

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**METFORMİNİN ÇEŞİTLİ DOZLARININ PENİSİLİN İLE  
İNDÜKLENEN SEKONDER SIÇAN KORTİKAL  
ASTROSİTLERİNDE MAPKİNAZLAR VE APOPİTOZ  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. HÜLYA ÖZDEMİR**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. MEHMET BÜLENT ÖZDEMİR**

**DENİZLİ – 2020**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**METFORMİNİN ÇEŞİTLİ DOZLARININ PENİSİLİN İLE  
İNDÜKLENEN SEKONDER SIÇAN KORTİKAL  
ASTROSİTLERİNDE MAPKİNAZLAR VE APOPİTOZ  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. HÜLYA ÖZDEMİR**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. MEHMET BÜLENT ÖZDEMİR**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 08.10.2019 tarih ve  
2019TIPF018 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ – 2020**

**Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR danışmanlığında, Dr. Hülya ÖZDEMİR tarafından yapılan “Metforminin Çeşitli Dozlarının Penisilin ile İndüklenen Sekonder Sıçan Kortikal Astrositlerinde MAPKinazlar ve Apoptoz Üzerine Etkisi” başlıklı tez çalışması ..../...../..... tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Anatomi Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.**

**BAŞKAN: Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR**

**ÜYE: Doç. Dr. Şakiha Pınar AKYER**

**ÜYE: Prof. Dr. Nurettin OĞUZ**

**Yukarıda imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.**

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

**Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı**

## TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'ndaki eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime katkı sağlayan ve tezimin hazırlanması sürecinde değerli katkılarıyla ve emekleriyle yardımını esirgemeyen ve beni yönlendiren kıymetli hocam, tez danışmanım Anatomi Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana sağladıkları katkılarından dolayı Anatomi Anabilim Dalı'ndan değerli hocalarım Prof. Dr. Esat Adıgüzel'e, Doç. Dr. Şahika Pınar AKYER'e, Doç. Dr. Barış Özgür DÖNMEZ'e ve Dr. Öğr. Üyesi Şule ONUR'a,

Asistanlığımın başlangıcından bugüne kadar beraber çalışmış olduğum tüm asistan arkadaşlarım ve anabilim dalı çalışanlarımıza,

Hayatım boyunca yanımda olduklarını hissettiğim annem, babam ve kardeşlerime,

Her anımda desteğini esirgemeyen hayat arkadaşım canım eşime ve enerji kaynağım olan kızım ve oğluma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	IX
ÖZET .....	X
İNGİLİZCE ÖZET .....	XI
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	1
ASTROSİT .....	1
PENİSİLİN .....	3
METFORMİN.....	3
GEREÇ VE YÖNTEM .....	6
BULGULAR .....	9
TARTIŞMA .....	14
SONUÇLAR .....	23
KAYNAKLAR .....	24

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACC: Asetil KoA karboksilaz

AD: Alzheimer Hastalığı

AMP: Adenozin monofosfat

AMPK: AMP-ile aktive edilmiş protein kinaz

APPc99: Amiloid öncü proteini c99

ATP: Adenozin trifosfat

BDNF/P70S6K: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör/ P70S6 kinaz

CA1: Cornu Ammonis area 1(Hipotalamus alanı 1)

Ca<sup>2+</sup>: Kalsiyum iyonu

CO<sub>2</sub>: Karbondioksit

Covid-19: Koronavirüs 19

DA: Dopamin

DMSO: Dimetil sulfoksit

EEG: Elektro Ensefalografi

FBS: Fetal sığır serumu

FDA: The Food and Drug Administration (ABD Gıda ve İlaç İdaresi)

GABA: Gama amino bütirik asit

GADD153: DNA hasarı ile indüklenebilir gen 153

GluR1: İyonotropik glutamat reseptör 1

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein

HIV: İnsan immünyetmezlik virüsü

IU: İnternasyonal Ünite

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

LID: L-DOPA kaynaklı diskinezi

L-DOPA: 3,4-dihidroksifenil-l-alanin

MAP Kinaz: Mitojen aktif protein kinaz

MaTLE: Kitle temporal lob epilepsisi

MET: Metformin

mg: Miligram

ml: mililitre

mM: Mili mol  
mRNA : Mesajcı ribonükleik asit  
MTLE: Orta temporal lob epilepsisi  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid  
NFkB: Nükleer faktör kappa B  
Nm: Nano molar  
OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon  
p38 MAPK: p38 mitojenle aktifleştirilen protein kinaz  
PARP: Poli Adenozin Difosfat riboz polimeraz  
PBS: Fosfat tamponlu tuzlu su  
PCOS: Polikistik Over Sendromu  
PD: Parkinson hastalığı  
PEN: Penisilin  
pTau: Tau proteini  
PTLE: Paradoksial temporal lob epilepsisi  
RPMI-1640 besi yeri: Roswell Park Memorial Institute (*RPMI*) 1640 besi yeri  
SARS-CoV-2: Şiddetli akut solunum yolu sendromu Coronavirüs 2  
SEM: Taramalı elektron mikroskobu  
µl: Mikrolitre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1:** Penisilinsiz ortamda, farklı dozlardaki Metformin'in hücre canlılığına etkisi

**Şekil 2:** 2500  $\mu$ M (500 IU) ve 1000 IU Penisilin'in astrosit hücre hattında hücre canlılığına etkisi

**Şekil 3:** Penisilin'in indüklediği astrosit hücreleri üzerindeki dejeneratif etkisine Metformin'in koruyucu etkisi



## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 1:** Sadece 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM Metformin içeren, Penisilin içermeyen gruplarda, kontrol grubuna göre en iyi hücre canlılığı

**Tablo 2:** 2500 µM (500 IU) ve 1000 IU Penisilin'in astrosit hücre hattında hücre canlılığı

**Tablo 3:** Penisilin'in indüklemesi ile astrosit hücreleri üzerinde oluşan dejenerasyona Metformin'in etkisi

## ÖZET

Astrositler beyin ve omurilikte; Kan-beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerinin biyokimyasal desteğinin ve sinir dokusuna besin maddelerinin sağlanması, hücre dışı iyon dengesinin korunması ve travmatik yaralanmaların ardından beyin ve omuriliğin onarım ve skarlaşma süreci gibi birçok işlevi yerine getirirler. Ayrıca astrositler, glutamat, ATP ve gama aminobutirik asit (GABA) başta olmak üzere çeşitli nörotransmitterler için plazma membran taşıyıcılarını eksprese eder. Astrositler veziküler  $Ca^{2+}$  'ya bağımlı bir şekilde glutamat salgırlar. Glutamat eksitotoksitesisi nöronal stres ile ilişkilidir. Genellikle epilepsi sebebi hippocampus'taki sklerotik alanlar olarak bilinir. Aslında astrositler sklerotik dokuda glutamat salınımını başlatırlar. Glutamat çevredeki nöronları uyarır ve nöbet aktivitesi gerçekleşir. Deneysel epilepside penisilin bu nöronal stresi başlatıp, epilepsi modelinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılır. Epileptik nöbetler sonrasında hippocampal atrofi, nöronal hücre kaybı ve astrosit hücre proliferasyonu gösterilmiştir. Buna karşın önceki çalışmalar, metformin'in uygun konsantrasyonlarda nöron hücrelerini koruyabildiğini göstermiştir. Bu çalışmanın amacı, nörodejeneratif hastalıklarda etkisi kanıtlanan metformin'in, penisilin tarafından indüklenen sekonder astrosit hücre hattı üzerindeki astrosit dejenerasyonu üzerindeki protektif etkisini göstermektir. Bu çalışmanın metformin'in penisilin neden olduğu astrosit ölümüne etkisi ile ilgili ilk çalışmalardan biri olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla, daha önce yeni doğan sıçan beyninden elde edilmiş sekonder astrosit hücre kültürü kullanıldı. Hücre hattına penisilin içermeyen ve 500-1000 IU penisilin içeren ortamlarda farklı metformin konsantrasyonları (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM) uygulandı. Penisilin astrosit hücrelerinin canlılığını ciddi şekilde azalttı. En yüksek hücre canlılığı, 0.5 ve 1 mM metformin olan ancak penisilin içermeyen ortamda ortaya çıktı. Bununla birlikte, penisilin içeren ortamda en iyi hücre sağ kalımı, 1 mM metformin içeren ortamdaydı. Metformin'in penisilin sekonder astrosit hücre hattına yol açtığı hasar üzerinde koruyucu etkiler gösterdiği sonucuna vardık. Hücrenin hayatta kalması, metformin konsantrasyonlarına kuvvetle bağlı idi. Bu çalışmanın sonuçları metformin'in antiepileptik olarak kullanılabilmesi konusunda başlangıç çalışması olarak literatüre katkı verecektir.

