

Metformin'in İnsan Gingival Fibroblastları Üzerindeki Sitotoksitesinin In Vitro Değerlendirilmesi

In Vitro Evaluation of the Cytotoxicity of Metformin on Human Gingival Fibroblasts

Gökay TEKÇAM¹ 
Adil BAŞMAN¹ 
Emin Ümit BAĞRIÇIK² 
Necla GÜNDÜZ³ 

¹Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi, İstatistik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı; antiapoptotik, antienflamatuar ve antioksidan etkileri olan, osteoblastik hücre farklılaşması ve mineralizasyon nodülü oluşumunu indükleyen metformin adlı ilacın Primer İnsan Gingival Fibroblast (HGF) hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisinin in-vitro olarak incelenmesidir. Bu çalışma daha ileri çalışmalara ve olası insan kullanımlarına ışık olması adına planlanmıştır.

Yöntemler: HGF hücreleri besiyerlerine eklenen 11 farklı metformin dozu ile 24 saat kültüre edilmiştir. Her metformin dozu için 3 farklı kuyucuk kullanılmıştır. Bu değerler MTT testi ile ölçülmüştür.

Bulgular: Metformin düzeyleri ile fibroblast canlılığı ve üremesi arasında ters bir orantı olduğu söylenebilir. Ayrıca, metformin düzeylerinin 2 mM ve altındaki değerleri için fibroblast ölçümleri hemen hemen aynı kalmaktadır. Metforminin 2' den büyük değerleri için fibroblast canlılığı ve üremesinin önemli derecede azaldığı görülmektedir.

Sonuç: Faz 2 tedavi ihtiyacını azaltacak, iyileşme periyodunu kısaltacak ve antibakteriyel etki sağlayacak etkili bir lokal ajan bulunması için yapılan çalışmalar sürekli güncelliğini korumaktadır. Rejenerasyona pozitif katkı sağlama ihtimali olan metforminin uygulanacağı bölgedeki öncül hücrelerden olan fibroblastlara etkisinin doz bağımlı değişiminin 2 mM konsantrasyonuna kadar anlamlı bir etki yapmadığı ancak 2 mM'den daha yoğun konsantrasyonlarda sitotoksitate oluşturduğu çalışmamızda gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fibroblast, metformin, sitotoksitate

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate the dose-dependent effect of metformin on Primary Human Gingival Fibroblast (HGF) cells in vitro, which has antiapoptotic, antienflamatuar and antioxidant effects, can promote osteoblastic differentiation and mineralization nodules. This study designed to be a precursor for further and possible human studies.

Methods: HGF cells were cultured for 24 hours with 11 different metformin dose added to the medium. 3 different applications were made for each metformin dose. These values were measured with the MTT test.

Results: In our research, it is shown that there is an inverse relationship between metformin levels and fibroblast viability and reproduction. Fibroblast vitality measurements didn't show any significant difference on metformin levels, below 2 mM. Fibroblast viability and proliferation appear to be significantly reduced for metformin values of 3 mM and greater than 3 mM.

Conclusion: Studies to find an effective local agent that reduces the need for The Phase 2 treatment, shorten the recovery period and provide an antibacterial effect are constantly up to date. It has been shown in our study that the dose-dependent change of the effect of metformin, which is likely to contribute positively to regeneration, of fibroblasts, which are the precursor cells in the area where it will be applied, does not have a significant effect up to a concentration of 2 mM, but creates cytotoxicity at concentrations of 3 mM and more dense than 3 mM.

Keywords: metformin, cytotoxicity, fibroblast

GİRİŞ

Periodontal hastalıklar mikrobiyal dental plak ile ya da günümüzdeki güncel tanımlamasıyla dental biyofilm ile konak yanıtı arasındaki etkileşimler sonucu oluşur. Periodontal hastalıklar, dişeti iltihabı gibi nispeten iyileşebilir formdan, kronik ve agresif periodontitis formlarına kadar çeşitlilik gösterir. Tüm bu hastalıklar sadece diş yapısını tehdit etmekle kalmaz, aynı zamanda genel sağlığı da tehdit edebilir.¹ Bu aşamalarda gerekli tedaviler yapılmazsa, önemli doku hasarları sonrası; etkilenen dişler lükse olabilir ve hatta ilgili dişler kaybedilebilir.² Periodontal hastalıkların tedavisinde öncelikli olarak: birincil etiyolojik faktör olan dental biyofilmin eliminasyonu hedeflenmektedir. Gingivitis tedavisinde, plağın eliminasyonu ve diştışı temizliği ile iyileşme gerçekleşirken, Periodontitis tedavisinde tek başına diş taşı temizliği, kök yüzeyi kazınması ve düzleştirilmesi yetmeyebilir ve ileri cerrahi yöntemler uygulanması gerekli olabilir.

