



**DENEYSEL DİYABET MODELİNDE METEORİN-BENZERİ
PROTEİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Furkan YÜKSEL

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Suat TEKİN**

Doktora Tezi-2023

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

**DENEYSEL DİYABET MODELİNDE METEORİN-BENZERİ PROTEİNİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Furkan YÜKSEL

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Suat TEKİN**

İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TDK-2022-3168) ve
YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

**MALATYA
2023**

KABUL VE ONAY SAYFASI



ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Prof. Dr. Suat TEKİN danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Deneyisel Diyabet Modelinde Meteorin-Benzeri Proteinin Etkilerinin Araştırılması ” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 27.11.2023

Furkan YÜKSEL
İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diyabet.....	3
2.1.1. Tanımı.....	3
2.1.2. Epidemiyolojisi.....	3
2.1.3. Sınıflandırılması.....	5
2.1.4. Patofizyolojisi	7
2.1.5. Nedenleri ve Risk Faktörleri.....	9
2.1.6. Semptomlar ve Klinik Bulguları.....	9
2.1.7. Tanı Kriterleri	10
2.1.8. Mevcut Tedavi Yöntemleri.....	10
2.1.9. Komplikasyonları.....	11
2.2. Diyabetik Nöropati	11
2.2.1. Tanımı.....	11
2.2.2. Epidemiyolojisi.....	11
2.2.3. Patofizyolojisi	12
2.2.4. Dorsal Kök Ganglionları ve Diyabetik Nöropati.....	15
2.2.5. Nöropatik Ağrının Etiyolojisi	16
2.3. Metabolizma.....	17
2.3.1. Keşfi ve Lokalizasyonu	17
2.3.2. Etki Mekanizması	18
2.3.3. Fizyolojik Roller.....	21
3. MATERYAL VE METOD.....	35
3.1. Deney Planı.....	35
3.2. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	38
3.2.1. Deney Hayvanlarının Belirlenmesi.....	38

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	38
3.2.3. Diyabetik Nöropati Modeli.....	39
3.2.4. Nosiseptif Davranış Testleri	40
3.2.5. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması.....	43
3.2.6. Analizlerin Yapılması	44
3.2.6.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi	44
3.2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Ölçümü	44
3.2.6.1.2. Katalaz Enzim Aktivitesi Ölçümü	45
3.2.6.1.3. Malondialdehit Ölçümü	45
3.2.6.1.4. Glutasyon Ölçümü.....	46
3.2.6.1.5. Lowry Protein Tayini.....	46
3.2.6.2. Histolojik Analizler.....	47
3.3. <i>In Vitro</i> Çalışmalar.....	48
3.3.1. Dorsal Kök Gangliyonu	48
3.3.2. Primer Hücre Kültürü	49
3.3.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve MTT Analizi.....	49
3.3.4. Hücre Canlılık Analizi	50
3.4. Verilerin İstatistiksel Analizi	54
4. BULGULAR.....	55
4.1. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	55
4.1.1. Metnrl'in Kan Glukoz Düzeyleri Üzerine Etkisi	55
4.1.2. Diyabetik Nöropati Modelinde Nosiseptif Davranış Değerleri	56
4.1.3. Metnrl'in SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	59
4.1.4. Metnrl'in CAT Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	60
4.1.5. Metnrl'in MDA Seviyesi Üzerine Etkisi	61
4.1.6. Metnrl'in GSH Seviyesi Üzerine Etkisi.....	62
4.1.7. Histolojik Bulgular	63
4.2. <i>In Vitro</i> Çalışmalar.....	68
4.2.1. Metnrl'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	68
4.2.1. Metnrl'in Hücre Canlılığına Yolak Üzerinden Etkisi	69

5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
EKLER.....	97
EK.1. ETİK KURUL KARARI.....	97
EK.2. ÖZGEÇMİŞ.....	98



TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmama sağladıkları maddi desteklerden ötürü Yüksek Öğretim Kurumu'na (YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Burs Programı) ve İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TDK-2022-3168),

Tezimin ve doktora sürecimin tüm aşamalarında katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Suat TEKİN ve ailesine, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Süleyman SANDAL başta olmak üzere bölümümüzün tüm öğretim üyelerine, tez çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mete ÖZCAN ve ekibine, çalışmamın histolojik analizlerini gerçekleştiren İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Aslı TAŞLIDERE'ye, çalışmamdaki deneyler ile tez yazımı sırasındaki katkılarından dolayı Tuba KESKİN, Güldeniz ŞEKERCİ, Semiha Nur ÖZKAYA, Öğr. Gör. Samet ÖZ, Vet. Hek. Engin KORKMAZ, Öğr. Gör. Mehmet Refik BAHAR ve tüm asistan arkadaşlarıma, hayatım boyunca sevgisini ve desteğini benden esirgemeyen aileme, varlığı ile bana güç veren, özellikle doktora sürecim boyunca anlayış ve desteğini bir nebze dahi olsa eksiltmeyen sevgili eşim Ceren Meral YÜKSEL'e ve canım oğlum Ali Dora YÜKSEL'e

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Furkan YÜKSEL

ÖZET

Deneysel Diyabet Modelinde Meteorin-Benzeri Proteinin Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Diyabet; insülin metabolizmasına bağlı şekillenen bir hastalık olup uzun süreli hiperglisemi sonucunda diyabetik nöropati (DN) oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarla insülin direncini regüle ettiği belirlenen Meteorin-benzeri protein (Metrnl)'in, tip-2 diyabet için terapötik olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma Metrnl'in diyabetik nöropatinin *in vivo* ve *in vitro* modelinde etkinliğinin araştırılması amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metod: Çalışmada 40 adet normoglisemik erkek *Balb-C* fareleri 4 gruba ayrıldı (n=10). Kontrol hariç tüm gruplara intraperitoneal (ip) tek doz streptozotosin (STZ) enjeksiyonu yapıldı. 72 saat sonra kan glukoz düzeyi ölçülerek 250 mg/dL'nin üzerindeki hayvanlar diyabet kabul edildi. Diyabet oluşumundan 21 gün sonra 14 günlük deneylere başlandı. 14 gün boyunca her gün DN grubuna serum fizyolojik, tedavi gruplarına sırayla 2 ve 4 µg/kg ip Metrnl uygulandı ve aynı süreçte hot plate, tail flick ve von frey testleri yapıldı. 14 günün sonunda hayvanlar dekapite edilerek pankreas dokuları alındı. 1-2 günlük *Wistar* ırkı sıçanlardan izole edilen dorsal kök gangliyonları (DKG) 24 saat yüksek glikoza maruz bırakıldı ve Metrnl'in hücre canlılığına etkisi ile kullandığı hücresel yolak belirlendi.

Bulgular: Metrnl enjeksiyonunun farelerde DN grubuna kıyasla ağrı eşiğini arttırdığı (p<0.05), oksidatif stres parametrelerini iyileştirdiği (p<0.05) ve pankreasın histolojik bütünlüğünü korumaya yardımcı olduğu belirlendi (p<0.05). Ayrıca Metrnl'in DKG'de MAPK yolağını kullanarak hücre canlılığını arttırdığı tespit edildi. (p<0.05)

Sonuç: Bu bulgular Metrnl'in analjezik etkinliğe sahip olduğunu, oksidatif hasarı ve pankreasın histopatolojik durumunu iyileştirdiği göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ağrı, Diyabet, DKG, Metrnl, Nöropati.

ABSTRACT

Investigation of The Effects of Meteorin-Like Protein in Experimental Model Of Diabetes

Aim: Diabetes; Diabetic neuropathy (DN) is a disease caused by insulin metabolism and occurs as a result of long-term hyperglycemia. Meteorin-like protein (Metrl), which has been determined to regulate insulin resistance through studies, is thought to be therapeutic for type-2 diabetes. This study was conducted to investigate the effectiveness of Metrl in the *in-vivo* and *in-vitro* model of diabetic neuropathy.

Material and Method: In study, 40 normoglycemic male *Balb-C* mice were divided 4 groups (n=10). Single dose of streptozotocin (STZ) was injected intraperitoneally (ip) in all groups except control. Animals with blood glucose levels above 250 mg/dL were considered diabetic after 72-hours. 14-day experiments started 21-days after the onset of diabetes. Physiological saline was applied to DN group every day for 14-days, and 2, 4 µg/kg ip Metrl was applied to treatment groups and hot-plate, tail-flick and von-frey tests were performed during same period. At end of 14-days, animals were decapitated and pancreatic tissues were removed. Dorsal root ganglia (DRG) isolated from 1-2 day old *Wistar* rats were exposed to high glucose for 24-hours, cellular pathway used by Metrl with its effect on cell viability was determined.

Results: It was determined that Metrl injection increased pain threshold in mice compared to DN group ($p<0.05$), improved oxidative stress parameters ($p<0.05$) and helped preserve the histological integrity of pancreas ($p<0.05$). Additionally, Metrl increased cell viability in DRG by using MAPK pathway. ($p<0.05$).

Conclusion: Results show that Metrl has analgesic activity and improves oxidative damage and histopathological status of pancreas.

Keywords: Pain, Diabetes, DRG, Metrl, Neuropathy.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADA	: Amerikan Diyabet Derneği
AGE	: Gelişmiş Glikasyon Son Ürünleri
Akt	: Protein Kinaz B
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AMPK	: Adenosin Monofosfatla Aktifleştirilen Protein Kinaz
AP-1	: Aktivatör Protein-1
APG	: Açlık Plazma Glukozu
AR	: Aldoz Redüktaz
BCC	: Bazal Hücreli Karsinom
BSA	: Bovine Serum Albümin
BYD	: Beyaz Yağ Doku
CaMKK	: Kalsiyum/Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz
CAN	: Kardiyovasküler Otonomik Nöropati
CAT	: Katalaz
c-KIT	: Tirozin Kinaz Reseptör Geni
DAG	: Diaçilgliserol
DAN	: Diyabetik Otonomik Nöropati
DCCT	: Diyabet Kontrolü ve Komplikasyon Çalışması
DFN	: Diyabetik Fokal Nöropati
DKG	: Dorsal Kök Gangliyonu
DM	: Diabetes Mellitus
DN	: Diyabetik Nöropati
DPN	: Diyabetik Periferik Nöropati
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERK	: Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Glutasyon Disülfit
GST	: Glutasyon S-Transferaz
HDAC5	: Histon Deasetilaz 5
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

H-E	: Hematoksilen-Eozin
HPT	: Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid
IASP	: Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
IgG	: İmmüoglobulin G
IHC	: İmmühistokimyasal
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
JAK2/STAT3	: Janus Kinaz 2-Sinyal Transduseri- Transkripsiyon Aktivatörü 3
JAK-STAT	: Janus Kinaz- Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
JNK	: c-Jun N-Terminal Kinaz
KLF3	: Krüppel Benzeri Faktör 3
KYD	: Kahverengi Yağ Doku
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MAPK	: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MDA	: Malondialdehit
Metrn	: Meteorin
Metrl	: Meteorin Benzeri Protein
MI	: Miyokard İnfarktüs
MPO	: Miyeloperoksidaz
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2-5-Difeniltetrazolyum Bromür
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidrojen
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NAFLD	: Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NGSP	: Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı
NGT	: Normal Glukoz Toleransı
NOFH	: Travmatik Olmayan Femur Başı Osteonekrozu
NYN	: Normal Yağlı Yem
OA	: Osteoartrit
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi

OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PG	: Plazma Glukozu
PGC-1α	: Peroksizom Proliferatör-Aktive Edici Reseptör Gama Koaktivatörü-1 α
PI3K	: Fosfoinositid 3-Kinaz
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDH	: Sorbitol Dehidrojenaz
SGBS	: Simpson-Golabi-Behmel Sendromu
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SVF	: Stromal Vasküler Fraksiyon
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
TAC	: Transversal Aort Daralması
TAS	: Toplam Antioksidan Seviyesi
TC	: Total Kolesterol
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör α
TOS	: Toplam Oksidan Seviyesi
UCP1	: Eşleşme Bozucu Protein 1
UCP3	: Eşleşme Bozucu Protein 3
YG	: Yüksek Glikoz
YYY	: Yüksek Yağlı Yem

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Diabetes Mellitus sınıflandırması	6
Şekil 2.2. NADPH tarafından oksijenin indirgenmesi	7
Şekil 2.3. Radikal oksijenlerin SOD ve CAT tarafından su ve serbest (kararlı) oksijenlere dönüştürülmesi.	8
Şekil 2.4. Poliyol yolunun metabolik aktivitesi.....	13
Şekil 2.5. AGE oluşumu	14
Şekil 2.6. AGE'lerin sinyal yolu aktiviteleri	15
Şekil 2.7. Metrnl'in insan kromozomundaki lokalizasyonu.....	18
Şekil 2.8. Fare, sıçan ve insanda Metrnl gen dizilimi özdeşliği	18
Şekil 2.9. Metrnl etki mekanizması	21
Şekil 2.10. Metrnl'in GLUT4 üzerine etkisi.....	24
Şekil 2.11. Egzersiz sonrası kas dokuda Metrnl aktivasyonu.....	33
Şekil 3.1. <i>In vitro</i> deney protokolü	36
Şekil 3.2. <i>In vivo</i> deney protokolü.....	37
Şekil 3.3. Hot plate testi.....	41
Şekil 3.4. Tail flick testi.....	42
Şekil 3.5. Von frey testi	43
Şekil 3.6. Dekapitasyon ve analizler	44
Şekil 3.7. MTT analizi için grupların 96'lık well plate üzerindeki yerleşimi	51
Şekil 3.8. Metrnl'in hücre canlılığına yolak üzerinden etkisini MTT analizi ile incelemek için grupların 96'lık plate üzerindeki yerleşimi	53
Şekil 4.1. Metrnl'in kan glukoz düzeyleri üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.2. Farelerde hot plate testi ile nosiseptif davranış ölçümleri.	56
Şekil 4.3. Farelerde tail flick testi ile nosiseptif davranış ölçümleri.	57
Şekil 4.4. Farelerde von frey testi ile nosiseptif davranış ölçümleri.	58
Şekil 4.5. Metrnl'in SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.6. Metrnl'in CAT enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.7. Metrnl'in MDA seviyesi üzerine etkisi.	61
Şekil 4.8. Metrnl'in GSH seviyesi üzerine etkisi	62
Şekil 4.9. Kontrol grubunda pankreasın histolojik görünümü.....	63
Şekil 4.10. DN grubunda pankreasın histolojik görünümü.	64

Şekil 4.11. DN+Metrl (2 µg/kg) grubunda pankreasın histolojik görünümü.	65
Şekil 4.12. DN+Metrl (4 µg/kg) grubunda pankreasın histolojik görünümü.	65
Şekil 4.13. Pankreas kesitlerinde Kaspaz-3'ün immünohistokimyasal boyanması.	66
Şekil 4.14. Histopatolojik hasar skoru.....	67
Şekil 4.15. Metrl'in DKG hücrelerinde canlılık üzerine etkisi.....	68
Şekil 4.16. Metrl'in hücre canlılığı üzerine log(doz)-yanıt ilişkisi grafiği.....	69
Şekil 4.17. Metrl'in DKG hücrelerinde canlılığa yolak üzerinden etkisi.....	70



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. ADA'ya göre diyabetin tanı kriterleri.....	10
Tablo 3.1. Hayvanların bilgisayara dayalı algoritma kullanılarak gruplara ataması.	38
Tablo 3.2. Sinir hücre kültür vasatı bileşimi	48



1. GİRİŞ

Diyabet; pankreastan insülin sekresyonunun yetersizliği, etkisizliği ya da insülin molekülündeki bozukluklar sonucu gelişen bir hastalıktır. Hiperglisemi ve glukagon yüksekliği ile karakterize olan diyabet metabolik ve kronik birçok komplikasyona neden olmaktadır. Klinik olarak polidipsi, poliüri, polifaji, kilo kaybı gibi semptomlar görülürken, karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasında bozukluklar da gelişebilmektedir. Diyabette mikrovasküler komplikasyonlar nöropati, nefropati ve retinopati gibi doku, organ hatta sistem düzeyinde hasarları ve buna bağlı olarak meydana gelen ciddi hastalıkları kapsar. Makrovasküler komplikasyonlar ise kardiyovasküler hastalıkları, perifer vasküler hastalığı ve inmeyi kapsar (1, 2). Bu komplikasyonlar arasında mikrovasküler komplikasyonların görülme sıklığı daha fazladır. Mikrovasküler komplikasyonlar arasından da nöropati yüksek prevalans ile öne çıkmıştır (3). Diyabetik Nöropati (DN), farklı paternler şeklinde ortaya çıkabilir. Hasar öncelikle duyu nöronlarında meydana gelir. Yapılan çalışmalar tüm birincil duyu nöronlarının diyabet tarafından hedef alındığını göstermektedir (4). Somatosensoriyel sistemde rol alan birincil duyu nöronlarının hücre gövdeleri, dorsal kök gangliyonlarında (DKG) bulunur (5). Uzun süreli hiperglisemi DKG nöron hasarına ve kaybına neden olur (6). Ayrıca hiperglisemi hem schwann hücre metabolik aktivitesinin bozulmasına hem de miyelin dejenerasyonuna neden olur (7). Bu defektler sonucunda ise “somatosensoriyel sinir sisteminin bir lezyonu veya hastalığının neden olduğu ağrı” olarak tanımlanan nöropatik ağrı meydana gelmektedir (7, 8).

2012 yılında, DKG gangliyonlarında varlığı bilinen meteorinin (Metrn) homoloğu olarak keşfedilen Meteorin benzeri protein (Metrn1), yağ dokudan sentezlenen 311 aminoasitten oluşan bir proteindir (9, 10). Metrn1'in literatürde Meteorin benzeri, Meteorin β , Cometin ve Subfatin gibi adlandırmaları mevcuttur (9). Yapılan çalışmalarda Metrn1'in insandaki ve faredeki gen diziliminin %77 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (10). Ayrıca insanda ve farede subkutan kahverengi yağ doku (KYD)'de yüksek düzeyde salgılanan Metrn1 aynı zamanda iskelet kası, deri, testis, böbrek, pankreas, karaciğer, kalp, stromal hücreler, makrofajlar, dalak ve beyin de dahil olmak üzere çeşitli dokularda da varlığı tespit edilmiştir (11, 12).