**Anahtar kelimeler:** astrosit, penisilin, insülin, glukoz, sıçan, hücre kültürü

## ABSTRACT

Astrocytes in the brain and spinal cord; they perform many functions such as the biochemical support of endothelial cells that make up the blood-brain barrier and the supply of nutrients to the nerve tissue, preservation of extracellular ion balance, and the process of repair and scarring of the brain and spinal cord after traumatic injuries. Astrocytes also express plasma membrane carriers, for various neurotransmitters, including glutamate, ATP and gamma aminobutyric acid (GABA). Astrocytes secrete glutamate dependent on the vesicular  $\text{Ca}^{2+}$ . Glutamate excitotoxicity is associated with neuronal stress. Often sclerotic areas in the hippocampus are known as the cause of epilepsy. In reality, astrocytes initiate glutamate release in sclerotic tissue. Glutamate excites neurons in the environment and seizure activity occurs. In experimental epilepsy, penicillin is widely used to initiate this neuronal stress and establish the epilepsy model. Hippocampal atrophy, neuronal cell loss and astrocyte cell proliferation have been demonstrated after epileptic seizures. In contrast, previous studies have shown that metformin can protect neuronal cells at appropriate concentrations. The aim of this study is to demonstrate the protective effect of metformin, which has been proven to be effective in neurodegenerative diseases, on penicillin-induced astrocyte degeneration on the primary astrocyte cell line. This study is thought as the first study about the effect of metformin on penicillin-induced astrocyte death. For this purpose, secondary astrocyte cell culture which previously obtained from the newborn rat brain was used. Different concentrations of metformin (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM) were applied to in penicillin-free medium and 500-1000 IU penicillin-containing medium at the cell line. Penicillin significantly reduced the viability of the astrocyte cell. The highest cell viability occurred in the medium with 0.5 and 1 mM metformin but without penicillin. However, in the penicillin containing medium, the best cell survival was in the medium containing 1 mM metformin. We conclude that metformin has protective effects on damage caused by penicillin secondary astrocyte cell line. Cell survival was strongly dependent on metformin concentrations. The results of this study will contribute to the literature as an initial study on the use of metformin as an antiepileptic.

**Keywords:** astrocyte, penicillin, insulin, rat, cell culture

## GİRİŞ VE AMAÇ

Bu çalışmadaki amacımız; penisilin ile indüklenerek oluşturulmuş epilepsi modelinde, metforminin MAP Kinaz ve apoptoz yolağı üzerine etkisini belirlemektir.

## GENEL BİLGİLER

### Astrofit

Embriyolojik gelişim sırasında radyal gliyal hücreler; astrositler, mikroglia hücreleri, ependimal hücreler ve oligodendrositler gibi tüm nöronları geliştiren primer nöral kök hücreleridir (1). Olgun astrositler fonksiyonel ve morfolojik özelliklerine göre kategorize edilmektedir. Frontal kortekste bu hücreler morfolojik olarak 4 tipte bulunur: beyindeki beyaz cevherde ve I, II, III, IV, V ve VI tabakalarında yerleşmiş fibröz astrosit, protoplazmik, genişlemiş ve interlaminar çıkıntılıdır (2). Diğer fonksiyonel ve morfolojik olarak farklı astrositler, radyal yükselme süreçli tek kutuplu Bergmann gliyalar ve uzamış radyal glia-benzeri tanisitlerdir. Serebellumda Bergmann glia, Purkinje hücrelerinin sinapsını kontrol ederken, hipotalamus tanisitleri nöroendokrin fonksiyonların modülasyonunda uzmanlaşmıştır (3, 4).

Toplu olarak astroglia olarak da bilinen astrositler, beyin ve omurilikte karakteristik yıldız şekilli gliyal hücrelerdir ve nöronal hücrelerin yaklaşık %30'unu oluştururlar. Kan-beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerinin biyokimyasal desteğı, sinir dokusuna besin maddelerinin sağlanması, hücre dışı iyon dengesinin korunması ve travmatik yaralanmaların ardından beyin ve omuriliğın onarım ve skarlaşma süreci gibi birçok işlevi yerine getirirler. Ayrıca astrositler, glutamat, ATP ve gama aminobutirik asit (GABA) başta olmak üzere çeşitli nörotransmitterler için plazma membran taşıyıcılarını (farklı doku ve organlara yerleşmiş ve çeşitli hayati işlevleri gerçekleştiren taşıyıcı proteinler) eksprese eder. Son zamanlarda astrositlerin veziküller  $Ca^{2+}$  'ya bağımlı bir şekilde glutamat veya ATP salgıladıkları gösterilmiştir (5-7).

En önemli astrosit fonksiyonlarından biri, astrosit-nöron laktat mekiği yardımıyla nöronlara enerji iletmektir (8). Astrositler, hücreler arası  $Ca^{2+}$  dalgalarını stimülasyona yanıt olarak uzun mesafelerde yayar ve nöronlara benzer şekilde, vericileri (gliotransmitter olarak adlandırılır)  $Ca^{2+}$  bağımlı bir şekilde serbest bırakır. Veriler astrositlerin  $Ca^{2+}$  bağımlı glutamat salınımı ile nöronlara da sinyal verdiğini göstermektedir (9). Kalsiyum yükselmeleri astrositlerde bilinen birincil aktivasyon eksenidir ve bazı astrositik glutamat salınım tipleri için gereklidir ve yeterlidir (10-12).

Son araştırmalar kan beyin bariyerinin korunmasındaki en önemli unsurların; astrosit hücreleri, serebral endotel hücrelerinin sıkı kavşakları ve bazal lamina olduğunu göstermiştir. (13, 14). İnflamasyon ve yaralanmalara cevap olarak astrositler reaktif hale gelir. Bu astrositler, yara-izi oluşturan astrositler ve hipertrofik astrositler olarak iki ana kategoriye ayrılabilir (15). Birçok çalışma reaktif astrositlerin potasyum iyonu alımı, iyon tamponlama,  $Ca^{2+}$  sinyali ve uyarıcı nörotransmitter alımı gibi homeostatik fonksiyonları değiştirdiğini vurgulamaktadır (16). Nöronlar aktif olduğunda, lokal hücre dışı konsantrasyonu artırarak potasyum salgırlar. Astrositler potasyuma yüksek derecede geçirgen olduklarından, hücre dışı boşluktaki fazla birikimi hızla temizlerler. Bu işleve müdahale edilirse, hücre dışı potasyum konsantrasyonu artacak ve nöronal depolarizasyona yol açacaktır. Hücre dışı potasyumun anormal birikiminin epileptik nöronal aktiviteye neden olduğu iyi bilinmektedir (9). Astrosit fonksiyonlarının düzenlenmesi Epilepsinin yanı sıra Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, İskemik inme ve gibi birkaç beyin patolojisini etkilemektedir (17).

Hipokampusta astrositler, adenosin vermek üzere ektonükleotidazlar tarafından hidrolize olan ATP'yi serbest bırakarak sinaptik iletimi bastırır (18, 19). Astrositler kan akışının nöronal düzenlenmesinde aracı olabilirler (20). Nöronlardaki elektriksel aktivite, miyelinin oluşması için önemli bir uyarıcı görevi gören ATP'yi serbest bırakmalarına neden olur. Bu astrositlerin beyinde yürütücü bir koordinasyon rolü olduğunu düşündürmektedir (21).

Nöronlardaki değişiklikler, protein ve gen ekspresyon paternlerinde ve astrosit morfolojisinde değişikliklere neden olabilir (22, 23). Artan kanıtlar, sinaptogenez

süreci ile epileptogenez arasındaki ilişkiyi göstermiştir (24, 25). Artık bozulmuş astrosit fonksiyonu ve enerji homeostazının epilepsi patogeneğinde kilit rol oynadığı, giderek daha fazla kabul edilmektedir (26).

### **Penisilin**

Penisilin 1928 yılında penicillium notatum'dan Alexander Fleming tarafından keşfedilmiş ancak yıllar içinde penisilin G olarak ticari üretimde kullanılacak hale getirilmiştir ve 1940'ların ortalarına bu yana antibiyotik olarak kullanılmaya başlanmıştır (27).

Kullanıldığı yıllardan bu yana çeşitli çalışmalarda penisilin farklı etkileri ortaya çıkmıştır. Yaygın olarak kullanılan bir antibiyotik olan penisilin ayrıca nöronal hücre üzerinde dejeneratif etkiye neden olan kimyasal bir ajandır. Bu etkilerden biri de sık kullanılan bir antibiyotik olan penisilin kimyasal bir konvülzan oluşudur. (28, 29). Bunu GABAerjik etkiyi azaltarak (30), uyarıcı glutamaterjik nörotransmisyonu artırarak (31) veya iyon kanallarında  $Ca^{2+}$  ve  $Na^{+}$  iletimini aktive ederek nöronal dejenerasyona ve nöron kaybına neden olması ile sağlamaktadır (31, 32). Glutamat eksitotoksitesinin nöronal stres ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (33-35). GABAerjik etki astrosit hücre ölümünde önemlidir (30). İyon kanallarında artan uyarıcı glutamaterjik nörotransmisyon, aktive  $Ca^{2+}$  ve  $Na^{+}$  iletimi de astrosit hücre ölümünün mekanizması olabilir (30, 32, 33, 34, 36).

