlerinde FFA ve glukoz seviyesi kontrolden farklı değildi. Sadece insulin reperfüzyon esnasında verildiğinde 15 dakikada bile infarkt alanı azalttığı bulundu [9]. Tüm bilgiler bir araya getirildiğinde “GIK’in kardiyoprotektif etkisi insulinin reperfüzyon esnasında tek başına olan etkisinden bağımsız olarak da vardır” şeklinde yorumlanabilir. İskeminin yaptığı gibi reperfüzyon işleminin kendisi de kalp dokusunda hasar yapmaktadır. Bunlara nekroz ve programlanmış hücre ölümü ya da apoptoz da dahildir. Bilindiği gibi reperfüzyon esnasında apoptoz artmakta olup insulin ile muamele muhtemelen bu apoptozu azaltarak kardiyak hasarı iskemi sırasında azaltmakta olabilir. MI sonrası reperfüzyon dokuyu kurtarıcı bir yol olmasına rağmen reperfüzyonla oluşan patolojileri açıklamak gerekir. Reperfüzyonun indüklediği myosit kayıpları sadece iskemiye bağlıdır şeklinde yorumlanmaktadır. Bunda reperfüzyona bağlı nekroz değil apoptoz sorumlu tutulmaktadır [10]. Kalp dokusu reperfüze edildiğinde çoğunda apoptozun arttığı pek çok deneysel çalışmada gösterilmiştir [11-13]. Bazı çalışmacılar insulinin postiskemik reperfüzyon sonrası doku hasarını azaltmada direkt etkili olduklarını, bunu da kısa sürede reoksijenasyonu artırarak, bunlara bağlı apoptozun azaltarak yaptığı ileri sürülmüştür [11].

Metforminin kardiyovasküler sistem üzerine iyileştirici etkisi olduğu bildirmiştir. Metforminin, AMP aktive eden protein kinaz (AMPK) aktivasyonu ile insülin rezistansı gelişmiş kalp hücrelerinde insülin aracılı ya da bazal glukoz alımını arttırdığı bildirilmektedir. Metformin miyokardın mekanikal etkinliğini artırır, AMPK aktivitesini, endotelial nitrik oksit sentaz aktivitesini, vasküler endotelial growth faktörü artırır, tümör nekrozis faktör alfa ekspresyonunu ve apoptozisi de azaltır. İskemi ya da reperfüzyon esnasında insulinin verilmesi ekstrasellüler potasyum birikimini, hücre içi sodyum, kalsiyum birikimini azaltabilir, metformin ile birlikte verildiğinde miyosite glukoz girişini de artıracığı için iskemik hasarda azalma yapabilir. Çalışmanın amacı, kalp dokusunda gelişen I/R hasarını azaltma amaçlı insülin ile birlikte metforminin verilmesi, insülin ve metformin kombinasyonunun sol ventrikül

fonksiyonunda yapacağı iyileştirici etki ve hasarı azaltmadaki rolü komet assay yöntemi kullanılarak araştırılacaktır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1. İNSÜLİN

İnsülin pankreastaki langerhans adacıklarının beta (I) hücreleri tarafından üretilen polipeptit yapıda 6000 dalton molekül ağırlığında bir hormondur. Molekölü 2 aminoasit zincirinden oluşmaktadır. Zincirler birbirlerine iki disülfür köprüsüyle ile bağlanmıştır. İnsülin, dokular tarafından yakıtların kullanımını düzenleyen en önemli hormonlardan biridir. Metabolik etkileri anaboliktir, glikojen, triaçilgliserol ve protein sentezini desteklemektedir[14]. Bunların dışında membran enzimlerini aktive ve inaktive edebilirler, birçok protein ve mRNA'nın sentez veya

yıkım hızını değiştirebilir, hücre büyüme ve farklılaşmasını etkileyebilirler. İnsülin sentezinin basamakları sırasıyla şöyledir:

- 1) Nükleusta insülin kodlayan genlerden mRNA transkripsiyonu olur.
- 2) mRNA stoplazmaya gelir ve kaba endoplazmik retikuluma (ER) bağlı polizom ile translasyona uğrar.
- 3) Polipeptit sentezi, N-Terminal sinyal polipeptidi oluşumuyla başlatılır ve ER membranı içine penetre olur.
- 4) Polipeptit zinciri, ER lümeni içine doğru uzar, sonuçta preproinsülin olur.
- 5) Sinyal peptidi ayrılır ve sisternada proinsülin oluşur.
- 6) Proinsülin ER'dan golgi kompleksine taşınır, orada proteazların etkisiyle C-peptit segmentini kaybederek insüline dönüşür. Dönüşüm golgi aparatından kopma sonucu oluşan insülin depo veziküllerinde devam eder.
- 7) İnsülin parsiyel ekzositozla salgılanırken onunla birlikte ekimolar miktarda C-peptiti de salgılanır [15].

Proinsülinin bir kısmı intakt olarak dolaşıma verilir. Dolaşımdaki insülin benzeri immün reaktivitenin % 20'sini teşkil eder. Proinsülinin biyolojik etkinliği insülininkinin % 10'u kadardır [15]. C-peptit insülin sekresyonunun periferik göstergesidir. C- peptit düzeyleri stabil olmayan klinik durumlarda bile sekresyon hızını doğru gösterir. C peptit insülin gibi karaciğer tarafından tutulmaz [15]. insülin sekresyonunu uyaran en önemli maddeler glukoz, aminoasitler (özellikle arginin), glukagon, gastrointestinal hormonlar (sekretin, gastrin, vazoaaktif intestinal peptit, kolesistokinin), büyüme hormonu, glukokortikoidler, prolaktin, plasental laktojen, cinsiyet hormonlar, parasempatometik ajanlardır. Hipertiroidi, beta (β) hücrelerinin glukoz duyarlılığını artırır. Paratiroid hormon, düşük dozlarda beta hücrelerini uyarırken yüksek dozlarda inhibe eder. Somatostatin ve epinefrin insülin sekresyonunu inhibe ederler [15]. İnsülinin glukoz metabolizması üzerine etkileri, en belirgin olarak üç dokuda gözlenir: karaciğer, kas ve yağ dokusu. Karaciğerde glikoneogenez ve glikojen yıkımını inhibe ederek, glukoz üretimini azaltır. Kas ve karaciğerde, glikojen sentezini artırır. Kas ve yağ dokusunda, hücre membranlarındaki glukoz taşıyıcılarını arttırarak glukoz alımını çoğaltır. İnsülin verilmesinden birkaç dakika sonra, yağ dokusundan yağ asidi salınmasında belirgin düşme görülür. İnsülin, yağ dokusunda hormon duyarlı lipazın aktivitesini inhibe ederek dolaşımdaki yağ asitlerini azaltır.

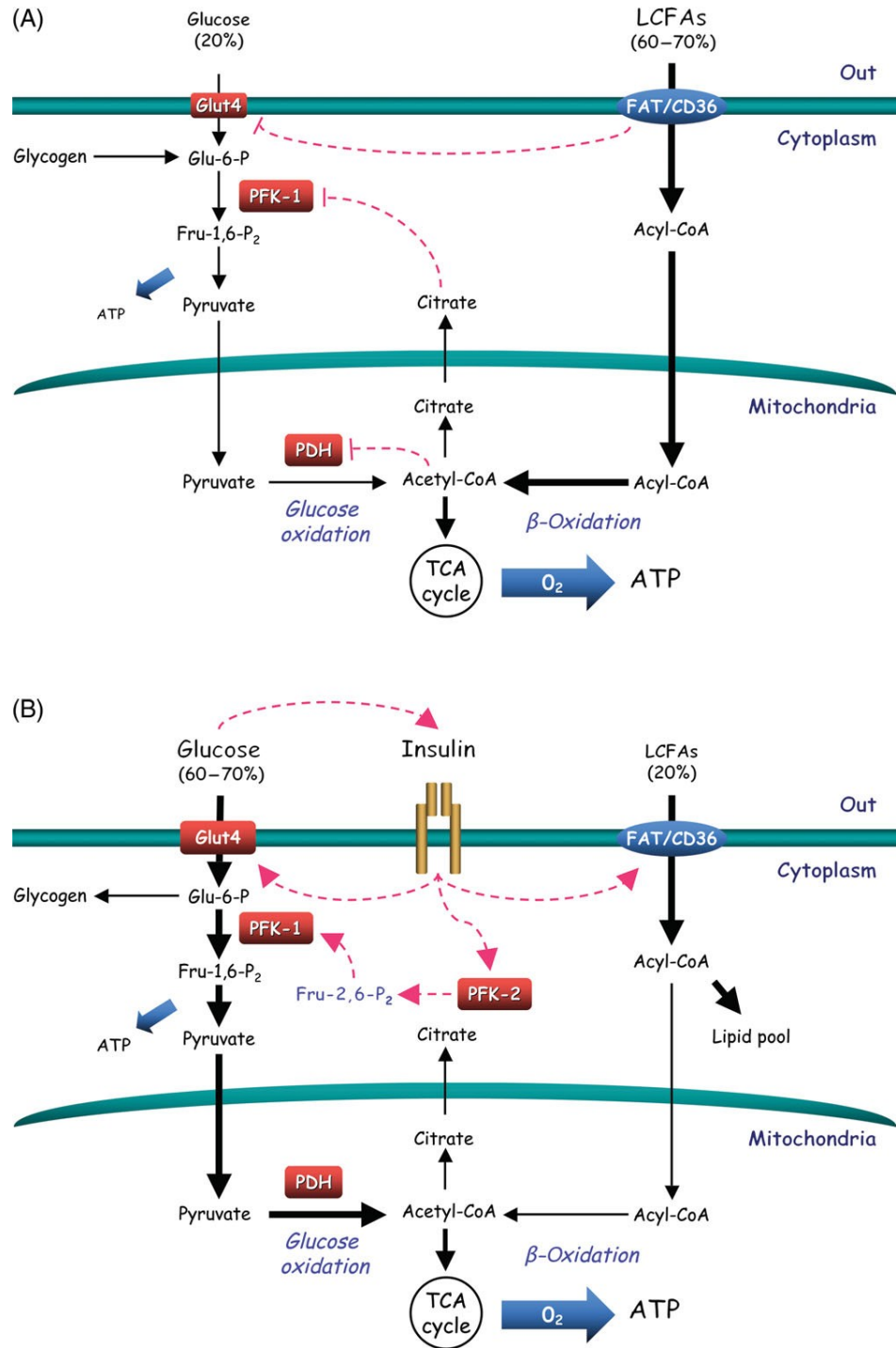
Çoğu dokuda aminoasitlerin hücre içine girişini ve protein sentezini uyarır [15]. İnsülin; karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi çoğu dokuda, hücre membranlarında bulunan yüksek afiniteli özgün reseptörlerine bağlanır. İnsülin reseptörü, tek bir polipeptit olarak sentezlenir, glukozillenir ve alfa-beta subünitlerine ayrılır. Bunlar daha sonra disülfid bağlarıyla bağlı bir tetramer oluşturmak üzere bir araya gelirler. Her beta subunitinin hidrofobik bölümü plazma membran içinde yer alır. Hücre dışında bulunan alfa subunitini insülin bağlanma bölgesi içerir. Beta subunitinin sitozolik bölümü, bir tirozin kinazdır ve insülin ile aktive olur. İnsülinin kendi reseptörünün alfa subünitlerine bağlanması, konumsal değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler, beta subunitlerine iletilir ve beta subunitindeki özgün bir tirozin biriminin hızlı otofosforilasyonuna neden olur. Ancak, reseptör tirozin kinazın, insülinin hücre içi etkileriyle bağlantısını sağlayan moleküller kesin olarak belirlenememiştir. İnsülin aktivitesinin bir kısmının, hedef proteinlerin serin veya treonin birimlerinin fosforilasyonu veya defosforilasyonu ile olduğu bilinmektedir. Bu nedenle reseptör tirozin kinaz aktivitesiyle insülin reseptör substrat (IRS-1, IRS-2) adı verilen bir peptidin tirozinlerinin fosforile edildiği düşünülmektedir. IRS-1 geni silinmiş farelerde glukoz homeostazının bozulduğu, glukoz toleransın geliştiği bulunmuştur. Belirgin diyabet oluşmaması, kaybolan IRS-1 yerine, kısmen IRS-2 tarafından tutulmasıyla açıklanmıştır. Birçok dokuda insülin varlığında glukoz taşınımı artmaktadır. İnsülin glukoz taşıyıcılarının (glukoz transport molekülleri, Glut) hücre içi vezikül havuzundan hücre yüzeyine devamlı hareketini sağlamaktadır. Çizgili kas ve yağ dokusunda insülin Glut-4 yardımıyla transloke olur. İnsülin bağlandıktan sonra, hormon reseptör kompleksi hücre içine alınır. Hücre içinde, insülin lizozomlarda yıkılır. Reseptörlerde yıkılabilir, fakat çoğu hücre yüzeyine geri döner. Yüksek insülin düzeyleri reseptör yıkımını artırır, böylece yüzey reseptörlerinin sayısı azaltılır (down regülasyon) [15]. İnsülinin bağlanması çok geniş etkilere yol açar. En erken yanıt, glukozun hücre içine girişinin artmasıdır. Bu olay, membran reseptörüne bağlandıktan sonra saniyeler içinde olmaktadır. İnsülinin neden olduğu enzimatik aktivite değişiklikleri ise, dakikalar ve saatler içinde meydana gelir (varolan proteinlerin fosforilasyon durumlarındaki değişiklikleri gösterir). İnsülin aynı zamanda birçok enzimin miktarını da artırır. Bunun için ise saatler veya günler gereklidir [14, 15]. İnsülin başta karaciğer, böbrek ve çizgili kaslar olmak üzere yağ dokusu, monosit, eritrosit, granülosit, plasentada yıkılır. Pankreastan salındıktan sonra yaklaşık % 50'si hepatositlerde yıkılır. Böbreklerde glomerüllerden süzülür ve proksimal tubulusta reabsorbsiyona uğrar, tubulus hücrelerinde kısmen yıkılır. İnsülinin hücre içinde yıkımında birçok enzim rol alır, bunların en önemlisi “glutatyon insülin transhidrojenaz”dır [15].

2.1.1. İnsulin Ve Kardiyovasküler Metabolizma

Kalp myokardiyal kasılma ve gevşemeyi kesintisiz sürdürebilmek için sürekli intrasellüler ATP seviyesini belirli düzeyde sürdürebilmek için yakıt ve oksijene ihtiyaç duyan bir enerji tüketici organdır. İnsan kalbi pompalama işini sürekli yapmak için her gün 3,5 ile 5,5 Kg'lık ATP oluşturur ve tüketir [16]. Bu enerjiyi oluşturma yolu koroner akım, kanın içindeki substrat, hormonlar ve beslenme durumuna bağlıdır [17, 18]. Fizyolojik şartlarda kalp ATP üretimini uzun zincirli serbest yağ asitlerinden (LCFA) % 60-70, glukozdan % 20 ve laktattan % 10 mitokondriyal oksidasyon ile sağlar (Şekil 2.1).

Eğer glukoz ve insülin miktarı artacak olursa yağ asitleri yerine glukozun oksidasyonu tercih edilmektedir. İnsulinin indüklediği substrat kullanımındaki adaptasyon kompleks olup, glukoz taşıyıcı Glut4, LCFA taşıyıcı 88kDaFA translokaz (FAT)/ CD36, glikolitik enzim 6-fosfofrukto-1-kinaz (PFK-1)'ı içeren çeşitli hücrel hedefleri etkileyebilmektedir (Şekil 2.1). İnsulin sinyal transdüksiyon yolunun proksimal kısmı bu metabolik etkilerde ortak yoldur.

İnsülin kardiyovasküler metabolizma ve glukoz, uzun zincirli yağ asitlerini içeren metabolizma fonksiyonları, protein translasyonu ve vasküler tonus regülasyonunda önemli role sahiptir. 1921'de keşfedilen insülin ile ilgili çok çalışma yapılmıştır. İnsulinin bu etkilerini açıklayacak moleküler sinyalizasyonun tam olarak açıklanması ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir. 1949'da ilk defa insülinin glukozun hücrelere alımını sağladığı keşfedildi fakat bunu GLUT 4 aracılığı ile yaptığı 1980'lerde ortaya çıkarıldı. 2003 yılında diğer iki protein olan protein kinaz B (PKB)/Akt ve Rab GTPaz-aktive edici protein (GAP) Akt substrat 160 (AS160) 'ın insülinin indüklediği glukoz alımında aranan kısımlar olabileceği düşünüldü. İnsuline bağlı moleküler adımlar hala kesin olarak açıklanmasa bile sinyal iletimi mekanizmasının açıklanması insülin direnci, kalp hipertrofisi veya miyokard iskemisi gibi kardiyovasküler hastalıkları moleküler düzeyde tedavi etmede yararlanmayı sağlayacaktır.