Metrn1 ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda Metrn1'in enerji metabolizması ve insülin direnci üzerinde önemli fizyolojik roller üstlenebileceği fikri ileri sürülmüştür (12,

13). Metrnl'nin bej yağ termojenezini ve antiinflamatuvar sitokinlerin üretildiği gen ifadesini uyardığı, beyaz yağ dokuda (BYD)'da kahverengileşmeyi sağlayarak yağ fonksiyonunu iyileştirdiği ve insülin direncini azalttığı belirlenmiştir (9). Metrnl'nin mitokondriyal biyogenezin asıl düzenleyicisi olan peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör gama koaktivatörü-1 α (PGC-1 α) aracılığıyla gerçekleşen fizyolojik süreçlere dahil olduğu düşünülmektedir. Bu durum da Metrnl'in mitokondriyal bağlantılı her süreçte etki edebileceğini akla getirmektedir. Sahip olduğu fizyolojik etkiler ile özellikle Tip2 diyabet ve obezite için teröpatik olabileceği düşünülen Metrnl'in mitokondriyal disfonksiyonla alakalı olan ve uzun süreli hiperglisemi sonucu şekillenen DN'de nasıl etki ya da etkiler göstereceği önemli bir soru işaretidir.

Bu çalışma Metrnl'in deneysel *in vivo* ve *in vitro* diyabetik nöropati modelinde etkinliğini araştırmak amacıyla yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet

2.1.1. Tanımı

Halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen diyabet (Diabetes Mellitus; DM) kan glikoz regülasyonunda primer rol oynayan insülinin sekresyon ve/veya aktivitesindeki bozukluğa bağlı seyreden ve birçok komorbidite ve komplikasyonlara neden olabilen metabolik bir hastalık olarak tanımlanabilmektedir (14).

2.1.2. Epidemiyolojisi

Gün geçtikçe prevalansının arttığı bilinen DM için Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation; IDF)'nin dünya genelinde 20-79 yaş aralığındaki bireylerde görülen DM prevalansı 2017 yılına ait raporunda 425 milyon vaka ile %8.8 olarak kaydedilmişken (15). 2019'da bu oran 463 milyon ile %9.3'e yükselmiştir (16). 2021 yılında ise aynı yaş aralığı için DM görülme sıklığı 536.6 milyon kişi ile %10.5 olduğunu rapor etmiştir ve bu oranının 2030'da %11.3'lere (yaklaşık 642.7 milyon kişi), 2045'te de %12.2'lere (yaklaşık 783.2 milyon kişi) ulaşabileceği öngörülmüştür (17). Tüm bu veriler geçmişten günümüze yaygınlığı artış gösteren DM'nin günümüzde olduğu kadar gelecek için de önemli bir tehdit unsuru olduğunu göstermektedir.

IDF 2017 raporunda DM görülme sıklığının; yüksek gelirli ülkelerde 75-79 yaş aralığında %22 oranı ile, orta gelirli ülkelerde de 69-75 yaş aralığında %19 oranı ile ve düşük gelirli ülkelerde de 55-64 yaş aralığında %8 oranı ile üst düzeylere ulaştığı rapor edilmiştir (15). 2019 ve 2021'de ise dünya genelinde DM prevalansının yaşla pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur. Her iki raporda da bu prevalansın 25-69 yaş aralığında erkeklerde 70-79 yaş aralığındaysa kadınlarda daha yüksek olduğu görülmüştür (16, 17) 20-24 yaş aralığında kadın ve erkeklerde DM görülme sıklığının birbirine çok yakın olduğu gösterilmiştir.

Ülkelerin gelir düzeylerine göre DM yaygınlığı incelendiğinde hem 2019 hem de 2021 raporunda orta ve düşük gelir düzeylerine kıyasla yüksek gelir düzeyine sahip ülkelerde DM görülme oranı daha fazladır (16, 17). Bunun yanı sıra 2021 raporunda dünya genelindeki bütün diyabetli bireylerin 432,7 milyon (yaklaşık %80.6) gibi büyük çoğunluğunun düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşadığı vurgulanmıştır. (17).

IDF 2017 raporu DM tanılı bireylerin yaklaşık üçte ikisinin (15), 2019 raporu da %67'sinin kentsel kesimlerde yaşadığını göstermiştir (16). 2021 yılı için DM görülme sıklığı bakımından kentsel ve kırsal bölgeler kıyaslandığında ise dünya genelinde DM prevalansı kırsal bölgelerde %8.3 (yaklaşık 176.6 milyon kişi) iken kentsel bölgelerde %12.1 (yaklaşık 360 milyon kişi) olarak saptanmıştır (17). Bu oranın global kentleşme de düşünüldüğünde 2045 yılı için kentsel bölgelerde %13.9'a (yaklaşık 596.5 milyon kişi) ulaşabileceği öngörülmüştür (17).

Dünya genelindeki DM prevalans verileri bölgesel olarak da ele alınmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda en yüksek DM prevalansı 2017'de Kuzey Amerika ve Karayipler bölgesinde (%10.8) bulunurken (15) 2019'da Orta Doğu ve Kuzey Afrika bölgesinde (%12.2) görülmüştür (16). 2017 ve 2019 raporlarında en düşük DM prevalansı sırasıyla %4.2 (15) ve %4.7 (16) oranlarıyla her iki raporda da Afrika olmuştur. En yüksek hasta sayısının 2017'de 168.4 milyon ile (15), 2019'da da 162.6 milyon ile (16) Batı Pasifik Bölgesi'nde olduğu görülmüştür. 2021 yılına ait raporda en yüksek prevalans 2019 raporuna benzer şekilde Orta Doğu ve Kuzey Afrika'da (%16.2), en düşük prevalansın ise diğer iki rapordaki gibi Afrika'da (%4.5) olduğu sonucuna varılmıştır (17, 18). En fazla DM tanısı almış hasta sayısının ise 206 milyon kişi ile yine diğer iki rapordaki gibi Batı Pasifik'te olduğu da dikkat çekmiştir (17).

Veriler ülkeler bazında incelendiğinde de en çok DM vakasının görüldüğü ülkenin 2017 raporunda 114.4 milyon kişi (15) ile 2019 raporunda da 116.4 milyon kişi (16) ile Çin olduğu ortaya konmuştur. 2021 raporunda ülkeler arasında karşılaştırmalı diyabet prevalansı oranı en yüksek olan ülkenin %30.8 ile Pakistan olduğu ve en çok DM tanılı hasta sayısının olduğu ülkenin de 140.9 milyon ile diğer iki rapora benzer şekilde Çin olduğu görülmüştür (17, 18). Ülkeler arasında Türkiye 2021 için hem karşılaştırmalı prevalansta hem de hasta sayısında dünya genelinde diğer ülkeler arasında ilk 10'a girmemiştir (17). Ancak 2045 yılı için öngörülen rakamlarda Türkiye 13.4 milyon hasta ile dünya genelinde 10. sırada yer almaktadır (17). Türkiye özelinde DM verilerine bakıldığında yaklaşık 9 milyon diyabet DM tanısı almış hastanın olduğu ve %14.5 oranında karşılaştırmalı prevalansa sahip olduğu görülmüştür (19).

DM ve komplikasyonlarının dünya genelinde önde gelen ölüm nedenlerinden olduğu bilinmektedir. 2021'de dünya genelinde 20-79 yaş aralığında yaklaşık 6.7 milyon kişinin diyabet ve komplikasyonları nedeniyle öldüğü IDF tarafından rapor edilmiştir. Bu değer dünya genelindeki tüm ölümlerin yaklaşık %12.2'sini oluşturmaktadır (19).

Yüksek prevalans ve mortalite oranlarına sahip DM, tüm dünyayı tehdit eden bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir.

2.1.3. Sınıflandırılması

DM, Amerikan Diyabet Derneği (American Diabetes Association; ADA) tarafından “insülin hormonunun sekresyonundaki ve/veya vücuttaki etkinliğindeki düzensizlik ya da bozukluk nedeniyle ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalık” olarak tanımlanmaktadır (20). Etiyolojik nedenlerine göre diyabet; Tip1 Diyabet, Tip2 Diyabet, Gestasyonel Diyabet ve Diğer Spesifik Diyabet Tipleri olmak üzere dört başlıkta incelenebilir (21). Epidemiyolojik veriler genellikle tüm diyabet tiplerini birleştirici nitelikte olduğundan diyabet tiplerine özgü kesin verilerden bahsetmek oldukça zordur. Bununla beraber tüm DM vakalarının %90’ından fazlasını tip 2 diyabet, %1.6’sını tip 1 diyabet tanısı almış hastaların oluşturduğu söylenebilmektedir (22).

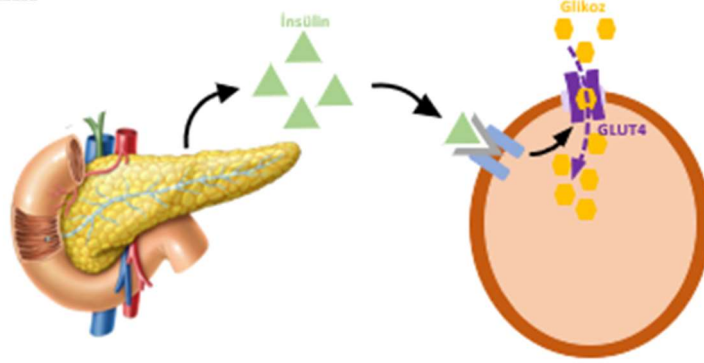
Tip1 Diyabet: Diyabetin bu tipi, pankreasın beta hücrelerinin hasarı ile kayıpları nedeniyle ortaya çıkar ve vücutta insülinin sentezi eksikliği/yoksunluğuna neden olur. Pankreas beta hücre hasarı immun aracılı (otoimmun) gerçekleşirse Tip1A olarak adlandırılırken belirlenemeyen bir neden ile (idiyopatik) gerçekleşirse Tip1B olarak adlandırılır (23).

Tip2 Diyabet: Bir diğer diyabet tipi olan bu tür tüm diyabet türleri arasında en yaygın olan türüdür (22). Bu türün temel nedenlerinden biri pankreas beta hücrelerinden defektif insülin salınmasıdır. Bir diğeri ise salınmış olan insülinin (defektif olmasa bile) etkinliğini gösterememesi nedeniyle hedef dokularda insüline bir yanıt oluşturulamaması yani insülin duyarlılığının azalmasıdır. (24)(Şekil 2.1.). Bu tür diyabette hastalığın patofizyolojisi oldukça karmaşık seyretmektedir.

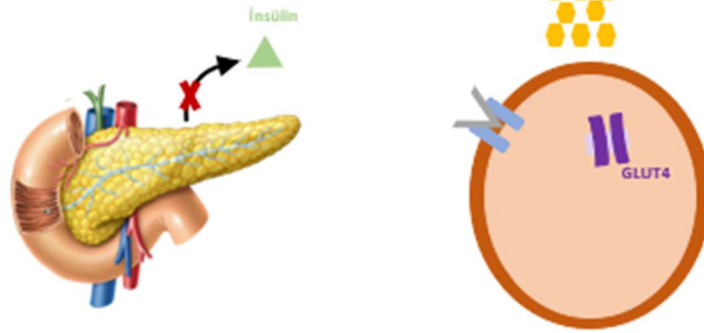
Gestasyonel Diyabet: Gebeliğin özellikle iki veya üçüncü trimester dönemlerinde görülen diyabet tipidir. Genellikle ikinci trimester (14-26. haftalar) sonlarında ya da üçüncü trimester (27-40. haftalar) başlarında gelişen glikoz intoleransıdır. Gestasyonel diyabet çoğunlukla doğumdan sonra iyileşmenin görüldüğü bir diyabet türüdür (25).

Diğer Spesifik Diyabet Tipleri: Diyabet tiplerinin hepsi daha önce bahsedilen bu üç tanıma uymayabilir. Bunlar genellikle, beta hücre fonksiyonunu etkileyen genetik bozukluklar, insülinle ilişkili genetik bozukluklar, pankreasta egzokrin bozukluklar, endokrinopatiler, enfeksiyon veya ilaç/kimyasal nedenli bozukluklar şeklinde sıralanabilen nedenlerden kaynaklanabilen çeşitli spesifik diyabet türleridir (26).

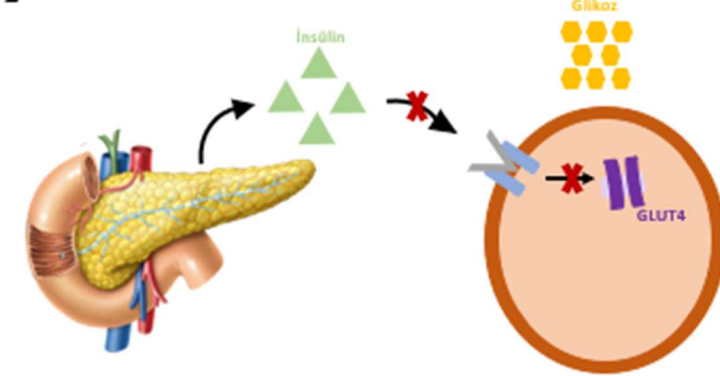
Sağlıklı



Tip 1



Tip 2

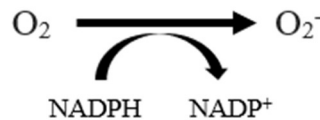


Şekil 2.1. Diabetes Mellitus sınıflandırması

2.1.4. Patofizyolojisi

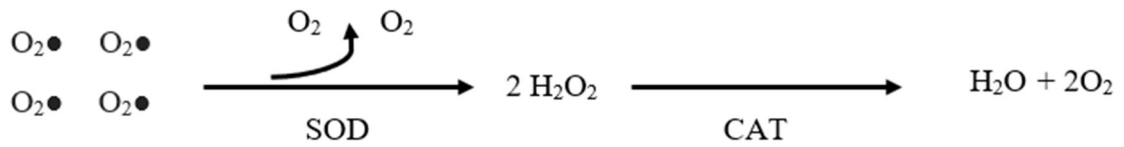
Tip1 Diyabet Patofizyolojisi: Daha önce de belirtildiği üzere diyabetin bu tipi beta hücrelerinin bağışıklık aracılı hasarı veya kaybı ile ortaya çıkar. Tip1 Diyabet'in patofizyolojik seyri organizmanın reaktif T hücrelerini aktive ederek pankreas beta hücre antijenlerine karşı immün yanıt oluşturmaya başlar. Bunu, proinflatuar sitokinler salınımı takip eder. Tüm bu süreç otoreaktif (otoimmün) yanıt olarak adlandırılır ve düzenleyici nitelikte bir kontrol gerektirir. Ancak Tip1 Diyabette otoimmün yanıt hafifletici nitelikte etkin bir kontrol söz konusu değildir (27).

Tip2 Diyabet Patofizyolojisi: Tip2 Diyabette belirgin olarak insülin sekresyonundaki bozukluklar ve yetersizlikler ile periferik dokularda insülin duyarlılığındaki azalma (insülin direnci) nedeniyle meydana gelen kronik hiperglisemi tablosu yaygındır (28). Kronik hipergliseminin öne çıkan bu iki nedeni birbirinden bağımsız olarak değerlendirilemez. İnsülin sekresyonundaki bozulmalara pankreatik beta hücre disfonksiyonu ve ölümü neden olur. Beta hücrelerindeki bu fonksiyon bozukluğunun altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar oldukça karmaşık olup insülin direnci ile ilişkilendirilmiştir. Dengesiz ve aşırı beslenme sonucu kan glikoz düzeylerini arttırmasıyla insülin üretmek üzere beta hücrelerinin sürekli uyarılması ve gerçekleşen aşırı insülin sekresyonu bu karmaşık sürecin başlangıcı olarak nitelendirilebilir (29, 30). Buna eşlik eden obezite ve aşırı beslenme nedeniyle hiperlipideminin kronik inflamasyonu desteklemesi de süreci hızlandırarak lipotoksiste, glikotoksiste, ER stresi, oksidatif stres ile Reaktif Oksijen Türleri (reactive oxygen species; ROS) üretimi gibi daha kompleks hale getirir (29, 30). Kompleks hale gelmiş bu süreçte en güçlü stres ROS üretimidir. Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) kararlı O_2 'lerin süperoksit (O_2^-) dönüştürülmesine neden olan oksidatif süreçte dikkat çeker (31). Bu dönüşümü kararlı oksijenin (O_2) indirgenmesini sağlayan hidrit iyonu (H^-) (veya elektron da denilebilir) ile gerçekleştirir (32)(Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. NADPH tarafından oksijenin indirgenmesi

Tüm bunlar insülin direncini indüklerken öte yandan bunlara neden olan obezitenin ve visseral yağ dokusunun da insülin direncine katkısı göz ardı edilemez. İnsülin direnci beta hücrelerinin daha fazla insülin üretimine neden olur (33). İnsülin direncinin baş gösterdiği koşullarda zaten fonksiyonlarını yitirmiş olan beta hücreleri, insülin hipersekresyonu ile hücre ölümüne varabilen katabolik bir sürece girer. Beta hücre kayıpları organizmada insülin sekresyonu yetersizlikleri neden olur. En nihayetinde beta hücre disfonksiyonu/kaybı ve insülin direnci kronik hiperglisemiye ve tip 2 diyabet tablosunun oluşmasına neden olur. (33). Her inflamatuvar süreç gibi bu süreç de bir takım inflamatuvar yanıtlarla sonuçlanır. Süreç kadar karmaşık olan bu yanıtta, Süperoksit Dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler öne çıkar. Oksidatif strese oluşturulan primer savunma hattı olan SOD, ROS'nin katalize edilmesinden sorumlu bir antioksidan enzimdir (34, 35). Oksidatif streste üretilen ROS'ni oksijen ve hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürmesi ile karakterizedir (34, 35). CAT ise SOD ile oluşan bu H_2O_2 'i su (H_2O) ve serbest (kararlı) O_2 'e dönüştüren antioksidan enzimdir (36)(Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Radikal oksijenlerin SOD ve CAT tarafından su ve serbest (kararlı) oksijenlere dönüştürülmesi. ($O_2^{\bullet}$: Radikal oksijen; O_2 : serbest (kararlı) oksijen; SOD: Süperoksit Dismutaz; H_2O_2 : Hidrojen peroksit; CAT: Katalaz; H_2O : Su)

Oksidatif strese oluşturulan yanıtta antioksidan enzimlerin yanında indirgenmiş glutatyon (GSH)'un rolü de dikkat çekmektedir. GSH'un antioksidan koruma mekanizmasındaki önemi peroksidazlar gibi antioksidan enzimler için önemli bir kofaktör olmasıdır (37).