Geliş Tarihi/Received: 21.10.2022

Kabul Tarihi/Accepted: 05.01.2023

Sorumlu Yazar/Corresponding Author:

Gökay TEKÇAM

E-mail: gokaytecam@gmail.com

Cite this article as: Tekçam G, Başman A, Bağrıçık EÜ, Gündüz N. Metformin'in insan gingival fibroblastları üzerindeki sitotoksitesinin in vitro değerlendirilmesi. *Curr Res Dent Sci.* 2023; 33(2): 73-78.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Periodontal yara iyileşmesi; biyolojinin doğal akışına uymasına rağmen vücudumuzun neredeyse en kompleks iyileşmelerindenidir.³ Beş veya daha fazla dokunun hücrelerinin (epitel, dişeti ve periodontal ligament bağ dokusu, kemik, sement) avasküler, devital kök yüzeyi dokusu ile yeni bağlantı kurması istenir. Ayrıca periodontal yara iyileşmesi daima bakteriyel yükün olduğu bir ortamda gerçekleşmektedir.

Konak modülasyon tedavisi (KMT); konak-bakteri etkileşiminin konak tarafını desteklemek anlamına gelir. Aslında amaç tedaviden çok daha önemli olan konağın cevabını regüle etmektir. KMT'nin hedefi organizmanın hastalığa verdiği cevabı indükleyerek, enflamatuar cevabı düzenlemek, anti-enflamatuar ve pro-enflamatuar dengesini sağlamaktır. Sonuç olarak KMT ile konak cevabı, konağın tüm fonksiyonlarını düzenleyerek, destekleyecek şekilde düzenlenir. Bu amaçla, farklı ajanlar lokal veya sistemik olarak kullanılabilir.

Dişeti bağ dokusundaki baskın hücresel eleman fibroblasttır. Lif demetleri arasında çok sayıda fibroblast bulunur. Fibroblastlar mezenkimal kökenlidir ve dişeti bağ dokusunun gelişimi, bakımı ve onarımında önemli bir rol oynarlar. Periodontal hastalık, periodontal destek dokularının yıkımı ile karakterize edilir ve İGF hücreleri doku homeostazının korunmasında ve periodontal dokuların yeniden şekillenmesinde önemli bir rol oynar.⁴ İGF hücreleri, sitokin ve kemokin üretimini modüle ederek bakteri tehdidine yanıt verebilir ve periodontitis hastalarında inflammatuar ve kemik dönüşümü düzenleyen yollarda kritik öneme sahiptir.⁵

Periodontal hastalıklar, sistemik hastalıklar ile de ilişkilidir. Diabetli hastaların diabetli olmayan hastalara göre kronik periodontal hastalıklara yakalanma prevalansı daha yüksektir.⁶ Metformin, tip 2 diyabetli hastaların tedavisinin ilk sırasındadır. Bu ilacın yan etkileri sınırlıdır. Metforminin, karaciğer hücrelerinden glikoz üretimini azaltmada (glukoneogenez), insülin direncini azaltmada, açlık plazma insülin düzeyini düşürmede ve periferik kan glikozunun adenozin monofosfat ile aktive olan aktive edici protein kinaz (AMPK) tarafından emilimini aktive etmede etkili olduğu gösterilmiştir.^{7,8} AMPK, enerji dengesini düzenlemede önemli bir faktördür ve aktivasyonu, AMP'nin ATP'ye oranını artırarak sağlar. Bu enzim farklı hastalıklarda çeşitli roller oynar.^{9,10} Metformin antiinflammatuar ve antioksidan etkisini; insülin düzeyini artırıp, kan şekerini düşürerek, inflamasyona karşı molekülleri düzenleyerek inflammatuar süreçleri baskılamak gibi farklı mekanizmalarla gerçekleştirmektedir.^{11,12}

Oksidatif stres, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki uyumsuzluk olarak tanımlanabilir. Serbest radikaller süperoksit, hidroksil, lipid peroksit ve nitrik oksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir.¹³

Reaktif oksijen türleri (Ros), mitokondriyal elektron transfer zincirinde üretilir. Bakteriyel enfeksiyon ve Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarı gibi bu iltihaplanma süreçleri sırasında bu oksidanların üretimi artar. Çalışmalar, metformin uygulamasının, kompleks I elektron transfer kompleks zincirini doğrudan inhibe ederek serbest oksijen radikallerinin üretimini durdurduğunu ortaya koymuştur.^{14,15} Kompleks I zincirinin inhibisyonu, ATP üretimini azaltır ve AMPK'nin aktivasyonu için ana uyarıcı olan ADP / ATP ve AMP / ATP oranını artırır. Bu kompleks, ROS aracılığıyla IL-1β üretimini indüklenmesinde rol oynar. Kompleks I'i bloke ederek metformin, LPS tarafından indüklenen IL-1β üretimini inhibe eder ve IL-10 üretimini artırır.¹⁶ Metforminin, antioksidan etkilerini NAD

(P) H / PKC oksidaz yollarını inhibe ederek gerçekleştirdiğini ortaya çıkmıştır.¹⁷ Doza bağlı metformin ayrıca karaciğer peroksit hidrojen seviyesini de düşürür.¹⁸ Mineralokortikoid reseptörlerini ve NOX₄'ü uyaran aldosteron, kardiyak fibroblastlarda H₂O₂ üretimini artırır, ardından sitoplazmik adaptör TRAF3IP2'nin ekspresyonunu indükler. Bu koşullarda metformin, antioksidan etkisiyle oksidatif reaksiyonları inhibe eder. Metformin bu etkisini; hidroksil radikallerinin doğrudan yakalanması, H₂O₂'nin ana ayrıştırıcısı olan katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktive edilmesi, NOX₄'ten transkripsiyonu azaltmak gibi yollarla gösterebilir.¹⁹⁻²¹