### **Metformin**

Metformin, insüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus (tip 2 diyabet) tedavisinde etkili olan ve giderek tüm dünyada kullanılan antidiyabetik bir ilaçtır (37). Bunun yanında, trigliserid ve kolesterolde önemli bir azalma, HDL- Kolesterolde ise artış etkisi gösterilmiştir. Giugliano ve ark (1993) bazı çalışmalarında yağlı karaciğer hastalığını iyileştirdiği, hepatomegali, steatoz ve aminotransferaz anormalliklerini tersine çevirdiği ortaya konmuştur (38). Ek olarak diyabetik bireylerde sıklıkla bulunan çeşitli kardiyovasküler risk faktörleri üzerinde olumlu etki göstermiştir. Yapılan çalışmalar metforminin kan basıncını düşürdüğünü ve miyokardiyal glukoz

alımını dengeleyerek sol ventrikül hipertrofisini önlediğini dolayısıyla kalp fonksiyonlarını iyileştirdiğini göstermiştir (39, 40). Metformin ayrıca diyet kaynaklı kilo kaybının sürdürülmesini sağlar. Bu etki nedeniyle obesite tedavisinde de kullanılmaktadır (41). Pan ve ark.(1999), yine yapılan bazı çalışmalarda metforminin, Polikistik Over Sendromu (PCOS) endokrinopatisini azalttığı ve daha önce PCOS'lu amenoreik kadınların çoğunda (% 91) normal adetlerin yeniden başlamasına neden olduğu gözlemlenmiştir (42-44). Metformin son yıllarda üzerinde en çok çalışılan ilaçlardan biri olmuştur. Bir çalışmada, nispeten düşük bir metformin dozajının, HIV ile enfekte lipodistrofisi olan hastalarda insülin direncini ve ilgili kardiyovasküler risk parametrelerini azalttığı gösterilmiştir (45). Yine yakın zamanda yapılan bir çalışmada günümüzün önemli bir sorunu olan SARS-CoV-2 enfeksiyonunda metforminin glikoz seviyelerini optimal düzeyde tutması ve immün modüle edici özelliğinin hastaların sonuçları üzerinde faydalı bir etkiye neden olabileceği fikri öne atılmıştır (46). Ayrıca yüzyılın en büyük salgın Covid-19 için de kullanılabilmesi konusunda çalışmalar vardır (47). Francesco ve ark. (2020), metforminin yüksek glikoz durumunda, hücre büyümesini azalttığı ve hücre göçünü inhibe ettiği düşünülmüştür. Zhou ve ark. (2020), Bu özelliği neticesinde yapılan çalışmalar ile artan kanıtlarla birlikte, metforminin umut verici bir kemoterapötik ajan olabileceği ve kanser tedavisinde kullanılabilmesi gösterilmiştir (48). Metforminin yalnızca kansere değil, kardiyovasküler hastalık ve nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşa bağlı hastalıklara karşı da yararları hakkında artan kanıtlar vardır. Bazı nörodejeneratif hastalıkların ve diyabetin açıkça bağlantılı olduğunu ve diğer diyabet ilaçları ile birlikte metforminin bazı hastalarda nörolojik semptomları azaltabildiğini ve hayvan ve hücre modellerinde hastalık fenotiplerini azaltabildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (49).

Çalışmamızda metforminin penisilin ile indüklenmiş astrosit hücre kültüründe protektif etkisini göstermek istedik. Çünkü gerçekte astrositler sklerotik dokuda glutamat salınımını başlatır, glutamat çevredeki nöronları aktifleştirir ve nöbet aktivitesi gerçekleşir. Ayrıca glikoz metabolizması astrosit hücreleri için önemlidir ve astrositler beyinde insülin reseptörleri olan hücrelerdir. Bu nedenle metformin gibi glukoz metabolizması için önemli bir ilacı seçtik.

Sklerotik hippocampus'ta farklı olarak eksprese olan genlerin astrositlerle ilgili moleküler düzeyde birkaç sinyal yolağı açıklanmıştır. Bunlardan biri down regule olan MAP kinazlardır. Fellin ve ark. (2006) astrositik glutamatın epileptiform nöbetin başlangıcında değil, asıl iktal dönemde rolü olduğunu belirlemişlerdir (50-53). Çocuklarda yüksek ateş sonucu görülen epileptiform nöbetlerde bu şekilde olmuş olabilir. Menejit, herpes (53), herpes simplex (54-57) gibi virüsler de aynı mekanizma ile nöbetlere sebep olmuş olabilir. Astrositlerin epileptik nöbetlerde bu denli ortaya çıkması etkin bir antiepileptik ilaç olarak kullanılabilme ihtimalini akla getirmektedir.



## GEREÇ VE YÖNTEM

### **Sekonder Kortikal Astrosit Hücre Kültürü**

Sekonder kortikal astrosit hücre hattı, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir. Hücreler %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besi yeri içerisinde 37 oC'de %5 CO2 içeren inkübatörde kültür edilerek çoğaltıldı. Her 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel amaca bağlı olarak hücreler pasajlandı.

### **Hücre Sayımı**

T75 flasklarda %70-80 konfluensiye ulaşmış hücreler Tripsin yardımıyla kaldırıldı ve 5 ml taze besi yeri içerisinde çözülüp tek tek hücrelerden oluşan homojen bir karışım elde edildi. Hücre sayımı hemositometre lamı ile gerçekleştirildi. Sayım öncesinde hemositometre lamı ve lamel %70 alkolle temizlendi ve lamel hemositometrenin üzerine yerleştirildi. Hücre sayımı için 15 µl Trypan Blue ile 15 µl hücre solüsyonu karıştırıldı. Bu karışımdan 15 µl alınıp hemositometre lamı ile lamel arasındaki boşluğa yüklendi ve invert mikroskopta hücre sayımı yapıldı. 1 ml besi yerinde bulunan canlı hücre sayısı; Ortalama Hücre Sayısı x Seyreltme Faktörü x 10.000 formülüne göre hesaplandı.

### **MTT Sitotoksosite Testi**

Penisilin ve metforminin tekli ve kombine olarak belirlenmiş olan dozlarının, sekonder kortikal astrosit hücre hattının 24. 48. ve 72. saatlerdeki canlılığı üzerine olan etkisi, kolorimetrik bir sitotoksosite yöntemi olan MTT yöntemi ile belirlendi.

Hücreler pasajlandıktan sonra tripan mavisi boyası ile boyanıp sayıldı. 96-kuyucuklu hücre kültürü plakasına kuyucuk başına 5000 hücre ekildi ve hücrelerin kuyucuk tabanına tutunması için plaka karbondioksit inkübatöründe 24 saat inkübasyona bırakıldı.

### **Metforminin Hazırlanışı**

Ticari olarak satın alınan metformin üretici firmanın protokolüne uygun olarak hazırlandı. 5 mg metformin hassas terazi yardımıyla tartıldı. 3019 µl moleküler grade suda çözülerek 10 mM stok metformin solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon 200µl'lik alikotlar halinde bölünerek kullanılacağı zamana kadar -80 oC'de saklandı.

### **Penisilinin hazırlanışı**

Ticari olarak satın alınan penisilin G (ieciline 800.000) kendi flakonu içinde 5 ml PBS ile sulandırıldı. Daha önceki bir çalışmada kullanılan dozlar dikkate alınarak hazırlanan bu solüsyondan 500 ve 1000 IU alınarak hücre hattına uygulandı.

### **Kuyucuklar;**

- 1- Kontrol grubu
- 2- PBS grubu
- 3- Penisilin grubu
- 4- Metformin grubu
- 5- Metformin+penisilin grubu olarak sınıflandırıldı.

### **Penisilinin ve metforminin hücre hattına uygulanması**

96 kuyucuklu plâtelere ekilen hücreler 24 saat inkübatörde bekletildikten sonra her kuyudaki besiyeri çekildi. Hücrelere 500 ve 1000 IU konsantrasyonunda penisilin ve 0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 mM konsantrasyonlarında metformin verildi. Metformin ve penisilinin hücreler üzerindeki çoğalma kapasiteleri sadece besi yeri ile muamele edilmiş kontrol hücreleri ve PBS uygulanmış hücreler ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Penisilin ve metforminin hazırlanan dozları tekli ve kombine olarak ilgili kuyucuklara uygulandı ve ayrı ayrı hazırlanmış olan 96-kuyucuklu plakalar 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Her bir inkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve ilgili kuyucuklara 100 µl MTT solüsyonu uygulandı. Uygulamanın ardından plaka 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon boyunca oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için, inkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara DMSO eklendi ve plaka kısa bir süre orbital çalkalayıcıda çalkalandı. Vakit kaybetmeden 96-kuyucuklu plaka mikropłaka okuyucuya yerleştirildi ve 450 nm dalga boyunda okutuldu.

Okumadan sonra elde edilen absorbans değerlerine göre yüzde hücre canlılık oranları hesaplandı.