Diyabetteki inflamatuvar süreç ve yanıtta dikkat çeken bir molekül de malondialdehit (MDA) seviyeleri eşlik eder. MDA ROS'nin neden olduğu hücre zarı ve organellere zarar veren lipid peroksidasyonu sürecinin son ürünüdür (38). Bu molekülün dikkat çekici yanı lipid peroksidasyonu için bir biyomarker niteliği almış olmasıdır (39). DM ile ilgili yapılan güncel çalışmalarda ve önemli bir parametre olarak MDA'nın yer alması dikkat çekmiştir (40, 41)

Gestasyonel Diyabet Patofizyolojisi: Gestasyonel Diyabet diğer üç tip DM şeklinde de seyredebilir. Yani Tip1 Diyabet gibi otoimmün kaynaklı, Tip2 Diyabet gibi insülin duyarsızlığına bağlı veya diğer spesifik türler gibi genetik mutasyonlar, endokrinopatiler veya ilaç kullanımına bağlı gelişebilir. Gestasyonel diyabet vakalarının büyük çoğunluğu insülin duyarsızlığına bağlı meydana gelen DM olarak kendini gösterir.(42)

Diğer Spesifik Diyabet Tiplerin Patofizyolojisi: Birbirine benzer veya farklı birçok kompleks patogeneze sahip olduklarından bu gruba giren diyabet tiplerinin patofizyolojisini açıklamak bahsetmek oldukça zordur.

2.1.5. Nedenleri ve Risk Faktörleri

Diyabet kompleks patofizyolojiye sahip metabolik bir hastalıktır. Sadece bu bilgiyle yola çıkıldığında bile birçok nedeni olabileceği anlaşılabılır. Diyabetin en önde gelen nedeni olarak azalan fiziksel aktivite ve artan sedanter yaşam tarzı ile bunlara bağlı gelişen obezite öne çıkmaktadır (43). Öyle ki bu iki parametre diyabet için değiştirilebilir risk faktörü olarak tanımlanmış olup artan fiziksel aktivitenin ve ağırlık kaybının DM riskini azaltabileceği gösterilmiştir (44). Bununla beraber beslenme durumunun da DM ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Tip2 Diyabet tanılı bireylerin beş ana besin grubundan (tahıllar, meyveler, sebzeler, et ve süt ürünleri) tüketmeyerek besin çeşitliliği bakımından fakir bir diyetle beslendiği ortaya konmuştur (45). Tüm bunlara ilaveten ilerleyen yaş ve ailede diyabet öyküsünün bulunması faktörlerinin de DM için bir risk teşkil ettiği görülmüştür (46). Ryan Ng ve arkadaşları yatıkları bir çalışmada diyabete neden olabilen risk faktörlerine alkol ve sigara tüketimi ile stresi de eklemiştir (47).

2.1.6. Semptomlar ve Klinik Bulguları

DM birçok semptom ve klinik bulguya sahip bir hastalıktır. Bunların başında sık sık idrara çıkma (poliüri), aşırı susama/su içme (polidipsi) ve aşırı yemek yeme (polifaji) gelir (48). Bu semptomlara polifajiye rağmen tanımlanamayan kilo kayıpları ve polidipsiyi tetikleyici ağız kurulukları eşlik eder. İlaveten yorgunluk, halsizlik, gerginlik ve sinirlilik hali de DM semptomları arasında yer alır. Özellikle genital bölgede, idrar yollarında, ciltte, ağız boşluğunda ve ayaklarda tekrarlı seyreden enfeksiyonlar görülür. Hatta ayaklarda bu enfeksiyonlar nedeniyle geç iyileşen veya iyileşmeyen yaralar, enfeksiyondan bağımsız yanma, ağrılar ve uyuşmalar da görülebilir. Bunun yanı sıra ciltte de özellikle koltuk altı, boyun ve kasık gibi bölgelerde kadifemsi koyu lekeler DM

göstergesi olabilir. Tüm bunlara ek olarak DM görüşte azalma ve çeşitli görme bozuklukları ile iktidarsızlık ve erektil disfonksiyon gibi çeşitli üreme sistemi bozuklukları ile kendini gösterebilmektedir (49).

2.1.7. Tanı Kriterleri

ADA, DM tanı kriterlerini Tablo 2.1’deki gibi tanımlamıştır (50).

Tablo 2.1. ADA’ya göre diyabetin tanı kriterleri (50)

APG ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L). (Açlık, en az 8 saat boyunca kalori alınmaması olarak tanımlanır) *
VEYA
OGTT sırasında 2 saatlik PG ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) (Test, suda çözölmüş 75 g susuz glikoz eşdeğerini içeren bir glikoz yükü kullanılarak, DSÖ tarafından açıklandığı şekilde yapılmalıdır.) *
VEYA
A1C ≥ 6.5 (Test, Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) onaylı Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları Çalışması (DCCT) göre standardize edilmiş bir yöntem kullanılarak bir laboratuvar da gerçekleştirilmelidir.) *
VEYA
Klasik hiperglisemi veya hiperglisemik kriz semptomları olan bir hastada, rastgele bir PG ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L).

DCCT, Diyabet Kontrolü ve Komplikasyon Çalışması; APG, Açlık Plazma Glukozu OGTT, Oral Glukoz Tolerans Testi; NGSP, Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı; DSÖ, Dünya Sağlık Örgütü; PG, Plazma Glukozu; A1C, Hemoglobin A1C (glikozillenmiş hemoglobin). (*Kesin hipergliseminin yokluğunda, teşhis için aynı numuneden veya iki ayrı test numunesinden alınan iki anormal test sonucu gerekir.)

2.1.8. Mevcut Tedavi Yöntemleri

DM için mevcut tedavi yöntemlerinin başında egzersiz ve sağlıklı beslenmeyi temel alan yaşam tarzı ve davranış değişiklikleri gelmektedir. Egzersiz ve sağlıklı beslenme DM komorbiditelerinden olan obezitenin de önlenmesinde önem taşır. Tedavi hedeflerinden bir diğeri de obezite, hipertansiyon ve dislipidemi/hiperlipidemi gibi DM komorbiditelerinin yönetimidir. Bu da temelde yaşam tarzı ve davranış değişiklikleri ile sağlanmaktadır (51, 52). Bunun yanı sıra başta metformin olmak üzere çeşitli ajanlar ile

farmakolojik müdahaleler de DM için tedavi yaklaşımlarındandır (51, 52). Tüm bunlara ilaveten düzenli olarak glikoz takibinin yapılması ile glisemik kontrolün değerlendirilmesi ve düzenlenmesi de DM yönetimi ve tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Glisemik kontrol sürekli glikoz görüntüleme, PG takibi ve A1C takibini kapsar ve glisemik hedeflerin korunmasını sağlar (51, 52).

2.1.9. Komplikasyonları

DM komplikasyonları mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olmak üzere iki başlıkta toplanabilir. Mikrovasküler komplikasyonlar nöropati (sinir sisteminde nöronal hasar), nefropati (böbrekte nefron hasarı) ve retinopati (gözde retinal hasar) gibi doku, organ hatta sistem düzeyinde hasarları ve buna bağlı olarak meydana gelen ciddi hastalıkları kapsar. Makrovasküler komplikasyonlar ise kardiyovasküler hastalıkları, perifer vasküler hastalığı ve inmeyi kapsar (1, 2). Bu komplikasyonlar arasında mikrovasküler komplikasyonların görülme sıklığı daha fazladır. Mikrovasküler komplikasyonlar arasından da nöropati yüksek prevalans ile öne çıkmıştır (3).

2.2. Diyabetik Nöropati

2.2.1. Tanımı

DN hiperglisemi nedenli nöronal hasar olarak tanımlanabilen diyabetin yaygın bir komplikasyonudur. Heterojen bir hastalık grubu olarak da nitelendirilmesi mümkün olan bu komplikasyon duysal, otonomik ve fokal olmak üzere üç temel başlıkta incelenebilmektedir. En yaygın tiplerinden olması bakımından Diyabetik Periferik Nöropati (Diabetic Periferic Neuropathy; DPN) öne çıkmaktadır (53).

2.2.2. Epidemiyolojisi

Diyabetik nöropatiler arasında en az görülen Diyabetik Fokal Nöropati (Diabetic Focal Neuropathy; DFN) tüm diyabetik nöropatilerin yaklaşık %5.8'ini oluşturmaktadır (53). Bir diğer diyabetik nöropati olan Diyabetik Otonomik Nöropati (Diabetic Autonomic Neuropathy; DAN), DFN'ye nispeten daha yaygın görülmektedir. DAN gastrointestinal kanal, akciğerler ve genitoüriner gibi birçok organ veya sistemleri etkileyebilmesi ile beraber en yaygın görülen DAN kalp ve dolaşım sisteminin etkilendiği Kardiyovasküler Otonomik Nöropati (Cardiovascular Autonomic Neuropathy; CAN)'dir (54). CAN diyabet vakalarının yaklaşık %20'sinde görülebilmektedir (54).

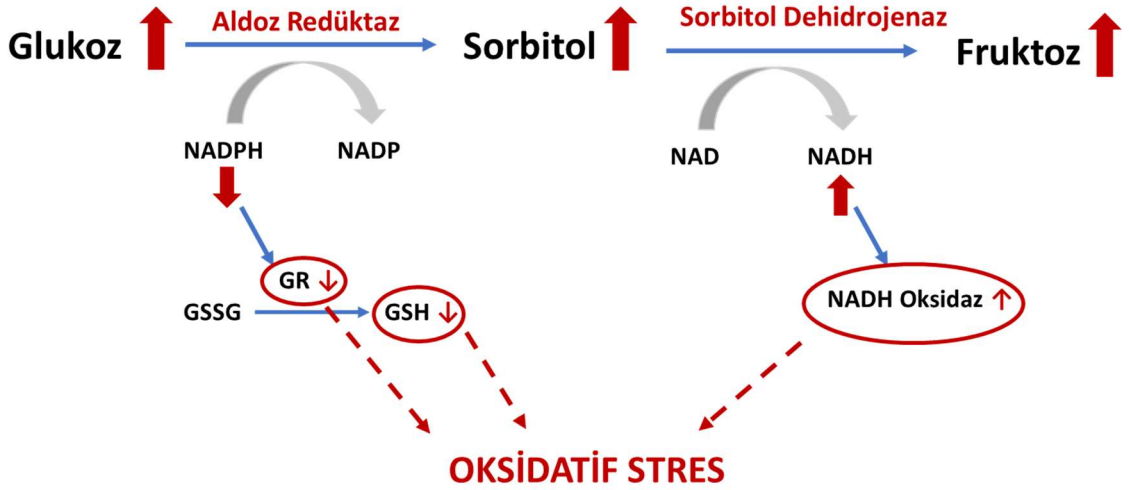
Daha önce de bahsedildiği üzere diyabette en sık görülen nöropati DPN olup tüm hastaların neredeyse yarısında görülen bir komplikasyon olması dikkat çekmektedir. %50 gibi ciddi bir prevalansa sahip olmak DPN'yi öne çıkarmaktadır (53). Bu oranın %60-70'lere varabileceğini söylemek de mümkündür (55). Güncel çalışmalar çeşitli ülkelerdeki genel DPN prevalansının %26.71 gibi ciddi bir orana ulaştığına (56) ve zamanla artış gösterdiğine dikkat çekmiştir (57).

2.2.3. Patofizyolojisi

Diyabetik nöropati, adı ile anlaşılacağı üzere diyabet nedenli nöronal hasar olarak tanımlanabilir. Hipergliseminin tetiklediği bu hasardan özellikle duyuşal nöronları etkilediği bilinmektedir. Diyabetik nöropati patofizyolojisinin altında yatan hücreşel mekanizmalara yakından bakıldığında “Polişol Yolu, Protein Kinaz C (PKC) Yolu ve Gelişmiş Glikasyon Son Ürünleri (AGE'ler)” dikkat çeker.

Polişol Yolu

İdeal glisemik koşullarda hücrelere (duyuşal nöronlara) ileşilen glikoz heşzokinaz adı verilen enzim ile fosforile edilir. Hiperglisemik koşullarda ise hücrelere (duyuşal nöronlara) aşırı glikoz girişı bu enzimin glikoza doymasına ve birken glikozu hızlıca fosforile edememesine neden olur. Bu durumda heşzokinaz ile fosforile edilemeyen fazla glikoz “Polişol Yolu” adı verilen alternatif metabolik yola yönlendirilir (58). Bu yolda glikoz Aldoz Redüktaz (AR) adlı enzimle sorbitole dönüştürölür (59). AR bu aktivitesini NADPH'ı tüketerek aktivitesini gerçekleştirir. NADPH önemli bir antioksidan enzim olan ve Glutasyon Disülfıt (GSSG)'un GSH dönüşümünü sağlayan Glutasyon Redüktaz (GR)'ın kofaktörüdür. Dolayısıyla NADPH'ın tükenmesi GR inhibisyonu ile GSH seviyelerinin azalmasına ve buna bağlı olarak serbest radikallerin birikmesiyle oksidatif strese neden olur (59, 60). Glikozun sorbitole dönüşümü ardından Sorbitol Dehidrojenaz (SDH) adlı enzim sorbitölü fruktoza dönüştürür. Bu dönüşüm sırasında ise Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD)'den Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidrojen (NADH) oluşur. NADH, NADH Oksidaz'ın substratı olduğundan bu oluşum ile süperoksit anyon üretimine neden olarak oksidatif strese katkı sağlar (59, 61). Polişol yolu Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Poliyol yolunun metabolik aktivitesi

Ayrıca Ozmotik Hipotez adlı bir hipoteze göre tüm bunların yanı sıra sorbitol dehidrojenaz bulunmayan doku ve/veya hücrelerde (Schwann hücreleri, böbrek ve retina dokuları gibi) fruktoza dönüştürülemeyen sorbitolün birikiminin meydana geleceğini ve bu durumun hücrede ozmotik strese neden olacağını öne sürmüştür (62).

Protein Kinaz C Yolu

Hiperglisemi nedenli aşırı glikoz artışı glikoz metabolizmasında glikolitik yolun yetersiz kalmasına ve alternatif yolların kullanılmasına neden olmaktadır (62). Bu alternatiflerden birinde de hücre içerisine alınan glikoz Fruktoz 6-Fosfat (F-6-P)'a, F-6-F Gliseraldehit 3-Fosfat (G-3-P)'a ve G-3-P da Diaçilgliserol (DAG)'e dönüştürülür. DAG, PKC Yolu'nu aktive eder. PKC Yolu $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz pompasında değişikliklere neden olur (63). Bu durum nöronlarda sinyalleşme bozuklukları ile sonuçlanır. İlaveten çeşitli enzimatik aktivite değişikliklerine, kan akışında bozukluklara ve hücre büyümesinde anomalilere neden olur (64).

Gelişmiş Glikasyon Son Ürünleri

AGE organizmada şekerlerin (özellikle glikoz ve fruktoz) proteinler, lipidler ve nükleik asitler ile oluşturduğu bir grup olarak tanımlanabilir. Bir başka deyişle AGE glikozillenmiş protein, lipid ve/veya nükleik asitlerdir (65). Organizmada bu bileşenlerin glikozillenmesi temelde hiperglisemi varlığı ile tetiklenir. Maillard Reaksiyonu olarak bilinen bu olay non-enzimatik glikasyon sürecidir. Bu süreç hücrede aşırı miktarda glikoz

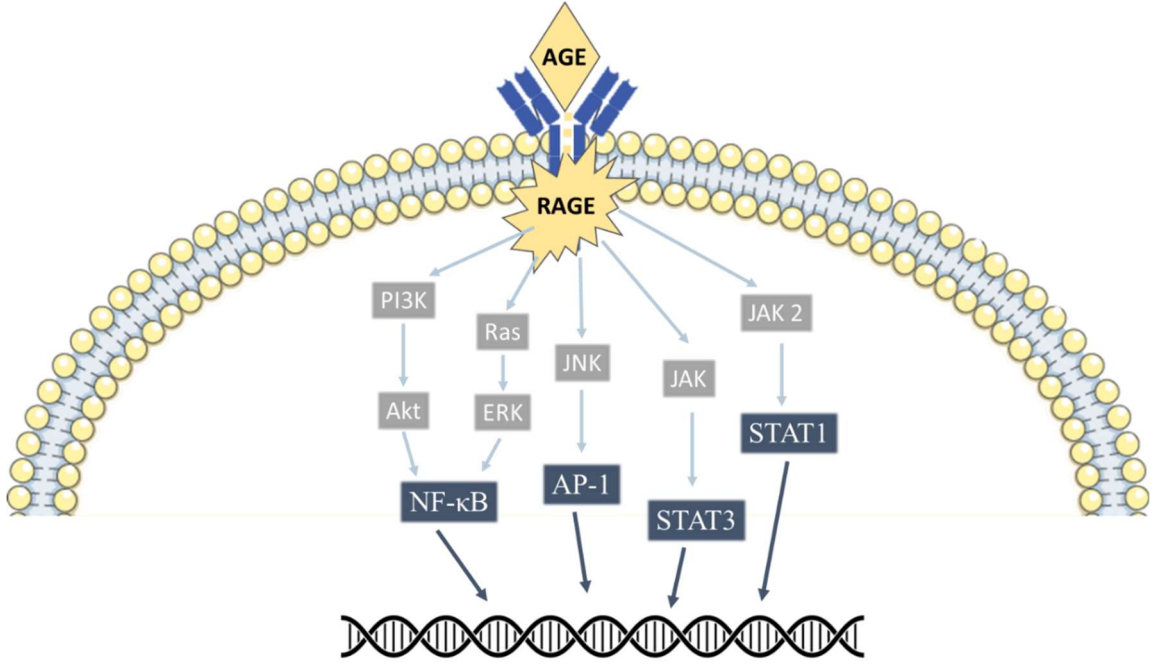
artışı ile başlar. Glikoz, enzimatik olmayan yollarla protein, lipid ve/veya nükleik asitlerle birleşerek Schiff Bazı adı verilen kararsız yapıda bir biyomolekölü oluşturur. Bu kararsız yapı daha kararlı forma dönüşmek üzere Amadori adı verilen yeniden düzenleme ürünlerine dönüşür. Amadori ürünleri de oksidasyon ve dehidrasyon ile AGE'leri oluşturur (66). AGE'lerin oluşumu Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. AGE oluşumu

AGE'ler AGE reseptörlerine (RAGE) bağlanarak inflamasyonla ilişkili bir dizi sinyal yolu aktivitesine yol açar. Bu yollar arasında Fosfoinositid 3-Kinaz (PI3K)- Protein Kinaz B (Akt) ve Ras- Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz (ERK) yolu ile Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)'nin, Janus Kinaz- Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü (JAK-STAT) yoluyla STAT1 ve STAT3'ün ve c-Jun N-Terminal Kinaz (JNK) yoluyla Aktivatör Protein 1 (AP-1)'in üretimi öne çıkar. Bu yollar aracılığıyla üretilen biyoürünler hedef genlerin genomik bölgelerine bağlanarak gen ekspresyonu seviyesinde değişikliklere ve inflamatuvar yanıtın oluşturulmasına neden olur (67, 68). Bu yollar arasında ilk olarak RAGE tarafından PI3K'nın aktive edilmesi ile Akt fosforilasyonunun gerçekleşmesi ve bu olay sonucunda NF- κ B'nin üretimi öne çıkar.