Şekil 2.1.İnsulin olmadığında (A) ve olduğunda (B) kardiyak metabolizma. ATP yapımı yağ asitleri ve glukoz oksidasyonundan sağlanır. Yağ asitleri kalbin kullandığı ayrıcalıklı substrattır, onun beta oksidasyonu glukoz oksidasyonu ile inhibe olur (Randle siklusu). Glukoz ve insülin plazma seviyesi arttığında glukoz esas enerji kaynağı haline gelir. İnsulin Glut 4 translokasyon ve 6-fosfofrukto-2- kinaz (PFK-2) aktivasyonunu sağlar, bu durumda glukoz alımı ve glikolizi başlatır. [19]

FAT/CD36, LCFA taşıyıcı

Fru-1,6-P2, fructose 1,6-bisphosphate;

Fru-2,6-P2, fructose 2,6-bisphosphate;

Glu-6-P, glucose 6-phosphate;

Glut4, glucose transporter4;

LCFAs, long-chain fatty acids;

PDH, pyruvate dehydrogenase;

PFK-1, 6-phosphofructo-1-kinase;

TCA cycle, tricarboxylic acid cycle.

2.1.2. Proksimal İnsulin Sinyalizasyonu

İnsülin reseptörü tetrametik enzim olup 2 adet ekstrasellüler alfa subünitesi ve 2 transmembran beta ünitesi içermektedir. Ekstrasellüler kısma insülin bağlanır, reseptörün beta ünitesindeki tirozin kinaz aktive olur. Beta subünite diğer pek çok tirozin rezidülerini fosforile ederek reseptörün otofosforilasyonuna neden olur. İnsulin reseptörleri insülin-like growth faktör (IGF-1) reseptörü ile benzer yapıdadır. İki reseptör ve onların ligandları arasında kros reaksiyon ve birbiriyle örtüşen fonksiyonları olması bu nedendir [20, 21]. İnsulin reseptörleri aktive ve fosforile edilen insülin reseptörleri onun fosfotirozin rezidülerine bağlanır ve insülin reseptörleri (IRS) ailesi ve Shc içeren bir seri downstream elementlerini fosforile eder [22, 23]. Bu recruitment (birikim) ve aktivasyon iki önemli yolağı sırasıyla aktive eder,

1. Fosfatidilinositol 3 kinaz

2. Mitojen aktiveli protein kinaz (MAPK) yolları.

PI3 K özellikle insülinin metabolik etkisinde ana rolü üstlenen yoldur. MAPK yolağı özellikle hücre büyüme ve çoğalmasında görevlidir. MAPK yolağı çok iyi tanımlanmıştır [24, 25].

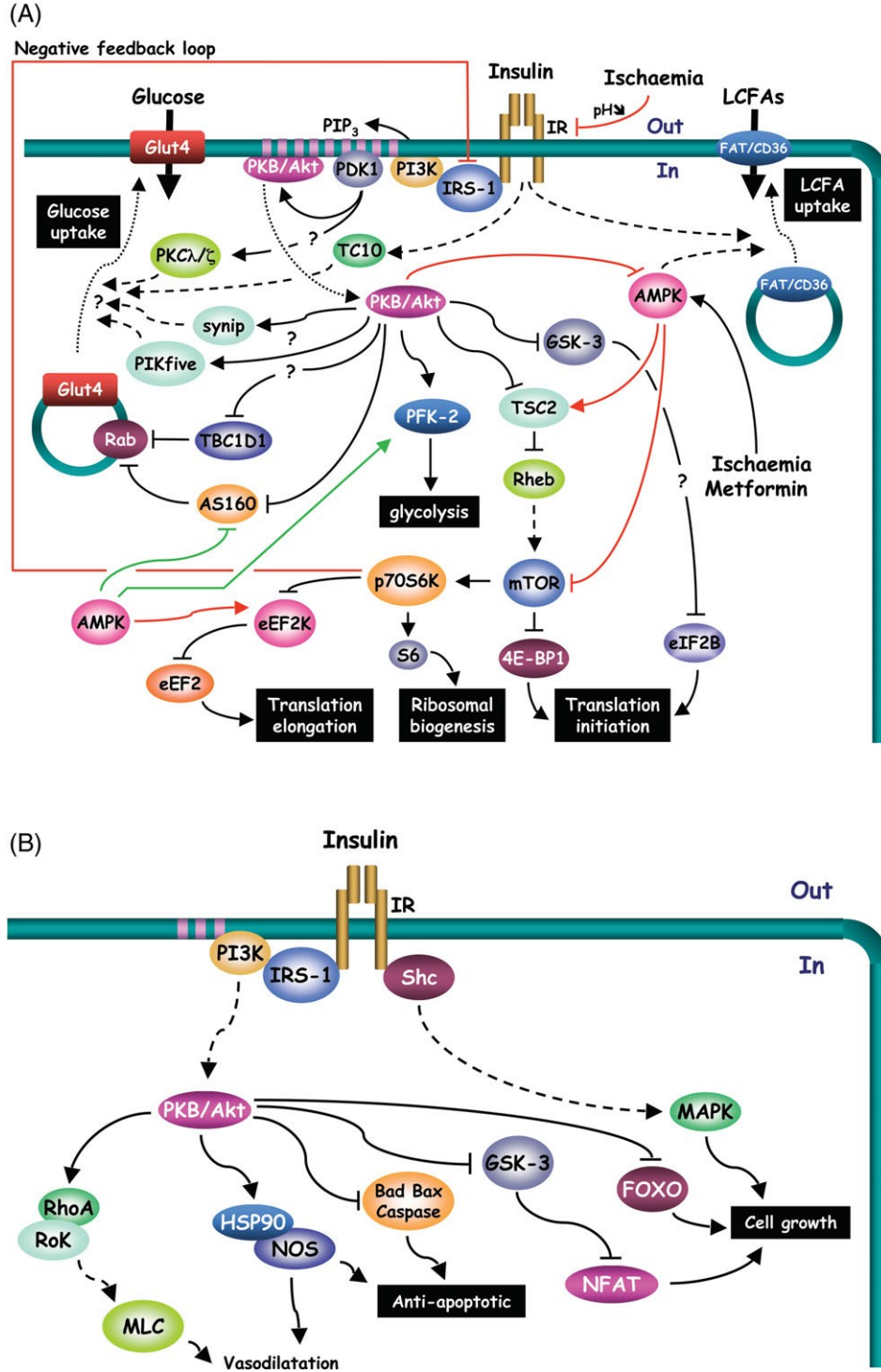
PI3K yolağı heterodimerik proteindir, p110 katalitik ve p85 regülatör kısımlarıdır. Regülatör kısım SH2 domain içerir ki bu İnsulin reseptörlerinin ya da IRS adaptör proteinlerin fosforile tirozin rezidülerine bağlanır

(İnsulin indüklemesi ile plazma membranında PI3K birikimi, PI3K aktive eder, PI3K bir lipit kinaz olup PI fosfatazı 3' pozisyonunda fosforile eder [26]. PI3K , PI4,5 P2'den PI3,4,5 P3 oluşturur. Plazma membranında artan PI3,4,5 P3 , fosfoinositid-bağımlı kinaz-1 (PDK1) ve PKB/Akt. 'ın birikimi ve co-lokalizasyonuna neden olur. İnsülin kalpte oldukça potent PKB/Akt'dür [27]. PDK1 ise kas spesifik knockout farede gösterilmiş olup insülinin kardiyak PKB/Akt aktivasyonu için gerekmektedir [28, 29] PDK1 ve PKBb/Akt2 izoformları kalbe glukoz alımı için esas yapılardır [30, 31]. PKB/Akt, PDK1 atipikal protein kinaz Cs (PKCs) I ve Z yi de aktive etme yeteneğine sahip olsa da insülin aracılı bu aktivasyon aslında kalp dokusunda henüz gösterilmemiştir [32].

2.1.3. Glukoz Ve Uzun Zincirli Yağ Asit Metabolizma Regülasyonu

Glukozun kalp hücre içerisine girebilmesi için okside formda olması gereklidir. Onun hücre içerisine membrandan alınması membrandaki glukoz taşıyıcılarının varlığında olmaktadır. Glut1 ve Glut4 insülin tarafından glukoz alımını düzenlemek için kullanılan asıl taşıyıcılar olarak kabul edilir [33, 34]. Glukoz taşıyıcıları kalp hücrelerinde intrasellüler ve plazma membranında olmak üzere iki farklı popülasyondur. İnsulin Glut 4 'ü intrasellüler depodan sarkolemmal membrana taşınmasını indükler, böylece de glukoz hücre içine alınır [33, 35].İnsulinin indüklediği Glut4 translokasyonunda PI3K/PKB/Akt- sinyalizasyon kaskadının rolü çok iyi tanımlanmıştır [36, 37]. Bilindiği gibi AS160, membran trafiğinde gerekli olan küçük G proteinleri Rabs'ın GAP'ı olup, PKB/Akt'ın bir substratıdır. İnsulin indüklediği fosforilasyon AS160'ı inaktive eder, Rab GAP fonksiyonu, buna bağlı olarak adiposit [29] ve kas dokusuna Glut-4 translokasyonu engellenir [16]. Kardiyomyositlerde insülin ile AS160'ın fosforilasyonu artırılır. Buna ilaveten diğer bir Rab GAP olan TBC1D1 ki bu ilave bir PKB/Akt substratıdır, AS160'a paralel bir rol oynar [38, 39] PKB/Akt substratı olan fosfoinositid 5 kinaz PIK5 ve SNARE ilişkili protein synip'in Glut4 translokasyonuna katıldığı düşünülmektedir. PIK5'in, F-aktin dinamikleri üzerine olan etkisi ile Glut-4 veziküllerinin trafiğinde rol oynayabilir. PI3K/PKB/Akt, spesifik lipit mikrodomanlerine yerleşmiş diğer bir yolak olup G protein TC10 ihtiva eder ki bu insülin reseptörleri ve IRS Cbl'ye

tutunur. Bu yolak adipozitlerdeki Glut4'ün translokasyonunda rol oynar [36, 37, 40-43]. Kalp kasında insülin Cbl, TC10'un her ikisinde fosforilasyonunu artırdığı gösterilmiştir [42] TBC1D1, PIK, synip, PKC I/z ya da Cbl/TC10'un insülinin indüklediği glukoz uptake stimülasyonu kalpte henüz araştırılmamıştır. Glukoz kas hücrelerine girdikten sonra glikojen sentezine ve insülin bağımlı glikolizise katılmak için metabolize edilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kardiyovasküler yolağı düzenleyen insülin sinyal yolağı

Bu şekilde metinde bahsedilen farklı insülin sinyal elemanları ayrıntılı olarak tarif edilmektedir. (A) İnsulinin kardiyomyositlerde substrat metabolizması ve protein translasyonuna etkileri. (B) İnsulinin endotelial / vasküler düz kas hücreleri sistemi, apoptoz ve hücre büyümesi üzerine oluşturduğu aracı vazodilatasyon. Noktalı çizgiler translokasyonlar ve düz çizgiler doğrudan etkileşimleri, kesik çizgiler ise dolaylı etkileşimleri temsil etmektedir. [19]

İnsülinin indüklediği negatif geri besleme döngüsü, kırmızı olarak sunulmuştur. İnsülin ve AMP-aktif protein kinaz sinyalizasyon yolağı arasındaki etkileşimler de bu şekilde görülmektedir. Kırmızı hat bir yolun diğerini inhibe etme etkisini, gösterirken yeşil çizgiler AMP-aktif protein kinazın insüline benzer etki oluşturan analoglarına etkilerini ifade etmektedir. Soru işaretleri kalp dokusunda henüz tanımlanmamış sinyal olaylarını ifade etmektedir.

İnsülin, PKB indüklemesi ile GS kinaz 3 inaktivasyonu yapıp kas hücresinde glikojen sentazı defosforile edebilmektedir [31, 44-46]. Fakat bu yolağın kalp hücresinde çalıştığı gösterilmemiştir [31]. Glukoz 6 fosfat ile GS'nin allosterik aktivasyonunu içeren mekanizma kardiyak glikojen seviyesini regüle eden esas mekanizmadır [31]. İnsulin kardiyak glikolizis stimülasyonu ile glukoz kullanımı tercih eder [47-49]. İnsulin fruktoz 2, 6 bifosfat sentezini yapan enzim olan 6-fosfofruktoz -2 kinaz (PFK-2) izoformunu aktive eder [50]. 2, 6 bifosfat, PFK1'in kuvvetli bir uyarıcısıdır, glikolitik yolda ana bir enzim regülatörüdür [49]. PI3K/PDK1 bağımlı yolun kontrolünde PFK-2 aktivasyonu sağlar [47, 50-53]. Bununla birlikte direkt PFK-2 fosdforilasyonundan alt grup protein kinazın sorumlu olduğu hala çelişkilidir, bir çalışma PKB'nin putatif bir rolü olduğunu, diğerleri ise diğer bir PDK1 bağımlı kinazın olduğunu ifade etmektedir. [27, 32, 50]. Ölü bir kinaz PFK2 'ın kardiyak spesifik ekspresyonun glikolitik akışı azaltması, hipertirofiyi ve fibrozisi indüklemesi, kardiyomyosit fonksiyonları azaltması nedeni ile PFK2'nin kardiyak fonksiyonu regüle etmede oldukça önemli olduğu görünmektedir [54]. İnsulin kalp hücrelerinde glukoz alımına paralel olarak LCFA alımını da indükler [55, 56] Kalp uyarılması ile İnsulin sinyalizasyonu plazma membranındaki LCFA transporteri FAT/CD36'nın insülin bağımlı translokasyonuna neden olur (şekil 2.2.). Bu fenomen insülinin indüklediği PI3K aktivasyonunu gerektirir [57]. Glukoza zıt olarak intrasellüler LCFA konsantrasyonu arttığında LCFA oksidasyonu artışı ile sonuçlanmaz fakat intrasellüler lipid havuzundaki aşırılığın depolanmasını sağlar [58].

2.1.4. İskemide İnsulin Etkisi, İnsulin Ve AMP-Activated Protein Kinase Sinyalizasyonu Arasındaki Etkileşim

İnsülin sinyalizasyonu sinyalizasyonu ve etkisi myokardiyal iskemide önemli ölçüde değişir [48, 59-63]. İnsulin sinyalizasyonu AMP'nin aktive ettiği protein kinaz (AMPK), diğeri protein ile ilişkili olmayan iki esas yol ile modifiye edilir [46]. İlk önce MI'n oluşturduğu asidozis, İnsulin reseptörleri tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olur (Şekil 2.2). Bu inhibisyon PKB/Akt, p70S6k ve GSK-3. 'yı içeren farklı downstream elementlerde azalma ile direkt ilişkilidir. İkinci olarak iskemide okside ATP oluşumunun etkilenmesi AMP konsantrasyonun artması AMPK aktivasyonunu artırır [64]. Aktive olan AMPK insülin sinyal yolunun farklı komponentlerini argüle ettiğini düşündürmektedir (Şekil 2.2) [48, 59, 61-64].

İnsülin gibi, AMPK Glut-4 translokasyon ve PFK-2 aktivasyonu gibi aynı yolların regülasyonunu yaparak kardiyak glukoz alımını ve glikolizisi stimüle eder[65, 66]. AMPK insüline zıt olarak TSC'/mTOR/p70S6K inhibisyonu ile protein sentezine olan insülin etkisini antagonize ettiği bildirilmektedir [67-69]. İskemik kalpte AMPK'nın protein sentezinin regülasyonundaki tam rolü hala açık değildir. Kardiyomyositlerde AMPK'nın farmakolojik ve genetik aktivasyonu p70S6K 'nın PKB/ Akt-aracılı aktivasyonu, eEF2'nin fosforilasyonu ve protein sentez stimülasyonunu açık olarak ortadan kaldırmaktadır.

Son çalışmalarda iskeminin indüklediği EF2 fosforilasyonu AMPKa2 izoformunun yokluğunda açık şekilde değiştiği, mTOR/p70S6K inhibisyonunda ise değişmediği gösterilmiştir. Son çalışmalar protein sentez uzanımının regülasyonunda AMPK'nın rolü olduğunu desteklemektedir fakat iskemide protein translasyonunda pre ya da başlangıç adımın inhibisyonuna bu protein kinazın etkisi ile ilgili sorular hala vardır.

İskemi bağımlı-insülin regülasyonuna paralel olarak insülinin AMPK sinyalizasyonunu antagonize ettiği çok iyi bilinmektedir [70, 71]. PKB/Akt AMPK'yı fosforile edebilir, bu fosforilasyon da iskeminin indüklediği AMPK aktivasyonunu azaltır (Şekil 2.2.) [45, 72, 73].

2.1.5.İnsulin İskemi-Reperfüzyonda Koruyucu Mudur?