Metformin'in preosteoblastik hücreler olan MC3T3-E1 hücreleri üstünde osteoblastik diferansiyasyonu, eNOS ve iNOS'u, BMP-2 seviyesini, AMPK aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir.^{22,23} Metformin insan kaynaklı pluripotent kök hücre kaynaklı mezenkimal kök hücreler üstünde ise osteoblastik diferansiyasyonu arttırmıştır.²⁴

Çalışmamızın temel amacı; antiinflammatuar, antioksidan ve osteojenik özellikleriyle lokal periodontal tedavide de etkili olabileceği düşünülen metforminin, bölgenin dominant hücrelerinden olan İGF hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisini değerlendirmek ve analiz etmektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma için etik kurul onayı Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (Tarih: 21 Kasım 2019, Sayı : 2019-23/3) alınmıştır.

Hücre Hattı ve Üretimi

Metformin'in İGF hücreleri (ATCC, PCS-201-018™) hücreleri üzerindeki doz bağımlı sitotoksitesinin belirlenmesi için planlanan çalışmamızda, donmuş olarak laboratuvara ulaşan hücreler, ATCC'nin önerileri doğrultusunda 37°C'de 90 saniye su banyosunda inkübe edilerek eritildikten sonra, 10 ml besi yerine transfer edildi. Transfer edilen hücreler 1²⁵ (xg) hızla, 10 dakika santrifüj (Beckman&Coulter, ABD) edilerek yıkandı. Hücreler 37 °C de, %90 oksijen (O₂), %5 karbondioksit (CO₂) varlığında uygun inkübatörde (Sanyo, Japonya) inkübe edilerek çoğaltıldı. Her 3 gün sonunda kültür besi yeri değiştirilerek tazelandı. Metformin uygulaması için 4. Pasaj (jenerasyon) hücreleri kullanıldı.

MTT Testi

Günümüzde en fazla kullanılan hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksitesite tespit yöntemlerinin başında 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi gelmektedir. MTT testinde Hücre canlılığı spektrofotometrik olarak belirlenir ve uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, uygulama yapılan hücrelerin canlılığı bu hücrelere göre yüzde (%) olarak belirlenir.^{25,26} Çalışmamızda Literatür bilgilerine dayanılarak geniş bir doz aralığı seçildi.⁵ Hazırlanan 33 kültür yerine sırasıyla 0, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6.25, 12.5, 25, 50 milimolar (mM) metformin dozu eklendi, her doz için 3 farklı tekrar yapıldı, 24 saat kültür ortamında bekletilmesinin ardından metforminin in vitro şartlarda İGF hücrelerine toksik olan ve olmayan dozlarının saptanması için MTT testi kullanıldı. MTT testi kolorimetrik mekanizmaya dayalı, ticari bir MTT kiti (Elabscience, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Buna göre, 5x10³/0.2 ml İGF hücresi, kültür besi yeri içinde düz tabanlı 96-kuyulu hücre kültürü plaklarının kuyularına yerleştirildi. Hücreler 37 °C de, %90 oksijen (O₂), %5 karbondioksit (CO₂) varlığında uygun hücre kültürü inkübatöründe (Sanyo, Japonya) 24 saat inkübe edildi. Çalışmamızda 24 saat sonrasında hücre kültürlerine MTT maddesi ilave edildikten sonra, hücreler 4 (dört) saat inkübe edildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurma

çözeltisi ilave edildi. Kolorimetrik MTT reaksiyonu 570/620 nm de bir plaka okuyucu (Synergy, Biotek, USA) kullanılarak okundu. Absorbans (optik dansite = OD) cinsinden kaydedilen değerler ile göreceli hücre canlılığı hesaplandı. Göreceli hücre canlılığı, [(Metformin dozu uygulanan hücre OD değeri / Kontrol, metformin uygulanmayan hücre OD değeri) x 100] formülü kullanılarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS versiyon 28.0 (IBM Statistical Package for Social Sciences Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Metformin düzeyleri ile fibroblast üremesi ve canlılığına ilişkin bazı betimsel istatistik değerleri hesaplanmıştır. Bu iki değişken arasındaki ilişki Spearman'ın rho korelasyon katsayısı kullanılarak tahmin edilmiştir. Fibroblast üremesi ve canlılığının metformin düzeylerine göre gösterdiği değişimin istatistiksel analizi tek faktörlü sabit etki varyans analizi kullanılarak incelenmiştir. Varyans analizi testi sonucunda fibroblast üreme ve canlılığının metformin düzeyleri bakımından değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bunun sonucu olarak hangi metformin düzeyleri arasında fibroblast üretim ve canlılığı ortalamalarının farklı olduğu sorusu post-hoc pair-wise testleri kullanılarak araştırılmıştır. Metformin düzeylerindeki fibroblast üreme ve canlılığının kontrol grubuna göre, göreceli yüzdeleri hesaplanmıştır. Tüm istatistiksel bulguların anlamlılık değerlendirmeleri $P < .05$ için anlamlı kabul edilmiştir.