AGE'lerin sinyal yolu aktiviteleri Şekil 2.6' da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. AGE’lerin sinyal yolu aktiviteleri

DN, farklı paternler şeklinde ortaya çıkabilir. Hasar öncelikle duyu nöronlarında meydana gelir. Bu hasarlar pozitif semptomlar ile negatif semptomlara sebebiyet verir (69). Yapılan çalışmalar tüm birincil duyu nöronlarının diyabet tarafından hedef alındığını göstermektedir (4). Araştırmalar duyu nöronlarında programlanmış hücre ölümünün, nöropatik ağrının tetiklenmesinde çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir (70). Somatosensoriyel sistemde rol alan birincil duyu nöronlarının hücre gövdeleri, DKG’nda bulunur (5). Diyabet gibi metabolik hastalıklar, DKG nöron hasarına ve kaybına neden olur (6). Deneysel çalışmalar, DKG nöron apoptozunun, diyabetik nöropati sonucu oluştuğunu göstermiştir (71).

2.2.4. Dorsal Kök Ganliyonları ve Diyabetik Nöropati

DM sonucu gelişen yüksek kan şekeri seviyeleri, DKG nöronlarında oksidatif baskı, pH dengesizlikleri gibi etkilere yol açar (72, 73). Ağrı algısıyla ilgili hücresel çalışmalarda, DKG hücreleri, ağrının hücresel mekanizmasının anlaşılması için sıkça kullanılan *in vitro* modellerde önemli bir rol oynar (74, 75). Normal koşullarda, DKG nöronları kendiliğinden aksiyon potansiyeli üretmezler. Bazı hücre çalışmaları, periferik sinir hasarından sonra DKG hücrelerinin uyarılabilirliklerinin arttığını ve anormal spontan aktivite sergilediğini göstermektedir (76-78). Primer nöronların 45 mM glukoz seviyelerine maruz kalması, ROS üretimini hızlandırarak önce mitokondriyal membranın

hiperpolarizasyonuna, ardından mitokondriyal membranın depolarizasyonuna, mitokondriyal işlev bozukluğuna, kaspaz-3 ve 9 aktivasyonuna ve nöronal apoptoza yol açar.

Schwann hücreleri, DKG nöronları ve aksonlarında, glukoz ve yağ asitleri üzerinden NADH ve İndirgenmiş Flavin Adenin Dinükleotidi (FADH₂) üreten glikoliz ve trikarboksilik asit döngüsü (glukoz) ile β oksidasyon (yağ asitleri) yoluyla enerji üretirler. Uzun zincirli yağ asitleri, Schwann hücrelerine taşınarak her bir β oksidasyon döngüsünde, NADH ve FADH₂ oluşturmak için trikarboksilik asit döngüsüne taşınan bir asetil KoA molekülü oluşturur. Ancak, diyabet durumlarında olduğu gibi, fazla substrat yüklenmesi durumunda, taşıma sistemi doygun hale gelir ve asetil KoA molekülleri açılıkarnitinlere dönüşür. Bu biriken açılıkarnitinler, hem Schwann hücreleri hem de DKG nöronları için zararlıdır ve sinir sistemi hasarına katkıda bulunur. Bu açılıkarnitinler, Schwann hücrelerinden salınarak mitokondrial disfonksiyon ve buna bağlı stres tepkilerinin aksonal dejenerasyonunu tetiklediği öne sürülen durumları içerebilir (79). NADH ve FADH₂, mitokondri içinde kompleks I-IV aracılığıyla ATP sentezi için oksidatif fosforilasyon yoluyla taşınır. Oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünü, düşük düzeyde ROS üretimidir ve bu ROS, doğal hücrel antioksidanlar olarak süperoksit dismutaz, glutatyon ve katalaz gibi maddeler tarafından kolayca etkisiz hale getirilir (80-83).

2.2.5. Nöropatik Ağrının Etiyolojisi

Nöropatik ağrı, pek çok farklı nörolojik sorunun periferik veya merkezi sinir sistemini etkilediği bir durum olabilir (84). Ancak, tüm nöral rahatsızlıklara veya lezyonlara sahip hastalarda nöropatik ağrı ortaya çıkmayabilir. Nöropatik ağrının türü ve şiddeti, özellikle diyabetik polinöropati veya sinir lezyonlarına sahip hastalar arasında belirgin bir şekilde değişiklik gösterebilir (85). Nöropatik ağrı, lezyonun yeri veya temel hastalığa bağlı olarak merkezi veya periferik sendromlara ayrılabilir. Merkezi nöropatik ağrı koşulları daha az anlaşılır ve temel mekanizmaları farklılık gösterebilir, bu yüzden ayrı bir değerlendirme gerekebilir (86). Ayrıca, periferik sinir hasarı, somatosensoriyel sistemde sürekli uyumsuzluk olarak kendini gösterir, yapısal ve işlevsel tepkilerin oluşumunu tetikler. Bu nedenle periferik nöropatik ağrı, hem periferik hem de merkezi mekanizmalardan kaynaklanır. Klinik belirtiler arasında duyu kaybı, kendiliğinden ağrı, allodini (ağrısız uyarana karşı ağrı hissi) ve hiperaljezi (ağrılı uyarana aşırı duyarlılık) gibi faktörler bulunur (87). Periferik sinir sistemi hasarı, omuriliğe iletilen sinyal miktarında

azalmaya, gen ifade modellerinde ve iyon kanalı özelliklerinde ektopik aktiviteye neden olan değişikliklere yol açar. Merkezi sinir sisteminde (MSS) ise spinal, talamik ve kortikal düzeylerde gelişen sinaptik iletim ve disinhibisyon, merkezi işlemeyi artırır. İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, nöropatik ağrılı hastalarda bazı bu mekanizmaların açığa çıktığı görülmüştür (88-90).

Periferik sinir hasarı sonrası nörodejenerasyon, periferik ve MSS arasındaki bağlantıyı bozar ve sonuç olarak duyu kaybına yol açar (90). Yanıcı, sürekli ağrı gibi devam eden ağrı, nöropatik ağrı sendromlarının en yaygın ve en rahatsız edici özelliği olarak kabul edilir (91). Devam eden ağrının ortaya çıkmasında, artmış sinaptik iletim spinal nöronlarda, ikincil nöronların artmış içsel uyarılabilirliği ve nosiseptif yollar içinde ektopik aksiyon potansiyeli gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (92, 93).

2.3. Metrnl

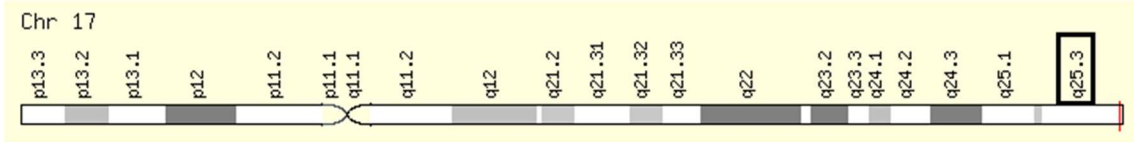
2.3.1. Keşfi ve Lokalizasyonu

İnsan genomu, yaklaşık 20687 gen içeren bir yapıdır, bu genler protein kodlaması yapmaktadır (94). Ancak, bu genlerin çoğunun ifade kalıpları ve işlevleri hakkında bilgi yeterli bilgi bulunmamaktadır (9). İşlevsel ve yeni proteinleri keşfetmek için kullanılan ileri düzey biyoinformatik yöntemler ile bulunan Metrnl geni ilk defa 2008 yılında ortaya çıkarılmıştır. (11, 95-97). Tam olarak tanımlanması ise 2012 yılında Jorgensen ve ekibi tarafından nörotrofik işlevi açısından Metrnl'e benzediğini ifade edilerek yapılmıştır (10).

Meteorin adı, glial hücreleri meteorlara benzeyen uzun kuyruklu hücrelere dönüştürme işlevinden dolayı gelmektedir (98). Metrnl, aminoasit dizi benzerliğinden dolayı meteorin adını almıştır (11). Çünkü Metrnl, homoloğu olduğu Metrnl'e yaklaşık olarak % 40 oranında benzerlik göstermektedir (99). Metrnl için literatürde ayrıca Subfatin, IL-41, Cometin, Metrnlβ gibi alternatif isimler yer almaktadır (10, 11, 100, 101). Başlangıçta Metrnl, IL-39 olarak da adlandırılmıştır (102), ancak yapılan çalışmalar sonucunda IL-39'un IL-12 ailesine ait olduğu belirlenmiştir (103).

Yapılan çalışmada Metrnl'in insan ve farede 45 NH₂-terminal sinyal peptidi ve 266 ön dizisi olmayan toplamda 311 aminoasitten oluştuğu, insan ve fare genlerinin karşılaştırılmasında ise 239 aminoasit benzerliği ile yaklaşık %77 oranında özdeş olduğu ifade edilmiştir (Şekil 2.7.) (10, 11). Aynı çalışmada Metrnl'in yaklaşık olarak 30 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu bildirilmiştir (10). Metrnl'in ifade edilen bu geninin,

farede 11qE2 kromozomunda iken insanda 17q25.3 kromozomunda olduğu belirtilmiştir (Şekil 2.8.) (10, 104). Bu gen her ne kadar başlangıçta Metrn'e benzer bir protein olarak belirtilse de, Li ve arkadaşları Metrn'in adipoz dokuyla ilişkili olduğunu rapor etmiştir (11).



Şekil 2.7. Metrn'in insan kromozomundaki lokalizasyonu (10, 104).

Metrn'in insan serumunda seviyesi yaklaşık olarak 300 pg/ml olarak belirlenmiştir, farelerde ise bu seviye 2500 pg/ml olarak ölçülmüştür (105, 106).



Şekil 2.8. Fare, sıçan ve insanda Metrn gen dizilimi özdeşliği (10, 11).

Metrn, lokalizasyon olarak deri ve adipoz dokuda yüksek düzeyde salgılanmaktadır (102, 107). Ek olarak iskelet kası, testis, böbrek, karaciğer, kalp, stromal hücreler, makrofajlar, dalak ve beyin gibi çeşitli dokularda da varlığı ifade edilmiştir (11, 12, 107). Yakın zamanda da Metrn'in kan beyin bariyerini geçen nörotrofik bir adipomiyokin olduğu ortaya konmuştur (108).

2.3.2. Etki Mekanizması

Metrn'in farklı alanlarda yapılan çalışmalarında çeşitli yolları kullanıldığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada izole edilen DKG'na Metrn ve homologu Metrn farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 3, 10, 100 ve 300 ng/ml) 24 saat süre ile uygulanmış ve nörit büyümesini teşvik ettiği rapor edilmiştir (10). Nörit büyümesinin yanı sıra nöroblast

göçünü de desteklediğini ve nörotrofik bir faktör olduğu ifade edilmiştir (10). Metnrl'in bu nörotrofik işlevlerini JAK-STAT3 ve MEK-ERK kinazları aracılığıyla gerçekleştirdiği ortaya çıkarılmıştır (10).

Hücrel işlev için bir hazırlık aşaması olarak sinyal iletimini ve gen ifadesini içeren gizli bir süreç (LP) ihtiyaç vardır. Bu süreçte ait genlerin belirlenmesi için yapılan *in vitro* bir çalışmada Metnrl'nin bir LP geni olduğu bildirilmiştir (109). Nöronal farklılaşma davranışının incelenmesinde yaygın olarak kullanılan sıçan feokromositoma PC12 hücre hatları ile yapılan çalışmada (97) LP genleri transfekte edilerek hücrelerin ekzojen sinir büyüme faktörüyle inkübasyonu sağlanmış. Inkübasyon öncesi ve sonrası LP genlerinin lokalizasyonu ölçülerek bulunduğu yerler saptanmış ve öncesinde hücre gövdesinde olan Metnrl, inkübasyon sonunda nörit terminallerinde görülmüştür. Bu durum bize Metnrl'in LP geni olduğunu ve JAK-STAT3/MEK-ERK yolları dışında hücre boyutunda da etkili olduğunu göstermektedir (109).

Adipoz dokuda fazla miktarda ekspresyon edilmesinden dolayı Subfatin olarak da adlandırılan Metnrl'in (11) hücre kültürü modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada adipogenez üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Metnrl'in 3T3-L1 preadipositlerinde farklılaşma indüksiyonunu ve lipid birikimini desteklediği gösterilmiştir (13). Ayrıca Metnrl'in aşırı ekspresyonu, adipositlere farklılaşmanın indüklenmesinden sonra birincil fare embriyonik fibroblastlarında ve C3H/10T1/2 hücrelerinde peroksizom-proliferatörle aktive olan reseptör gamma (PPAR- γ) ekspresyonunu artırmıştır (13).

Aynı çalışmanın *in vivo* basamağı için Metnrl'in adiposit-spesifik ablasyonu ile transgenik fareler üretilerek normal yağlı yem (NYY) ve yüksek yağlı yemle (YYY), besledikten sonra 2 farklı PPAR- γ inhibitörüne maruz bırakılmıştır. YYY yiyen gruptaki farelerin Metnrl'in insülin duyarlılaştırıcı etkisinin ortadan kalktığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler adiposit Metnrl'in adiposit farklılaşması, metabolizma aktivasyonu ve inflamasyon inhibisyonu dahil olmak üzere adipoz fonksiyonunu iyileştirerek obezite kaynaklı insülin direncini antagonize ettiğini ve bunu PPAR- γ yoluyla gerçekleştirdiğini ifade etmektedir (13).

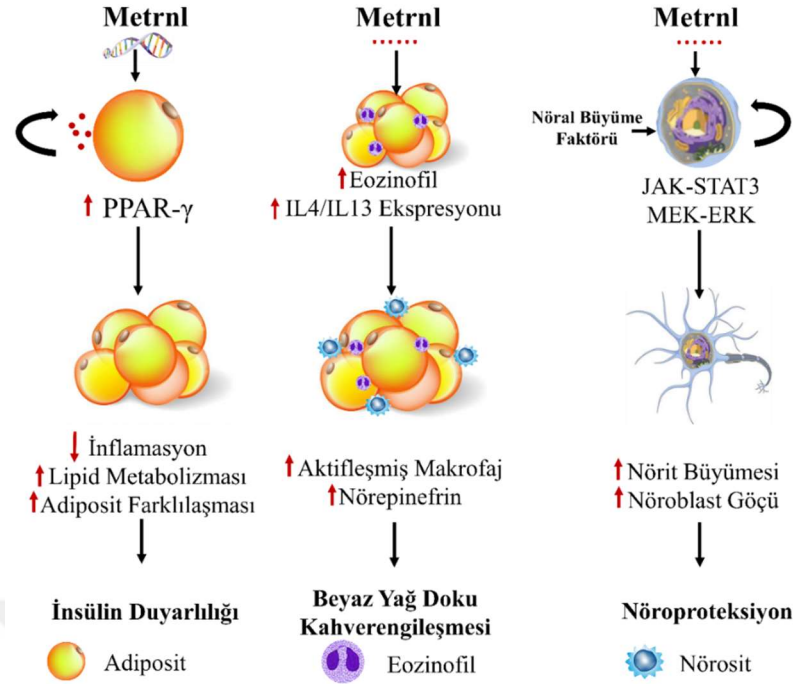
Beyaz yağın termojenezine katkıda bulunabilecek, peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama ortak aktifleştirici 1-alfa-4 (PGC-1 α 4) tarafından kontrol edilen yeni salgılanan faktörleri belirlemek için yapılmış bir çalışmada kasa özgü PGC-1 α 4 transgenik fareler (Myo-PGC-1 α 4) kullanılmıştır. Farelerin kuadriseps kasından izole edilen ve mRNA seviyelerinin yüksekliğine göre seçilen genler arasında olan Metnrl'in Myo-PGC-1 α 4 farelerinde transgenik olmayanlara göre mRNA seviyesinin

yaklaşık 4 kat fazla olduğu bildirilmiştir (12). Aynı çalışmada değerlendirilen egzersiz ve Metrnl ilişkisi için koşu egzersizi yaptırılan farelerin egzersizden sonraki gün dolaşımında ölçülen Metrnl seviyesinin 2 katına çıktığı rapor edilmiştir (12).

Metrnl ekspresyonunun soğuğa maruziyetteki değişkenliğinin belirlenmesi için fareler akut ve kronik olarak 4°C'ye tabi tutularak kahverengi, subkutan ve epididimal yağ dokularında ölçümler gerçekleştirilmiştir (12). Ölçümler sonucunda akut soğuk maruziyetinin üç yağ dokusunda da Metrnl gen ifadesini önemli ölçüde artırdığı, yapılan western blot ve ELİSA ile de dolaşımdaki Metrnl seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Genel olarak bu sonuçlar Metrnl'in egzersiz ve soğuğa fizyolojik adaptasyonlarda potansiyel bir rol oynadığını göstermektedir (12). Aynı çalışmada Rao ve arkadaşları Metrnl enjeksiyonunun kontrol olarak kullanılan Lac Z genine kıyasla enerji harcanmasını arttırdığını rapor etmişlerdir. Ek olarak Metrnl enjeksiyonunun termojenez ve mitokondriyal gen programlarıyla ilgili eşleşme bozucu protein 1 (UCP1), PGC-1 α 1 gibi belirteçlerin subkutan ve epididimal beyaz yağ doku mRNA seviyelerinde artış görülmüştür (12). Ayrıca subkutan beyaz yağ dokusunda eozinofil sayısı akış sitometrisi ile ölçülerek anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Bu eozinofil artışının bej yağ termojenik genlerinin ekspresyonunu uyaran IL-4/IL-13 sitokinlerinin ifadesini indüklediği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak Metrnl'in tüm vücut enerji harcanmasını UCP1 ve PGC-1 α 1 mRNA seviyelerini artırarak, eozinofil sayısındaki artışa bağlı sitokin ekspresyonunu uyarak termojenik yolla sağladığı rapor edilmiştir (12).

Bir başka çalışmada YYY ile beslenen farelerde Metrnl'in iskelet kasındaki ekspresyonunun ve dolaşımdaki seviyesinin azaldığı bildirilmiştir. YYY tüketiminin NYY ile beslenen hayvanlara göre glukoz toleransını belirgin şekilde arttırdığı ve insülin duyarlılığını azalttığı ortaya konmuştur (110). Tedavi olarak uygulanan Metrnl'in ise YYY'in neden olduğu glukoz toleransını ve insülin direncini iyileştirdiği rapor edilmiştir (110). Ayrıca, Metrnl uygulamasının, YYY'in neden olduğu vücut ağırlık artışını kalori alımını değiştirmeden azalttığı da gösterilmiştir. Palmitat ile muamele edilen ve YYY ile beslenen farelerin iskelet kası hücresi olan C2C12 miyositlerinde ve soleus kaslarında Metrnl tedavisinin palmitat kaynaklı enflamasyonu ve insülin direncini iyileştirdiği ortaya çıkarılmıştır (110). Bu etkiyi ise Adenosin Monofosfatla Aktifleştirilen Protein Kinaz (AMPK) ve PPAR- γ aracılı yolla PGC-1 α mRNA seviyesini artırarak sağladığı bildirilmiştir (110).