İnsulin sinyalizasyon yolu iske mi esnasında bloklansa bile , insülin hala reperfüzyon esnasında aktif olabilir. Uzun yıllar glukoz/insülin/potasyum (GIK) MI sonrası infarkt alanı azalttığı için iyi bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir[74, 75]. Pek çok çalışma GIK'in protektif etkisini açıklamada PKB/Akt'nın insülin aracılı aktivasyonuna bağlamıştır[61, 75-77]. Böyle düşünme nedenlerinden birisi; bilindiği gibi reperfüzyon esnasında miyokardiyal metabolizma LCFA'lerden glukoz oksidasyonuna kaymaktadır. İkincisi PKB/Akt aktivasyonu çeşitli koruyucu mekanizmaları çalıştırır. PKB/Akt'in f fosforilasyonu, sequesters, ve BAD, BAX, ve caspase-9 gibi çeşitli proapoptotik proteinlerin inaktivasyonuna sebep olur (Şekil 2.2) [78, 79]. Sonuç olarak PKB/Akt/mTOR/ p70S6K diğerleri ile birlikte kontraktıl proteinlerin post iskemik sentezini sürdürerek kalbi iskemiden koruduğu farz edilmektedir. İnsulin gibi IGF-1 iske mi reperfüzyonda PKB/Akt gibi aynı yolağı etkileyerek protektif etki gösterir [80, 81].

AMI'lı 132 hastada mortalite üzerine GIK'in nötral bir etkisinin olduğu gösterilmiş. GIK'in verilme zamanı tedavinin etkinliği ile direkt ilişkilidir. En iyi iyileşme GIK'in çok hızlı perfüzyonu ile gelişir [82]. Son yıllardaki bir çalışma insülin kalp koruyuculuğunu azaltıldığını belirtmektedir. Sonuç olarak GIK infüzyonu insülinin yararlı etkisine rağmen hiperglisemi yapmakta glukotoksisiteyi provoke etmektedir [83](Şekil 2.2).

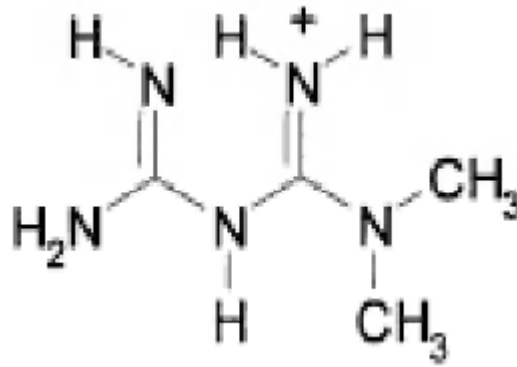
2.2. METFORMİN

Metformin Tip 2 DM da sıkça reçete edilip, hastalar tarafından da yaygın olarak kullanılan biguanit türevi bir ilaçtır. İskelet kasları ve yağ hücrelerinde insülinin etkinliğini arttırıp, sindirim sisteminden ise glikoz absorbsiyonunu azaltarak etki göstermektedir [84-88]. Son yıllarda metformin kadınlarda polikistik over sendromunun tedavisinde de kullanılmaktadır [89]. Dikkate değer bir diğer durum ise; metformin kullanan diyabetiklerin ve kardiyovasküler

hastalığı bulunan kişilerin hayatta kalma oranının arttığının gözlenmesidir [90]. Araştırmalar metformine bağlı olarak daha sağlıklı bir hayat sağlanabileceğini düşündürmektedir [91-93].

2.2.1. Bulunuşu

Metformin (1,1-dimetilbiguanid hidroklorid) Tip 2 Diabetes Mellitusta sıkça reçete edilip, hastalar tarafından da yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biridir. Galega officinalis isimli bitkinin özütünden elde edilen biguanid yapılı bir maddedir [94, 95]. Tarihte Galega officinalis'in ilk kullanımları bitkisel ilaç olarak ortaçağ Avrupasında görülmektedir. Diyabet tedavisinde kullanımı ise özellikle 1930'ların sonlarına doğru Fransa'da olmuştur. Aslında Galega officinalis ile ilk çalışmalar 1800'lerin sonlarında "guanidin" yapısının bulunmasıyla başlamış ve 1918 yılında da guanidinin hayvanlarda hipoglisemik aktiviteye sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak 1920'lerde guanidinin klinik kullanımının toksik olduğu görülünce yine aynı bitkiden elde edilmiş ve daha az toksik olan "galegin" antidiyabetik ilaç olarak kullanılmaya başlandı. Yine aynı yıllarda hem daha iyi tolere edilebilen hem de daha etkili iki sentetik diguanin olan "sitalin A" ve "sitalin B" de kullanılmaya başlanmıştır. 1929'da ise "dimetilbiguanidinin" de içinde bulunduğu bazı biguanidinler sentezlendi. Sentezlenen biguanidler hayvanlarda toksik değildi ancak insanlar üzerinde henüz hiçbir test yapılmamıştı [96, 97]. Metformin hakkında ilk ciddi makale ise Jean Sterne tarafından yayınlanmıştır. Bu makalede Sterne metformini glukoz yiyici anlamına gelen "Glucophage" olarak adlandırmaktaydı [97]. Daha sonraları yine biguanidlerden olan "fenformin" ve "buformin" de kullanıma girdi. Ancak bu ilaçlarla oluşan laktik asidoz vakaları dikkat çekiciydi. İlerleyen yıllarda metformin, diğerlerine göre daha az laktik asidoza sebep olması, hipoglisemi ve kilo almaya neden olmamasıyla dikkat çekti. Sonuçta da tedavide en fazla tercih edilen biguanid oldu [96].



Şekil 2.3. Metforminin kimyasal yapısı [98]

2.2.2. Kimyasal yapısı

Metformin sentezinin orijinal tanımı ilk olarak 1921 de yapılmıştır [99]. Buna göre eşit molaritede dimetilamin ve 2-siyanoguanidin toluen içerisinde eritilmiş ve sonra bu işlemler sırasında solüsyon soğutularak yoğunlaştırılmıştır. Sonrasında ise eşit molaritede HCl yavaşça solüsyona eklenmiştir. Karışım kendiliğinden kaynamaya başlayıp ve sonrasında soğutulduğunda metformin hidroklorit çökeltisi elde edilmiştir (Şekil 2.3.).

2.2.3. Absorbsiyonu

Metformin gastrointestinal sistemden emilimi yavaş ve biyoyararlanımı %50- %60 oranında olan bir ilaçtır. Tek dozunun doruk plazma konsantrasyonuna (Tmax) ulaşması yaklaşık üç saat olarak hesaplanmıştır [100]. Metformin ile 850 mg'dan 2550 mg'a kadar dozlarda yapılan çalışmalarda emilimin tam olmaması ve doygunluğa ulaşması sebebiyle biyoyararlanımın doz ile doğrusal orantılı olmadığı tespit edilmiştir. Gastrointestinal sistemde metformin emiliminden temel olarak "Plasma Membrane Monoamine Transporter" (PMAT) proteinlerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir [101]. İnce bağırsakta az bulunmalarına rağmen "Organic

Cation Transporters" (OCTs) OCT1 ve OCT2 proteinlerinin de metformin emiliminden sorumlu olduğu düşünülmektedir [102, 103].

2.2.4. Dağılımı

Metforminin kanda plazma proteinlerine bağlanmasının ihmal edilecek kadar az olduğu görülmüştür [100]. Bununla birlikte, dokularda dağılımı yüksek olan bir ilaçtır. Metforminin sanal dağılım hacmi (Vd) 300 litre olarak hesaplanmış [104], kararlı durum plazma konsantrasyonuna 24-48 saat içinde eriştiği belirlenmiştir. Metforminin kandaki iyonizasyonu % 0.01 den daha azdır. Bu da metformini birçok bazik ilaçtan daha bazik yapmaktadır. Ancak metforminin lipofobik özellikte olması hücre içersine pasif difüzyonla hızlı bir şekilde girebilmesine engeldir [104] Yukarda da belirtildiği gibi hücre içine ulaşmasının OCTs proteinleri tarafından gerçekleştirildiği bulunmuştur [102, 103].

2.2.5. Metabolizma

Tek doz intravenöz uygulanmayı takiben metformin idrardan değişmeden atılmaktadır. Karaciğerde metabolizmaya uğramadığı gibi safra yoluyla da atılmamaktadır. Aynı zamanda idrarda metformin metabolitlerine de rastlanılmamıştır [105].

2.2.6. Atılım

Sağlıklı deneklerde; günde iki kere 1000 mg'lık metformin verilmesi sonrasında plazma konsantrasyonunun 0.4 mg/L ile 1.3 mg/L arasında değiştiği saptanmıştır. Renal fonksiyon bozukluğu olmayan bireylerde metforminin yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) yaklaşık 5 saat olarak gösterilmiştir [106]. Oral uygulanmasını takiben emilen ilacın yaklaşık % 90'ı böbrek yolu ile 24 saat içinde atılmaktadır. Metforminin renal klerensi yüksektir. Bunun üç nedeni olduğu düşünülmektedir:

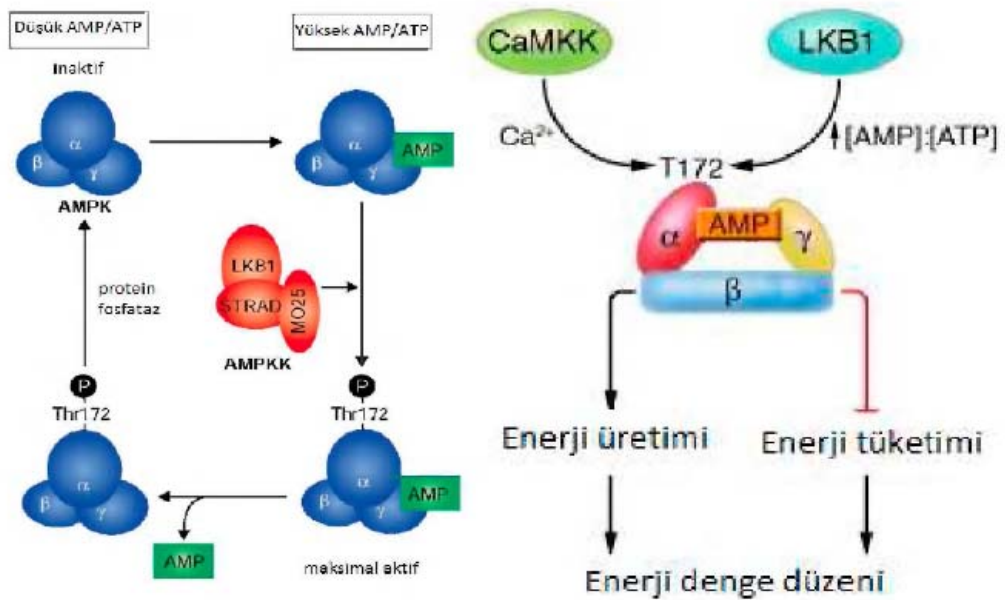
1. Metformin ufak molekül yapısına sahiptir ve plazma proteinlerine bağlanmamaktadır
2. Böbrekte metforminin transportundan sorumlu birden çok protein bulunmaktadır
3. Metforminin yağda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle tekrar emilim minimum düzeyde olmaktadır [100, 105, 107].

2.2.7. Etki mekanizması Adenozin monofosfat'ın aktive ettiği protein kinase (AMPK)

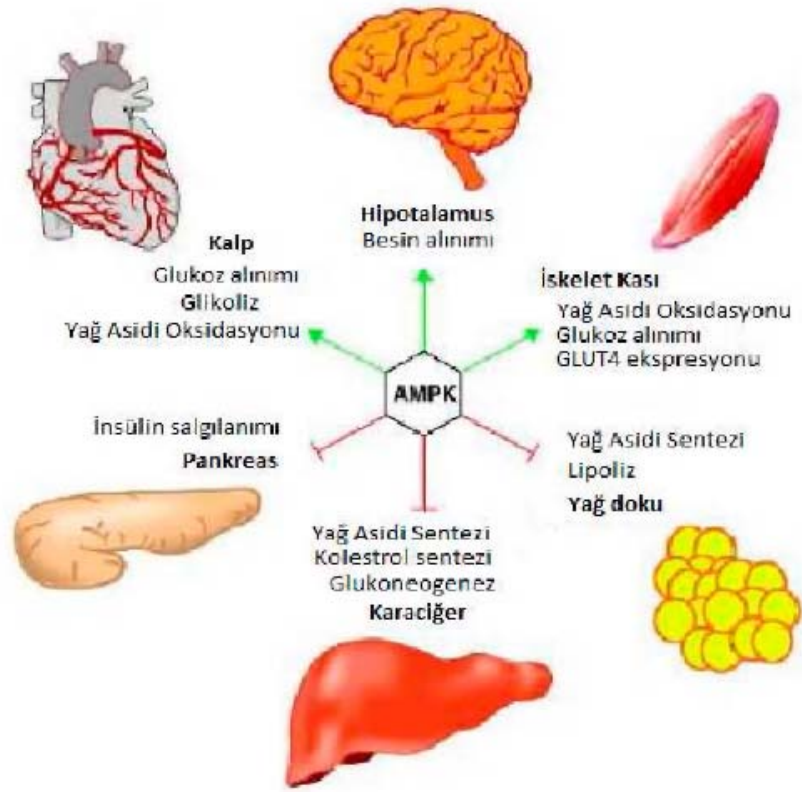
Metforminin temel işlevi hepatik glukoz üretimini azaltması ve periferik insülin duyarlılığını artırarak hiperglisemiyi düzeltmesidir [108]. Metformin aynı zamanda çizgili kaslarda glukoz utilizasyonunu arttırıp, plazma trigliserid düzeyinin de düşmesini sağlamaktadır [109]. Ayrıca metformin hepatik glukoneojenezi de inhibe etmektedir [110]. Metformin bu etkileri "Liver Kinase B1" (LKB1) bağımlı aktive edilmiş AMPK mekanizması aracılığı ile sağladığı düşünülmektedir [109, 110]. AMPK'nin ise özellikle enerji metabolizması ve dengesi yönünden çok önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir [111]. Memelilerde, AMPK'nin görevi yağ asidi, protein ve kolesterol sentezi gibi metabolik yolların modülasyonunu sağlamaktır. Bunun yanında hücre içine glukoz taşınması ve karaciğer ile iskelet kaslarında glikoliz mekanizmasında da rol oynamaktadır [112]. Bu aşamalarda AMPK, hücre içi enerji sensörü olarak glukoz modülasyonu ve yağ asidi metabolizmasında görev almaktadır [113]. AMPK'nin eksersiz gibi fiziksel uyarı, kas kasılması, adiponektin ve leptin gibi hormonlarla, fizyolojik strese, glukoz yoksunluğunda, hipoksida, oksidatif strese ve osmotik şokta etkin hale geldiği gösterilmiştir. Bu durumun glukoneojenezi ve lipojenezi inhibe ederken, yağ asidi oksidasyonunu ve lipolizi arttırdığı düşünülmektedir [113, 114] (Şekil 2.4).

AMPK aracılıklı mekanizmanın bulunuşu 1973 yılında yayınlanan birbirinden bağımsız iki ayrı çalışma ile olmuştur. Bu araştırmalarda asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-isoprenoid (HMG-CoA) redüktazın Adenozin trifosfat (ATP) ile inkübe edilmesi sonucu inaktive olduğu rapor edilmiştir [115, 116]. Bu yayınlarda; bulunan bu iki grubun etkinliğinin fosforilasyon sonucu ortaya çıktığı, bu fosforilasyonu sağlayanın da bir protein kinaz olduğu düşünülmekteydi. Nitekim, 1987 yılında bu protein kinaz bulunarak adı AMPK olarak belirlendi [117]. AMPK'nin birçok alt üniteden oluştuğu belirlenmiştir. Bunlar, her biri iki veya daha fazla izoformu olan, farklı genler tarafından kodlanan, farklı dokularda farklı

oranlarda sentezlenen α , β ve γ alt üniteleridir [118]. α alt ünitesinin iki izoformu ($\alpha 1$, $\alpha 2$) kinaz bölgesinde N-terminalin yarısını oluşturmaktadır [119]. Aynı zamanda α alt ünitesi katalizör bölgeyi de içermektedir ve burada başka kinazlar. 172 tarafından fosforile edilen önemli bir düzenleyici olan threonin 172 (Thr 172) bulunmaktadır [120]. β ($\beta 1$, $\beta 2$) alt ünitesi glikojen-bağlayan C-terminal bölgesini içermektedir. İskelet kaslarında hücre içi yüksek glikojen seviyesinin β alt ünitesini etkileyerek AMPK'yi inhibe edebileceği gösterilmiştir [121]. γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) alt ünitesi ise dört tekrarlı iki bölgeden oluşmaktadır [121]. AMPK'nin aktivasyonunun iki şekilde olduğu düşünülmektedir. Birincisi AMP'nin bağlanması sonucu AMPK'nin aktive olması [117], ikincisi ve daha önemlisi, AMPK α alt ünitesine LKB1 kinazın bağlanarak AMPK'yi fosforile etmesidir [122]. AMPK'nin α alt ünitesinde bulunan Thr bölgesini fosforile eden ana kinazın LKB1 ve iki yardımcı alt ünite STRAD (Ste20-bağımlı adaptör) ve MO25 (mouse protein 25) olduğu düşünülmektedir. STRAD ise LKB1 kompleksine katılan Thr' nin fosforilasyonu için gerekli olan bir alt ünite [123]. LKB1'nin aynı zamanda AMPK alt ailesinden 13 kinazı aktive edebildiği gösterilmiştir [124]. LKB1, STRAD ve MO25'in yanında AMPK'yı LKB1'den 2+ bağımsız Ca²⁺/kalmodulin bağımlı protein kinazın (CaMKK) da aktive edebildiği 2+ düşünülmektedir [125]. Hücre içi Ca artışının ise CaMKK aktivitesinin artışından sorumlu olduğu bilinmektedir [126].