### **İstatistiksel analiz**

Değerler, 96 bağımsız deneyden ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel çalışmada önce varyans analizi ve eşleştirilmemiş t testi (bağımsız örneklem t testi) yapılmıştır. Daha sonra varyans analizindeki anlamlılığın hangisinden kaynaklandığını belirlemek için StatView yazılımı (Abacus kavramları, Berkeley, CA, ABD) kullanılarak post-hoc test yapılmıştır.  $P < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

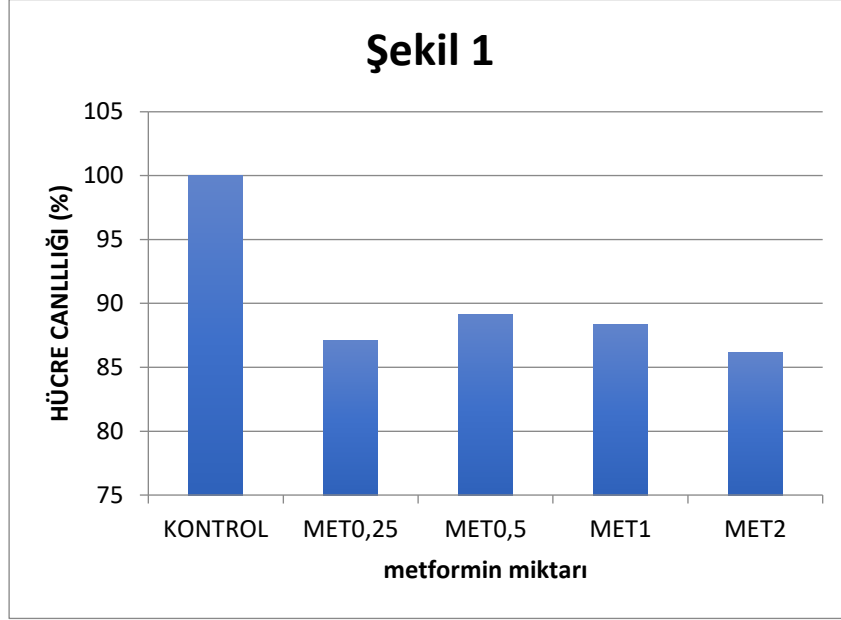
### 1-) Penisilin içermeyen astrosit hücre hattı

Sadece 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM metformin içeren, penisilin içermeyen gruplarda, kontrol grubuna göre en iyi hücre canlılığı %88 ile 0.5 mM metformin içeren grupta idi. Fakat sadece metformin içeren gruplar arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $P > 0.05$ ) (Tablo 1, Şekil 1).

**Tablo1:** Sadece 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM metformin içeren, penisilin içermeyen gruplarda, kontrol grubuna göre en iyi hücre canlılığı

METFORMİN MİKTARI	HÜCRE CANLILIĞI (%)
KONTROL	100
METFORMİN 0,25 mM	87,1
METFORMİN 0,5 mM	89,11
METFORMİN 1 mM	88,33
METFORMİN 2 mM	86,14

**Şekil 1:** Penisilinsiz ortamda, farklı dozlardaki metforminin hücre canlılığına etkisi



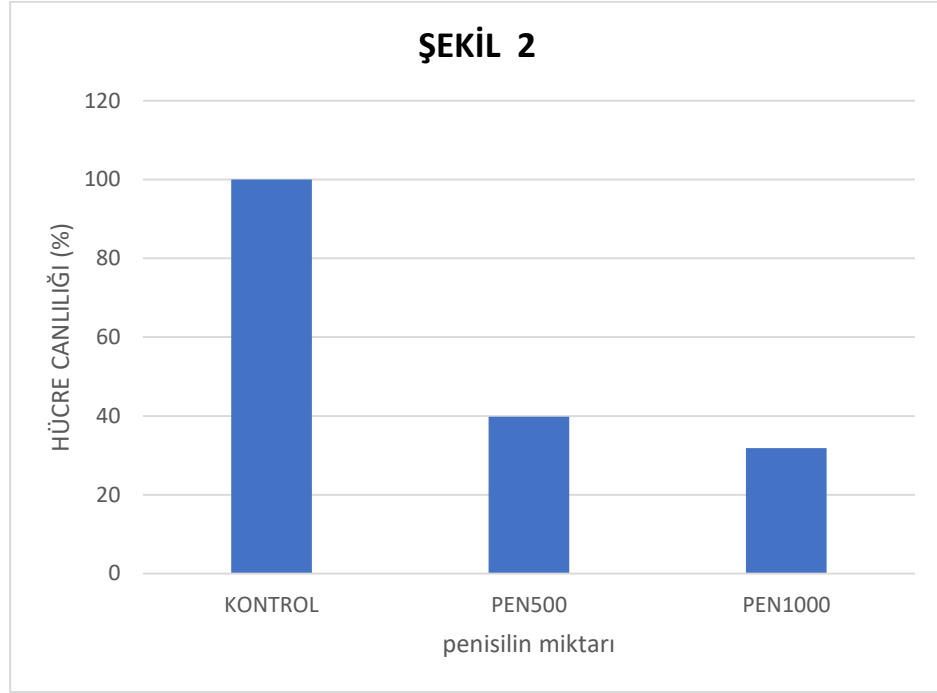
## 2-) 500 (2500 µM) ve 1000 IU penisilin içeren astrosit hücre hattı

Penisilin 2500 µM (500 IU) ve 1000 IU olarak hücre hattında hücre canlılığını istatistiki olarak anlamlı düzeyde azalttı ( $P < 0.05$ ) (Tablo 2, Şekil 2).

**Tablo 2:** 2500 µM (500 IU) ve 1000 IU Penisilin'in astrosit hücre hattında hücre canlılığı

PENİSİLİN MİKTARI	HÜCRE CANLILIĞI (%)
KONTROL	100
PEN500	39,79
PEN1000	31,87

**Şekil 2:** 2500 µM (500 IU) ve 1000 IU Penisilin'in astrosit hücre hattında hücre canlılığına etkisi



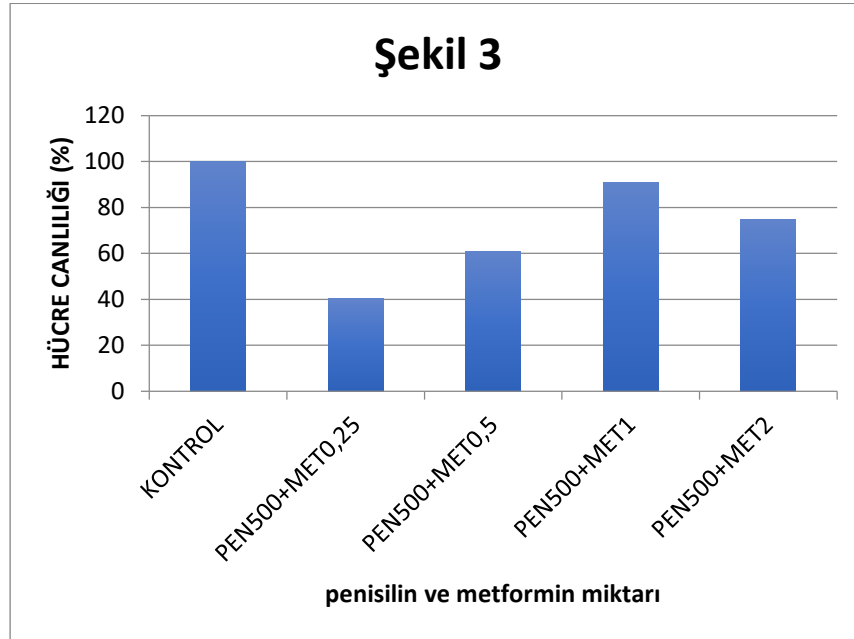
### **3-) 500 IU Penisilin ve Metformin içeren astrosit hücre hattı:**

Penisilin astrogial hücreler üzerindeki dejeneratif etkisini 1 mM Metformin istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttı ( $P < 0.05$ ) (Tablo 3, Şekil 3).

**Tablo 3:** Penisilin'in indüklemesi ile astrosit hücreleri üzerinde oluşan dejenerasyona Metformin'in etkisi

PENİSİLİN VE METFORMİN MİKTARI	HÜCRE CANLILIĞI (%)
KONTROL	100
PEN500+MET0,25	40,58
PEN500+MET0,5	60,89
PEN500+MET1	91,072
PEN500+MET2	74,89

**Şekil 3:** Penisilin'in indüklediği astrosit hücreleri üzerindeki dejeneratif etkisine Metformin'in koruyucu etkisi



Dip Not: 2 Mm ve 4 Mm metforminin etkileri aynı olması nedeniyle 4 Mm metformin tablo ve şekillerde kullanılmamıştır.

### **Sonuç olarak;**

Penisilinin astrosit hücreleri üzerinde ciddi ölüm etkisine sahip olduğu açıktır. Farklı konsantrasyonlarda metformin penisilinin neden olduğu hücre ölümüne karşı astrosit hücre canlılığı üzerinde koruyucu etkileri olmuştur. Bu durum, beyne bağlı astrosit hücrelerinin farklı mekanizmalarına bağlı olabilir.



## TARTIŞMA

Metformin, insüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus (tip 2 diyabet) tedavisinde etkili olan ve giderek tüm dünyada kullanımını artan antidiyabetik bir ilaçtır (37). Hipoglisemiye neden olmadan kan şekeri konsantrasyonunu düşürür. Metformin, ince bağırsaktan yavaşça emilir ve hepatik metabolizmaya girmez. Yarılanma ömrü yaklaşık beş saattir. Ana eliminasyon yolu renaldir; böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda kontrendikedir. İlaç, obez olmayan veya obez olan ve diyabeti diyetle kontrol edilmeyen hastalarda sülfonilüreler kadar etkilidir. En yaygın yan etkiler gastrointestinaldir. Nadir fakat potansiyel olarak ölümcül bir yan etki; laktik asidozudur. Metformin, renal tübüler yolla atılan katyonik ilaçlarla etkileşime girme potansiyeline sahiptir. Kullanılan rutin doz, iki veya üç bölünmüş doz halinde oral olarak 1.5-2.5 g / gündür (58).