Metrnl'nin etki mekanizması Şekil 2.9'da şematize edilmiştir (9).



Şekil 2.9. Metrn1 etki mekanizması (9, 111).

Metrn1'in β hücre apoptozu ve proliferasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada fare insülinomasından üretilen ve pankreas β hücre özelliklerini gösteren MIN6 hücreleri kullanılmıştır (112). Akış sitometrisi analizi kullanılarak değerlendirilen farklı gruplarda Metrn1'in yüksek glikozun (YG) sebep olduğu β hücre apoptozunu ve kaspaz-3 ekspresyonunu iyileştirdiği rapor edilmiştir. YG inkübasyonu ile azalan β hücre proliferasyonunun Metrn1 tedavisinden sonra arttığı bildirilmiştir. Ayrıca hücre apoptozu ve proliferasyonu ile ilişkili olan WNT/ β -katenin yolağında YG uygulaması apoptozu teşvik etmiş ve β hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir. Metrn1 tedavisi ise, WNT/ β -katenin yolağı belirteçleri olan β -katenin ve Transcription Factor 4 (TCF4)'ün artan mRNA ve protein ekspresyonuna katkıda bulunmuştur. Bu da, Metrn1'in β hücre apoptozunu engelleyebileceğini ve WNT/ β -katenin yolu yoluyla β hücre proliferasyonunu destekleyebileceğini göstermiştir (112).

2.3.3. Fizyolojik Roller

Diyabet ve Obezite Üzerindeki Etkisi

Adiposit Metrn1'nin insülin duyarlılığına etki mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada Metrn1 yüksek doz transgenik farelerinde Metrn1'nin PPAR- γ aracılı yolla

insülin duyarlılığını sağladığı ve adiposit farklılaşmasını teşvik ettiği ortaya çıkarılmıştır (13).

Dört haftalık obez olmayan diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada kuyruk damarından intravenöz (iv) olarak 2 µg/fare/gün Metrnl uygulanmıştır. Hayvanlar 24 haftalık olduklarında, glutatyon s-transferaz (GST) ile tedavi edilen obez olmayan diyabetik kontrol grubunun %65'i diyabetik hale gelirken, Metrnl uygulanan grupta bu oran %35 olarak tespit edilmiştir. Hayvanlar 40 haftalık olduğunda ise, GST ile tedavi edilen farelerin %85'i diyabet olurken, Metrnl ile tedavi edilen farelerin %60'ının diyabetik hale geldiği ve diyabet gelişimini geciktirdiği rapor edilmiştir (113). Ayrıca langerhans adacıklarında yapılan histolojik incelemede Metrnl tedavisinin lenfosit infiltrasyonunu anlamlı olarak azalttığı görülmüştür. Aynı çalışmada tüm bunlara ek olarak Metrnl'in otoreaktif T hücrelerini baskıladığı ve sitokin üretimini de değiştirdiği bildirilmiştir (113).

Metrnl'in tüm dokular için metabolizmayı düzenleyerek obeziteyi iyileştirebileceği hipoteziyle yapılan bir çalışmada 16 hafta boyunca YYY ile beslenen ve obez yapılan C57BL/6 fareleri kullanılmıştır. Çalışma sonunda hayvanların serum, kas ve adipoz dokulardaki Metrnl seviyesinin obez farelerde düşük olduğu tespit edilmiştir (114). Obezite sonrası yaptırılan sekiz haftalık egzersizin ise Metrnl seviyesini YYY ile beslenen obez farelerde anlamlı olarak arttırdığı rapor edilmiştir (114). Metrnl ile yapılan bir başka çalışmada 12 hafta YYY ile beslenerek obezite modeli oluşturulan bir başka çalışmada ise subkutan adipoz dokuda Metrnl mRNA seviyesi kontrole kıyasla yüksek bulunmuştur (11).

Metrnl'in, beyaz yağ dokusunun esmerleşmesini, yağ dokusunun termojenezini, yağ dokusunun ayrışmasını hızlandırdığı ve insülin direncini iyileştirdiği belirtilmiştir. Bu durum da metabolik sendrom oluşumunda önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (115).

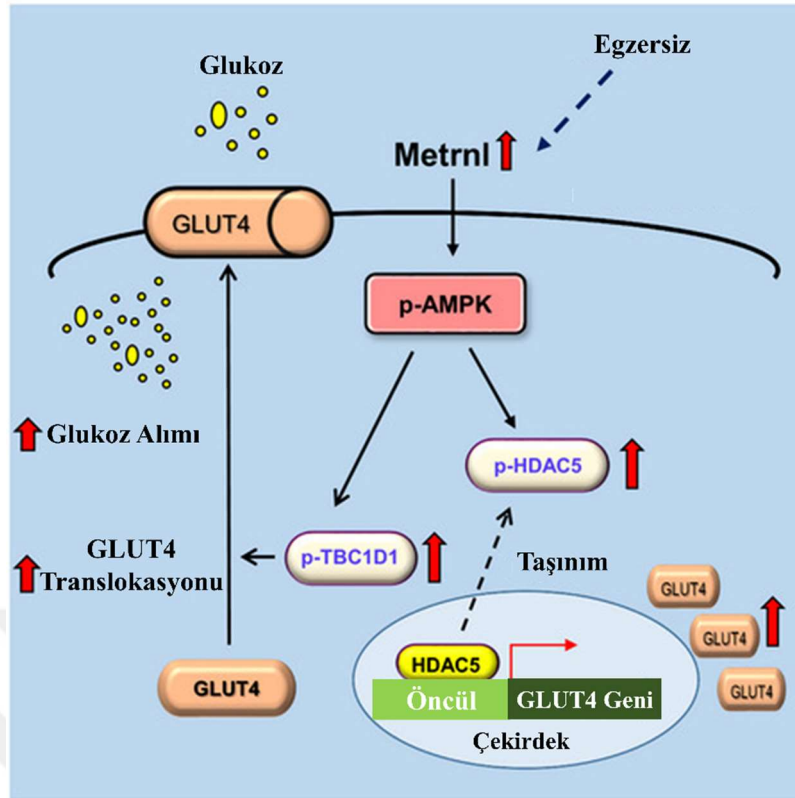
YYY ile oluşturulan obezite modelinde sekiz haftalık farelere sekiz hafta boyunca 2 µg/fare/gün dozunda iv olarak Metrnl uygulamasının, YYY'in sebep olduğu glukoz toleransı ve insülin direncini iyileştirdiği rapor edilmiştir (110).

Metrnl'in, tip 2 diabetes mellitus (T2DM) da dahil olmak üzere metabolik ve inflamatuvar hastalıklar için terapötik potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir (116). Bu bağlamda yapılan bir çalışmada T2DM tanısı almış ve normal glukoz toleransı (NGT)'na sahip bireylerde Metrnl etkisi incelenmiştir. Ölçülen serum Metrnl seviyelerinin T2DM'lularda, NGT'na sahip bireylere kıyasla yüksek olduğu belirtilmiştir

(116). Wang ve arkadaşları bu durumu insülin veya leptin direnci gibi metabolik stresle savaşmak için bir savunma mekanizması olabileceğini öne sürmektedir. Ayrıca bu yüksekliğin insülin direnci ile de korele olduğu rapor edilmiştir (116).

Metrl'nin glukoz homeostazi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada C2C12 fare iskelet kası hücrelerinde Metrl uygulaması, AMPK α 1/2 fosforilasyonunu doza ve zamana bağlı bir şekilde arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca Metrl'nin, farklılaştırılmış C2C12 hücrelerinde 30 ile 300 ng/ml doz aralıklarında glikoz alımını arttırdığı da rapor edilmiştir (117). Metrl'nin, AMPK α 1/2 fosforilasyonunu hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırarak sağladığı düşünülerek kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz (CaMKK) inhibitörü kullanılmış ve Metrl'nin sağladığı AMPK α 1/2 fosforilasyonu ve glukoz alımının bloke olduğu tespit edilmiştir (117). Oldukça kapsamlı olan aynı çalışmada Metrl'nin, glukoz alımını p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu ile arttırdığı da bildirilmiştir.

AMPK, Histon deasetilaz 5 (HDAC5)'i fosforile eder ve hücre içi glukoz taşıyıcısı GLUT4'un transkripsiyonunu artırır (118, 119). Bu bilgi ışığında yapılan çalışmada Metrl'nin GLUT4'ün mRNA ve protein ifadesini ve HDAC5'in fosforilasyonunu zamana bağlı bir şekilde arttırdığı rapor edilmiştir (117). Aynı çalışmanın *in vivo* basamağında, Metrl'nin glukoz toleransı üzerine etkisi araştırmak adına C57BL/6 farelerine intraperitoneal (ip) olarak rekombinant Metrl uygulaması yapılmıştır. Sağlıklı farelere uygulanan Metrl'nin kan glukoz seviyesini düşürdüğü ve glukoz toleransını geliştirdiği bulunmuştur (117). Sağlıklı farelerden sonra T2DM olan hayvanlara uygulanmış ve burda da bozulmuş glukoz toleransını iyileştirdiği rapor edilmiştir. Son olarak ise YYY indüklenen obez farelerde de Metrl'nin etkinliğini belirlemek amacıyla 8 haftalık ip tedavi sonucu glukoz toleransının önemli ölçüde iyileştiği aynı zamanda vücut ağırlığının da azaldığı bildirilmiştir (Şekil 2.10.)(117).



Şekil 2.10. Metrn1'in GLUT4 üzerine etkisi (111, 117).

Metrn1'in T2DM'da etkilerinin araştırıldığı çalışmada hayvanlar kontrol, T2DM ve T2DM+Metrn1 olmak üzere üç gruba ayrılmış ve Metrn1 tedavisinin, üçüncü haftadan itibaren T2DM grubundaki farelerin artan vücut ağırlığını ve kan şekerini azalttığı rapor edilmiştir (112). Hayvanların pankreas dokularında T2DM'un kaspaz-3 ifadesinin, kontrol farelerine göre önemli ölçüde arttığı, Metrn1 tedavisinin ise bu ifadeyi baskıladığı ortaya konmuştur (112). Aynı çalışmada Metrn1 ile tedavi edilen grubun, T2DM grubuyla karşılaştırıldığında β hücre proliferasyonunun ve aynı zamanda WNT/ β -Katenin yolu belirteçleri olan β -katenin ve TCF4 ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir (112). Elde edilen sonuçlara göre Metrn1'in β hücre fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (112).

Obezite ve alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer (NAFLD) hastalarında yapılan çalışmada adipokin/miyokin olarak nitelendirilen Metrn1'in ve eozinofillerde Metrn1 ekspresyonunun düzenleyicisi olan Krüppel benzeri faktör 3 (KLF3)'ün seviyeleri incelenmiştir. NAFLD aktivite skoru yüksek olan hastalarda Metrn1 ve KLF3 seviyelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir ve her ikisinin de hepatokin olarak adlandırılabilceği vurgulanmıştır (120).

Metnrl'in diyabet ve glukoz metabolizması ile ilişkisinden yola çıkılarak yapılan bir çalışmada gestasyonel diyabetli hastalarda, gebeliğin 24 ile 28. haftaları arasında ve doğum sırasında Metnrl'in plazma seviyesinin sağlıklı gebelere göre yüksek olduğu bildirilmiştir (121). Metnrl yüksekliğinin gestasyonel diyabetin diyetle kontrolünde azaldığını dolayısıyla diyetin, diyabetik hamile kadınlarda Metnrl'in metabolik kontrolüne aracılık ettiği ifade edilmiştir (121).

Gestasyonel diyabetli gebelerle yapılan bir başka çalışmada ise Metnrl'in sağlıklı gebelere kıyasla sütte, kanda ve meme dokusundaki düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre Metnrl'in gestasyonel diyabetlilerde kolostrum, geçiş sütü ve olgun sütteki miktarının sağlıklı gebelere kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu ifade edilmiştir (122). Bir önceki çalışmaya benzer olarak gestasyonel diyabetlilerde kanda da Metnrl düzeyinin yüksek olduğu belirtilmiştir (121, 122). Meme dokusunda yapılan incelemede ise Metnrl'in meme alveolar dokusunda asprosin, elabela, betatrofin gibi peptidlere kıyasla yüksek düzeyde sentezlendiği bildirilmiştir (122). Metnrl'in hem anne sütünde hem de meme dokusunda varlığı bu peptidin yenidoğan ve bebeklerde metabolik gelişime katkıda bulunabileceği şeklinde düşünülmektedir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada diyabetli ve sağlıklı farelerde yara iyileşmesi üzerine Metnrl etkinliği değerlendirilmiştir. Topikal olarak uygulanan rekombinant Metnrl'in sağlıklı ve diyabetik farelerde yara epitelizasyonunu ve anjiyogenezi hızlandırdığı bildirilmiştir (123). Ek olarak fizyolojik yara iyileşmesi sırasında Metnrl ifadesinde önemli bir artış gözlemlendiği de belirtilmiştir. Metnrl'in yara iyileşme sürecini hızlandırmadaki bu etkisini keratinosit ve M2 makrofajlar tarafından salgılanarak tirozin kinaz reseptör geni (c-KIT) bağımlı bir şekilde AKT fosforilasyonunun aktivasyonu yoluyla gerçekleştirdiği ve bu anlamda biyolojik bir aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (123).

Kemik Metabolizması Üzerindeki Etkisi

Travmatik olmayan femur başı osteonekrozunda (NOFH) ile kalça osteoartriti arasındaki gen ekspresyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada sekiz tane ortak gen tespit edilmiş ve bu sekiz genden birinin Metnrl olduğu bildirilmiştir (124).

Pluripotent öncüllerden kaynakların adiposit, kondrosit ve kasa farklılaşabilen osteoblastların bu sürecine birçok faktör katılır (125, 126). Osteoblast proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonunda yer alan yeni genleri tanımlamak amacıyla yapılan çalışmada insan osteosarkom hücreleri olan MG63 hücre hattı kullanılmıştır (127).

Metnrl'in esas olarak büyüme plakasının hipertrofik kondrositlerinde ve trabeküler kemik yüzeylerini kaplayan osteoblastlarda eksprese edildiği, ayrıca Metnrl'in aşırı ekspresyonunun MG63 tarafından mineralize nodül oluşumunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (127).

Metnrl'in osteoartrit (OA) ile ilişkisinin incelendiği klinik çalışmada serum Metnrl düzeylerinin OA hastalarında OA olmayanlara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (128). Daha sonra OA şiddeti ile Metnrl ilişkisini belirlemek için OA grubundaki hastaları 3 dereceyi ayırarak serum düzeyi ölçülmüş ve Metnrl'in en yüksek derecede en az dereceye göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada insanlardan alınan sinoviyal sıvılarda Metnrl seviyesi analiz edilmiştir. OA hastalarında OA olmayanlara kıyasla Metnrl'in ciddi bir artış gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan analizler ve sonuçlar, Metnrl'in OA için teröpatik bir aday olabileceğini düşündürmektedir (128).

Cherian ve ekibi, obezite ve hastalarında, kemik şekillenmesi modelinde irisin ve Metnrl düzeylerini analiz ederek bu iki adipomiyokinin kemik şekillenmesinde rol alan faktörler ile pozitif bir ilişki olduğu rapor etmişlerdir. Bu rapor Metnrl'in, obezite ve tip 2 diyabet ile ilişkili kemik ve kas komplikasyonlarının gelişimini potansiyel olarak etkileyebileceğini öne sürmektedir (129).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada 6 haftalık farelerde Metnrl'in iskelet büyümesi sırasında ekspresyonu araştırılarak metafaz hücrelerinde Metnrl'in varlığı belirlenmiştir (130). Bu da Metnrl'in iskelet içindeki gelişme, büyüme ve olgunlaşma sırasındaki ifadesini doğrulamaktadır. Ayrıca aynı çalışmada Metnrl'in kemik gelişimi sırasında özellikle *in vivo* osteoblastlar tarafından eksprese edildiğini ve *in vitro* osteoblast farklılaşmasını da desteklediği rapor edilmiştir (130).

Metnrl, antiinflamatuvar etkilerini NF-κB ve 3 pirin içeren NLR ailesi (NLRP3)'ün inflamatuvar aktivasyonunu inhibe ederek göstermektedir (131). Bu bağlamda yapılan bir çalışmada Metnrl'in koruma ile ilgili mekanizmalarını araştırmak için kondrositlerdeki PI3K/Akt/NF-κB ve NLRP3/kaspaz-1/gasdermin D (GSDMD) yolları sorgulanmıştır. Elde edilen veriler Metnrl'in *in vitro* olarak PI3K/Akt/NF-κB sinyal yolağının inhibisyonu yoluyla IL-1β ile tedavi edilen kondrosit inflamasyonunu iyileştirdiğini ve NLRP3/kaspaz-1/GSDMD kaskadını baskılayarak kondrosit piroptozunu hafiflettiğini göstermiştir. Ayrıca çalışmada *in vivo* optimum egzersiz yoğunluğunun Metnrl'in maksimum düzeyde ekspresyonunu indükleyerek dizin eklem kıkırdağını koruduğu rapor edilmiştir (132).

Kardiyovasküler Metabolizma Üzerindeki Etkisi

Metnrl'in T2DM ve Koroner arter tanısı alan hastalarda serum düzeyini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada Metnrl'in serum seviyesinin iki hastalıkta da sağlıklı bireylere kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak ölçülen IL-6 ve tümör nekroz faktör α (TNF- α) serum seviyelerinin ise kontrol grubuna kıyasla hastalık gruplarında önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Adiponektin seviyesi ise hastalık gruplarında kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, Metnrl'in koroner arter hastalığının ve T2DM'un patojenik mekanizmalarında olası bir rol oynayabileceğini ve bu iki hastalıkla da ilişkili olduğunu ifade etmektedir (133).

Yine T2DM'lu ve sağlıklı bireyler üzerinde yapılan çalışmada dolaşımdaki Metnrl konsantrasyonunun T2DM durumunda yükseldiğini ve kardiyometabolik risk faktörleri ile ters ilişkili olduğunu göstermektedir (134).