Şekil 2.4. AMPK aktivasyonunun moleküler yapısı ve işleyişi [127]



Şekil 2.5. AMPK'nın organlarda ki başlıca etkileri[128]

AMPK aktivitesinin hücre içi solunum zincirindeki Kompleks 1 inhibisyonuna bağlı olduğu da gösterilmiştir [129]. Kompleks 1'in inhibisyonu AMP/ATP düzeyinin artmasına bunun da AMPK'nin aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir [129]. Hücre içi solunumun azalması sonucu ise hücrede glikojenezis azalmaktadır [130]. Bu bulguyla uyumlu olarak yüksek metformin konsantrasyonunun hücrede total ATP seviyesini baskıladığı bildirilmiştir. Bu durumun da hücrede AMP/ATP oranının artmasına neden olduğu açıktır [131, 132]. AMPK'nin bir diğer işlevinin ise çizgili kas heksokinaz ve glukoz taşıyıcılarının (Glut4) ekspresyonunu indüklemesi olduğu düşünülmektedir [118]. AMPK aktivasyonunun aynı zamanda "sterol regulatory element-binding proteins" (SREBP-1) mRNA ve protein ekspresyonunun azalmasında rol oynadığı düşünülmektedir. SREBP-1'in ise dislipidemi ve insülin direncinin patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir [131].

2.2.8. Metforminin Kullanım Alanları

Metformin ve diyabet 2025 yılında dünya genelinde 300 milyon bireyin diabetes mellitus olacağı öngörülmektedir [132]. Dünya sağlık örgütü (WHO) diyabet tanısını kan glukoz düzeyine göre açıklıta; glukoz > 70 mg/dl ve glukoz yüklenmesinin (75g) ardından 2 saatin sonunda; glukoz > 110 mg/dl olarak belirlemiştir [133]. Diyabet hastalarının % 90 gibi büyük bir bölümü DM2 hastasıdır, geri kalan % 10'luk bir kısmını ise tip 1 ve diğer diyabet hastaları oluşturmaktadır. DM2 karakteristik olarak 4 ana metabolik anormallik göstermektedir:

1. Obezite
2. İnsülin etkinliğinde azalma
3. İnsülin saliverilmesinde fonksiyonel bozukluk
4. Dokuların glukoz kullanımında azalma [134].

Metforminin hepatik glukoz üretimini doğrudan glukoneogenik enzimleri (fosfoenolpruvat karboksikinas, fruktoz-1,6-bisfosfataz, ve glukoz- 6-fosfataz) inhibe ederek düşürdüğü düşünülmektedir [135]. Metforminin karaciğere glukoz alınmasını arttırmasının yanı sıra glikolitik enzimleri (hekzokinaz, glukokinaz ve piruvat kinazı) aktive ederek glikolizisi uyardığı da bilinmektedir [135] (şekil 4.5). Bunun yanı sıra metformin insülin reseptör birimlerinin (insülin reseptör substrat (IRS) -1 ve -2) fosforilasyonunu arttırmaktadır [135]. Metforminin karaciğerde anahtar glukoneogenik genlerin ekspresyonunu da inhibe etmektedir [136]. Diğer taraftan, metforminin iskelet kaslarında da insülin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir [135]. Metforminin insüline dirençli iskelet kası hücrelerinde insülin reseptörlerinde IRS-1 fosforilasyonu ve fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) aktivasyonunu azaltarak etki gösterdiği anlaşılmıştır [135]. İskelet kaslarındaki bir başka etkisi ise atipik protein kinaz C (aPKC) izoformunu indükleyerek glukoz taşınmasında görev alan Glut-4'ü aktive etmektir [135]. Metforminin pankreatik adacık hücrelerinde de AMPK aktivasyonunu düzenleyerek P-hücre fonksiyonlarını etkileyebildiği düşünülmektedir [137]. Özetle; Metformin; 1. İnsülin duyarlılığını arttırarak [138], 2. Kaslarda glukoz utilizasyonunu arttırarak [138], 3. Hepatik glukoz üretimini azaltarak [139], 4. Glukoz ve yağ asidi metabolizmasında rol oynayan AMPK yolağının aktivasyonunu arttırarak etki gösterir [140]. DM2'de metformin kullanımı ekonomik olması,

kilo kaybını arttırması, hipoglisemiye sebep olmaması ve glukoz düşürücü etkisi sebebiyle European Association for the Study of Diabetes (EASD) ve American Diabetes Association (ADA) tarafından tavsiye edilmektedir [141]. DM2'li obez hastalarda kan glukoz seviyesini kontrol etmede metformin kullanımını öngören yayınların yanında obez olmayan DM2'li hastalarda da metformin kullanımında kan glukoz düzeyinin düzenlenmesinde metforminin etkinliğini destekleyen yayınlar bulunmaktadır [142].

2.2.9. Metformin Ve Kardiyovasküler Sistem

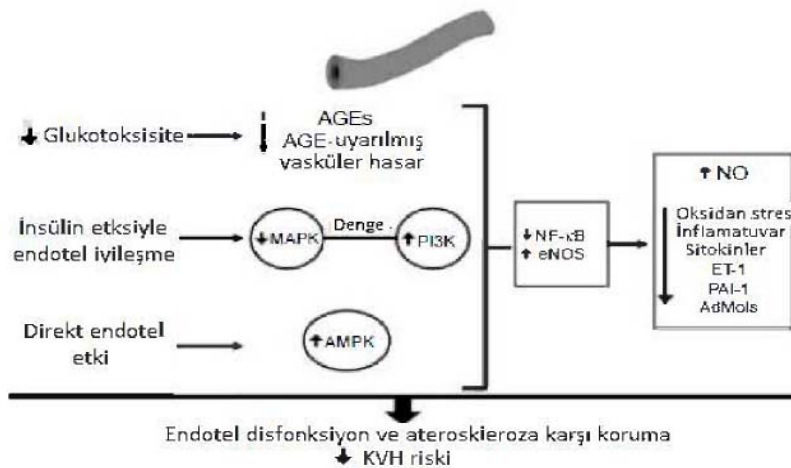
2.2.9.1. Kalp

Kalp ve kaslar minimal düzeyde enerji depolayabilen dokulardır, bu yüzden metabolik stres altındaki bu organlarda AMPK enerji sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Metabolik stres sırasında AMPK aktivasyonu sonucu ATP üretiminin ve bunun sonucu dokularda yağ asidi oksidasyonu, glukoz alımı ve glikolizisin arttığı gösterilmiştir [62, 143, 144]. Diğer taraftan kalp yetmezliği ile mitokondrial biyogenezis arasında önemli bir bağ olduğu düşünülmektedir [145]. Bu açıdan bakıldığında AMPK'nin hipertansiyonda, miyokart hasarında, anterogenezis ve enflamasyonda rol aldığı gösterilmiştir [146]. AMPK aktivasyonunun fosforilasyon ve endothelial nitrik oksit sentez (eNOS) aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir [147]. Bunun yanında AMPK aktivasyonu mitokondrial biyogenez ve fonksiyonunda etkili "Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptor- γ Koaktivator" (PPAR-1a) ekspresyonunu da artırmaktadır [148]. Bir başka bulgu ise iskemik kalpte AMPK aktivasyonunun enerji homeostazında anahtar rol oynadığıdır [144]. DM2 olmayan obez kişilerde yapılan BIGPRO (biguanides and the prevention of the risk of obesity) çalışması bu açıdan ilginçtir. Bu araştırmada bir yıl boyunca metformin ve plasebo verilen kişilerdeki metabolik parametrelerdeki değişiklikler gözlenmiştir. Çalışmada kilo, plazma insülin, glukoz, total kolesterol ve fibrinolitik marker değerlerindeki değişiklikler takip edilmiştir [149, 150]. Çalışmanın sonuçları metforminin kardiyovasküler risk açısından önemli olan açlık insülin düzeyi, total kolesterol ve Apo B düzeylerinde düzelme sağladığını göstermiştir [151, 152]. Metforminin kardiyovasküler açıdan yararını sadece antihiperglisemik etkisi ile açıklamak yetersiz olacaktır. Metformin aynı zamanda lipid metabolizmasını, kalp kası ve damar düz kasında hücre içi kalsiyumun kullanımı ve endotelial fonksiyonları düzenleyerek de olumlu kardiyovasküler etkiler göstermektedir [106]. Benzer şekilde, metforminin iskemi-

reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu, kardiyak fibrozisi inhibe ettiği de literatürde yer almaktadır [153-155].

2.2.9.2. Damarlar

Endotel disfonksiyonunda obezite ve insülin direncinin de rol oynadığını gösteren yayınlar bulunmaktadır [156]. Endotel disfonksiyonu; kabaca vazokonstriktör maddeler ile vazodilatör maddeler arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır [157]. Kardiyovasküler sistemde endotel fonksiyonları açısından insülinin, nitrik oksit (NO), endothelin-1 (ET-1) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) salıverilmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir [158]. AMPK aktivasyonunun eNOS ve NO sentezini arttırdığı anlaşılmıştır [147, 159]. Diğer taraftan meforminin doğrudan damar genişletici etkisi olduğu da düşünülmektedir [160]. Metforminin vazodilatasyon oluşturmasının mekanizması olarak önerilen bir başka olaysa arteriyel düz kas hücrelerinde hücre içi kalsiyum düzeylerini düşürmesidir [161]. Bu etkilerin bir sonucu olarak metforminin pulmoner arterial hipertansiyonda koruyucu etki gösterdiği anlaşılmıştır [162]. Metforminin kardiyovasküler koruyucu etkisine antioksidan özelliğinin katkısı da bulunabilir [163]. Başka bir önemli bulgu da AMPK aktivasyonun düz kas proliferasyonundan sorumlu önemli bir madde olan anjiyotensin II'yi inhibe etmesidir [164]. Metforminin damar duvarındaki hücrelerde pro-inflamasyonu inhibe etmesi de kardiyovasküler açıdan önemlidir [165].(Şekil2.6).



Şekil 2.6. Metformin ve damarlar arasındaki ilişki [166]

2.3. KOMET (TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ) TEKNİĞİ

Sitogenetik yöntemler, mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişen 'komet tekniği' de çeşitli tipte DNA hasarlarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle yaygın kullanım görmektedir.

2.3.1. Tarihçe

İlk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasarını tespit etmek üzere "Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği" (SCGE) geliştirilmiştir [167]. Ostling ve Johanson mikroskop lamı üzerinde, bir ince tabaka agar jeline süspanse ettikleri az sayıda hücreyi, tuz ve deterjanlarla lize ettikten sonra, nötral şartlarda elektroforeze tabi tutmuşlardır. Elektroforez sırasında uygulanan elektrik akımı, kırılmış ve hafif DNA parçalarının çekirdekten hızlı göçünü sağlamaktadır. Komet tekniği, hasar görmüş DNA'nın elektroforez ile çekirdekten salınması prensibine dayanır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, hasarlı DNA, çekirdekten anoda doğru göç etmekte ve etidyum bromid gibi fluoresan bağlayıcı bir boya ile boyandıklarında bu hasarlı hücreler, kuyruklu yıldız (komet) benzeri görünüm almaktadır [167]. DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa ki, DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından alkali şartlar altında ($pH > 13$), DNA tek sarmal kırılmalarının tespitine izin veren komet tekniği oluşturulmuştur [168]. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları, proteinlerin %95'inden fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile alkali oynak bölgelerin ve tek zincir kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde tanınması sağlanmıştır. Pek çok genotoksik ajanın çift zincir kırıklarından çok tek zincir kırıkları ve/veya alkali oynak bölgeler oluşturmaları nedeniyle metodun bu versiyonu daha çok önerilir hale gelmiştir [168, 169]. Böylelikle komet tekniğinin yeni dizaynı, birey hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasarı büyüklüğünün direk olarak tespitini sağlamaktadır.

Bunun yanında, DNA hasar/onarım tespiti ve mekanizması çalışmalarında kullanılabilmektedir [170, 171].

2.3.2.Kullanım Alanları

SCGE tekniği tek bir hücrede DNA hasarının direk tayininin yanı sıra, bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitine, dolayısıyla da bir tedavi sırasında hücrelerin cevabının özellikle radyoterapi ve kemoterapi rejimlerinde tümör cevabının saptanmasına yardımcı olabilmekte, dirençli hücre popülasyonunun tanımlanmasını sağlamaktadır. SCGE tekniği pek çok deneysel şartlarda DNA hasar ve onarımını incelediğinden, son yıllarda genotoksisite ve DNA onarım mekanizmalarının incelemesinde kullanımı artan bir yöntemdir [172, 173]. Yöntem tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen hemen hemen her ökaryot hücrede DNA hasar ve onarımını tespit etmektedir. Oldukça küçük hacimde örneklerle çalışılabilmekte, sonuçlar bir günde elde edilebilmektedir. Yöntem alkali elüsyon gibi diğer uzun DNA analizleri kadar duyarlıdır [174]. Günümüzde komet tekniği insan popülasyonlarından alınan lenfosit örneklerinde oksidatif hasar, UV ve iyonizan radyasyona duyarlıkların incelenmesi yönünden başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Özellikle izleme (human biomonitoring) çalışmalarında, meslekleri nedeniyle veya çevresel ya da kazayla çeşitli kimyasal maddelere maruz kalan kişilerde, DNA hasarının incelemesinde son yıllarda rağbet gören bir tekniktir [172-174]. Komet ölçümü insan çalışmalarında kullanılabilecek en uygun testlerdendir. Çünkü radyoaktif maddelerle işaretleme gibi zararlı işlemleri içermez ve kolaylıkla görünebilir hücrelere uygulanabilir. Normalde sıklıkla kullanılan beyaz kan hücreleridir. Bu hücreler relatif olarak invaziv olmayan yollarla, kolaylıkla ayrılabilir ve metoda iyi uyum sağlar. Ancak kanser için hedef doku olmamaları ve beyaz kan hücrelerindeki hasarın gerçek hedef dokudaki hasarı yeterince yansıtıp yansıtmadığının net olmaması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bazen cerrahi sonrası çıkarılan dokular kullanılabilmekle birlikte sağlıklı kontrol dokusu elde etmek oldukça güçtür. Bukkal ve üreteryal epitel hücreler de denenmiştir ancak bu hücreler yapıları nedeniyle ek proteaz kullanımı ve uzun bir lizis süresi gerektirirler [172].

2.3.3.Uygulama Protokolü

Tekniğin uygulanmasında iki tip jel modeli vardır. Tek tabakalı jel ve sandviç jeller. Daha yaygın olarak kullanılan, sandviç modelidir. Gömülen bu hücreler, lysing solüsyonunda bekletilir. En çok tercih edilen yöntem, en az bir saat süreyle, pH>10- 12'de, deterjanla ve yüksek tuz konsantrasyonunda hücrelerin bekletilmesi şeklindedir. Elektroforezden önce lamalar, alkali elektroforez solüsyonunda DNA sarmalının ayrılması için bekletilir. Bu solüsyon pH>12 ve düşük tuz konsantrasyonunda olmalıdır. Uygulanacak olan elektroforez süresi ve voltajı hücrelerdeki DNA göçünü etkilediği için, her denemede standart seçilen bir tanesi kullanılmalıdır. Elektroforezi takiben lamaların yıkanması için en çok tris tamponu tercih edilir. En son olarak DNA bağlayıcı boyalarla (akridin oranj, etidium bromid, propidyum iyodit, DAPI gibi) floresan renk oluşturulur [175].

Komet oluşum şekillerini değerlendirmek ve tayini yapmak için pek çok farklı çalışmalar yapılmaktadır. Değerlendirme tekniklerinin en basiti hasar derecelerine göre kategorilendirilerek (genelde 4 veya 5 sınıfta) kometleri göz ile ampirik olarak kaydetmektir [171, 176]. Gözle görüntü analizinde göç etmiş hücreler, sıklıkla kuyruk uzunluklarına göre, sınıflandırılarak ayırt edilebilmektedir

Belli bir bölgedeki DNA miktarı, o bölgedeki floresans yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu özellikten yararlanarak dijital görüntü sistemlerinde ve analiz yazılım programlarındaki ilerlemeye paralel olarak daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. Hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk moment gibi çeşitli komet parametreleri ölçülebilmektedir. Bunlar arasında kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu en sık kullanılanlar olmasına rağmen, önerilen ve kullanımı gittikçe artan ölçüm parametresi kuyruk DNA yüzdesidir. Çünkü bu parametre kometlerin görünür kısmıdır ve DNA kırık frekansı ile doğru orantılıdır. Kuyruk momenti; kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranının çarpımı olarak tanımlanmaktadır. Araştırmacı hangi ölçüm parametresini kullanırsa kullansın, parametreler çalışmalarda açıkça not edilmelidir [170, 177]. Gelişmiş laboratuvarlarda ise genellikle ' image analyzer'dan yararlanılmaktadır. Son yıllarda ise ölçümler LSM (Laser-scanning microscopy) teknolojisiyle geliştirilmiştir. Böylece sarmal kırılmalarındaki farklılıklar kolaylıkla belirlenebilmektedir [178].