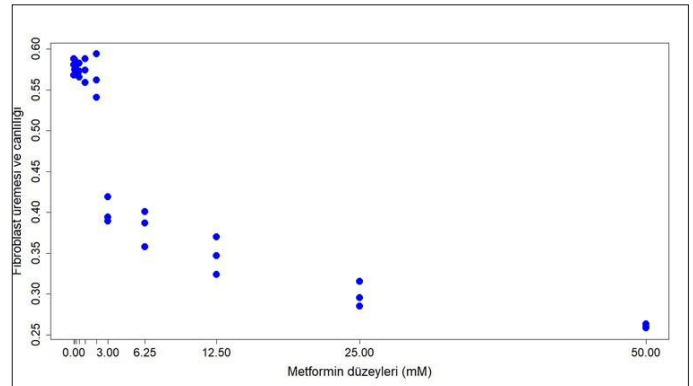
BULGULAR

Birisi metformin düzeyi 0.0 mM olan kontrol grubu olmak üzere, belirlenen 11 metformin düzeyinde, birbirinden bağımsız 3 kuyuktan fibroblast üremesi ve canlılığına ilişkin gözlemler alınmıştır. Her metformin düzeyinde alınan gözlemler ve bu gözlemlere ilişkin betimsel istatistikler Tablo 1'de verilmektedir. Tablo 1 ve Şekil 1'den görüldüğü gibi; metformin düzeyleri ile fibroblast üremesi ve canlılığı arasında ters yönlü ve kuvvetli bir ilişki vardır (örneklem korelasyon katsayısı $r = -0.811$ 'dir ve $P = .000$). Metformin düzeyi 2 mM ve altında ise fibroblast üremesi ve canlılığı artarken, metformin düzeyi 3 ve 3 mM'dan daha büyüdükçe fibroblast canlılığı ve üremesi oldukça hızlı azalmaktadır.

Fibroblast üremesi ve canlılığının metformin düzeylerine göre gösterdiği değişimin istatistiksel analizi tek faktör varyans analizi

kullanılarak incelenmiş ve analiz yapılmadan önce gözlem değerlerinin normal dağılıma uygunluğu ve her düzeydeki varyansların homojen olduğu test edilmiştir. Normallik varsayımı için yapılan Shapiro-Wilk test sonuçları incelendiğinde, 11 grubun her birisi için "p değerlerinin $> .05$ " olduğu gözlemlenmiş normallik varsayımının sağlandığı saptanmıştır. 11 grup için varyansların homojenliği varsayımı da Levene test sonucuna göre anlamlı bulunmuştur ($P = .162 > .05$). Bu sonuçlara göre varyans analizi gerçekleştirilmiş ve ANOVA tablosu, Tablo 2'de verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre, $P = .000 < .05$ olduğundan "fibroblastların üremesi ve canlılığı bakımından gruplar arasında fark yoktur" şeklinde ifade edilen yokluk hipotezi reddedilir. Metformin düzeyinin, fibroblastların üremesi ve canlılığı üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Metformin düzeylerinde fibroblast üreme ve canlılığı ortalamaları arasındaki farklılıklarının belirlenmesi için post-hoc pair-wise ikili karşılaştırmaları Benferroni ve Tukey yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Test sonuçlarına göre; kontrol grubu ile 2 ve 2 mM'ün altındaki metformin düzeyleri için fibroblast üremesi ve canlılığı ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktur ($P > .05$)¹, öte yandan kontrol grubu ile 3 ve 3 mM'ün üzerindeki bütün metformin düzeylerinden oluşan gruplar arasında fibroblast canlılığı açısından anlamlı farklılık vardır ($P < .05$)².



Şekil 1.

Deneyde dikkate alınan metformin düzeylerinde gözlenen İGF üremesi ve canlılığı.

Tablo 1. Farklı metformin düzeyleri için 3 kez optik yoğunlukla ölçülen İGF değerleri ve bu ölçümlere ilişkin betimsel istatistikler

		OD verileri								
		Tekrar1	Tekrar2	Tekrar3	min	max	aralık	medyan	ortalama	St.sapma
Metformin	50	0,258	0,260	0,263	0,258	0,263	0,005	0,260	0,260	0,0025
Düzeyleri (mM)	25	0,315	0,295	0,285	0,285	0,315	0,030	0,295	0,298	0,0153
	12,5	0,370	0,347	0,324	0,324	0,370	0,046	0,347	0,347	0,0230
	6,25	0,401	0,387	0,358	0,358	0,401	0,043	0,387	0,382	0,0219
	3	0,394	0,419	0,389	0,389	0,419	0,030	0,394	0,401	0,0161
	2	0,541	0,562	0,594	0,541	0,594	0,053	0,562	0,566	0,0267
	1	0,559	0,574	0,588	0,559	0,588	0,029	0,574	0,573	0,0145
	0,5	0,566	0,573	0,583	0,566	0,583	0,017	0,573	0,574	0,0085
	0,25	0,572	0,580	0,576	0,572	0,580	0,008	0,576	0,576	0,0040
	0,12	0,575	0,587	0,580	0,575	0,587	0,012	0,580	0,581	0,0060
	0	0,588	0,568	0,581	0,568	0,588	0,020	0,581	0,579	0,0101

1 İki test istatistiği de aynı sonuçları vermektedir.