Dislipidemi, kardiyovasküler bozukluklar ve tip 2 diyabet açısından bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir ve kan lipidlerinin modülasyonunda önemli roller oynar (105). Metnrl ile ilişkisini irdelemek adına yapılmış olan çalışmada hayvanları yedi hafta süreyle YYY'le besleyerek serum Metnrl düzeyleri ölçülmüş ve Metnrl'in NYY yiyenlere göre önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (105). Daha sonra total olarak Metnrl'den yoksun transgenik fareler on altı hafta YYY'le beslenmiş ve kan lipidleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve total kolesterol (TC) olmak üzere başlıca klinik lipid parametreleri ölçülerek LDL seviyesinin kontrole göre değişmediği, HDL ve TC seviyelerinin kontrole göre anlamlı olarak düştüğü, trigliseritin ise kontrole göre attığı belirtilmiştir. Karaciğere özgü Metnrl'den yoksun transgenik farelerde ise aynı deney uygulanmış ve HDL, LDL ve TC'nin kontrole kıyasla azaldığı rapor edilmiştir. Bu verilere göre Metnrl'in, farklı dokular yoluyla kan lipidlerine etki edebileceği vurgulanmıştır (105).

Metnrl ve kardiyovasküler sistemle alakalı yapılan bir çalışmada Metnrl'in, kardiyomiyositler tarafından üretilip salgılandığı ve kalpte eksprese edildiği rapor edilmiştir (135). Aynı çalışmada hipertrofik ajan izoproterenol (ISO), transversal aort daralması (TAC) ve anjiyotensin II (AngII) ile indüklenen hipertansiyon tedavisine dayalı modellerde kardiyak hipertrofinin indüksiyonu ile hayvanların kalp Metnrl ekspresyonlarının önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir (135). Kalpteki Metnrl ifadesinin PPAR- α ile kontrol edildiği ortaya konmuştur. Ek olarak Metnrl'den yoksun fareler ile

yapılan deneyde bu durumun hayvanlarda sol ventrikül disfonksiyonu ile karakterize asimetrik kardiyak hipertrofiyi teşvik ettiği ve interstisyel fibrozu arttırdığı dolayısıyla farelerin kardiyak hasarının arttığı gösterilmiştir (135).

Miyokard infarktüsünden (MI) sonra doku onarımı, henüz tam olarak tanımlanmamış immün hücre-endotelial hücre etkileşimlerini içeren güçlü bir anjiyojenik tepki gerektirmektedir. İnfarktüs onarımını yönlendiren daha önce karakterize edilmemiş miyeloid hücre kaynaklı büyüme faktörlerini belirlenmesi için yapılan bir çalışmada Metrnl'in sol ventrikülün infarktüs bölgesindeki miyeloid hücreler tarafından güçlü bir şekilde eksprese edildiği ve miyokard infarktüsünden sonra anjiyogenezi desteklediği ortaya konmuştur (136). Aynı çalışmada Metrnl eksikliği olan farelerde MI modeli oluşturularak kılcal damar oluşumu izlenmiş ve miyokardiyal kapiller yoğunluğun infarktüs bölgesinden uzakta azalmayıp infarktüs sınır bölgesinde ise Metrnl eksikliğinde bozulduğu belirtilmiştir. Bu durum Metrnl delesyonunun iskemik yaralanmadan sonra anjiyogenezi spesifik olarak bozduğunu göstermektedir (136).

Akut MI ve Metrnl ile alakalı yapılmış klinik bir çalışmada, Akut MI hastalarında Metrnl düzeyinin azaldığı ve Metrnl düzeyi ile göğüs ağrısının başlangıcından acil servise başvuruya kadar geçen süre ve troponin düzeyi arasında negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ek olarak sağlıklı kontrol grubuna kıyasla toplam oksidan seviyesi (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı, toplam antioksidan seviyesi (TAS) düzeyinin ise önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (137).

Tirozin kinaz reseptör geni (KIT) kök hücre faktörü için reseptördür ve hematopoietik kök, progenitor hücreler ile germ hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından ifade edilir. Metrnl'in hem kültürlenmiş insan endotel hücreleri üzerindeki anjiyojenik etkileri hem de MI fare modelinde infarktüs sınır bölgesindeki KIT eksprese eden endotel hücre popülasyonunu genişleterek infarktüs onarımını desteklediği bildirilmiştir (136). Metrnl eksikliği olan farelerde KIT'e bağlı anjiyojenik yanıtın oluşmadığı ve ciddi infarktüs sonrası kalp yetmezliği geliştiği sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar monosit ve makrofaj türevli sitokin Metrnl'in KIT için yüksek afiniteli ligand olarak tanımlanabileceğini göstermektedir (136).

Metrnl'in diyabetik kardiyomiyopati üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, streptozotosin (STZ) ile indüklenen ve leptin reseptöründen noksan farelerde kardiyak ve dolaşımdaki Metrnl seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir (138). Farelerde Metrnl'in kardiyomiyositlere özgü aşırı ekspresyonunun hipergliseminin neden olduğu kardiyak hipertrofiyi, fibrozisi, apoptozu ve oksidatif stresi tersine çevirdiği rapor

edilmiştir. Aynı çalışmada Metrn1'in diyabetik kardiyomiyopatideki hücre içi sinyal yolları sorgulanmış ve fosforile karaciğer kinaz B1 (LKB1)/AMPK/Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1 (ULK1) sinyal yolunu aktive ettiğini ortaya çıkarılmıştır. Metrn1'in belirlenen bu sinyal yolağına bağımlı olarak siklik GMP-AMP sentazı (cGAS)/interferon genleri (STING) sinyalini inhibe ettiği bildirilmiştir (138). Metrn1'in indüklediği ULK1 fosforilasyonunun ise, STING fosforilasyonunu ve mitokondriyal translokasyonunu kolaylaştırdığı ve burada tümör nekroz faktörü reseptörüne bağılı faktör 2 (TRAF2) ve STING'in her yerde bulunmasından ve bozulmasından sorumlu olan E3 ubiquitin ligazı ile etkileşime girerek otofaji aktivasyonunu sağlayıp kardiyomiyositleri ve kalp fonksiyonunu iyileştirdiği rapor edilmiştir (138).

Boşaltım Metabolizması Üzerindeki Etkisi

Temelde sağlıklı bireyler ile T2DM'lu hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmada kronik böbrek hastalığına sahip bireylerin de değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda kronik böbrek hastalarının dolaşımlarındaki Metrn1 konsantrasyonlarının yüksek düzeyde çıktığı bulunmuştur. Ek olarak Metrn1 düzeyinin glomerül filtrasyon hızıyla negatif korele olduğu rapor edilmiştir (134).

Bir başka çalışmada diyabetik nefropatiyi değerlendirmek için T2DM ve sağlıklı insanlar çalışmaya dahil edilmiştir (139). T2DM tanısı almış insanlar albümin/kreatin oranına göre üç gruba ayrılmış ve serum Metrn1 düzeyleri analiz edilmiştir. Normoalbuminüri ve mikroalbuminüri grubundaki insanların Metrn1 düzeyinin kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, makroalbuminüri grubundakilerin ise hem kontrole hem de diğer iki gruba göre anlamlı azaldığı rapor edilmiştir. Mikroalbuminüri ve makroalbuminüriye sahip olan T2DM'lu hastaların diyabetik nefropatiye sahip olduğu düşünülmüş ve sonuç itibarıyla serum Metrn1 düzeyinin böbrek fonksiyonu ve diyabetik nefropati ile negatif korele olduğu ortaya konmuştur (139). Aynı zamanda ilerleyen süreçlerde Metrn1'in bu konuda teröpatik aday olabileceği ifade edilmiştir (139).

Diyabetik nefropati ile alakalı yapılan kapsamlı bir çalışmada, sağlıklı hasta ve farelerde Metrn1'in böbrek tübüllerinde yüksek düzeyde eksprese edildiği, nefropati sonrasında ise bu ekspresyonun önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (140). Ek olarak böbrekteki Metrn1 konsantrasyonunun, lipid birikimi ve serum kreatinin ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Diyabetik nefropatide oluşan böbrek hasarının, Metrn1'in aşırı ekspresyonu ya da ekzojen Metrn1 uygulaması ile hafiflediği bildirilmiştir. Ayrıca Metrn1'in bu etkilerini SIRT3-AMPK/UCP1 sinyal eksenini aracılı mitokondriyal

homeostaz yoluyla böbrek tübüllerinde lipid metabolizmasını düzenleyerek gerçekleştirdiği belirlenmiştir (140).

İmmün Sistem Metabolizması Üzerindeki Etkisi

Yapılan bir çalışmada, kemik iliği makrofajlarında Metrnl üretiminin birçok sitokin tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (101). Bu bağlamda TNF- α 'nın kemik iliği makrofajlarında en yüksek Metrnl ifadesini indüklediği, IL-17, IL-4, IL-1 β , IL-5 ve IL-12'nin Metrnl seviyesinde önemli artışlar sağladığı ve IFN- γ ve TGF- β 'nın ise Metrnl seviyesini azalttığı rapor edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Metrnl'in inflamatuvar tepkiler sırasında üretildiğini ve muhtemelen bu sürece de katıldığını düşündürmektedir (101).

Daha sonra sekiz haftalık farelere sepsis modeli için ip olarak lipopolisakkarit enjekte edilerek Metrnl seviyesinin lipopolisakkarit dozuna göre anlamlı olarak yükseldiği ortaya konmuştur. Bu durum Metrnl'in *in vivo* inflamasyon ile ilişkili olduğunu göstermektedir (101). Bu bulgular Metrnl'in bağışıklık tepkileri ve iltihaplanma ile ilişkili olduğu düşüncesini vurguladığından son olarak Metrnl'den yoksun transgenik fareler üretilerek immünoglobulin G (IgG) düzeyleri analiz edilmiştir. Metrnl yoksun hayvanların daha düşük IgG seviyelerine sahip oldukları rapor edilmiştir. Ayrıca bu hayvanlarda sitokin ve kemokin üretiminde düzensizlikler gözlenmiştir. Metrnl'den yoksun farelerin endotoksemiye karşı da duyarlılık gösterdikleri belirtilmiştir (101).

Ekzojen Metrnl uygulamasının kemik iliğinden izole makrofajlarda NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunun nasıl etkilendiğinin araştırıldığı bir çalışmada, rekombinant Metrnl ile ön tedavinin, makrofajlarda lipopolisakkarit ve ATP tarafından indüklenen IL-1 β sekresyonunu tamamen ortadan kaldırdığı rapor edilmiştir. Ek olarak, Metrnl'in bu anti-inflamatuvar etkisini ERK ve p38 MAPK'nın yollarını aktive ederek gerçekleştirdiği bulunmuştur (131).

Doku hasarı sırasında Metrnl'in indüklenmesi ve anti-enflamatuvar fenotipleri teşvik etmedeki immünomodülatör rolü göz önüne alınarak alerjik astım sırasında Metrnl'in nasıl etkiler göstereceğini belirlemek amaçlı bir çalışma yapılmıştır. Metrnl'in ev tozu akarına maruz kaldıktan sonra farelerin, ağırlıklı olarak makrofajlar ve eozinofiller dahil olmak üzere hava yolu epitel hücreleri ve inflamatuvar hücreler tarafından salgılandığı ve önemli ölçüde yükseldiği rapor edilmiştir (141). Artan Metrnl düzeyinin, hava yolu hiper reaktivitesinin gelişimini bloke ederek dendritik hücre aracılı

hava yolu infiltrasyonunu ve tip 2 sitokin üretimini azalttığı ortaya konmuştur. Metrnl'in ayrıca alerjik astımı olan şiddetli kombine immün yetmezlikli farelerde ve *in vitro* 3D hava-sıvı arayüz solunum modelinde anti-enflamatuar özellikler sergilediği bildirilmiştir (141). Elde edilen sonuçlar Metrnl'in alerjik astımda da terapötik bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Kanser ve immun sistemle alakalı yakın zamanda yapılan bir çalışmada kıl kökünden köken alan deri tümörleri bazal hücreli karsinom (BCC) ve trikoblastomada Metrnl ve asprosinin varlığı araştırılmıştır (142). Metrnl ekspresyonunun, normal deri numuneleri ile karşılaştırıldığında hem BCC'de hem de trikoblastomada yüksek olduğu belirlenmiştir. BCC ile trikoblastoma karşılaştırıldığında, Asprosin ve Metrnl'in BCC'deki ekspresyonlarının hem tümöral dokularda hem de peritümöral stromada trikoblastoma göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular ile BCC tanısında asprosin ve Metrnl'in, trikoblastoma tanısında ise Metrnl'in ayırıcı tanı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (142).

Bir sitokin olarak da görev yaptığı ifade edilen Metrnl'in sepsisi olan hastalarda dolaşımdaki seviyesinin sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir (143). Aynı çalışmada farelerde *in vivo* olarak deneysel sepsis modeli oluşturularak Metrnl seviyesi ölçülmüştür. Metrnl'in deney sırasında serum, karaciğer, akciğer, böbrek ve peritoneal lavaj sıvısındaki düzeyinin kontrol grubundaki hayvanlara kıyasla arttığı görülmüştür. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, sepsisin temel olarak dengesiz Th17/Treg hücrelerinden kaynaklandığı bildirmiştir (144). Bu bilgi ışığında Metrnl eksikliğinin bu dengeyi nasıl etkilediği araştırılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla, Metrnl'den yoksun farelerin, periferik kan Th17 ve Treg hücre düzeylerinin önemli ölçüde arttığı, bu durumun da Metrnl'in, sepsis açısından kritik bir faktör olan Treg/Th17 dengesini düzenlediğini düşündürdüğü ifade edilmiştir (143). Son olarak deneysel sepsis modelinde teröpatik etkinliğinin belirlenmesi için farelere rekombinant Metrnl uygulanmış ve hayvanların hayatta kalma oranını önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir (143). Rekombinant Metrnl uygulanmasının kan ve peritoneal lavaj sıvısındaki bakteri titrelerini azalttığı, miyeloperoksidaz (MPO) ve kreatinin seviyelerini ve akciğer dokularındaki alanin aminotransferaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir (143).

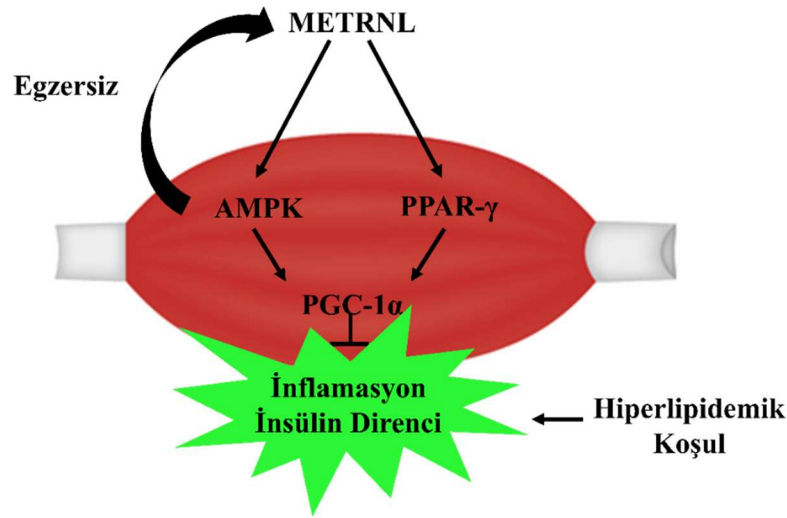
Kas, Adipoz Doku ve Enerji Metabolizması Üzerindeki Etkisi

Egzersiz üzerine Metrnl etkinliğinin sorgulandığı bir çalışmada farklılaşmış C2C12 miyoblast hücrelerine egzersizi taklit etmek için elektriksel darbe uyarımı uygulanarak Metrnl konsantrasyonu ölçülmüş ve akut/kronik darbe uyarımlarlarında Metrnl'in arttığı rapor edilmiştir (117). Bu durum Metrnl'in kas stimülasyonu üzerine salgılandığını göstermiştir. Aynı çalışmada fareler sedanter grup ve egzersiz yaptırılan grup olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Dekapitasyon sonrası ölçülen Metrnl'in kan konsantrasyonlarının egzersiz grubunda anlamlı olarak arttığı rapor edilmiştir (117). Ayrıca egzersiz yapan farelerde glukoz toleransının da iyileştiği görülmüştür. Metrnl ekspresyonunun dışında, egzersiz grubundaki farelerin kuadriseps femoris kaslarında AMPK α 1/2 ve TBC1D1'in fosforilasyonunun da yükseldiği orataya konmuştur. Tüm bu sonuçlar, egzersizin Metrnl'in kas kasılmasıyla indüklenen sekresyonunu arttırdığını göstermektedir (117).

Farelerin ve insanların iskelet kasında egzersiz sonrası Metrnl ifadesini belirleyen bir çalışmada egzersizden 1 saat sonra Metrnl mRNA ifadesinde bir artış görülmüştür (12). Ek olarak, PGC-1 α 4 mRNA ekspresyonunda da artışlar bulunmuştur. PGC-1 α 4'ün artmasının Metrnl'in subkutan beyaz yağ dokudaki kahverengileşmeyi sağladığını düşündürmektedir (12). Metrnl'in kas gücünü ve hipertrofiyi destekleyen bir eksantrik egzersiz fare modelinde ise egzersizden sonraki günde dolaşımdaki Metrnl'in yaklaşık 2 kat arttığı rapor edilmiştir (12).

Metrnl'in yağ dokularında çok miktarda bulunmasından yola çıkılarak regülasyonunun, termojenik uyarılar ve soğuğa maruz kalma ile araştırıldığı çalışmada Metrnl ekspresyonu ölçülmüştür. Bu çalışma kapsamında hayvanlar 30°C ve 4°C'de bekletilmiştir. Soğuğa maruziyet sonrası kahverengi yağ doku, subkutan yağ doku ve epididimal yağ dokuda Metrnl gen ifadesinin önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (12). Bu veriler Metrnl'in egzersiz ve soğuğa adaptasyonlarda potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir (12).

Kas dokuda artan Metrnl seviyesinin PGC-1 α 4 seviyesine etkisi Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Egzersiz sonrası kas dokuda Metrn1 aktivasyonu.

Metrn1'in insan adipogenezinde fonksiyonel öneminin belirlenmesi ve çocuklarda obezite, termogenez ve hiperinsülinemi ile ilişkilerinin sistematik olarak değerlendirilmesi için yapılan bir çalışmada Simpson-Golabi-Behmel sendromu (SGBS) insan adiposit hücreleri kullanılmıştır (145). İnsan preadipositlerinin farklılaşması sırasında Metrn1 ekspresyonunun mRNA ve protein seviyesinde azalma tespit edilmiştir. Daha sonra beyaz adipoz dokudan elde edilmiş stromal vasküler fraksiyon (SVF) ile Metrn1 ekspresyon düzeyi karşılaştırılarak Metrn1'in daha düşük olduğu belirtilmiştir (145). Hiperinsülinemi açısından değerlendirildiğinde, adipogenez sırasında Metrn1'in azalması, adiposit farklılaşmasının inhibisyonu ve SVF hücrelerinde artmış proliferasyonun hipertrofik yağ doku birikimine neden olabileceği, obez çocuklarda da yağ hücrelerinde artan Metrn1 ekspresyonunun bu durumu açıklayabileceğini göstermiştir (145).