2.3.4.Komet Tekniğini Etkileyen Faktörler

SCGE tekniğinin farklı uygulanması sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), lysing solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre ve pH), metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle deneylerde şartlar standart tutulmalıdır. Ayrıca insana yönelik çalışmalarda genotoksik etkiyi potansiyelize ettiği tartışılan faktörler SCGE tekniği de etkileyebilir.

2.3.5. Komet Tekniğinin Avantajları

- Az sayıda hücre gerektirir.
- Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
- Kolay uygulanabilir.
- Hassastır.
- Hızlıdır.
- Ekonomiktir.
- Güvenilirdir.
- Çeşitli türlerde DNA hasarlarını tespit edebilir.
- Tek hücre seviyesinde bilgi edinilebilir.
- Endüstriyel toksikoloji, çevresel toksikoloji, genetik toksikoloji, insan biyoizlemleri, DNA onarım ve hasarının temel mekanizması gibi çalışmalarda geni ş olarak kullanılabilmektedir [172, 177].

Yöntem in vivo modellerde herhangi bir dokuya da uyarlanabildiğinden, sadece hızlı proliferasyon olan hücrelerde uygulanabilir olan diğer genotoksisite testlerinden daha üstündür. Aynı zamanda tek bir doku hasarını belirlemek de mümkündür [177].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirildi. TYL-2013-4388 kodlu projemiz, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığının 13/15 nolu kararı ile onaylanmıştır.

3.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışma; etik kurul onayı alınarak Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden (DEKAM) sağlanan ve vücut ağırlığı 400 ± 50 g olan 48 adet Spraque Dawley cinsi erkek sıçanlar ile gerçekleştirildi. Sıçanlar deney süresince sıcaklığı $24 \pm 1^\circ\text{C}$ arasında olan ortamda barındırıldı. Gece gündüz döngüsü otomatik aygıt ile 12 saat gece, 12 saat gündüz olacak şekilde ayarlandı. Çalışma süresince hayvanlara pelet şeklinde standart sıçan yemi ve çeşme suyu verildi. Deney öncesi sıçanların ağırlıkları tartıldı. Sıçanların yarısı Langendorff çalışması için diğer yarısı da Komet tekniği ile DNA hasar değerlendirilmesi için ayrıldı.

3.2. DENEY GRUPLARI

1) İskemi/reperfüzyon Kontrol Grubu (I/R, n=6): Kalp Langendorff sistemine asıldı 30 dakika iskemi 1 saat reperfüzyon yapıldı.

2) İskemi/reperfüzyon + Metformin(I/R_{met}, n=6): Langendorff sistemine asıldı 30 dakika iskemi 1 saat reperfüzyon yapıldı. İskemi- reperfüzyon esnasında metformin verildi.(2 μM metformin krebs solusyonu ile)

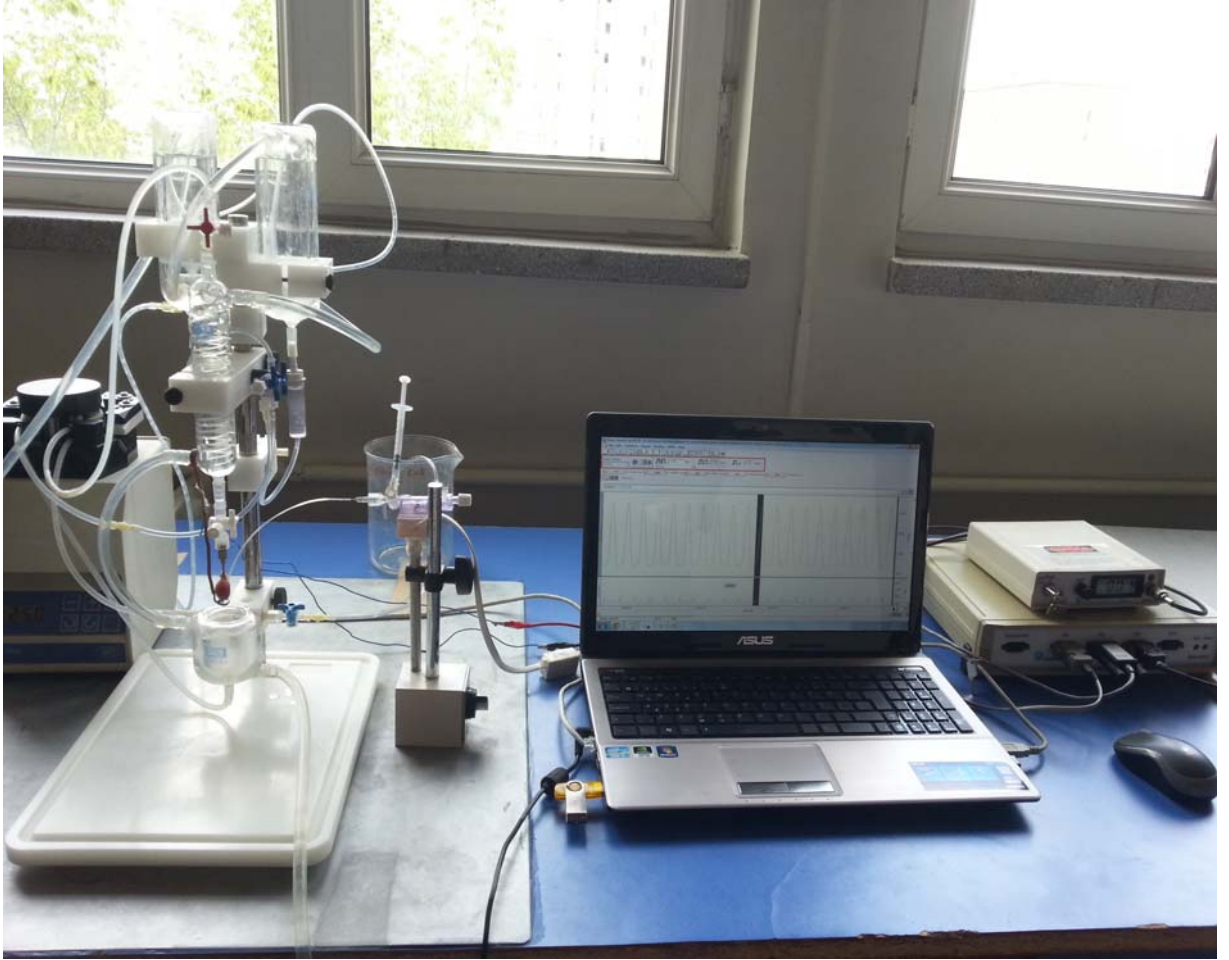
3) İskemi/reperfüzyon + İnsulin (I/R_{ins}, n=6): Kalp Langendorff sistemine asıldı 30 dakika iskemi 1 saat reperfüzyon yapıldı. İskemi- reperfüzyon esnasında insulin verildi. (3mU/ml krebs solusyonu ile)

4) İskemi/reperfüzyon +İnsulin+Metformin (M,I/R_{ins}, n=6): Kalp Langendorff sistemine asıldı 30 dakika iskemi 1 saat reperfüzyon yapıldı. İskemi- reperfüzyon esnasında insulin ve metformin verildi. (3mU/ml ve 2 µM metformin krebs solusyonu ile)

Aynı gruplar ikinci kez oluşturuldu (her grupta 6 hayvan olacak şekilde) langendorff sistemine kalpler asıldı, iskemi reperfüzyon işlemleri aynı şekilde uygulandı fakat ventrikül basınç kayıtları alınmadı. Bu hayvanların kalpleri reperfüzyon sonrası myosit izolasyonunda kullanılıp onlarda komet tekniği ile DNA hasrı tesbit edildi.

3.3. LANGENDORFF DÜZENİĞİ İLE HEMODİNAMİK PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ

Anestezi (sodyum pental intra peritoneal olarak verildi) altındaki sıçanların, sağ sternotomi ile toraksı açıldı ve kalbe herhangi bir mekanik hasar vermeden aortu izole edildi. Vücuttan ayrılan kalp dokusu soğuk perfüzyon solüsyonuna bırakıldı (kalbin atması soğuk perfüzyon solüsyonunda geçici bir süre durur ve perfüzyon için hazır bekletilen kanüle takılmasını kolaylaştırır). Kalp, aorttan Langendorff perfüzyon sistemindeki perfüzyon solusyonunun geldiği kanüle 4/0 ipek ip ile bağlandı ve izole organ banyosu kalbin korunmasını sağlamak için kalbi içine alacak şekilde sabitlendi. Sistem 37°C sabit ısı altında Krebs solüsyonu ile (mmol/L: NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,0; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,2; Glikoz 11,1) perfüze edildi. 8 ml/dk sabit akımla verilen perfüzyat sıvısı aort kapaklarını kapatıp, perfüzyat sıvısının sol ventriküle geçişini engelleyerek ve koroner perfüzyon sağlandı. Daha sonra içi su dolu elastik bir balon kalbin sol ventrikülüne yerleştirildi, 15 dk' lık stabilizasyon süresinden sonra kayıtlar alınmaya başlandı. Balona belirli bir basınç uygulanarak preload (önyük) oluşturuldu (8 mmHg). Oluşan yanıtlar yani sol ventrikül basınç gelişimi (SVDSB), basınç gelişim hızı (kasılma, +dP/dt) ve basınç düşme hızı (gevşeme, -dP/dt) bir analog-dijital sistem (MP 30 Biopac System) ve bir basınç çevirici ile bilgisayara kayıt edildi (Resim 3.1).



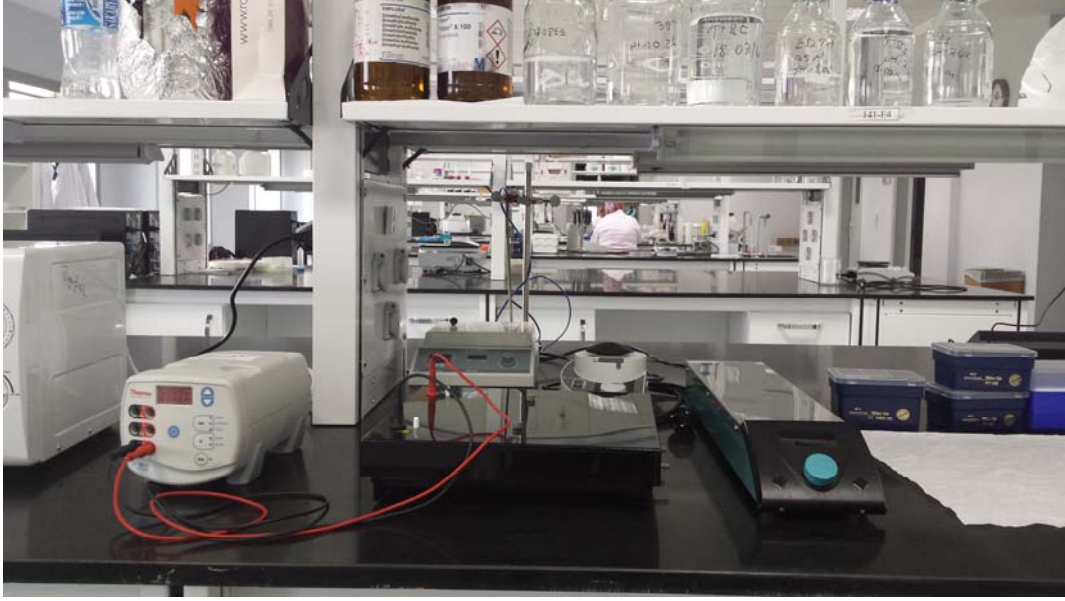
Resim 3.1. Laboratuvarımızdaki Langendorff reperfüzyon sisteminde sol ventrikül fonksiyon değerlendirilmesi

3.4. KARDİYOMİYOSİTLERDE KOMET TEKNİĞİ İLE DNA HASARININ GÖSTERİLMESİ

Dokuda DNA hasarı nötral şartlarda tek hücre jel elektroforez (komet) yöntemi kullanılarak araştırıldı. DNA komet assay ya da tek hücre jel elektroforezi (SCGE) canlı populasyonlarında, hücre düzeyinde DNA hasar tespitinde kullanılan, hızlı, basit ve çok hassas flouresan mikroskopik yöntemdir.

Langendorff sisteminde iskemi reperfüzyon işlemleri yapıldıktan sonra hazırlanmış olan Tyrod solüsyonuna (mmol/L: NaCl 137; KCl 5,4; CaCl₂ 1,8; Glikoz 10; MgCl₂ 0,5; Hepes 10) kollejenaz tip 1 (220IU/mg roche marka) den 40mg ve Proteaz'dan 5 mg konuldu. Perfüzyon hızı 7,5 ml/dk ya ayalandı ve Krebs solüsyonun ardından sistemden kollejenaz içeren solüsyon geçirildi. Kollejenaz sisteme konulduktan sonra atık solüsyon borusunun ucuna kollejenaz gelince hortum temizlenip kollejenazın bulunduğu perfüzyon sıvısı 20 dk boyunca koronerleri besledi. 20 dk sonunda kalp Tyrod solüsyonu bulunan bir petri içine alındı önce apeks kısmı kesilip atıldı geri kalan kısım solüsyon içerisinde mekanik olarak makas kesisinden sonra bir pens yardımıyla hafif ve yavaş bir şekilde sallanarak hücreler döküldü. Bu hücreler fosfat tamponu içerisinde konularak kometin yapılacağı zamana kadar -80 de saklandı.

Her bir mikroskop slaytı distile suda hazırlanmış %0,5'lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, ilk katın üstüne PBS de hazırlanmış, 37 °C 'de % 0,8'lik düşük erime noktalı agarozun 100 µL ile 10 µL elde edilen hücre süspansiyonu karıştırıldı ve birinci katın üzerine yayıldı. Slaytlar 4°C 'de buz aküsünün üzerinde 5 dakika katılaşmaya bırakıldı. Lameller slâytlardan kaldırıldı, taze hazırlanmış soğuk lizis çözeltisinde (TBE, 25 g SDS) 7 dakika 4 °C 'de lizis edildi. Slaytlar lizis çözeltisinden alındı, yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (TBE: 54 g Tris, 27,5 borik asit, 20 mL EDTA, pH 8,4) ile dolduruldu ve slaytlar yerleştirildi, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 64 V-250 mA' de 2 dakika elektoroforez uygulandı. Daha sonra slâytlar iyon ve deterjanların uzaklaştırılması için 5 dakika distile su ile yıkandı. Nötralizasyondan sonra 50 µL ethidiumbromide (1 µg/mL) ile boyandı ve lamelle kapatıldı. Bütün işlemler DNA hasarını önlemek için karanlıkta uygulandı [181, 182]. Görüntüler floresan mikroskop (Olympus, Japan) kullanılarak 200x büyütmeyle çekildi. Rastgele seçilmiş 100 hücre görüntüsü CASP (Comet Assay Software Project -1.2.2, Windows 2010) kullanılarak analiz edildi. Hasar hücre başından göç etmiş, komete neden olan kırılmış DNA kuyruğuna göre belirlendi, kuyruklu hasarlı, kuyruksuz hasar görmemiş olarak düşünüldü [183].CASP kullanılarak DNA hasarı % tail DNA (kuyrukta % DNA) parametresinden hesaplandı, hasar % olarak değerlendirildi (Resim 3.2).