Metformin, yan etkisi az olan, ucuz ve güvenli bir ilaçtır. Bu nedenle in vitro ve in vivo deneylerde kullanılmaktadır (59). Biguanid türevi bu ilacın etki mekanizmaları arasında ince bağırsakta glikoz emiliminin azalması, hücrelere glikoz taşınmasının arttırılması ve glukoneogenezin inhibisyonu bulunur (60). Ayrıca, oral glikoz toleransını arttırır ve vücut ağırlığındaki değişikliklerden bağımsız olarak plazma lipit seviyelerini azaltır (61). Lipid profilindeki bu değişiklik trigliserid ve kolesterolde önemli bir azalma, HDL- Kolesterolde ise artış yönündedir (38). Yapılan bazı çalışmalarda yağlı karaciğer hastalığını iyileştirdiği, hepatomegali, steatoz ve aminotransferaz anormalliklerini tersine çevirdiği ortaya konmuştur (62). Ancak, kahverengi yağ dokusunun enerji harcamasını arttırmadığı gösterilmiştir (63).

Metformin, tip 2 diyabet tedavisine ek olarak diyabetik bireylerde sıklıkla bulunan çeşitli kardiyovasküler risk faktörleri üzerinde olumlu etki göstermiştir. Doku plazminojen aktivatörü antijeni ve von Willebrand faktörün plazma konsantrasyonlarını düşürerek endotel hasarını önlemeye yardımcı olmaktadır (39). Yapılan çalışmalar metforminin kan basıncını düşürdüğünü ve miyokardiyal glukoz alımını dengeleyerek sol ventrikül hipertrofisini önlediğini, dolayısıyla kalp fonksiyonlarını iyileştirdiğini göstermiştir. Bu nedenle, metforminin, kronik

hipertansiyona bağlı sol ventrikül hipertrofini önlemek veya iyileştirmek için yeni bir tedavi yöntemi olabileceği düşünölmüştür (40).

Metformin bunun yanında diyet kaynaklı kilo kaybının sürdürölmesini sağlar. Bu etki nedeniyle obesite tedavisinde de kullanılmaktadır. Metformin tedavisinden sonra vücut kitle indeksi, vücut ağırlığı, bel çevresi ve yağ kütleinde anlamlı bir azalma saptanmıştır (41). Metformin, bozulmuş glukoz toleransı olan hastalarda da glukoz metabolizmasına etki etmiş ve bu hastalarda iyi bir tedavi seçeneği olabileceği düşünölmüştür (64). Yine, yapılan bazı çalışmalarda metforminin, Polikistik Over Sendromu (PCOS) endokrinopatisini azalttığı ve daha önce PCOS'lu amenoreik kadınların çoğunda (%91) normal adetlerin yeniden başlamasına neden olduğu gözlemlenmiştir (42). PCOS'lu kadınlarda hamilelik boyunca metformin tedavisi uygulanmış ve metformin almayan diğer gebelere göre spontan düşük oranlarında azalma görölmüştür (43). Metformin polikistik over sendromu olan infertilite hastalarının tedavisinde rutinde kullanılan ilaçlarla kombine edilmiş ve klinik olarak etkinliği var olan tedaviye göre daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur (30).

Metformin 2017 yılına kadar gebelik katagorisi c sınıfı olması sebebiyle gebelerde kontrollü olarak kullanılmaktaydı. Uzun yıllar yapılan araştırmalar neticesinde 2017 yılından itibaren ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından b sınıfı olarak değerlendirilmiş ve gebelerde güvenle kullanılmaya başlanmıştır (65).

Metformin gestasyonel diyabetik hastalarda da çalışılmış bir ilaçtır. Bu çalışmalar, insülin direncinin preeklampsinin nedenlerinden biri olduğunu göstermiştir. Araştırma sonuçları metforminin preeklampside plasental implantasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu sonuçların preeklampsinin tahmini ve tedavisi hakkında önemli bilgiler sağlayacağı düşünölmektedir. Ayrıca, preeklampside plasenta gelişimini önemli ölçüde artırabileceği, böylece preeklampsi ve hipertansiyon, proteinüri ve fetal doğum ağırlığı dahil olmak üzere maternal ve fetal sonuçlarla ilgili semptomları iyileştirebileceği düşünölmektedir (66).

Metformin son yıllarda üzerinde en çok çalışılan ilaçlardan biri olmuştur. 1940'larda antimalaryal ajanların araştırılması sırasında keşfedilmiştir. Klinik çalışmalar sırasında kan glikozunu düşürerek influenza tedavisinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır (67). Yapılan bir çalışmada, nispeten düşük bir metformin dozajının, HIV ile enfekte lipodistrofisi olan hastalarda insülin direncini ve ilgili kardiyovasküler risk parametrelerini azalttığı gösterilmiştir (45). Yine, yakın zamanda yapılan bir çalışmada günümüzün önemli bir sorunu olan COVID-19 Coronavirüs 2 (SARS-CoV-2) enfeksiyonunda metforminin glikoz seviyelerini optimal düzeyde tutması ve immün modüle edici özelliğinin hastaların sonuçları üzerinde faydalı bir etkiye neden olabileceği fikri ortaya atılmıştır (46). SARS-CoV-2'nin neden olduğu ciddi küresel akut solunum sendromu oluşturan bir hastalıktır. Bugüne kadar, dünya çapında 225'den fazla ülkede görülmüştür. Son çalışmalar obezitenin özellikle İtalya'da COVID-19'un ölüm oranını arttırmaktan sorumlu olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, metformin bu enfeksiyon hastalığında da çalışılmaya kayda değer bulunmuştur (48).

Metformin, 1995 yılında FDA tarafından oral hipoglisemik bir ajan olarak onaylanmış ve dünya çapında en çok reçete edilen antidiyabetik ilaçlardan biri haline gelmiştir. Yapılan son çalışmalarda otoimmün hastalık ve azalmış makrofaj sentezinin tedavisinde metforminin yeni etkileri gösterilmiştir (68). Metforminin virüs üzerine etkisini insülin duyarlılığını artırarak gösterdiği öne sürülmüştür. (69). ABD'de 65 yaşından büyük hastalar ve daha önce diyabet öyküsü olan ve pnömoni ile hastaneye yatırılan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, metforminin önceden uygulanmasının, önemli ölçüde düşük mortalite ile ilişkili olduğu bulunmuştur (70). Büyük ölçüde, yaşlı insanlar COVID-19'a genç insanlardan daha yatkındır. COVID-19 olan yaşlı hastaların ölüm oranı, genç ve orta yaşlı hastaların ölüm oranından daha yüksektir. Bu nedenle metformin kullanarak yaşlı, obez ve diyabetik hastalarda obezite ve zatürreyi azaltarak COVID-19'un mortalite oranını azaltmanın mümkün olabileceği düşünülmektedir (48).

Metformin, öncelikle karaciğeri hedefleyen, glukoneogenezin baskılanmasına yol açan ve oksidatif fosforilasyonu inhibe eden bir biguaniddir. Yüksek glikoz varlığında, hücre büyümesini azalttığı ve hücre göçünü inhibe ettiği düşünülmektedir.

Bu özelliği neticesinde yapılan çalışmalar ile artan kanıtlarla birlikte, metforminin umut verici bir kemoterapötik ajan olabileceği ve kanser tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (47). Son dönemde yapılan çalışmalarda, diyabetin özellikle meme, kolon, prostat, böbrek ve pankreası olumsuz etkileyerek, kanser riskini yüksek oranda arttırdığı gösterilmiştir (71). Bu durumun, kronik olarak artan plazma insülin seviyesinin büyümeyi arttırıcı etkisi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (72). Etkinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olsa da, en önemli sebebin hem normal hücreler hem de kanser hücreleri için metabolizma ve büyümeyi düzenlemede büyük bir etkiye sahip olan AMPK (AMP-ile aktive edilmiş protein kinaz) ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle de, birçok kanser türünde çalışma yapılmış ve önemli sonuçlar ortaya konmuştur. Tespit edilen metabolik etkileri yanı sıra, retrospektif epidemiyolojik kanıtlar, metformin kullanımının diyabetik kanser hastalarında, farklı antidiyabetik ilaçlarla tedavi edilenlere kıyasla, kanser riskinde azalma ve hastalık prognozunda iyileşme açısından daha iyi olduğunu göstermektedir. Bu durum, onkolojide adjuvan bir ilaç olarak metforminin kullanılması için sağlam bir argümandır; ancak, daha çok veriye ihtiyaç vardır. Metforminin anti-neoplastik etkisinden sorumlu mekanizmaları; sitostatik veya sitotoksik etki ile sonuçlanan metabolizma değişiklikleriyle hücre içi enerjisel strese neden olmak gibi görünmektedir (73).