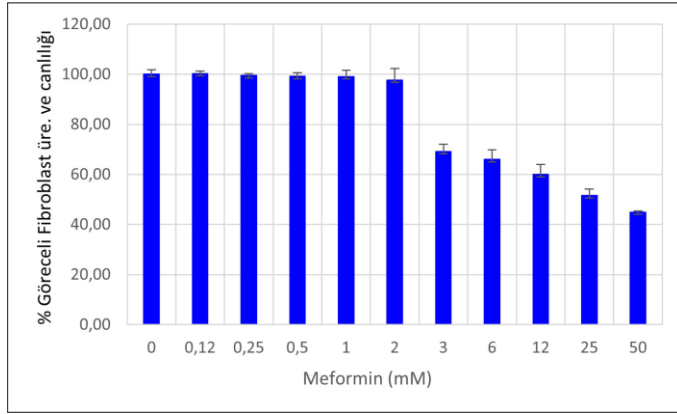
2 Metformin düzeylerine ilişkin örnek çapının küçük olması nedeniyle parametrik olmayan tek yönlü varyans analizi yöntemi olan Kruskal-Wallis varyans analiziyle de farklı düzeylerdeki metformin uygulanan 11 gruba ilişkin fibroblast üremesi ve canlılığı ortalamaları arasında farklar test edilmiştir. $P = .03 < .05$ olduğu için Kruskal-Wallis varyans analizi sonucunda da fibroblast üremesi ve canlılığının metformin gruplarına göre gösterdiği değişiklik istatistiksel olarak anlamlıdır. Metformin düzeylerinde ortalama fibroblast üremesi ve canlılığının farklılıklarının belirlenmesi için parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile de ikili karşılaştırmaları yapılmış ve parametrik yöntemle aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 2. Tek faktör varyans analizi anova tablosu

	ANOVA Tablosu				
	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama Kare	F	P
Gruplar Arası	0.501	10	0.050	207.372	.000
Gruplar İçi	0.005	22	0.000		
Toplam	0.507	32			

Tablo 3. Metforminin İGF hücreleri canlılığı üzerine etkilerinin göreceli yüzdelerle değerleri

Metformin Düzeyleri mM	% Göreceli Canlılık				
	Tekrar 1	Tekrar 2	Tekrar 3	Ortalama	St Sapma
50	44,56	44,91	45,42	44,96	0,43
25	54,40	50,95	49,22	51,53	2,64
12,5	63,90	59,93	55,96	59,93	3,97
6,25	69,26	66,84	61,83	65,98	3,79
3	68,05	72,37	67,18	69,20	2,78
2	93,44	97,06	102,59	97,70	4,61
1	96,55	99,14	101,55	99,08	2,50
0,5	97,75	98,96	100,69	99,14	1,48
0,25	98,79	100,17	99,48	99,48	0,69
0,12	99,31	101,38	100,17	100,29	1,04
0	101,55	98,10	100,35	100,00	1,75



Şekil 2. Metforminin İGF hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin göreceli yüzdelerle değerlerine ilişkin çubuk grafiği

Bu istatistiksel analizlerin yanı sıra, Tablo 1’de verilen fibroblast canlılığına ilişkin veriler kullanılarak kontrol grubuna göre, göreceli hücre canlılığı (hücre toksisitesi) hesaplanmıştır. Kontrol grubunda hücre canlılığı %100 canlılık olarak alınarak göreceli hücre canlılık değerleri elde edilmiştir (Tablo 3, Şekil 2). Metformin düzeyi 2 mM ve altında ise fibroblast üretimi ve canlılığı %100-%97,70 değerleri arasında değişirken, metformin düzeyi 3 ve 3 mM’dan daha büyük ise fibroblast canlılığı ve üretimi %44,96-%69,20 değerleri arasındadır.

Bu sonuçlara göre, başlangıç dozları olan 0,12 mM, 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM dozlarında metformin in vitro şartlarda İGF hücre vitalitesine anlamlı bir toksik etki göstermemektedir. Bir başka deyişle, metforminin toksik etkileri, 3 mM doz ve üstünde doza bağımlı olarak artmakta ve test edilen maksimum doz olan 50 mM de en yüksek seviyeye ulaşmaktadır.

TARTIŞMA

Birçok hasta tarafından kullanılan birinci basamak bir anti-diyabetik ilaç olan metforminin, potansiyel osteojenik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir.

Kang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada metformin ile Porphyromonas gingivalis Lipopolisakkarit’lerinin (LPS) İGF hü-

releri üstündeki doz bağımlı sitotoksik etkisi incelenmiştir. Bu çalışma planı sitokinleri incelemek için kurulmuştur ve sonuç olarak çalışmada LPS ve metformin ile kültüre edilen İGF hücrelerinin 2 ve 4 mM metformin uygulamasına toksik özellik gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamızda periodontal hastalık planı oluşturmadığımızdan LPS eklentisi yapılmamıştır ve sonuçta 2 mM metformin uygulamasının da toksik özellik oluşturmadığı belirtilmiştir, 2 mM metformin dozunun toksik çıkmasına neden olan durumun LPS ile kültüre edilmesi olduğu düşünülmüştür.

Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, klinik olarak ilgili metformin dozlarının, indüklenmiş Pluripotent Kök Hücre kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (iPSC-MSC’ler) osteojenik farklılaşmasını ve mineralizasyonunu desteklediğini ve metformin’in periodontal dokunun rejeneratif tedavilerinde umut verici bir ajan olduğunu belirtilmiştir. Çalışma 0,01 mM ve 0,04 mM metformin ile yapılmıştır.²⁴

Kanazawa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, metforminin osteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin farklılaşmasını ve mineralizasyonunu indüklediğini ve hücrelerde eNOS ve BMP-2 ekspresyonunu arttırdığını gösterilmiştir. Metformin, AMPK sinyal yolunun aktivasyonu ve ardından eNOS ve BMP-2 üretimindeki artış yoluyla osteoblastik hücrelerin farklılaşmasını ve mineralizasyonunu teşvik etmiştir. Metformin dozu çalışmada 0,005 mM, 0,05 mM aralığında incelenmiştir. Çalışmada 0,05 mM metformin uygulamasının tip 1 kolajen, osteokalsin ve alkalen fosfataz seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir.²²

Cortizo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada metforminin osteoblastik farklılaşmayı alkalik fosfataz ve tip 1 kolajen üretimini artırarak etkilediğini göstermişlerdir. Ek olarak, metformin ile tedavi edilen MC3T3E1 osteoblastlarının uzun süreli kültürlerinde mineralizasyon nodüllerinin oluşumunda oldukça fazla bir artış gözlenmiştir. Metformin ile ilgili yapılan incelemelerde 0,1 mM, 0,5 mM arası değerler ile inceleme yapılmıştır.²³

Hücre çalışmalarında İGF hücreleri üzerinde metforminin doz bağımlı etkisini herhangi başka bir eklenti olmadan ölçen başka bir çalışma bulunmamaktadır. Kang ve ark. tarafından yapılan çalışmada, LPS ve metforminin birlikte sitotoksik dozları incelenmiştir.⁵

Pradeep ve ark. tarafından yapılan çalışmada periodontal kök yüzey düzleştirilmesi tedavisine ek olarak metformin'in %0.5, %1 ve %1.5'lik jel formulasyonları lokal olarak uygulanmıştır. 45 hastanın dahil olduğu bu çalışmada 3 ve 6 aylık klinik parametrelerin (periodontal cepteki azalma, kanama indeksindeki azalma, ataçman seviyesindeki artış, kemik içi defektlerin radyografik görüntüleri) değerlendirilmesinde; tedavi sonrası herhangi bir lokal uygulama yapılmamış kontrol grubuna kıyasla, metformin uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı farklar gösterilmiştir. Metformin uygulanan grupların; kanama indeksi açısından 3 ve 6 aylık sonuçları değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok daha anlamlı sonuçlar gözlenmiştir. Metformin uygulanan gruplarda periodontal cep derinliği azalması ve klinik ataçman seviyesi kazancı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterirken, %1 ve %1.5 metformin uygulaması yapılan gruplarda bu sonuç istatistiksel olarak çok daha anlamlı bulunmuştur. Kemik içi defektlerin incelenmesinde ise 6. ayda metformin grupları kontrol grubuna kıyasla yine istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı sonuçlar gösterse de en anlamlı sonucu; %1'lik metformin jel uygulanan grup göstermiştir.²⁷

Pradeep ve ark. tarafından 2015 yılında tamamlanan başka bir çalışmada ise 136 hastaya oral hijyen eğitimi verildikten ve faz 1 tedavileri tamamlandıktan sonra açık flap debridmanı (AFD) planlanmıştır. 4 gruba ayrılan ve her grupta 34 hasta içeren bu çalışmada ilk grup AFD, 2. Grup AFD ile Plazmadan Zengin Fibrin (PZF) uygulaması, 3. gruba AFD ve %1'lik Metformin Jel uygulaması ve 4. gruba AFD, PZF ve %1'lik metformin jel uygulaması planlanmıştır. 9 ay süren bu çalışma sonucunda 120 hasta kontrollere katılmıştır ve kontrol grubuna kıyasla periodontal cep derinliği azalması, ataçman seviyesi artışı, kemik içi defektlerdeki değişim ve kanama indeksi açısından değerlendirildiğinde; 4. grupta diğer 3 gruba kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenirken, ilk 3 grupta kendi aralarında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.²⁸

Pradeep ve ark. tarafından yapılan iki çalışmada; kök yüzey düzleştirmesine ek olarak %1 metformin jel lokal olarak uygulanmış ve 6 ve 9 aylık sonuçları klinik parametreler eşliğinde değerlendirilmiştir. Ataçman kazancı, periodontal cep derinliği ve kemik içi defekt derinliği parametrelerinde anlamlı sonuçlar gösterilmiştir.^{2,29}