Resim 3.2. Elektroforez sisteminin görünümü

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel hesaplamalar, Excell ve SPSS 16.0 programları kullanılarak yapıldı. İki den çok grup arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde; normal dağılıma uygunluk saptanan koşullarda, tek yönlü ANOVA uygulandı ve ardından post hoc test olarak, Tukey testi kullanıldı. Bağımlı grupların ortalamalarını karşılaştırmak için önce Kruskal Wallis ANOVA ardından ikili karşılaştırma için bağımlı gruplarda t-testi kullanıldı. Değerler $\text{ort.} \pm \text{SD}$ olarak gösterildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

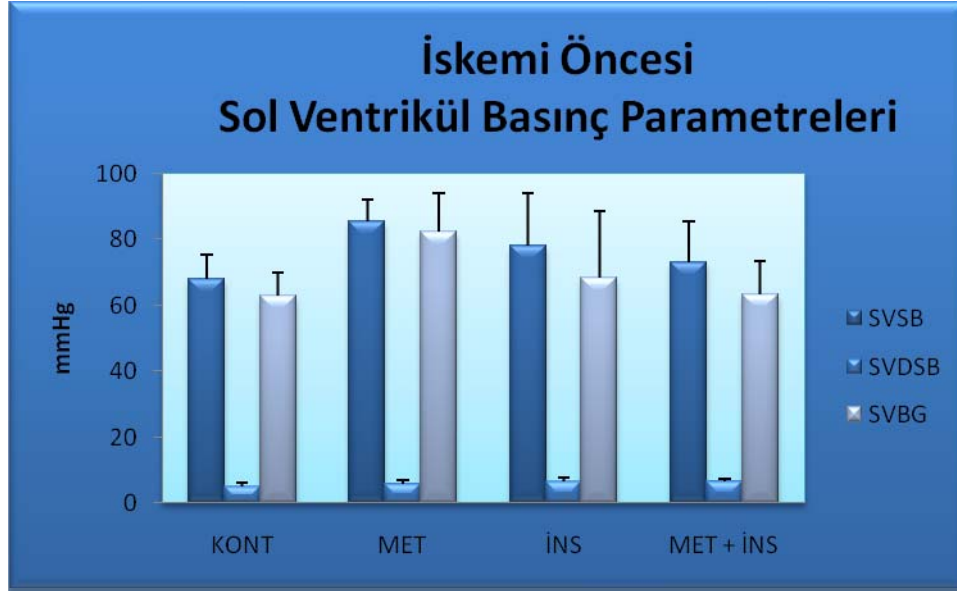
4.1. Sol Ventrikül Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Langendorff sisteminde izole kalp dokusunda global iskemi oluşturmada önce sol ventrikül basınç kayıt değerleri verilmiştir. Sol ventrikül sistolik basıncı, sol ventrikül diyastol sonu basıncı, sol ventrikül basınç gelişimi değerleri gruplar arasında istatistiksel anlamda farklı bulunmamıştır (Tablo 4.1. ile Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. Global iskemi öncesi izole kalpten kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB), sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB), sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG) ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (mmHg).

	KONT (n=6)	MET (n=6)	İNS (n=6)	MET+İNS (n=6)
SVSB	67.78 $\pm$ 7.66	85.30 $\pm$ 6.56	77.89 $\pm$ 16.01	72.93 $\pm$ 12.52
SVDSB	4.99 $\pm$ 1.15	5.89 $\pm$ 1.08	6.36 $\pm$ 1.17	6.63 $\pm$ 0.77
SVBG	62.77 $\pm$ 7.22	82.23 $\pm$ 11.56	68.22 $\pm$ 20.40	63.46 $\pm$ 10.10

KONT: İskemi/reperfüzyon kontrol, MET: Metformin, İns: İnsülin, MET+İNS: Metformin + insülin

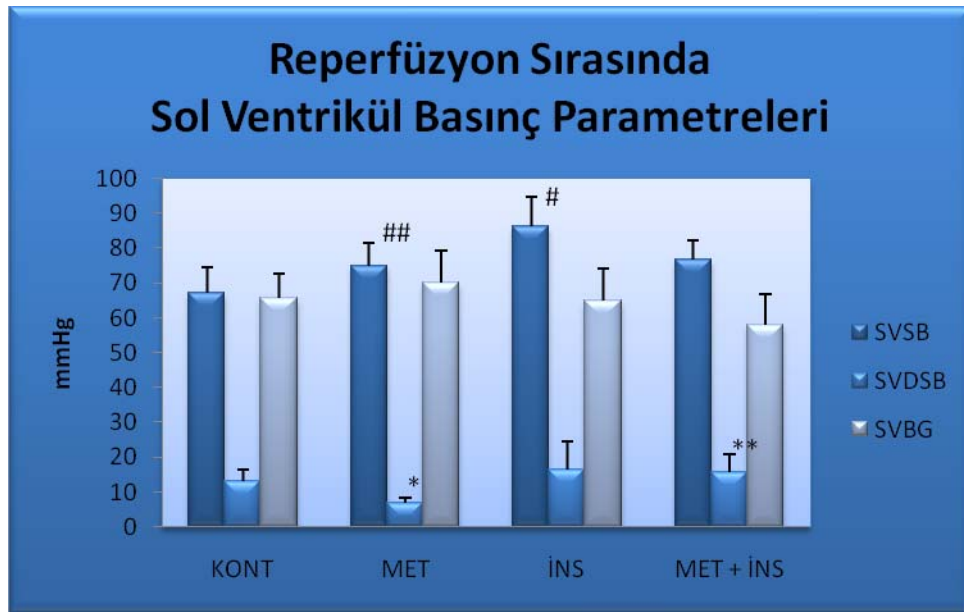


Şekil 4.1. Global iskemi öncesi izole kalpten kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB), sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB), sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG) ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (mmHg).

Langendorff sisteminde izole kalp dokusunda global iskemi sonrası bir saatlik reperfüzyon süresince sol ventrikül basınç kayıt değerleri verilmiştir. Sol ventrikül sistolik basıncı, sol ventrikül diyastol sonu basıncı gruplar arasında istatistiksel anlamda farklılık göstermiştir (Tablo4.2. ile Şekil4.2.). Reperfüzyon esnasında insulin verilen grubun sol ventrikül sistolik basıncı, kontrol ve metformin verilen grupların sol ventrikül sistolik basıncından istatistiksel anlamda yüksek olduğu gösterilmiştir, ($p < 0,017$ metformine göre). Reperfüzyon esnasında bir saat metformin verilen grubun sol ventrikül diyastol sonu basıncı insulin verilen grup ile insulin ile birlikte metforminin verildiği grup ile kıyaslandığında istatistiksel anlamda düşük bulunmuştur. Reperfüzyon esnasında sadece metformin verilen grubun izole kalplerinden kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç gelişim hızı, metformin ile birlikte insulin verilenlere kıyasla istatistiksel anlamda yüksek bulunmuştur (Tablo4.4. ile Şekil4.4.).

Tablo 4.2. Reperfüzyon esnasında izole kalpten kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB), sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB), sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (mmHg).

	KONT (n=6)	MET (n=6)	İNS (n=6)	MET+İNS (n=6)
SVSB	67.14 $\pm$ 7.47	74.73 $\pm$ 6.57##	86.25 $\pm$ 8.40#	76.71 $\pm$ 5.28
SVDSB	13.2 $\pm$ 3.09	6.91 $\pm$ 1.44*	16.51 $\pm$ 7.88	15.55 $\pm$ 5.2**
SVBG	65.66 $\pm$ 6.93	70.18 $\pm$ 8.97	64.74 $\pm$ 9.24	57.82 $\pm$ 9.04



Şekil 4.2. Reperfüzyon esnasında izole kalpten kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB), sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB), sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG) ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (mmHg).

*SVDSB insulin grubuna göre $p < 0,017$

**SVDSB metformin grubuna göre $p < 0,034$

#SVSB kontrol grubuna göre $p < 0,001$

##SVSB insulin grubuna göre $p < 0,046$

Global iskemi öncesi izole kalpten kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç gelişim hızı ile sol ventrikül minimum basınç gelişim hızı değerleri gruplar arasında istatistiksel anlamda farklı bulunmamıştır (Tablo 4.3. ile Şekil 4.3.).

Tablo 4.3. Global iskemi öncesi izole kalpten kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç gelişim hızı (Maks dP/dt) ile sol ventrikül minimum basınç gelişim hızı (Min dP/dt) ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (mmHg).

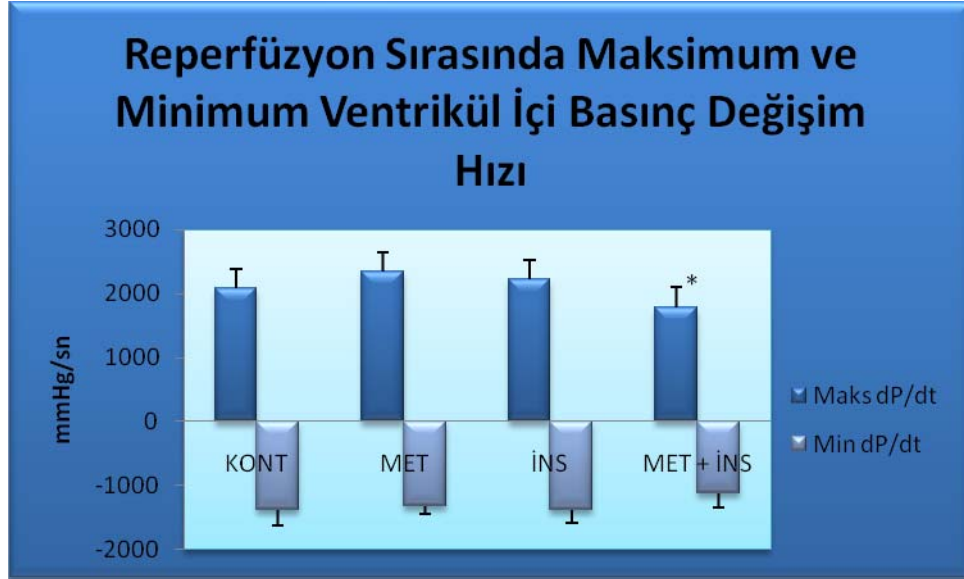
	KONT (n=6)	MET (n=6)	İNS (n=6)	MET + İNS (n=6)
Maks dP/dt	2511 $\pm$ 415	2723 $\pm$ 457	2526 $\pm$ 616	2924 $\pm$ 408
Min dP/dt	-1529 $\pm$ 363	-1534 $\pm$ 159	-1328 $\pm$ 472	-1538 $\pm$ 234



Şekil 4.3. Global iskemi öncesi izole kalpten kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç gelişim hızı (Maks dP/dt) ile sol ventrikül minumum basınç gelişim hızı (Min dP/dt) ortalama değerleri ve standart sapma değerleri(mmHg).

Tablo 4.4. Reperfüzyon esnasında izole kalpten kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç gelişim hızı (Maks dP/dt) ile sol ventrikül minumum basınç gelişim hızı (Min dP/dt) ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (mmHg).

	KONT (n=6)	MET (n=6)	İNS (n=6)	MET+İNS (n=6)
Maks dP/dt	2082±303	2342±297	2220±296	1773±321*
Min dP/dt	-1380±238	-1332±110	-1377±210	-1116±229



Şekil 4.4. Reperfüzyon esnasında izole kalpten kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç gelişim hızı (Maks dP/dt) ile sol ventrikül minumum basınç gelişim hızı (Min dP/dt) ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (mmHg).

*Maks dP/dt metformin grubuna göre $p < 0,020$

4.2. DNA Hasarlarının Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada kalp doku DNA' sında meydana gelen tek ve çift iplik kırılmalarını belirlemek için nötral komet tekniği kullanıldı. Kuyrukta % DNA (tail DNA), parametresi CASP (Comet Assay Software Project) kullanılarak analiz edildi. Hasar hücre başından göç etmiş, komete neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi, kuyruklu hasarlı, kuyruksuz hasar görmemiş olarak düşünüldü [182,184].

DNA hasarı metformin ($p < 0,003$), insulin ($p < 0,02$) ve insulin ile birlikte metformin ($p < 0,005$) verilen 3 grupta da kontrolden daha az bulundu (Tablo 4.5, Şekil 4.6.)

Tablo 4.5. Reperfüzyon esnasında kalp dokusundaki DNA hasarı.

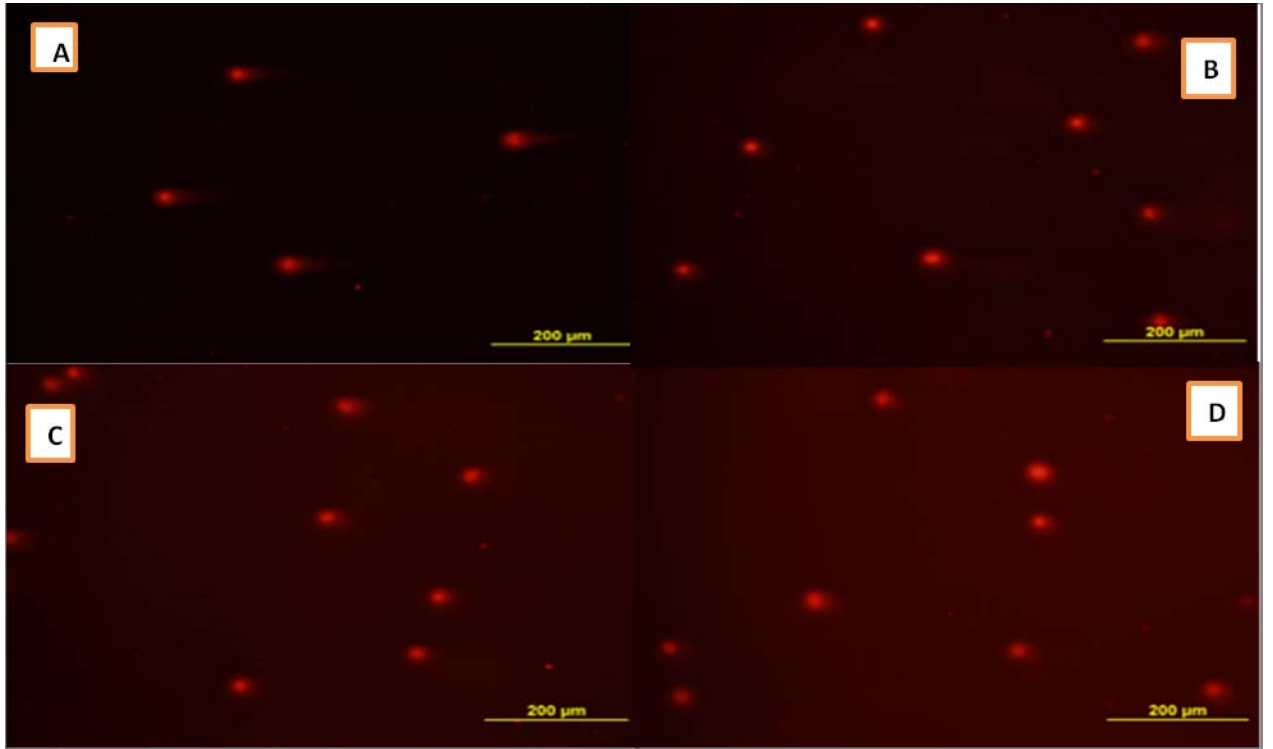
	KONT (n=6)	MET (n=6)	İNS (n=6)	MET+İNS (n=6)
% Tail DNA	15.87±5.91	9.01±3.59*	11.48±5.94**	10.72±4.6***

Tail DNA: Kuyrukta % DNA, $\pm$ standart sapma

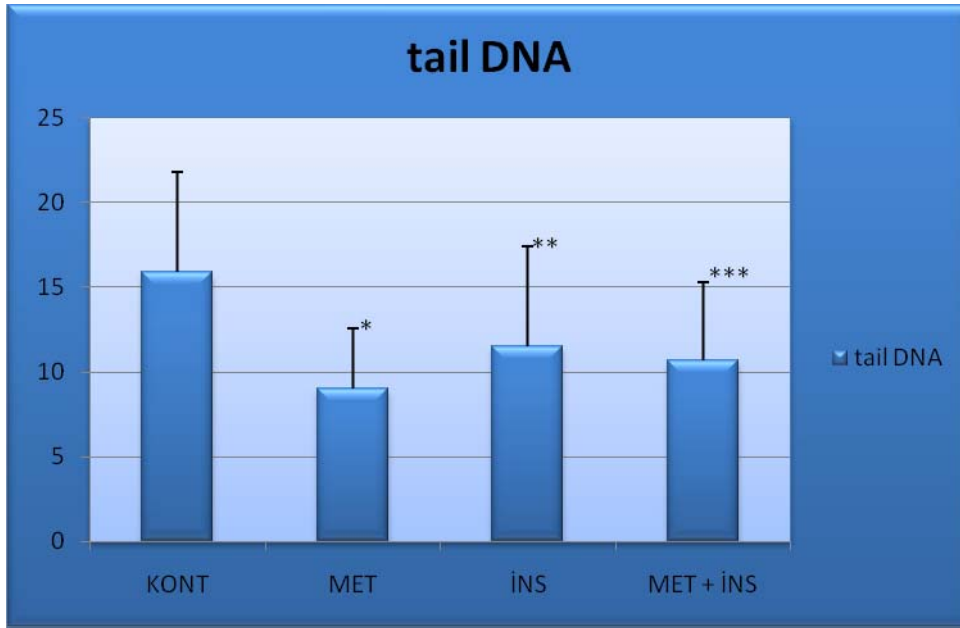
* kontrol grubuna göre $p<0,003$ anlamlı

**kontrol grubuna göre $p<0,02$ anlamlı

***kontrol grubuna göre $p<0,005$ anlamlı



Şekil 4.5. Kalp doku hücreleri, A) Kontrol grubu tail DNA % 16.35, B) MET grubu tail DNA % 10.45 C) İNS grubu tail DNA % 11.48, D) MET +İNS grubu tail DNA % 10.72 (Ethidium bromide boyama x200, Olympus, Japan)



Şekil 4.6. Reperfüzyon esnasında kalp doku hücrelerinde tail DNA % oranları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamız in vitro bir çalışmadır, Langendorff sistemi ile sol ventrikül basınç değerlendirmesi yarım saatlik iskemi öncesi ve bir saatlik reperfüzyon süresince yapılmış ve iskemi öncesi, reperfüzyon süresince diye adlandırılmış, değerlerin ortalaması alınıp istatistiksel olarak anlamlılıkları yorumlanmıştır. İskemi öncesi ventrikül sistolik basınç (SVSB), diyastol sonu basınç (SVDSP), basınç gelişimi (SVBG) ve minimum, maksimum dP/dt değerleri gruplar arası anlamlı fark göstermemiştir ($p<0.05$). Reperfüzyon esnasındaki grupların ventrikül basınç değişim değerleri istatistiksel anlamda karşılaştırıldığında insulin grubunun sistolik ve diyastolik basınçları diğer gruplardan önemli derecede yüksek bulunmuştur. İskemi öncesi ve reperfüzyon esnasındaki metformin verilen grubun diyastol sonu basınç değeri kontrolden de düşük iken basınç gelişimi tüm gruplardan yüksek görünmektedir. İskemi/Reperfüzyon esnasındaki gelişecek doku hasarı, nekroz ya da apoptozu genel değerlendirebileceğimiz DNA hasar değerlendirmesini komet tekniği ile yaptık. Gruplar arası karşılaştırmada metformin, insulin ve ikisinin birlikte verildiği grupların kalp dokularında (sol ventrikül) DNA hasarı, sadece kreps ile perfüze edilen kontrol grubu değerleri ile kıyaslandığında önemli derecede az olduğu belirlenmiştir ve bu farklılık istatistiksel anlamda önemlidir. Bu bulgu in vitro yapılan I/R esnasında ventrikülün insulin ya da metformin ile ya da herikisi ile birlikte muamale edilmesinin I/R esnasında gelişecek hasarı azaltmada etkili olduğunun göstergesidir. Bu etkiyi;

1. Direkt apoptozu aktifleyen yolları aktifleyerek,
2. Enerji eldesinde oksijen radikal oluşumunu artıran ham maddeyi (FFA) kullanma yerine glukoz kullanımını artırarak,
3. Mitokondriyal yapıdaki etkilenmeyi azaltıp ATP yapımını iyileştirerek,
4. Antioksidan savunmayı güçlendirerek yapabilir.