Metformin, diyabetli hastalarda glikoz yönetimi için güvenli, etkili ve yararlı bir ilaçtır. Bununla birlikte, son yıllarda, metforminin yaşlanma karşıtı bir ilaç olarak kullanılmasına daha fazla dikkat çekilmiştir. Bazı model organizmalarda yaşam süresini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Klinik çalışmalar sonrası artan kanıtlar, metforminin yalnızca kansere karşı değil, kardiyovasküler hastalık ve nörodejeneratif hastalıklar (49) ve kronik inflamasyon gibi yaşa bağlı birçok hastalık ve durumun riskini etkili bir şekilde azaltabildiğini göstermektedir.

Metformin kan-beyin bariyerini geçebilme ve beyin çeşitli bölgelerine dağılılabilmek yeteneğindedir. Metforminin nöroprotektif etkileri, çeşitli beyin hastalıklarında gösterilmiştir; ancak, ilgili mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Metforminin en kabul edilen moleküler mekanizması, metabolik stres altında aktive edilen hücresel enerji sensörü olan AMPK'nın aktivasyonudur. Veriler ayrıca,

AMPK'nın bilişsel bozulmaya karşı koruyucu işlevi için metforminin birincil hedefi olduğunu göstermiştir, ancak aşağı yönde sinyal yollarının çeşitli hastalık modellerinde farklı olduğu gösterilmiştir. Metformine bağlı AMPK aktivasyonu, global serebral iskemi/reperfüzyon sıçan modelinde pasif kaçınma görevlerinde bellek oluşumunu arttırmak için hipokampal nöronlarda Beyin kaynaklı nörotrofik faktör/P70S6 kinaz (BDNF/P70S6K) yolunun aktivasyonuna yol açtığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (74).

Diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar arasındaki bağlantı çoğunlukla kabul görmektedir, ancak veriler kesin olmamakla birlikte ve ilgili mekanizmalar da belirsizdir. Nörodejeneratif hastalıkları olan insanlarda ve hayvanlarda metformin kullanımı ile ilgili büyük bir veri havuzu mevcuttur, ancak sonuçlar genellikle çelişkili olduğu için metforminin terapötik kullanımı henüz kabul edilmemiştir. Bazı nörodejeneratif hastalıkların ve diyabetin açıkça bağlantılı olduğunu ve diğer diyabet ilaçları ile birlikte metforminin bazı hastalarda nörolojik semptomları, hayvan ve hücre modellerinde de hastalık fenotiplerini azaltabildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (49).

Son epidemiyolojik çalışmalar, demans gelişme riski yüksek diyabetik hastalarda metformin tedavisinin bilişsel azalmayı önlediğini göstermiştir. Preklinik çalışmalar, metforminin Alzheimer Hastalığı'nın (AD) fare modellerinde, Alzheimer benzeri patolojiyi azalttığını ortaya koymuştur. Metformin, spontan başlangıçlı AD'nin fare modelinde öğrenmeyi ve hafızayı geliştirmiştir. Ayrıca, biyokimyasal analizler, metforminin APPc99 ve pTau'yu azaltarak belleği geliştirdiğini gösterilmiştir (76). Yine nörodejeneratif bir hastalık olan, Parkinson hastalığında (PD) tedaviye ek olarak metforminin de kullanılabileceği düşünülmüştür. Parkinson hastalığı, ciddi hareket kusurları ile karakterizedir ve yaygın olarak dopamin (DA) öncüsü 3,4-dihidroksifenil-l-alanin (L-DOPA) ile tedavi edilir. Bununla birlikte, L-DOPA'nın uzun süreli kullanımı, L-DOPA kaynaklı diskinezi (LID) gelişimine yol açabilir. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular metforminin PD hastalarında L-DOPA ile indüklenen motor komplikasyonların baskılanması veya tedavisi için terapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir (77). Hatta metforminin Frajil X gibi özel

nörodejeneratif hastalıkların da temel nörolojik semptomlarını düzeltmek adına bir potansiyele sahip olabileceği tartışılmaktadır (78).

Metformin, tüm pankreatik hücre hatlarında hücre proliferasyonunu ve apoptozu önemli ölçüde inhibe eder. Metformine bağlı apoptoz, Poli adenzin difosfat riboz polimeraz (PARP) bölünmesi, kaspaz-3, -8 ve -9'un zamana ve doza bağlı bir şekilde aktivasyonu ile ilişkilidir. (79).

Metforminin hücre içindeki öncelikli moleküler hedefinin, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ve adenzin trifosfat (ATP) sentezinde önemli rolü olan mitokondri olduğu bilinmektedir. Metforminin etkisi kısmen AMP ile aktive edilmiş protein kinaza (AMPK) uyarılmasına atfedilmektedir. Yapılan çalışmalar, metforminin pankreas beta hücrelerinde AMPK'yi doza bağlı olarak aktive ettiğini ve bunun da asetil KoA Karboksilazın (ACC) fosforilasyonunun artmasına neden olduğunu göstermektedir (80).

Metformin elektron taşıma zincirinde yer alan Kompleks I ekspresyonunu yavaşlatıp, ATP sentezini azaltmaktadır. Bu durumda, artan adenzin monofosfat (AMP), kasların kandan glukozu almasını indükleyen AMPK'ya bağlanmakta ve enzimde allosterik olarak yapısal değişikliğe neden olmaktadır. AMPK'nın aktivasyonu, hücre anabolik evreden katabolik evreye geçmektedir (80). Daha uzun metformin maruziyeti (>24 saat), apoptotik beta hücrelerinde aşamalı bir artış ile sonuçlanmış; metformine bağlı bir apoptoza yol açmıştır. Beta hücrelerinde, metformine bağlı AMPK aktivasyonunun, glikoza yanıt verebilirliklerini azalttığı ve sürekli maruz kalmanın ardından apoptoza neden olabileceği sonucuna varılmıştır (81).

Ortaya çıkan kanıtlar, metforminin çeşitli böbrek hastalıklarına karşı da koruyucu etkiler ortaya koyduğunu göstermektedir. Bazı çalışmalar, böbrek hastalığının temelinde aslında metabolik bir hastalık olduğunu ve oksidatif stresi, endoplazmik retikulum stresi, inflamasyon, lipotoksisite, fibroz ve yaşlanmayı kontrol eden çözülme patofizyolojik yolların yanı sıra AMPK gibi yetersiz konak savunma mekanizmalarının olduğunu göstermektedir. Metforminin, böbrekleri

yaralanmalardan korumak için AMPK sinyalini ve AMPK'dan bağımsız yolları düzenleyerek bu yollara müdahale edebileceği gösterilmiştir. FDA tarafından, metforminin 2016 yılında hafif veya orta derecede böbrek yetmezliği olan hastalar için güvenli olduğu beyan edilmiş, böbrek yetmezliği olan hastalarda metformin endikasyonlarının ve metforminin böbrek koruyucu etkilerinin araştırılması gerektiği vurgulanmıştır (81). Özellikle, son yıllarda yapılan çalışmalarda metforminin p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz (p38 MAPK) ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) içeren diğer moleküler hedefler, ilacın farklı deneysel bağlamlardaki etkilerinden sorumlu olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar, metforminin oksidatif stres kaynaklı apoptoza karşı koruyucu etkisinin kısmen JNK (p54) aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla olduğunu göstermiştir (82).

JNK'nin insülin direncinde önemli bir aracı olduğu ve yağlı karaciğer hastalığı ve tip 2 diyabet patogeneğinde kritik bir unsur olduğu anlaşılmıştır (83). Ancak, pro-apoptotik mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (84). Bilim insanları özellikle son yıllarda metforminin JNK ve p38 üzerine etkileriyle ilgili çok fazla çalışma yapmaktadır. Yine bir çalışmada metformin tedavisinin, AMP ile aktive edilen protein kinazı, JNK/p38 MAPK sinyal yolunu ve kaspazlarını aktive edebildiğini ve ayrıca büyüme durması ve DNA hasarı ile indüklenebilir gen 153'ün (GADD153) ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, metforminin JNK/p38 MAPK yolunu ve GADD153'ü aktive ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir (85).

Yaygın organik epilepsi sebepleri sklerotik ve sklerotik olmayan olarak ikiye ayrılmıştır. Sklerotik hippocampus'ta eksprese olan farklı genlerin astrositlerle ilgili moleküler düzeyde birkaç sinyal yolağında etkileri açıklanmıştır (50). Gerçekte Astrositler sklerotik dokuda glutamat salınımını başlatırlar. Glutamat çevredeki nöronları heyecanlandırır ve nöbet aktivitesi gerçekleşir.

İlk olarak 1880 de sklerotik hippocampusta, hippocampal atrofi, nöronal hücre kaybı ve astrosit hücre proliferasyonu gösterilmiştir. Yale üniversitesindeki 151 hasta içeren cerrahi seride %60 hastada orta temporal lob epilepsisi (MTLE) olanlarda sklerosis görülmüştür. Fakat kitle temporal lob epilepsisi (MaTLE) %28 ve

paradoksiyal temporal lob epilepsisi (PTLE) %12 non-sklerotik vakalardır. Burada görülmüştür ki hippocampal atrofi nöbetin şiddeti ve süresi ile korale değildir (50-52).