Kurian ve ark tarafından 2017 yılında tamamlanan bir çalışmada kök yüzey düzleştirmeye ek olarak lokal olarak aloe vera jel ve %1 metformin jel kullanımı incelenmiştir. Kök yüzey kazıma ve düzeltmeye ek olarak herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubuna kıyasla aloe vera jel uygulaması sonrası, klinik parametrelerde anlamlı sonuçlar gösterilirken, metformin grubunda ise diğer 2 gruba kıyasla da istatistiksel olarak çok daha anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.³⁰

Metformin'in insanlarda kök yüzeyi düzleştirmesi (KYD) sonrası lokal olarak uygulandığı ilk çalışmada %1'lik metformin dozunun kanama indeksi, sondlama derinliği, plak indeksi ve klinik ataçman seviyelerinde olumlu etkileri gösterilmiştir. Sonuç olarak %1'lik metformin dozunda; placebo, %0.5 metformin ve %1.5 metformin konsantrasyonlarına göre daha anlamlı sonuçlar gösterilmiştir. Ayrıca kemik içi defektlerde; özellikle %1'lik metformin konsantrasyonunda daha anlamlı klinik başarı gösterilmiştir.²⁷ Bu sebeple; konu ile ilgili diğer çalışmalarda da %1'lik metformin dozu tercih edilmiştir.^{2,27-30}

Yapılan insan çalışmalarında seçilen doz aralığı periodontoloji alanında kanıt düzeyinde bir veriye dayanmamaktadır. Daha ileri çalışmalar için hücre kültürü ve hayvan çalışmaları ile doz aralığı kanıt düzeyinde verilerle belirlenmelidir.

Periodontoloji'de kök yüzey düzleştirme tedavisi sonrası iyileşme periyodunun kısalması, iyileşmenin daha efektif olması ve cerrahi tedavilere olan ihtiyacın azalması için yapılan çalışmalar her zaman güncelliğini korumaktadır. Genelde konvansiyonel tedaviler sonrası özellikle kemik içi ceplerde oldukça sınırlı bir iyileşme görülürken, periodontal dokuların rejenerasyonuna yönelik uygulamalar sonrası oldukça tatmin edici sonuçlar alınmaktadır. Rejeneratif işlemler yapılmadığında, rezidüel periodontal cepler varlığını tedavi ve oral hijyen alışkanlıklarına rağmen sürdürür ve zararlı bakteri popülasyonu hiçbir zaman beklenen seviyelere düşemez.

Periodontal hastalıklar dişetin enflamasyonu ile başlar ve periodontal destek dokuların yıkımı ile ilerler. Enflamasyonun kontrol altına alınması, periodontal hastalıkların yıkıcı etkilerinin görülmemesi için oldukça kritik bir konudur. Antioksidan etkileri ile periodontal hastalıkta serbest oksijen radikallerinin yanı sıra, enflamatuar bir sitokin olan IL-1 β üretimini inhibe edebilen, osteojenik özellikleri ile kemik mineralizasyonunu ve osteoblastik hücre farklılaşmasını uyabilen metformin; gingival fibroblastlar üzerinde belirli konsantrasyonlarda toksik etki göstermemiştir. Ayrıca metforminin, gingival fibroblastların IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi inflamatuar sitokinlerin salgılamasını da baskıladığı gösterilmiştir.⁵

Metformin'in periodontal tedavilerde faz 2 tedavi olan cerrahi tedavi ihtiyacını azaltmak veya periodontal cerrahi tedavi sonrası etkinliği arttırmak için; lokal olarak kullanımı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^{2,27-30}

Bu sebeplerle metforminin, uygulanacağı bölgedeki baskın hücre olan gingival fibroblastlara etkisinin doza bağımlı değişiminin belirlenmesi ileri çalışmalar yapılabilmesi için önemli bir konudur. Sonuç olarak Metforminin, 2 mM konsantrasyonu seviyesine kadar İGF hücrelerine sitotoksik bir etki yapmadığı, ancak 3 mM ve 3mM konsantrasyon seviyesinden daha yoğun konsantrasyonlarda uygulanması sonrası ise aynı hücrelere bu kez sitotoksik etki yaptığı çalışmamızda gösterilmiştir. Metforminin; İGF hücrelerine ve hatta bu hücrelerin Alkalin fosfataz (ALP) sentezi yoluyla kemik hücreleri üzerine osteojenik etkilerinin tam olarak anlaşılabilmesi için, deney hayvanları üzerinde, çok parametrelili değerlendirme metodlarıyla, daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Gazi Üniversitesi'nden alınmıştır. (Tarih: 21 Kasım 2019, Sayı: 2019-23/3)

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.B, G.T.; Tasarım - A.B, G.T, E.Ü.B.; Denetleme - A.B.; Kaynaklar - A.B, G.T.; Malzemeler - A.B, G.T.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - G.T, E.Ü.B.; Analiz ve/veya Yorum - N.G.; Literatür Taraması - G.T.; Yazıyı Yazan - A.B, G.T, N.G.; Eleştirel İnceleme - A.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Gazi University (Date: November 21, 2019, Decision No: 2019-23/3).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - A.B, G.T.; Design - A.B, G.T, E.Ü.B.; Supervision - A.B.; Resources - A.B, G.T.; Materials - A.B, G.T Data Collection and/or Processing - G.T, E.Ü.B.; Analysis and/or Interpretation - N.G.; Literature Search - G.T.; Writing Manuscript - A.B, G.T, N.G.; Critical Review - A.B.