İskemik alanın reperfüzyonu dokuyu iyileştirmekten çok hasarlar, bunun sorumlusu reaktif oksijen türleri olup proteinlerin, lipidlerin, ve DNA'nın oksidatif hasarına neden olur [185, 186].

Reaktif oksijen türleri aynı zamanda hücre sinyal yolağı olarak da görev yapar, ikinci haberci gibi davranır, kardiyak hipertrofi, inflammatör olaylar ve apoptoz etkili olur [187, 188].

Reperfüzyon hasarında kalbi koruyan ve G protein aracılı çalışan reseptörler ile onların aktive ettiği salvage kinaz (RISK) yolağı en iyi bilinenidir. Bu yolak fosfatidylinozitol3-kinaz (PI3K), fosforillenmiş protein kinaz B (AKT), mitojen-aktive protein kinazlar (MAPKs), protein kinaz C (PKC), P70S6 kinaz ve endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS)'ı içerisine almaktadır. Bu yolağın

aktivasyonu mitokondriyal permeabiliteyi transition porların, mitokondriyal KATP kanallarının açılımını inhibe eder **(myokardiyal iskemi ve postiskemik reperfüzyon esnasında bu por ve kanallar açık olduğunda nekroz ve apoptoz ile hücre ölümüne neden olurlar)**. İnsulinin bu RISK yolunu aktive ettiği, reperfüzyon esnasında verildiğinde infarkt alanı azalttığı gösterilmiştir [12, 189, 190].

İnsulin aynı zamanda substrat kullanımını artırma [191], koroner vazodilatasyon yapma [192] ve antiinflamator etkileri [193] ile reperfüzyonda tedavi edicidir.

Metformin diyabetin tedavisinde ilk kullanılan ilaçtır fakat kardiyorenal hastalığı olanlarda kullanımı tartışmalıdır. Eksperimental çalışmalar metforminin kardiyak iskemi reperfüzyon hasarını azalttığını ileri sürmektedir. Metformin tip II diyabetli tedavisinde geniş kullanım alanı olan antihiperlipidemik biguanidin grubu ilaçtır. Aynı zamanda tip II diyabetlilerde ölüme neden olan tüm riskleri, myokardiyal enfarktüsü ve kalp yetmezliğine bağlı ölümleri azaltmaktadır [194-198] .

İlacın antioksidan özelliği de son yıllarda ortaya konulmuştur. Metforminin AMP-aktifli protein kinaz (AMPK) aktivasyonu yolu ile kalp yetmezlikli hayvanlarda ROS oluşumunu azalttığı ve H₂O₂ ya da TNF α 'nın indüklediği oksidatif stresden kardiyomyositleri koruduğu gösterilmiştir [155,199].

Bir grup çalışmacı kardiyomyositler üzerine doksorubisinin yaptığı oksidatif stres ve hücre ölümlerini metforminin azalttığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada DNA hasarını azaltmada hem insulin hem de metformin etkili olmuştur. Birlikte verilmesinin DNA hasarı azaltmada ekstrasdan etkisi oluşmamıştır. Pek çok çalışmada kalp hastalıkları ile AMPK sinyal yolağı işleyişi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Metformin verilmesi de DNA hasarını azaltarak AMPK sinyalizasyonunun iyi çalışmasına buna bağlı apoptoz ve mitokondriyal hasarı azaltma ve enerji üretimini normalleştirmede etkili olabilir ya da insulin ve metforminin herikisi de I/R'un yaptığı radikal oluşumunu azaltma etkili olup buna bağlı DNA hasarını azaltabileceği buna bağlı apoptozda azalma, ya da enerji üretimindeki sinyalizasyon yollarının daha az etkilenmesi ile kalp dokusunu koruduğunu düşünebiliriz.

6. KAYNAKLAR

1. Sodi-Pallares D. et al. *Effects of an intravenous infusion of a potassium-glucose-insulin solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. A preliminary clinical report.* Am J Cardiol, 1962: **9**: 166-81.
2. Opie L.H. *Metabolism of free fatty acids, glucose and catecholamines in acute myocardial infarction: relation to myocardial ischemia and infarct size.* The American journal of cardiology, 1975: **36**(7): 938-953.
3. Fath-Ordoubadi F. and K.J. Beatt *Glucose-insulin-potassium therapy for treatment of acute myocardial infarction: an overview of randomized placebo-controlled trials.* Circulation, 1997: **96**(4): 1152-6.
4. Detry J.M. et al. *Trimetazidine: a new concept in the treatment of angina. Comparison with propranolol in patients with stable angina. Trimetazidine European Multicenter Study Grou* Br J Clin Pharmacol, 1994: **37**(3): 279-88.
5. Stanley A.W. Jr. et al. *Effects of glucose-insulin-potassium on myocardial substrate availability and utilization in stable coronary artery disease. Studies on myocardial carbohydrate, lipid and oxygen arterial-coronary sinus differences in patients with coronary artery disease.* Am J Cardiol, 1975: **36**(7): 929-37.
6. Malmberg K. et al. *Randomized trial of insulin-glucose infusion followed by subcutaneous insulin treatment in diabetic patients with acute myocardial infarction (DIGAMI study): effects on mortality at 1 year.* J Am Coll Cardiol, 1995: **26**(1): 57-65.

7. Ceremuzynski L. et al. *Low-dose glucose-insulin-potassium is ineffective in acute myocardial infarction: results of a randomized multicenter Pol-GIK trial*. Cardiovasc Drugs Ther, 1999: **13**(3): 191-200.
8. Jonassen A.K. et al. *Glucose-insulin-potassium reduces infarct size when administered during reperfusion*. Cardiovasc Drugs Ther, 2000: **14**(6): 615-23.
9. Jonassen A.K. et al. *Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling*. Circ Res, 2001: **89**(12): 1191-8.
10. Yellon D.M. and G.F. Baxter, *Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality?* Heart, 2000: **83**(4): 381-7.
11. Jonassen A.K. et al. *Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism*. J Mol Cell Cardiol, 2000: **32**(5): 757-64.
12. Gao F. et al. *Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation*. Circulation, 2002: **105**(12): 1497-502.
13. Ryu B.R. et al. *Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I*. J Neurobiol, 1999: **39**(4): 536-46.
14. Pamela C. and R. Denise *Lippincotts Illustrated Reviews: Biochemistry*. Champe and Richard A, Harvey JB Lippincott company, PA, 1994: 269-277.
15. Pedersen O. et al. *Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM*. Diabetes, 1990: **39**(7): 865-870.
16. Opie L.H. and G.D. Lopaschuk, *Fuels: aerobic and anaerobic metabolism*. Heart Physiology, From Cell to Circulation, edited by Weinberg RW, Bersin J, Aversa F. Philadelphia, PA: Lippincot Williams & Wilkins, 2004: 306-354.
17. Lopaschuk G.D. C.D. Folmes and W.C. Stanley, *Cardiac energy metabolism in obesity*. Circulation research, 2007: **101**(4): 335-347.
18. Ventura-Clapier R. A. Garnier and V. Veksler, *Energy metabolism in heart failure*. The Journal of physiology, 2004: **555**(1): 1-13.
19. Bertrand L. et al. *Insulin signalling in the heart*. Cardiovasc Res, 2008: **79**(2): 238-48
20. Nakae J. Y. Kido, and D. Accili, *Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors*. Endocrine reviews, 2001: **22**(6): 818-835.
21. Siddle K. et al. *Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors*. Biochemical Society Transactions, 2001: **29**(Pt 4): 513-525.

22. Muniyappa R. et al. *Cardiovascular actions of insulin*. Endocr Rev, 2007: **28**(5): 463-91.
23. Thirone A.C. C. Huang and A. Klip, *Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2006: **17**(2): 72-78.
24. Heineke J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006: **7**(8): 589-600.
25. Wang Y. *Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases*. Circulation, 2007: **116**(12): 1413-23.
26. Hirsch E. C. Costa and E. Ciruolo, *Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling*. Journal of Endocrinology, 2007: **194**(2): 243-256.
27. DEPREZ J. et al. *Partial purification and characterization of a wortmannin-sensitive and insulin-stimulated protein kinase that activates heart 6-phosphofructo-2-kinase*. Biochem. J, 2000: **347**: 305-312.
28. Levine R. et al. *The action of insulin on the distribution of galactose in eviscerated nephrectomized dogs*. Journal of Biological Chemistry, 1949: **179**(2): 985-986.
29. Sano H. et al. *Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation*. Journal of Biological Chemistry, 2003: **278**(17): 14599-14602.
30. Dummler B. and B. Hemmings, *Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease*. Biochemical Society Transactions, 2007: **35**(2): 231-235.
31. Mora A. et al. *Role of the PDK1–PKB–GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart*. FEBS letters, 2005: **579**(17): 3632-3638.
32. Mouton V. et al. *Evaluation of the role of protein kinase Czeta in insulin-induced heart 6-phosphofructo-2-kinase activation*. Cell Signal, 2007: **19**(1): 52-61.
33. Zorzano A. et al. *Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes*. The American journal of cardiology, 1997: **80**(3): 65A-76A.
34. Abel E.D. *Glucose transport in the heart*. Front Biosci, 2004: **9**: 201-15.
35. Slot J.W. et al. *Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991: **88**(17): 7815-9.
36. Watson R.T. and J.E. Pessin *Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation*. Trends in biochemical sciences, 2006: **31**(4): 215-222.
37. He A. et al. *How many signals impinge on GLUT4 activation by insulin? Cellular signalling*, 2007: **19**(1): 1-7.

38. Roach W. et al. *Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1*. Biochem. J, 2007: **403**: 353-358.
39. Chen S. et al. *Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators*. Biochem. J, 2008: **409**: 449-459.
40. Watson R.T. and J.E. Pessin, *GLUT4 translocation: the last 200 nanometers*. Cell Signal, 2007: **19**(11): 2209-17.
41. Chang L. S.H. Chiang and A.R. Saltiel, *TC10alpha is required for insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes*. Endocrinology, 2007: **148**(1): 27-33.
42. Gupte A. and S. Mora *Activation of the Cbl insulin signaling pathway in cardiac muscle; dysregulation in obesity and diabetes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006: **342**(3): 751-7.
43. Chang L. S.H. Chiang and A.R. Saltiel, *Insulin signaling and the regulation of glucose transport*. Mol Med, 2004: **10**(7-12): 65-71.
44. Kovacic S. et al. *Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart*. J Biol Chem, 2003: **278**(41): 39422-7.
45. Wang L. X. Wang and C.G. Proud, *Activation of mRNA translation in rat cardiac myocytes by insulin involves multiple rapamycin-sensitive steps*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000: **278**(4): H1056-68.
46. Beauloye C. et al. *No-flow ischemia inhibits insulin signaling in heart by decreasing intracellular pH*. Circ Res, 2001: **88**(5): 513-9.
47. Lefebvre V. et al. *Signaling pathway involved in the activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by insulin*. J Biol Chem, 1996: **271**(37): 22289-92.
48. Hue L. et al. *Insulin and ischemia stimulate glycolysis by acting on the same targets through different and opposing signaling pathways*. J Mol Cell Cardiol, 2002: **34**(9): 1091-7.
49. Rider M.H. et al. *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis*. Biochem J, 2004: **381**(Pt 3): 561-79.
50. Bertrand L. et al. *Heart 6-phosphofructo-2-kinase activation by insulin results from Ser-466 and Ser-483 phosphorylation and requires 3-phosphoinositide-dependent kinase-1, but not protein kinase B*. J Biol Chem, 1999: **274**(43): 30927-33.
51. Mora A. et al. *Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia*. The EMBO journal, 2003: **22**(18): 4666-4676.

52. Pozuelo Rubio M. et al. *14-3-3s regulate fructose-2,6-bisphosphate levels by binding to PKB-phosphorylated cardiac fructose-2,6-bisphosphate kinase/phosphatase*. EMBO J, 2003: **22**(14): 3514-23.
53. Deprez J. et al. *Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades*. Journal of Biological Chemistry, 1997: **272**(28): 17269-17275.
54. Donthi R.V. et al. *Cardiac expression of kinase-deficient 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase inhibits glycolysis, promotes hypertrophy, impairs myocyte function, and reduces insulin sensitivity*. J Biol Chem, 2004: **279**(46): 48085-90.
55. Coort S.L. et al. *Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: role of sarcolemmal substrate transporters*. Mol Cell Biochem, 2007: **299**(1-2): 5-18.
56. Glatz J.F. et al. *Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart*. Cardiovasc Drugs Ther, 2006: **20**(6): 471-6.
57. Luiken J.J. et al. *Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36*. Diabetes, 2002: **51**(10): 3113-9.
58. Dyck D.J. G. Steinberg and A. Bonen, *Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001: **281**(3): E600-7.
59. Dolinsky V.W. and J.R. Dyck, *Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006: **291**(6): H2557-69.
60. Young L.H. et al. *AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart*. Trends Cardiovasc Med, 2005: **15**(3): 110-8.
61. Tian R. and J.A. Balschi, *Interaction of insulin and AMPK in the ischemic heart: another chapter in the book of metabolic therapy?* Circ Res, 2006: **99**(1): 3-5.
62. Dyck J.R. and G.D. Lopaschuk, *AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally?* J Physiol, 2006: **574**(Pt 1): 95-112.
63. Arad M. C.E. Seidman and J.G. Seidman, *AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease*. Circ Res, 2007: **100**(4): 474-88.
64. Kudo N. et al. *Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia*. Biochim Biophys Acta, 1996: **1301**(1-2): 67-75.
65. Russell R.R. 3rd et al. *Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR*. Am J Physiol, 1999: **277**(2 Pt 2): H643-9.

66. Marsin A.S. et al. *Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia*. Curr Biol, 2000: **10**(20): 1247-55.
67. Krause U. L. Bertrand and L. Hue, *Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes*. Eur J Biochem, 2002: **269**(15): 3751-9.
68. Horman S. et al. *Myocardial ischemia and increased heart work modulate the phosphorylation state of eukaryotic elongation factor-2*. J Biol Chem, 2003: **278**(43): 41970-6.
69. Horman S. et al. *Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis*. Curr Biol, 2002: **12**(16): 1419-23.
70. Beauloye C. et al. *Insulin antagonizes AMP-activated protein kinase activation by ischemia or anoxia in rat hearts, without affecting total adenine nucleotides*. FEBS Lett, 2001: **505**(3): 348-52.
71. Gamble J. and G.D. Lopaschuk, *Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation*. Metabolism, 1997: **46**(11): 1270-4.
72. Horman S. et al. *Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491*. J Biol Chem, 2006: **281**(9): 5335-40.
73. Soltys C.L. S. Kovacic and J.R. Dyck, *Activation of cardiac AMP-activated protein kinase by LKB1 expression or chemical hypoxia is blunted by increased Akt activity*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006: **290**(6): H2472-9.
74. Diaz R. et al. *Metabolic modulation of acute myocardial infarction. The ECLA (Estudios Cardiológicos Latinoamerica) Collaborative Group*. Circulation, 1998: **98**(21): 2227-34.
75. Schipke J.D. R. Friebe and E. Gams *Forty years of glucose-insulin-potassium (GIK) in cardiac surgery: a review of randomized, controlled trials*. Eur J Cardiothorac Surg, 2006: **29**(4): 479-85.
76. Hausenloy D.J. and D.M. Yellon *Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection*. Heart Fail Rev, 2007: **12**(3-4): 217-34.
77. Apstein C.S. *The benefits of glucose-insulin-potassium for acute myocardial infarction (and some concerns)*. J Am Coll Cardiol, 2003: **42**(5): 792-5.
78. Hausenloy D.J. and D.M. Yellon, *Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning*. Cardiovasc Res, 2006: **70**(2): 240-53.