Metrn1 düzeyinin yağ ve kas dokuda egzersizle değişmesinin incelendiği çalışmada hayvanlar NYY, NYY+Egzersiz, YYY ve YYY+Egzersiz olmak üzere dört farklı gruba ayrılmıştır (114). YYY ile beslenen farelerin kas ve yağ dokularında Metrn1'in azaldığı, ancak sekiz haftalık egzersiz programından sonra Metrn1'in arttığı bulunmuştur. Ayrıca egzersiz yaptırılan gruptaki hayvanların kendi kontrollerine göre Metrn1 seviyelerinin çok daha yüksek olduğu ortaya konmuştur (114).

Önceki çalışmalarda bildirildiğine göre, egzersizle indüklenen miyokinler, antiinflamatuvar etkilerini kas-adipoz doku yoluyla gösterirler (146). Metrn1'in kaslardaki ifadesinin incelendiği bir çalışmada YYY ile indüklenen obez farelerde Metrn1'in protein

ve mRNA seviyesinin, soleus, gastroknemius ve kuadriseps kasında hem egzersiz hem de egzersiz ve diyetle birlikte yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (131).

Metrl'nin hipotalamus-hipofiz-tiroid (HPT) aksı ve enerji metabolizması üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, sıçanlara 14 gün boyunca osmotik mini pompa ile beyin için infüzyon yapılmıştır (147). Deney sonunda merkezi olarak uygulanan Metrl'nin TRH, TSH, T3 ve T4 düzeylerini artırarak HPT ekseninde rol oynadığı rapor edilmiştir. Ek olarak Metrl'nin periferik enerji kullanımının önemli göstergeleri olan beyaz ve kahverengi adipoz dokuda UCP1 ve kas dokusunda UCP3 ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir (147).



3. MATERYAL VE METOD

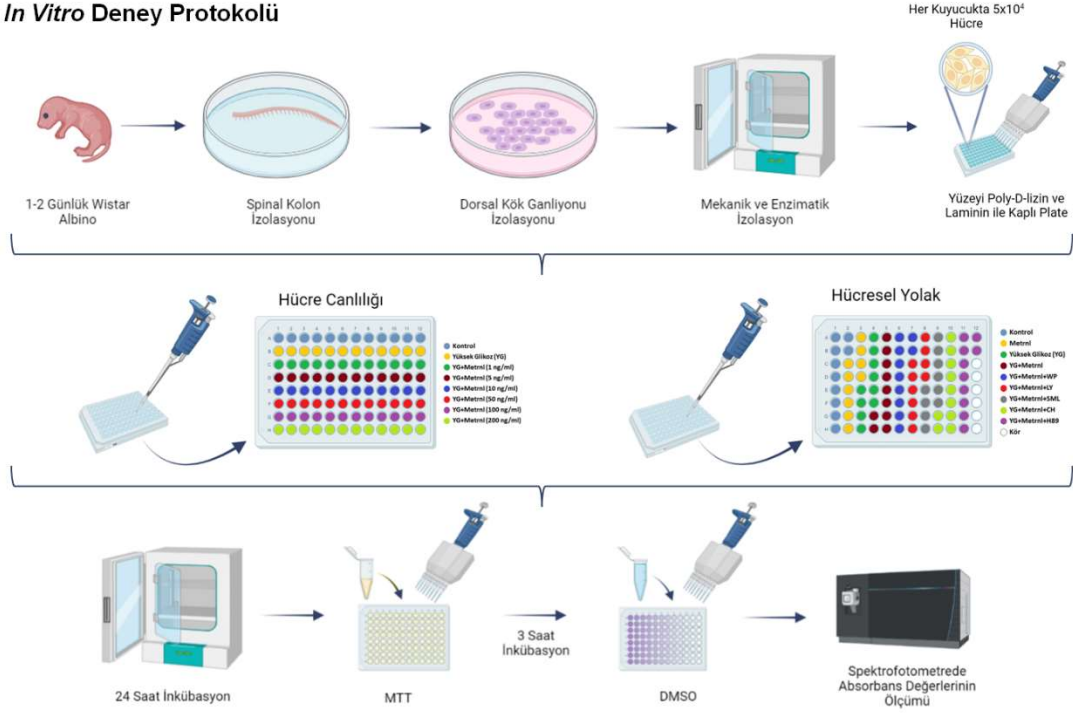
İnönü Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 27/05/2022 tarih ve 2022/7-5 sayılı kararı ile etik açıdan uygun bulunan çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Deney Planı

Bu çalışmada Metnrl'in *in vitro* diyabet modelinde hücre canlılığı, *in vivo* olarak ise diyabete bağlı şekillenen nöropatik ağrı üzerine etkinliği incelendi.

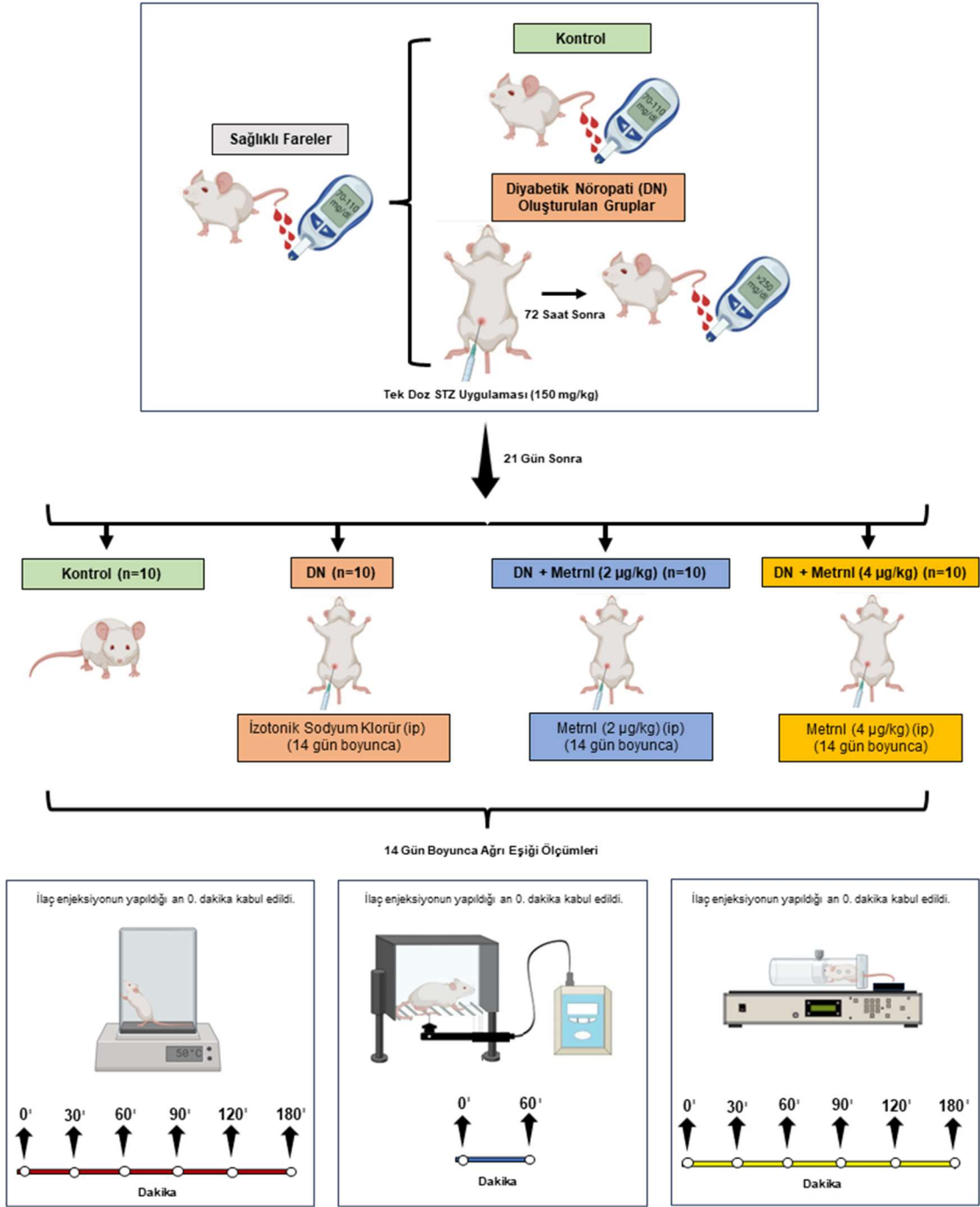
In vitro modelde Metnrl'in hücre canlılığı üzerine etkinliğini incelemek amacıyla 1-2 günlük *Wistar Albino* (n=10) ırkı sıçanlar kullanıldı. Dekapite edilen sıçanların DKG'ları diseke edildi. Diseke edilen bu nöronlar enzimatik ve mekanik işlemlerle izole edilerek hücrelere ayrıştırıldı. İzole edilerek ayrıştırılan bu sinir hücreleri, yüzeyi laminin-poli-L-ornitin (Sigma; Steinheim, Almanya) veya poli-D-lizin (Sigma; Steinheim, Almanya) kaplı 96'lık plate'lere ekilerek 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ nemli inkübatörde (Esco, Egaa, Danimarka) hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılıncaya kadar inkübe edildi. Primer hücre kültürü yapılarak hazırlanan DKG hücrelerinin 24 saat süreyle YG'ye (45 mmol/L) maruz bırakılması ile DN'nin *in vitro* modeli oluşturuldu. Bu aşamada Metnrl'in farklı dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi test edildi. Kontrol, YG, YG+Metnrl (1 ng/ml), YG+Metnrl (5 ng/ml), YG+Metnrl (10 ng/ml), YG+Metnrl (50 ng/ml), YG+Metnrl (100 ng/ml) ve YG+Metnrl (200 ng/ml) grupları oluşturularak 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi yapıldı ve etkin doz ile hücre canlılığı tespit edildi. Ayrıca belirlenen etkin doz ile DKG hücrelerinde Metnrl'in hücre sel yolağı kontrol, M, YG, YG+M, YG+M+WP, YG+M+LY, YG+M+SML, YG+M+CH ve YG+M+H89 gruplarında MTT analizi ile belirlendi. *In vitro* deney akış diyagramı Şekil 3.1'de sunulmuştur.

In Vitro Deney Protokolü



Şekil 3.1. *In vitro* deney protokolü

In vivo modelde ortalama 30 gr ağırlığında olan 40 adet erkek *Balb-c* fare randomize bir şekilde 4 gruba ayrıldı; Kontrol, DN, DN + Metrnl (2 µg/kg) ve DN + Metrnl (4 µg/kg) (n=10). Kontrol hariç tüm gruplara tek doz STZ (150 mg/kg, ip) enjeksiyonu yapıldı. STZ enjeksiyonu yapılarak DM indüklenen fareler 21 gün boyunca gözlemlendi. 21 günden sonra DN'nin oluşup oluşmadığını belirlemek amacıyla nosiseptif davranışları testlerine tabi tutuldu (148). DN gelişimi gözlemlendikten sonra ise 14 gün boyunca günde 1 kez DN + Metrnl gruplarındaki farelere Metrnl (Biolegend, San Diego, CA) 2 µg/kg ve 4 µg/kg enjeksiyonu yapıldı. Aynı süreç içerisinde DN grubundaki farelere ise Metrnl'in çözücüsü olan serum fizyolojik (SF) ip enjeksiyonu yapıldı. 14 günün sonunda tüm hayvanlar dekapite edildi. Dekapite edilen hayvanların pankreas dokuları alınıp histolojik ve oksidatif stres analizleri yapılınca kadar -80 °C'de muhafaza edildi. *In vivo* deney akış diyagramı Şekil 3.2' de sunulmuştur.



Şekil 3.2. *In vivo* deney protokolü

3.2. *In Vivo* Çalışmalar

3.2.1. Deney Hayvanlarının Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında kullanılacak hayvanların sayısı (örneklem büyüklüğü), hayvanların deneye başlama ağırlık ortalaması 30 gr, standart sapması 5 gr, %8 sapma, tip 1 hata (α) 0.05 ve tip 2 hata (β) 0.20 (Güç=0.80) ile hayvanların dört gruba ayrılması durumunda her bir grupta en az 10 hayvanın olması gerektiği güç (power) analizi ile belirlendi.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneye başlamadan önce hayvanlar tartılarak vücut ağırlıkları ve kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Belirlenen vücut ağırlıklarına göre hayvanların gruplara ataması, bilgisayar algoritmasına dayalı basit rastgele atama yöntemi ile yapıldı (MedCalc 11.0 for Windows) ve tek yönlü varyans analizi bulgularına göre gruplar arasında hayvanların ağırlıkları açısından fark olmadığı tespit edildi (Tablo 3.1; $p=0.927$).

Tablo 3.1. Hayvanların bilgisayara dayalı algoritma kullanılarak gruplara ataması.

Ağırlık					
Gruplar	Kontrol	DN	DN+Metrnl (2 µg/kg)	DN+Metrnl (4 µg/kg)	<i>p</i>
Hayvan sayısı (n)	10	10	10	10	
Ortalama	33.2	33.4	33.4	33.3	
SD	2.250	1.349	1.505	1.347	0.927
En küçük	29	31	31	31	
En büyük	35	35	35	35	

Çalışmanın bütün deneysel protokolleri “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prensipleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Ayrıca Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (IASP) Araştırma ve Etik Komitesi ilkeleri de göz önünde bulunduruldu (149).

Gruplara atama sonrası fareler tekli kafeslere alındı. Tek barındırma ortamı hayvanlarda stres oluşturabileceğinden 7 gün tekli yaşam koşullarına adapte olmaları sağlandı. Bu sürenin sonunda fareler 4 gruba ayrıldı ($n=10$). Deney süresi boyunca

kafeslerin bulunduğu ortam, $21\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında ve 12 saat aydınlık/karanlık periyodu olacak şekilde ayarlandı. Hayvanlara adlibitum olarak standart fare yemi ve normal musluk suyu verildi.

Oluşturulan deney grupları aşağıda belirtilmiştir.

1. Kontrol (n=10): Sağlıklı farelerden oluşturulan bu gruptaki hayvanlara herhangi bir cerrahi ve medikal işlem uygulanmayarak sadece davranış testleri yapıldı. Davranış testleri deneye başlamadan önce 1 hafta süreyle uygulanarak hayvanların deney şartlarına alışmaları sağlandı.

2. DN (n=10): Tek doz STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulan hayvanlarda 21 gün beklenilerek DN gelişimi takip edildi. STZ, 150 mg/kg olacak şekilde 0.1 M sodyum sitrat tamponunda (pH 4.5) çözündürülerek ip enjeksiyonla verildi. DN gelişen hayvanlara 14 gün boyunca ip olarak Metrn1 çözücüsü izotonik sodyum klorür 0.1 ml hacimde uygulandı. Enjeksiyonun yapıldığı dakika 0. dk olarak kabul edildi ve 0, 30, 60, 120 ve 180. dakikalarda davranış testleri yapıldı. Davranış testleri deneye başlamadan önce 1 hafta süreyle uygulanarak hayvanların deney şartlarına alışmaları sağlandı.

3. DN + Metrn1 (2 µg/kg) (n=10): Tek doz STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulan hayvanlarda 21 gün beklenilerek DN gelişimi takip edildi. STZ, 150 mg/kg olacak şekilde 0.1 M sodyum sitrat tamponunda (pH 4.5) çözündürülerek ip enjeksiyonla verildi. DN gelişen hayvanlara 14 gün boyunca ip olarak 2 µg/kg Metrn1 0.1 ml hacimde uygulandı. Enjeksiyonun yapıldığı dakika 0. dk olarak kabul edildi ve 0, 30, 60, 120 ve 180. dakikalarda davranış testleri yapıldı. Davranış testleri deneye başlamadan önce 1 hafta süreyle uygulanarak hayvanların deney şartlarına alışmaları sağlandı.

4. DN + Metrn1 (4 µg/kg) (n=10): Tek doz STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulan hayvanlarda 21 gün beklenilerek DN gelişimi takip edildi. STZ, 150 mg/kg olacak şekilde 0.1 M sodyum sitrat tamponunda (pH 4.5) çözündürülerek ip enjeksiyonla verildi. DN gelişen hayvanlara 14 gün boyunca ip olarak 4 µg/kg Metrn1 0.1 ml hacimde uygulandı. Enjeksiyonun yapıldığı dakika 0. dk olarak kabul edildi ve 0, 30, 60, 120 ve 180. dakikalarda davranış testleri yapıldı. Davranış testleri deneye başlamadan önce 1 hafta süreyle uygulanarak hayvanların deney şartlarına alışmaları sağlandı.

3.2.3. Diyabetik Nöropati Modeli

Çalışmaya açlık kan glukoz seviyesinin normoglisemik (70-110 mg/dl aralığında) olduğu belirlenen hayvanlar dahil edildi. Modelin oluşturulması için STZ (Sigma, Steinheim, Almanya), 0.4 ml (0.1 M) sodyum sitrat tamponu (pH 4.5) içinde çözüldü.

Hazırlanan STZ, 10 saat öncesinde önlerinden yemleri alınan farelere tek doz 150 mg/kg ip olarak uygulandı (150-152). Üç gün sonra farelerin kuyruk veninden punksiyon ile kan alındı ve manuel glukometre ile ölçüldü. Hayvanların kan glukoz ölçümleri sabah saat 9.00'da yapıldı. Ölçüm sonucu açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabet olarak kabul edildi. Farelerin genel sağlık durumları kontrol edildi. Bu bağlamda vücut ağırlığında %10'dan fazla kayıp, aktivitesinde belirgin azalma veya tüylerinde anormal sertleşme olan fareler çalışmadan dışlandı. Diyabet oluşumundan sonra 21 gün beklenilerek DN gelişimi takip edildi. DN'nin geliştiği belirlemek amacıyla nosiseptif davranış testleri uygulandı (148).