Declaration of Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding: This study was supported by Gazi University Scientific Research Projects Coordination Unit.

KAYNAKLAR

- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000. 1997;14(1):216-248.
- Pradeep AR, Patnaik K, Nagpal K, et al. Efficacy of locally-delivered 1% metformin gel in the treatment of intrabony defects in patients with chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Investig Clin Dent*. 2016;7(3):239-245.
- McCulloch CA. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol* 2000. 1993;1(1):16-25.
- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2001;72:1354-1363.
- Kang W, Wang T, Hu Z, Liu F, Sun Y, Ge S. Metformin Inhibits *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide-Influenced Inflammatory Response in Human Gingival Fibroblasts via Regulating Activating Transcription Factor-3 Expression. *J Periodontol*. 2017;88(10):e169-e178.
- Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;44:127-153.
- Wang C, Liu C, Gao K, et al. Metformin preconditioning provide neuroprotection through enhancement of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis after spinal cord injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;477(4):534-540.
- Ismail AA, Espinosa-Oliva AM, Santiago M, et al. Metformin, besides exhibiting strong in vivo anti-inflammatory properties, increases mptp-induced damage to the nigrostriatal dopaminergic system. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;298:19-30.
- Grahame Hardie D. AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease. *J Intern Med*. 2014;276(6):543-559.
- Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension*. 2006;47(6):1183-1188.
- Hyun E, Ramachandran R, Hollenberg MD, Vergnolle N. Mechanisms behind the anti-inflammatory actions of insulin. *Crit Rev Immunol*. 2011;31(4):307-340.
- Monnier L, Hanefeld M, Schnell O, Colette C, Owens D. Insulin and atherosclerosis: how are they related? *Diabetes Metab*. 2013;39:111-117.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161-1208.
- Cho JG, Song JJ, Choi J, Im GJ, Jung HH, Chae SW. The suppressive effects of metformin on inflammatory response of otitis media model in human middle ear epithelial cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016;89:28-32.
- Diniz Vilela D, Gomes Peixoto L, Teixeira RR, et al. The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:6978625.
- Kelly B, Tannahill GM, Murphy MP, O'Neill LA. Metformin inhibits the production of reactive oxygen species from NADH: ubiquinone oxidoreductase to limit induction of interleukin-1 β and boosts interleukin-10 (IL10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. *J Biol Chem*. 2015;290(33):20348-59.
- Batchuluun B, Inoguchi T, Sonoda N, et al. Metformin and liraglutide ameliorate high glucose-induced oxidative stress via inhibition of PKC-NAD(P)H oxidase pathway in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2014;232(1):156-164.
- Markowicz-Piasecka M, Sikora J, Szydłowska A, Skupień A, Mikiciuk-Olasik E, Huttunen KM. Metformin - a Future Therapy for Neurodegenerative Diseases : Theme: Drug Discovery, Development and Delivery in Alzheimer's Disease Guest Editor: Davide Brambilla. *Pharm Res*. 2017;34(12):2614-2627.
- Mummidi S, Das NA, Carpenter AJ, et al. Metformin inhibits aldosterone-induced cardiac fibroblast activation, migration and proliferation in vitro, and reverses aldosterone+salt-induced cardiac fibrosis in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;98:95-102.
- Buldak Ł, Łabuzek K, Buldak RJ, et al. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages [published correction appears in *Pharmacol Rep*. 2017 Jun;69(3):594] [published correction appears in *Pharmacol Rep*. 2019 Oct;71(5):981-982]. *Pharmacol Rep*. 2014;66(3):418-429.
- Dai J, Liu M, Ai Q, et al. Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chem Biol Interact*. 2014;216:34-42.
- Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;375(3):414-419.
- Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, Blanco A, Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol*. 2006;536(1-2):38-46.
- Wang P, Ma T, Guo D, et al. Metformin induces osteoblastic differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(2):437-446.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD: Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018, 2018(6).
- Pradeep AR, Rao NS, Naik SB, Kumari M. Efficacy of varying concentrations of subgingivally delivered metformin in the treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2013;84(2):212-220.
- Pradeep AR, Nagpal K, Karvekar S, Patnaik K, Naik SB, Guruprasad CN. Platelet-rich fibrin with 1% metformin for the treatment of intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2015;86(6):729-737.
- Pradeep AR, Patnaik K, Nagpal K, Karvekar S, Guruprasad CN, Kumaraswamy KM. Efficacy of 1% Metformin Gel in Patients With Moderate and Severe Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol*. 2017;88(10):1023-1029.
- Kurian IG, Dileep P, Ipshita S, Pradeep AR. Comparative evaluation of subgingivally-delivered 1% metformin and Aloe vera gel in the treatment of intrabony defects in chronic periodontitis patients: A randomized, controlled clinical trial. *J Investig Clin Dent*. 2018;9(3):e12324.