79. Hausenloy D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. Cardiovasc Res, 2004: **61**(3): 448-60.
80. Ren J. W.K. Samson and J.R. Sowers, *Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease*. J Mol Cell Cardiol, 1999: **31**(11): 2049-61.
81. Opgaard O.S. and H. Wang, *IGF-I is a matter of heart*. Growth hormone & IGF research, 2005: **15**(2): 89-94.
82. Apstein C.S. and L.H. Opie, *A challenge to the metabolic approach to myocardial ischaemia*. Eur Heart J, 2005: **26**(10): 956-9.
83. Poornima I.G. Parikh and R. Shannon, *Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis*. Circ Res, 2006: **98**(5): 596-605.
84. Hundal H.S. et al. *Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells*. Endocrinology, 1992: **131**(3): 1165-73.
85. Klip A. et al. *Stimulation of hexose transport by metformin in L6 muscle cells in culture*. Endocrinology, 1992: **130**(5): 2535-44.
86. Nestler J.E. et al. *Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome*. N Engl J Med, 1998: **338**(26): 1876-80.
87. Wiernsperger N.F. and C.J. Bailey, *The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms*. Drugs, 1999: **58 Suppl 1**: 31-9; discussion 75-82.
88. Hardie D.G. *AMP-activated protein kinase as a drug target*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007: **47**: 185-210.
89. Diamanti-Kandarakis E. et al. *Therapeutic effects of metformin on insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome*. Eur J Endocrinol, 1998: **138**(3): 269-74.
90. Scarpello J.H. *Improving survival with metformin: the evidence base today*. Diabetes Metab, 2003: **29**(4 Pt 2): 6S36-43.
91. Anisimov V.N. *Insulin/IGF-1 signaling pathway driving aging and cancer as a target for pharmacological intervention*. Exp Gerontol, 2003: **38**(10): 1041-9.
92. Ingram D.K. et al. *Development of calorie restriction mimetics as a longevity strategy*. Ann N Y Acad Sci, 2004: **1019**: 412-23.
93. Ingram D.K. et al. *Calorie restriction mimetics: an emerging research field*. Aging Cell, 2006: **5**(2): 97-108.

94. Campbell I.W. *Metformin—life begins at 50 A symposium held on the occasion of the 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Amsterdam, The Netherlands, September 2007*. The British Journal of Diabetes & Vascular Disease, 2007: **7**(5): 247-252.
95. Witters L.A. *The blooming of the French lilac*. J Clin Invest, 2001: **108**(8): 1105-7.
96. Bailey C. and C. Day, *Metformin: its botanical background*. Practical Diabetes International, 2004: **21**(3): 115-117.
97. Sterne J.D. *Nouveau dans les antidiabétiques. La NN diméthylamino guanyl guanidine (NNDG)*. Maroc Med, 1957: **36**: 1295-6.
98. Khouri H. et al. *Radical-induced oxidation of metformin*. Eur J Biochem, 2004: **271**(23-24): 4745-52.
99. Werner E.A. and J. Bell CCXIV.—*The preparation of methylguanidine, and of 88-dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1922: **121**: 1790-1794.
100. Tucker G. et al. *Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus*. British journal of clinical pharmacology, 1981: **12**(2): 235-246.
101. Zhou M. L. Xia and J. Wang, *Metformin transport by a newly cloned proton-stimulated organic cation transporter (plasma membrane monoamine transporter) expressed in human intestine*. Drug Metabolism and Disposition, 2007: **35**(10): 1956-1962.
102. Choi M.-K. and I.-S. Song *Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences*. Drug metabolism and pharmacokinetics, 2008: **23**(4): 243-253.
103. Hilgendorf C. et al. *Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines*. Drug Metabolism and Disposition, 2007: **35**(8): 1333-1340.
104. Graham G.G. et al. *Clinical pharmacokinetics of metformin*. Clinical pharmacokinetics, 2011: **50**(2): 81-98.
105. Pentikäinen Neuvoenen and A. Penttilä, *Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man*. European journal of clinical pharmacology, 1979: **16**(3): 195-202.
106. Timmins et al. *Steady-state pharmacokinetics of a novel extended-release metformin formulation*. Clinical pharmacokinetics, 2005: **44**(7): 721-729.
107. Beckmann R. *Absorption, distribution in the organism and elimination of metformin*. Diabetologia, 1969: **5**(5): 318-324.

108. Kirpichnikov D. S.I. McFarlane and J.R. Sowers, *Metformin: an update*. Annals of internal medicine, 2002: **137**(1): 25-33.
109. Musi N. et al. *Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes*. Diabetes, 2002: **51**(7): 2074-2081.
110. Foretz M. et al. *Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state*. The Journal of clinical investigation, 2010: **120**(7): 2355-2369.
111. Hardie D.G. and R.W. MacKintosh, *AMP-activated protein kinase--an archetypal protein kinase cascade?* Bioessays, 1992: **14**(10): 699-704.
112. Long Y.C. and J.R. Zierath, *AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation*. The Journal of clinical investigation, 2006: **116**(7): 1776-1783.
113. Towler M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circulation research, 2007: **100**(3): 328-341.
114. Kemp B. et al. *AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator*. Biochemical Society Transactions, 2003: **31**(Pt 1): 162-168.
115. Carlson C.A. and K.H. Kim, *Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation*. J Biol Chem, 1973: **248**(1): 378-80.
116. Beg Z.H. D.W. Allmann and D.M. Gibson, *Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol*. Biochem Biophys Res Commun, 1973: **54**(4): 1362-9.
117. Carling D. V.A. Zammit and D.G. Hardie, *A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis*. FEBS Lett, 1987: **223**(2): 217-22.
118. Hardie D.G. *AMP-activated protein kinase as a drug target*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2007: **47**: 185-210.
119. Stapleton D. et al. *Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily*. J Biol Chem, 1996: **271**(2): 611-4.
120. Hawley S.A. et al. *Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1996: **271**(44): 27879-87.
121. Polekhina G. et al. *AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen*. Curr Biol, 2003: **13**(10): 867-71.
122. Woods A. et al. *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. Curr Biol, 2003: **13**(22): 2004-8.

123. Hawley S.A. et al. *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade.* J Biol, 2003: **2**(4): 28.
124. Lizcano J.M. et al. *LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1.* The EMBO journal, 2004: **23**(4): 833-843.
125. Hurley R.L. et al. *The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases.* J Biol Chem, 2005: **280**(32): 29060-6.
126. Witters L.A. B.E. Kemp and A.R. Means, *Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK.* Trends in biochemical sciences, 2006: **31**(1): 13-16.
127. Kyriakis J.M. *of Biology.* Journal of biology, 2003: **2**: 26.
128. Hardie D.G. *AMP-activated protein kinase: the guardian of cardiac energy status.* Journal of Clinical Investigation, 2004: **114**(4): 465-468.
129. Owen M. E. DORAN and A. Halestrap, *Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain.* Biochem. J, 2000: **348**: 607-614.
130. Ebert B.L. J.D. Firth and J. Ratcliffe, *Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences.* J Biol Chem, 1995: **270**(49): 29083-9.
131. El-Mir M.Y. et al. *Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I.* J Biol Chem, 2000: **275**(1): 223-8.
132. Holmes B.F. E. Kurth-Kraczek and W. Winder, *Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle.* Journal of Applied Physiology, 1999: **87**(5): 1990-1995.
133. Shimomura I. et al. *Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice.* Mol Cell, 2000: **6**(1): 77-86.
134. King H. R.E. Aubert and W.H. Herman, *Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections.* Diabetes Care, 1998: **21**(9): 1414-31.
135. Consultation W. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.* Vol. 1. 1999: Part.
136. Weyer C. et al. *The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.* Journal of Clinical Investigation, 1999: **104**(6): 787-794.

137. Diamanti-Kandarakis E. et al. *Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome*. Eur J Endocrinol, 2010: **162**(2): 193-212.
138. He L. et al. *Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein*. Cell, 2009: **137**(4): 635-46.
139. Leclerc I. and G.A. Rutter, *AMP-activated protein kinase: a new beta-cell glucose sensor?: Regulation by amino acids and calcium ions*. Diabetes, 2004: **53 Suppl 3**: S67-74.
140. Widen E.I. J.G. Eriksson and L.C. Groop, *Metformin normalizes nonoxidative glucose metabolism in insulin-resistant normoglycemic first-degree relatives of patients with NIDDM*. Diabetes, 1992: **41**(3): 354-8.
141. Hundal R.S. et al. *Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes*. Diabetes, 2000: **49**(12): 2063-9.
142. Zhou G. et al. *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J Clin Invest, 2001: **108**(8): 1167-74.
143. Nathan D.M. et al. *Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes*. Diabetologia, 2009: **52**(1): 17-30.
144. Ito H. et al. *Long-term effect of metformin on blood glucose control in non-obese patients with type 2 diabetes mellitus*. Nutr Metab (Lond), 2010: **7**: 83.
145. Kudo N. et al. *High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase*. J Biol Chem, 1995: **270**(29): 17513-20.
146. Russell R.R. 3rd et al. *AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury*. J Clin Invest, 2004: **114**(4): 495-503.
147. Ning X.H. et al. *Signaling and expression for mitochondrial membrane proteins during left ventricular remodeling and contractile failure after myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2000: **36**(1): 282-7.
148. Li C. and J.F. Keaney Jr, *AMP-activated protein kinase: a stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease*. Current opinion in pharmacology, 2010: **10**(2): 111-115.

149. Morrow V.A. et al. *Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells*. J Biol Chem, 2003; **278**(34): 31629-39.
150. Jager S. et al. *AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007; **104**(29): 12017-22.
151. Fontbonne A. et al. *The effect of metformin on the metabolic abnormalities associated with upper-body fat distribution*. BIGPRO Study Group Diabetes Care, 1996; **19**(9): 920-6.
152. Charles M.A. et al. *Effect of weight change and metformin on fibrinolysis and the von Willebrand factor in obese nondiabetic subjects: the BIGPRO1 Study*. Biguanides and the Prevention of the Risk of Obesity. Diabetes Care, 1998; **21**(11): 1967-72.
153. Charles M.A. et al. *Treatment with metformin of non-diabetic men with hypertension, hypertriglyceridaemia and central fat distribution: the BIGPRO 1.2 trial*. Diabetes Metab Res Rev, 2000; **16**(1): 2-7.
154. Fontbonne A. et al. *Effects of 1-year treatment with metformin on metabolic and cardiovascular risk factors in non-diabetic upper-body obese subjects with mild glucose anomalies: a post-hoc analysis of the BIGPRO1 trial*. Diabetes Metab, 2009; **35**(5): 385-91.
155. Gundewar S. et al. *Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure*. Circ Res, 2009; **104**(3): 403-11.
156. Solskov L. et al. *Metformin induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury in the rat heart 24 hours after administration*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008; **103**(1): 82-7.
157. Xiao H. et al. *Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGFbeta1-Smad3 signalling pathway*. Cardiovasc Res, 2010; **87**(3): 504-13.
158. Caballero A.E. *Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease*. Obes Res, 2003; **11**(11): 1278-89.
159. Quyyumi A.A. *Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease*. Am J Med, 1998; **105**(1A): 32S-39S.
160. Potenza M.A. F. Addabbo and M. Montagnani, *Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009; **297**(3): E568-77.
161. Michell B.J. et al. *Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase*. Journal of Biological Chemistry, 2001; **276**(21): 17625-17628.

162. Verma S. et al. *Metformin treatment corrects vascular insulin resistance in hypertension*. J Hypertens, 2000: **18**(10): 1445-50.
163. Dominguez L.J. et al. *Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle*. Endocrinology, 1996: **137**(1): 113-21.
164. Agard C. et al. *Protective role of the antidiabetic drug metformin against chronic experimental pulmonary hypertension*. Br J Pharmacol, 2009: **158**(5): 1285-94.
165. Ouslimani N. et al. *Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells*. Metabolism, 2005: **54**(6): 829-34.
166. Nagata D. et al. *AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation*. Circulation, 2004: **110**(4): 444-51.
167. Isoda K. et al. *Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006: **26**(3): 611-7.
168. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome*. European journal of endocrinology, 2010. **162**(2): 193-212.
169. Ostling O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1984: **123**(1): 291-8.
170. Singh N.P. et al. *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res, 1988: **175**(1): 184-91.
171. Tice R.R. P.W. Andrews and N.P. Singh, *The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair*. Basic Life Sci, 1990: **53**: 291-301.
172. Tice R.R. et al. *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. Environ Mol Mutagen, 2000: **35**(3): 206-21.
173. Olive P.L. J.P. Banath and R.E. Durand, *Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay*. Radiat Res, 1990: **122**(1): 86-94.
174. Collins A. et al. *Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications*. Environ Mol Mutagen, 1997: **30**(2): 139-46.
175. Lee R.F. and S. Steinert, *Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2003: **544**(1): 43-64.

176. Faust F. et al. *The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2004: **566**(3): 209-229.
177. Fairbairn D.W. P.L. Olive and K.L. O'Neill, *The comet assay: a comprehensive review*. Mutat Res, 1995: **339**(1): 37-59.
178. Anderson D. et al. *The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1994: **307**(1): 261-271.
179. Hartmann A. et al. *Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop*. Mutagenesis, 2003: **18**(1): 45-51.
180. O'Neill K.L. D.W. Fairbairn and M.D. Standing, *Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy*. Mutat Res, 1993: **319**(2): 129-34.
181. Türk Standardı. Gıda maddeleri-ışınlanmış gıda maddelerinin belirlenmesi için DNA comet deneyi-eleme yöntemi.TS EN 13784 Aralık 2004:
182. Haines G. et al. *DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay*, in *Reproductive Toxicology*. 1998: Springer. 79-93.
183. Singh N. and R.E. Stephens, *X-ray induced DNA double-strand breaks in human sperm*. Mutagenesis, 1998: **13**(1): 75-9.
184. Sariozkan S. et al. *The effects of different sugars on motility morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4 degrees C*. Cryobiology 2012: **65**(2): 93-7.
185. Zweier J.L. et al. *Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart*. J Biol Chem, 1989: **264**(32) 18890-5.
186. Boyle A.J. S.P. Schulman and J.M. Hare, *Stem Cell Therapy for Cardiac Repair Ready for the Next Step*. Circulation, 2006: **114**(4) 339-352.
187. Hensley K. et al. *Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury*. Free Radical Biology and Medicine, 2000: **28**(10) 1456-1462.
188. Giordano F.J. *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005: **115**(3) 500-8.
189. Jonassen A.K. et al. *Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling*. Circulation research, 2001: **89**(12) 1191-1198.

190. Jonassen A.K. et al. *Glucose-insulin-potassium reduces infarct size when administered during reperfusion*. Cardiovascular drugs and therapy, 2000: **14**(6) 615-623.
191. Brownsey R.W. A.N. Boone and M.F. Allard, *Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms*. Cardiovasc Res, 1997: **34**(1) 3-24.
192. Sundell J. et al. *Dose-dependent vasodilating effects of insulin on adenosine-stimulated myocardial blood flow*. Diabetes, 2002: **51**(4) 1125-30.
193. Hansen T.K. et al. *Intensive insulin therapy exerts antiinflammatory effects in critically ill patients and counteracts the adverse effect of low mannose-binding lectin levels*. J Clin Endocrinol Metab, 2003: **88**(3) 1082-8.
194. Gundewar S. et al. *Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure*. Circulation research, 2009: **104**(3) 403-411.
195. Kirpichnikov D. S.I. McFarlane and J.R. Sowers, *Metformin: an update*. Ann Intern Med, 2002: **137**(1) 25-33.
196. *Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)*. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998: **352**(9131): 854-65.
197. Eurich D.T. et al. *Improved clinical outcomes associated with metformin in patients with diabetes and heart failure*. Diabetes Care, 2005: **28**(10) 2345-51.
198. Romero S.P. et al. *Metformin therapy and prognosis of patients with heart failure and new-onset diabetes mellitus. A propensity-matched study in the community*. Int J Cardiol, 2013: **166**(2) 404-12.
199. Sasaki H. et al. *Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase*. Circulation, 2009: **119**(19) 2568-77.