Ayrıca görülmüştür ki, rezeke olan sklerotik alandan 2 yıl sonra nöbet remisyonları olmaktadır (50). Buradan gideceğimiz sonuç; sklerotik bölgede hippocampal nöbetler astrositler hipereksitabiliteye katkı vermektedir. Absans nöbetlerde astrositlerin rolü yakın zamana kadar hala tartışılmaktadır.

Astrositler özet olarak şu şekilde nöbete sebep olurlar; Astrosit membranında Na<sup>+</sup> kanalları artar, mRNA iyonotropik glutamat reseptör-1 (GluR1) glutamata daha duyarlı hale gelir. Glutamat sentetaz down regule olur. Nükleer faktör kappa B (NFkB) (inflamatuvar reksiyonda rol alır) artar. Sonuç olarak sklerotik hippokampusta astrositlerden ekstracelluler alana kalsiyum bağımlı glutamat salınımı olur. Bu da nöbeti tetikler. MTLE olan hastalarda EEG de aynı zamanda gyrus dentatus'da da hipereksitabilite görülmüş; fakat bu durum PTLE ve MaTLE'li hastaların EEG'sinde görülmemiştir. MaTLe olan hastalarda tümör çıkartılınca nöbet tamamen kaybolmuştur. Bu çalışmada hippocampal sklerotik olan ile non sklerotik epilepsi karşılaştırıldığında hastalarda 4 kat nöronal kayıp, Cornu Ammonis area 1 (Hipotalamus alanı 1) (CA1) bölgesinde 3 kat gliosis görülmüş ve hippocampal atrofi de görülmüştür (50).

Astrosit ve mikroglial hücreler beynin immun proseslerinde merkezi rol oynayabilirler. Nöbetlerde ekstraselüler glutamat çok fazladır. Bunun sebebinin ya da kaynağının sklerotik hippokampus olması yanlış bir inanış olabilir. Çünkü burada zaten glutamerjik nöronlar deplese olmuştur. Bu yüzden bunların kaynağının astrositler olduğu düşünülmektedir (51). Astrositik glutamat nöbette paroksimal depolarizasyon yolağını canlandırabilmektedir (52). Ve nöbette iktal dönemde çok önemli bir rol alabilirler (53). Fellin ve ark. (2006) astrositik glutamatın epileptiform nöbetin başlangıcında değil, asıl iktal dönemde rolü olduğunu belirlemişlerdir. (53). Hipokampustan beyne giden outputların ana kaynağıdır.

Çocuklarda yüksek ateş sonucu görülen epleptiform nöbetler, menejit, herpes simplex gibi virüsler de aynı mekanizma ile nöbetlere sebep olmuş olabilir.



Astrofitlerin epileptik nöbetlerde bu denli ortaya çıkması antiepileptiklerde etkin bir rol oynama ihtimalini akla getirmektedir (54-57, 75).

## SONUÇLAR

Astrosit ve mikroglial hücreler beynin immun proseslerinde merkezi rol oynarlar. Beyinde nöronal stres durumlarında hızla aktive olurlar. Penisilinin nöronal strese sebep olduğu gibi astrosit hücre stresine de sebep olduğu bu çalışmada gösterilmiştir. Artık nöron-astrosit hücre stresinin astrositik glutamat sebebiyle epileptik nöbetlere sebep olduğu bilinmektedir. Metforminin en başta oral antidiyabetik etkileri yanısıra antikarsijenöz etkileri, nöroprotektif etkileri bilinmektedir. Bizim çalışmamızda penisilin ile indüklenen astrosit dejenerasyonuna karşı protektif etkisi ortaya konmuştur. Bu sonuçla metforminin antiepileptik olarak kullanılması muhtemel olabilir.

## KAYNAKLAR

- (1) Taverna E., Götz M., and Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annual review of cell and developmental biology*, 2014; 30, 465-502.
- (2) Vasile F., Dossi E., and Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function* 2017; 222.
- (3) De Zeeuw C.I., and Hoogland T.M. Reappraisal of Bergmann glial cells as modulators of cerebellar circuit function. *Frontiers in cellular neuroscience* 2015; 9, 246.
- (4) Prevot V., Dehouck B., Sharif A., Ciofi P., Giacobini P., and Clasadonte J. The versatile tanycyte: a hypothalamic integrator of reproduction and energy metabolism. *Endocrine reviews* 2018; 39, 333-368.
- (5) Agulhon C, Fiacco T, McCarthy K. Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca<sup>2+</sup> signaling. *Science*. 2010;327(5970):1250–1257.
- (6) Rafalski VA, Brunet A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Prog Neurobiol*. 2011;93(2):182–203.
- (7) Santello M, Volterra A. Synaptic modulation by astrocytes via Ca<sup>(2+)</sup>-dependent glutamate release. *Neuroscience*. 2008;22(1):253–259.
- (8) Siracusa R, Fusco R Cuzzocrea S. Front Pharmacol. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 1114.
- (9) Kimelberg HK, Jalonen T, Walz W. Regulation of the brain microenvironment: transmitters and ions. In: Murphy S, editor. *Astrocytes: pharmacology and function*. San Diego, CA: Academic Press; 1993.

- (10) Akdogan I, Adiguzel E, Yilmaz I, et al. Penicillin-induced epilepsy model in rats: dose-dependant effect on hippocampal volume and neuron number. *Brain Res Bull.* 2008;77(4):172–177.
- (11) Twyman RE, Green RM, MacDonald RL. Kinetics of open channel block by penicillin of single GABAA receptor channels from mouse spinal cord neurones in culture. *J Physiol.* 1992;445:97–127.
- (12) Bennett M, Contreras J, Bukauskas F, et al. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 2003;26(11):610–617.
- (13) Newman EA. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J Neurosci.* 2001;21:2215–2223.
- (14) Parpura V, Haydon P. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(15):8629–8634.
- (15) Khakh B.S., Beaumont V., Cachope R., Munoz-Sanjuan I., Goldman S.A., and Grantyn R. Unravelling and exploiting astrocyte dysfunction in Huntington’s disease. *Trends in neurosciences* 2017; 40, 422-437.
- (16) Rossi, D., and Volterra, A. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain research bulletin*, 2009; 80, 224-232.
- (17) Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S. *Front Pharmacol.* Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 1114.
- (18) Swaminathan N. Brain-scan mystery solved. *Sci Am Mind.* 2008:7.  
doi:10.1038/scientificamericanmind1008-7b.

- (19) Durand DM, Park EH, Jensen AL. Potassium diffusive coupling in neural networks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365(1551):2347–2362
- (20) Pascual O, Casper KB, Kubera C, et al. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science.* 2005;310(5745):113–116.
- (21) Piet R, Vargová L, Syková E, et al. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(7):2151–2155.
- (22) Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* (2009) 32:638–47. doi: 10.1016/j.tins.2009.08.002
- (23) Götz M, Sirko S, Beckers J, Irmeler M. Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: in vivo lineage, in vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *Glia.* (2015) 63:1452–68. doi: 10.1002/glia.22850
- (24) Covolan L, Ribeiro LT, Longo BM, Mello LE. Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus.* (2000) 10:169–80.  
doi: 10.1002/(SICI)10981063(2000)10:2<169::AID-HIPO6>3.0.CO;2-W
- (25) Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol.* (2004) 73:1–60.  
doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.03.009
- (26) Songbai Xu, Qihan Sun, Jie Fan, Yuanyuan Jiang, Wei Yang, Yifeng Cui<sup>4</sup>, Zhenxiang Yu, Huiyi Jiang<sup>1</sup> and Bingjin Li Role of astrocytes in post-traumatic epilepsy 2019 13;10:1149. doi: 10.3389/fneur.2019.01149.
- (27) Ayaz C. *Turkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics.* 2017;10(1):39-42)

- (28) Biziere K, Chambon JP. Animal models of epilepsy and experimental seizures. *Rev Neurol*. 1987;143(5):329–340.
- (29) Fisher RS. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Rev*. 1989;14(3):245–278.
- (30) Arzimanoglou A, Hirsch E, Nehlig A, et al. Epilepsy and neuroprotection: an illustrated review. *Epileptic Disord*. 2002;4(3):173–182.
- (31) Babb TL, Brown WJ, Pretorius J, et al. Temporallobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 1984;25(6):729–740.
- (32) Dam AM. Hippocampal neuron loss in epilepsy and after experimental seizures. *Acta Neurol Scand*. 1982;66(6):601–642.
- (33) Heath PR, Shaw PJ. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2002;26(4):438–458.
- (34) Nakamura N, Negishi K, Hirano A, et al. Real-time monitoring of L-glutamate release from mouse brain slices under ischemia with a glass capillary-based enzyme electrode. *Anal Bioanal Chem*. 2005;383(4):660–667.
- (35) Tomiyama M, Kimura T, Maeda T, et al. Expression of metabotropic glutamate receptor mRNAs in the human spinal cord: implications for selective vulnerability of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2001;189(1-2):65–69.
- (36) Bagirici F, Gokce FM, Marangoz C. Depressive effect of nifedipine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Neurosci Res Commun*. 1999;24(3):149–154.
- (37) Klip A, Leiter LA. Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes Care*. 1990; 13(6):696-704.

- (38) Giugliano D, De Rosa N, Di Maro G, Marfella R, Acampora R, Buoninconti R, D'Onofrio F. Metformin improves glucose, lipid metabolism, and reduces blood pressure in hypertensive, obese women. *Diabetes Care*. 1993; 16(10):1387-90.
- (39) Charles MA, Eschwège E. Prevention of type 2 diabetes: role of metformin. *Drugs*. 1999; 58 Suppl 1:71-3; discussion 75-82.
- (40) Li J, Minćzuk K, Massey JC, Howell NL, Roy RJ, Paul S, Patrie JT, Kramer CM, Epstein FH, Carey RM, Taegtmeier H, Keller SR, Kundu BK. Metformin Improves Cardiac Metabolism and Function, and Prevents Left Ventricular Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Am Heart Assoc*. 2020; 7;9(7):e015154. doi: 10.1161/JAHA.119.015154.
- (41) Sadeghi A, Mousavi SM, Mokhtari T, Parohan M, Milajerdi A. Metformin Therapy Reduces Obesity Indices in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta- Analysis of Randomized Clinical Trials. *Child Obes*. 2020; 16(3):174-191. doi: 10.1089/chi.2019.0040.
- (42) Glueck CJ, Wang P, Fontaine R, Tracy T, Sieve-Smith L. Metformin-induced resumption of normal menses in 39 of 43 (91%) previously amenorrheic women with the polycystic ovary syndrome. 1999; 48(4):511-9.
- (43) Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, Sieve-Smith L, Wang P. Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril*. 2001; 75(1):46-52.
- (44) Zhuang L, Cui W, Cong J, Zhang Y. Efficacy of Vitamin D Combined with Metformin and Clomiphene in the Treatment of Patients with Polycystic Ovary Syndrome Combined with Infertility. *Iran J Public Health*. 2019; 48(10):1802-1809.

- (45) Hadigan C, Corcoran C, Basgoz N, Davis B, Sax P, Grinspoon S. Metformin in the treatment of HIV lipodystrophy syndrome: A randomized controlled trial. *JAMA*. 2000; 26;284(4):472-7.
- (46) Ursini F, Ciaffi J, Paola Landini M, Meliconi R. COVID-19 and diabetes: is metformin a friend or foe? *Diabetes Res Clin Pract*. 2020; 24:108167. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108167.
- (47) Zhou DM, Ran F, Ni HZ, Sun LL, Xiao L, Li XQ, Li WD. Metformin inhibits high glucose-induced smooth muscle cell proliferation and migration. 2020; 24;12(6):5352-5361. doi: 10.18632/aging.102955.
- (48) Amr Ahmed EL-Arabey and Mohnad Abdalla 2. Metformin and COVID-19: A novel deal of an Old Drug. 2020; ORCID doi: 10.1002 / jmv.25958.
- (49) Rotermund C, Machetanz G, Fitzgerald JC .The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 19;9:400. doi: 10.3389/fendo.2018.00400.
- (50) Lee TS, Mane S, Eid T, Zhao H, Lin A, Guan Z, Kim J H, Schweitzer J, King-Stevens D, Weber P, Spencer S S, Spencer DD, & de Lanerolle NC (2007). Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 13(1-2), 1–13. <https://doi.org/10.2119/2006-00079.Lee>
- (51) Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L et al. (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*. 391:281–5.
- (52) Tian G-F, Azmi H, Takano T et al. (2005) An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med*. 11:973–81.



- (53) Fellin T, Gomez-Gonzalo M, Gobbo S, Carmignoto G, Haydon PG. (2006) Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 26:9312–22.
- (54) C Glaser GH, Lindsay J, Richards P. (1985) Focal epilepsy with mesial temporal sclerosis after acute meningitis. *Arch. Neurol.* 42:1058–60.
- (55) Uesugi H, Shimizu H, Maehara T, Arai N, Nakayama H. (2000) Presence of human herpes virus 6 and herpes simplex virus detected by polymerase chain reaction in surgical tissue from temporal lobe epileptic patients. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 54:589–93.
- (56) Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 61:1013–21.
- (57) Medzhitov R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135–45.
- (58) Klepser TB, Kelly MW. Metformin hydrochloride: an antihyperglycemic agent. *Am J. Health Syst Pharm.* 1997; 15;54(8):893-903
- (59) Rotermund C, Machetanz G, Fitzgerald JC. The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018; 19;9:400. doi: 10.3389/fendo.2018.00400.
- (60) Grzybowska M, Bober J, Olszewska M. Metformin - mechanisms of action and use for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Postepy Hig Med Dosw.* 2011; 6;65:277-85.
- (61) DeFronzo RA, Barzilai N, Simonson DC. Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73(6):1294-301.

- (62) Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med*. 2000; 6(9):998-1003.
- (63) Keates AC, Bailey CJ. Metformin does not increase energy expenditure of brown fat. *Biochem Pharmacol*. 1993; 24;45(4):971-3.
- (64) Li CL, Pan CY, Lu JM, Zhu Y, Wang JH, Deng XX, Xia FC, Wang HZ, Wang HY. Effect of metformin on patients with impaired glucose tolerance. *Diabet Med*. 1999; 16(6):477-81.
- (65) Lindsay RS, Loeken MR. Metformin use in pregnancy: promises and uncertainties. *Diabetologia*. 2017; 60(9):1612-1619. doi: 10.1007/s00125-017-4351.
- (66) Wang F, Cao G, Yi W, Li L, Cao X. Effect of Metformin on a Preeclampsia-Like Mouse Model Induced by High-Fat Diet. *Biomed Res Int*. 2019; 7;2019:6547019. doi: 10.1155/2019/6547019.
- (67) Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia*. 2017; Diabetologia volume 60, pages1566–1576(2017).
- (68) EL-Arabey AA. Update on off label use of metformin for obesity. *Prim Care Diabetes*. 2018; 12(3):284-285. doi: 10.1016/j.pcd.2018.02.004.
- (69) Chen Y, Gu F, Guan JL. Metformin Might Inhibit Virus through Increasing Insulin Sensitivity. *Chin Med J (Engl)*. 2018; 5;131(3):376-377. doi: 10.4103/0366-6999.223856.
- (70) Eric M and Antonio A. Association of metformin and mortality for patients with diabetes who are hospitalized with pneumonia. *European Respiratory Journal* 2018; 52: PA2639; doi: 10.1183/13993003.congress-2018.PA2639.

- (71) Giovannucci E., Harlan D. M., Archer M. C., Bergenstal R. M., Gapstur S. M., Habel L. A. Diabetes and Cancer: A consensus report. *Diabetes Care*. 2010; 33(7):1674-85. doi: 10.2337/dc10-0666.
- (72) Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AK, Gans RO, de Vries EG. Metformin: taking away the candy for cancer? *Eur J Cancer*. 2010; 46(13):2369-80. doi: 10.1016/j.ejca.2010.06.012.
- (73) Pácal L, Kaňková K. Metformin in Oncology - How Far Is Its Repurposing as an Anticancer Drug? *Klin Onkol*. 2020; 33(2):107-113. doi: 10.14735/amko2020107.
- (74) Zhao B, Luo J, Yu T, Zhou L, Lv H, Shang P. Anticancer mechanisms of metformin: A review of the current evidence. *Life Sci*. 2020; 24:117717. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117717.
- (75) Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, Miller SD. (2005) Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*. 49:360–74.
- (76) Farr SA, Roesler E, Niehoff ML, Roby DA, McKee A, Morley JE. Metformin Improves Learning and Memory in the SAMP8 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2019; 68(4):1699-1710. doi: 10.3233/JAD-181240.
- (77) Ryu YK, Park HY, Go J, Choi DH, Kim YH, Hwang JH, Noh JR, Lee TG, Lee CH, Kim KS. Metformin Inhibits the Development of L-DOPA-Induced Dyskinesia in a Murine Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(7):5715-5726. doi: 10.1007/s12035-017-0752-7.
- (78) Gantois I, Popic J, Khoutorsky A, Sonenberg N. Metformin for Treatment of Fragile X Syndrome and Other Neurological Disorders. *Annu Rev Med*. 2019; 27:167-181. doi: 10.1146/annurev-med-081117-041238.

- (79) Wang LW, Li ZS, Zou DW, Jin ZD, Gao J, Xu GM. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2008; 21;14(47):7192-8.
- (80) Josie M M Evans, Louise A Donnelly, Alistair M Emslie-Smith, Dario R Alessi, Andrew D Morris. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. 2005; 330(7503): 1304–1305.doi: 10.1136/bmj.38415.708634.F7.
- (81) Pan Q, Lu X, Zhao C, Liao S, Chen X, Guo F, Yang C, Liu HF. Metformin: the updated protective property in kidney disease. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12. doi: 10.18632/aging.103095.
- (82) Conde de la Rosa L, Vrenken TE, Buist-Homan M, Faber KN, Moshage H. Metformin protects primary rat hepatocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Pharmacol Res Perspect*. 2015; 3(2):e00125. doi: 10.1002/prp2.125.
- (83) Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002; 420(6913):333-6.
- (84) Czaja. The future of GI and liver research: editorial perspectives. III. JNK/AP-1 regulation of hepatocyte death. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 284(6):G875-9.
- (85) Wu N, Gu C, Gu H, Hu H, Han Y, Li Q. Metformin induces apoptosis of lung cancer cells through activating JNK/p38 MAPK pathway and GADD153. *Neoplasma*. 2011; 58(6):482-90.