3.2.4. Nosiseptif Davranış Testleri

Diyabet oluşumundan 21 gün sonra hayvanlar nosiseptif davranış testlerine tabi tutuldu. DN'nin gelişiminin ve Metnrl etkinliğinin belirlenebilmesi amacıyla uygulanan bu testler için 3 cihaz kullanıldı. Cihazlarda hayvanların termal ve mekanik hassaslığı test edildi. Termal nosiseptif davranışlar için farelerde sıcak plaka (Hot plate) ve Tail flick testleri yapıldı. Mekanik nosiseptif davranışların değerlendirilmesinde ise Von Frey testi kullanıldı. Davranış testleri tüm hayvanlarda deneye başlamadan önce 1 hafta süreyle uygulanarak hayvanların deney şartlarına alışmaları sağlandı. Ayrıca fareleri ortam koşullarına alışması ve standardizasyonun sağlanması amacıyla testler farklı günlerde aynı saatlerde aynı araştırmacılar tarafından 5 kez tekrarlandı. Diyabet oluşumundan 21 gün sonraki ilk gün 0. Gün kabul edildi. 0., 3., 6., 9., ve 12. günlerde hot plate testleri gerçekleştirildi. 1., 4., 7, 10., ve 13. günlerde tail flick testi yapıldı. 2., 5., 8., 11. ve 14. günlerde ise von frey testi uygulandı.

Hot plate testi

Sıcak plaka üzerine şeffaf bir pleksiglas silindirin yerleştirilmesi ile hayvanların dışarı çıkmaları engellenecek şekilde yapıldı (Ugo Basile, Hot/Cold Plate, Cat. No. 35150). Hayvanlar 50 ± 0.5 °C sıcaklığa ayarlanmış olan sıcak plaka üzerine bırakıldı. Pençelerini hızla çekip titretme, yalama veya zıplama davranışları gözlemlendiği anda deney sonlandırılarak geçen süre kaydedildi. Doku hasarını önlemek adına 60 saniyelik kesme süresi (cut-off) uygulandı. Bu süre içerisinde nosiseptif yanıt göstermeyen fareler sıcak tabla üzerinden alındı. Her bir fare için enjeksiyonun yapıldığı dakika 0. dk olarak kabul edildi ve 0, 30, 60, 120 ve 180. dakikalarda Hot plate testi yapıldı. Nosiseptif

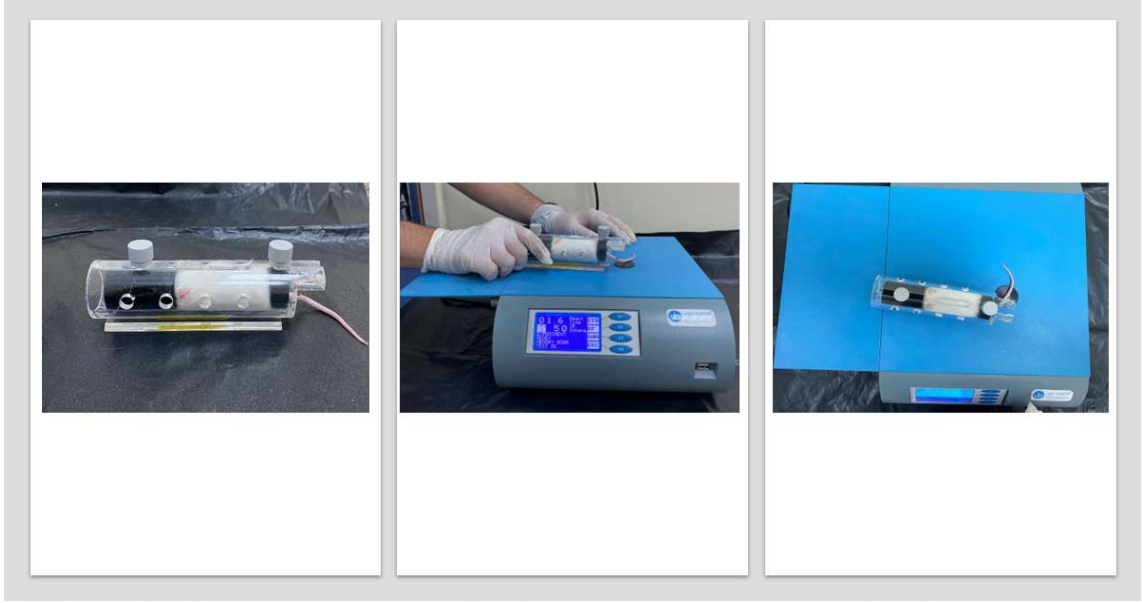
yanıtlar STZ enjeksiyonundan önce ve DN gelişiminden sonra olmak üzere kaydedildi. DN gelişiminden sonraki ölçümler farklı günlerde 5 kere tekrarlandı (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Hot plate testi

Tail flick testi

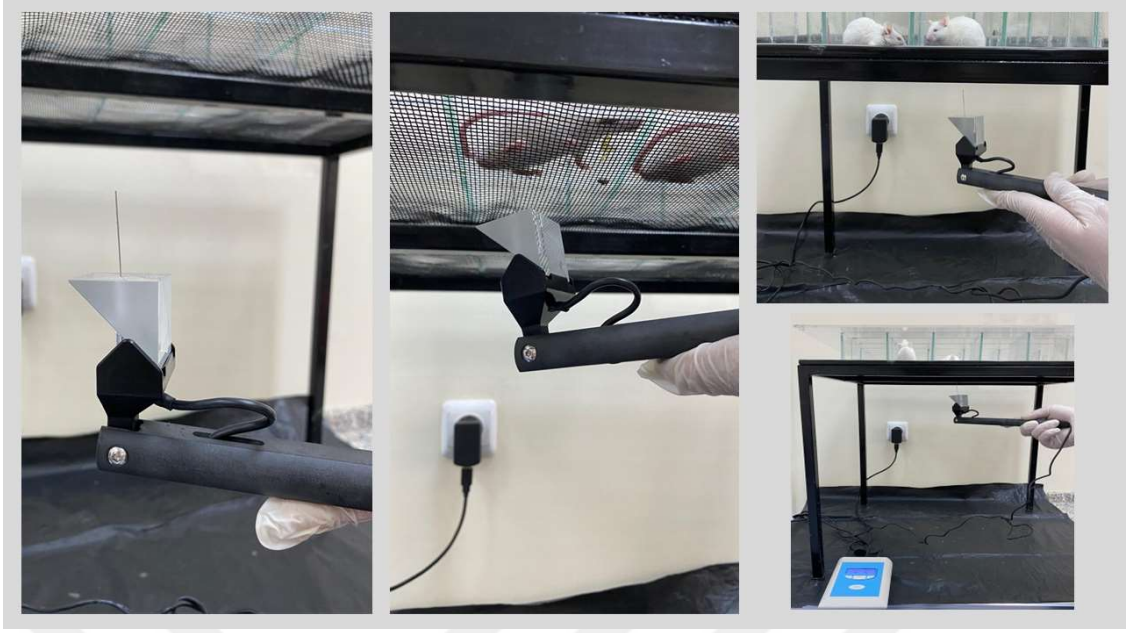
Temelde hot plate testine benzeyen tail flick testi kuyruğa uygulanan radyant ısı kaynağına karşı hayvanın kuyruğunu çekmesiyle sonlandırıldı (Ugo Basile, Tail Flick, Cat. No. 37360). Geri çekme latansı saniye cinsinden kaydedildi. Hayvanın kuyruğu ısı kaynağının distal üçte birlik kısmı üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Stabilizasyonu sağlamak için fareler restrainera konularak test edildi. Farelerin kuyruklarında doku hasarını önlemek için 20 saniyelik kesme süresi (cut-off) uygulandı. Bu süre içerisinde nosiseptif yanıt göstermeyen fareler cihaz üzerinden alındı. Her bir fare için enjeksiyonun yapıldığı dakika 0. dk olarak kabul edildi ve 0, 30, 60, 120 ve 180. dakikalarda Tail flick testi yapıldı. Nosiseptif yanıtlar STZ enjeksiyonundan önce ve DN gelişiminden sonra olmak üzere kaydedildi. DN gelişiminden sonraki ölçümler farklı günlerde 5 kere tekrarlandı (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Tail flick testi

Von Frey Testi

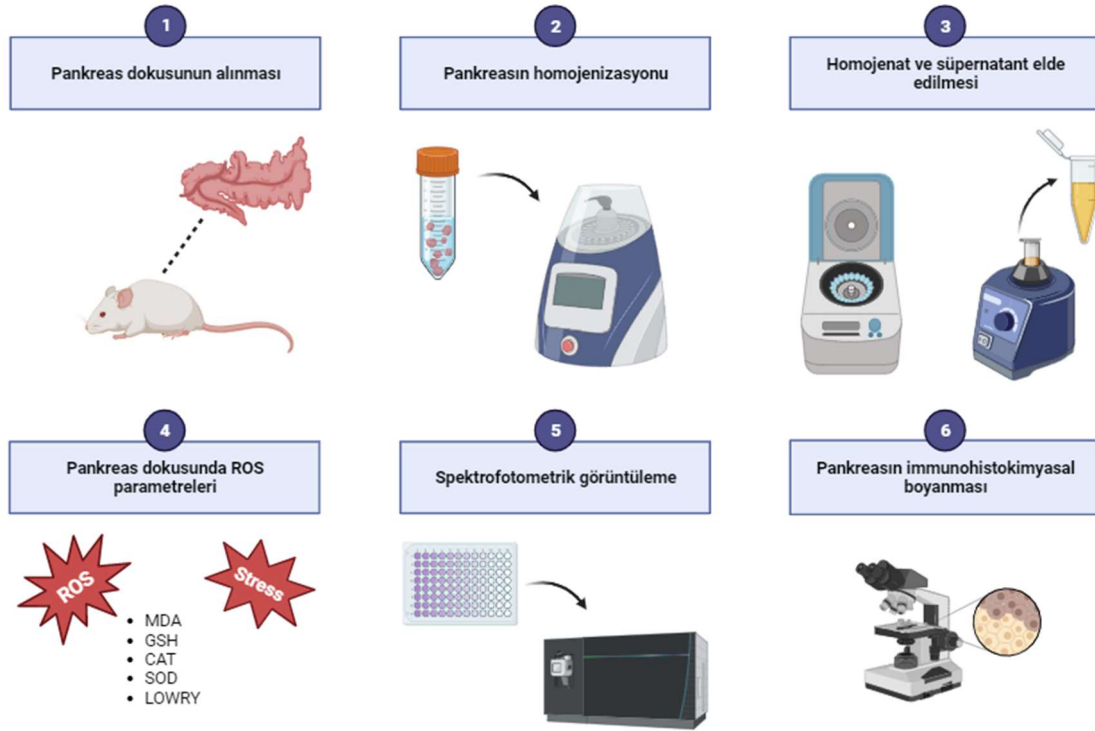
Mekanik nosiseptif davranış yanıtlarının belirlenmesi için elektronik Von Frey cihazı kullanıldı (Ugo Basile, Electronic Von Frey, Cat. No. 38450). Testlerin gerçekleştirilmesi için fareler delikli paslanmaz çelik bir plaka (100x50 cm, 5 mm daire delikli ve delik sınırları arası 2.5 mm) üzerinde 7x9x7 cm ölçülerinde pleksiglas kutular içine yerleştirildi. Hayvanlar, ortama alışmaları için, hiçbir işlem yapılmadan 15 dakika süresince kutular içinde bekletildi. Farelerin sağ arka pençelerinin plantar yüzeyine cihazın flamenti uygulandı. Hayvanın pençeyi geri çekme davranışı göstermesiyle uygulanmış olan kuvvet G cinsinden ölçüldü. Test her bir fare için 3 kez tekrarlandı ve bu 3 denemenin ortalaması nosiseptif yanıt olarak kaydedildi. Her bir fare için enjeksiyonun yapıldığı dakika 0. dk olarak kabul edildi ve 0 ile 60. dakikalarda Von Frey testi yapıldı. İlacın hesaplanan maksimum olası etkisi en yüksek olduğu sürenin 60. dakika olması sebebiyle enjeksiyondan sonra sadece 60. dakikada ölçüm alındı. Nosiseptif yanıtlar STZ enjeksiyonundan önce ve DN gelişiminden sonra olmak üzere kaydedildi. DN gelişiminden sonraki ölçümler farklı günlerde 5 kere tekrarlandı (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Von frey testi

3.2.5. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması

Deney sonunda hayvanlar dekapite edilerek pankreas dokuları alındı. Pankreas doku örnekleri mikroskopik incelemeler için %10'luk tamponlu formalin solüsyonuna alındı. Ayrıca oksidatif stres ölçümü için de alınan pankreas doku örnekleri, analizleri yapılmaya kadar -80°C'de muhafaza edildi. Deney sonrası işlemler Şekil 3.6'da illüstre edilmiştir.



Şekil 3.6. Dekapitasyon ve analizler

3.2.6. Analizlerin Yapılması

3.2.6.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi

3.2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

SOD enzim aktivitesi, Sun ve ekibinin tanımladığı yöntem kullanılarak belirlendi (153). Bu metot, SOD'un nitro mavi tetrazolium (NBT) indirgenmesi ile süperoksit radikallerin etkisini engellemesine dayanmaktadır. Bu yöntemde serbest radikal üretimi ksantin oksidaz (XO) tarafından sağlanmıştır. Kullanılan reaktifler arasında 150 μmol NBT, 0.3 mmol/L ksantin, 0.6 mmol/L Na_2EDTA , 400 mmol/L Na_2CO_3 ve 1 gr/L sıgır serum albümini (BSA) bulunmaktadır.

Her kuyucuğa, numune ve substrat solüsyonundan toplam 2.5 μl eklenmiştir. Kör kuyucuğuna ise 2 μl distile su eklenmiştir. Tüm kuyucuklara, 0.5 μl XO (167 U/L) eklenmiştir. Daha sonra, 25°C'de 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, spektrofotometrede (Thermo, ABD) 560 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Tüm solüsyonların hazırlanması ve ölçümler, karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir.

SOD aktivitesi aşağıdaki hesaplamalarla belirlenmiştir:

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{AK} - \text{AN}) / \text{AK} \times 100$$

AN: Numune Absorbansı

AK: Kör Absorbansı

%50 inhibisyon 1 U olarak kabul edildiğinde;

Aktivite (U/ml) = [(% inhibisyon / 50) x (1 / 0.1)] ml

Spesifik aktivite (U/mg protein) = [U/ml / mg protein] hesaplamasıyla U/mg biriminde ifade edilmiştir.

3.2.6.1.2. Katalaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

CAT, toksik ve oksidatif etkilere karşı dokuyu koruyan bir oksidoredüktaz sınıfı antioksidan enzimdir. CAT enzim aktivitesi, Aebi yöntemi kullanılarak tespit edildi (154). Bu yöntemde H₂O₂, eklenen CAT aktivitesi ile su ve oksijene dönüştürülür. H₂O₂'nin suya dönüşme hızı, CAT enzim aktivitesini yansıtır ve absorbans değeri, UV spektrumuyla doğru orantılı olarak azalır.

Absorbans ölçümleri için, pH 7.0 ve 50 mM fosfat tamponuyla hazırlanan H₂O₂ çözeltisi kullanıldı. H₂O₂ çözeltisi için başlangıçta 0.5 nm'lik bir absorbans ayarı yapıldı. Kontrol olarak fosfat tamponu kullanıldı. H₂O₂ çözeltisi 25 ml fosfat tamponu ile seyreltildi ve bu, substrat olarak kullanıldı. 2 µl süpernatant, kuyucuklara eklenmiş ve 10 µl H₂O₂ eklenmiştir. Her 15 saniyede bir, 5 dakika boyunca absorbans düşüşü kaydedildi. Spektrofotometre (Thermo, ABD) kullanılarak ölçümler, 240 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

CAT aktivitesi aşağıdaki denklemlerle hesaplandı:

$$k \text{ (reaksiyon hızı sabiti)} = [2.3 \times \log (OD1/OD2)] / \Delta t \text{ (sn)}$$

$$k/g \text{ protein} = k / [(g/ml \text{ protein}) \times 1000]$$

Sonuçlar, k/g protein cinsinden ifade edildi.

3.2.6.1.3. Malondialdehit Ölçümü

MDA, oksidatif stresin bir sonucu olarak meydana gelen lipid peroksidasyonunun ürünlerinden biridir. MDA ölçümü için Ohkawa ve arkadaşları tarafından geliştirilen spektrofotometrik bir yöntem kullanılmıştır (155). Bu yöntemin temeli, peroksidize olan lipidlerin parçalanması sonucu oluşan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonunun neden olduğu renkli ürünün miktarının belirlenmesine dayanır.

Yöntem şu şekilde uygulandı: %0.675'lik 1,25 gram TBA distile suyla karıştırıldı, sonra cam beherin ağzı parafilm ile kapatıldı ve 95°C'de eritildi. Daha önceden cam tüplere alınmış homojenatların üzerine %10'luk 10 gram trikloroasetik asit (TCA)

çözeltisi ve 100 ml distile su karıştırılarak 1,25 ml eklenmiştir. Ardından, distile su ve 1,25 ml TCA eklenmiştir. Cam tüpler 10 saniye boyunca vortex yardımıyla karıştırıldı ve ardından 95°C'ye kadar 25 dakika ısıtıldı. Daha sonra cam tüpler buzlu suya alınarak soğumaları beklenmiş ve 3000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örneklerin süpernatantları ayrıldı. 1 ml süpernatant ve 500 µl TBA cam tüplere eklenip tüpler 95°C'de 15 dakika boyunca kaynatıldı ve renk değişimi izlendi. Süre sonunda cam tüpler buzlu suyla soğutuldu. Numuneler, 96 delikli bir well plate'e eklenmiş ve 1,25 µl eklenen numunelerin absorbans değerleri, 532 nm dalga boyunda bir spektrofotometre (Thermo, ABD) kullanılarak ölçüldü.

3.2.6.1.4. Glutasyon Ölçümü

GSH, hücresel oksidasyon-redüksiyon dengesinde kritik bir rol oynamaktadır. Toksik metabolitleri hücrelerden uzaklaştırır ve indirgenmiş formu sayesinde hücrelerdeki sülfhidril gruplarının devamlılığını korur (156). GSH ölçümü, spektrofotometrik bir yöntemle gerçekleştirildi (157, 158). Bu yöntem, reaksiyon ortamına ilave edilen 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) sayesinde sülfhidril gruplarının indirgenmesi sonucunda parlak sarı renkte nitro-merkaptobenzoik asitin oluşumuna dayanmaktadır. Yöntemde önceden hazırlanan süpernatantların üzerine %1'lik sodyum sitrat solüsyonunda hazırlanan DTNB solüsyonu eklenmiş ve 412 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Thermo, ABD) ölçülmüştür. Kalibrasyon grafiği, GSH redüktaz çözeltisi kullanılarak oluşturulmuştur. Elde edilen sonuçlar µmol/mg protein cinsinden ifade edilmiştir. Hesaplamalar, bilinen GSH seviyelerinin standart grafiklere göre yapılmıştır.

3.2.6.1.5. Lowry Protein Tayini

Protein tayininde en yaygın kullanılan yöntemlerden Folin-Lowry yöntemidir (159). Bu yöntemde biüre reaktifi kullanılarak oluşan protein kompleksi, fosfomolibdik fosfotungstik asit ile heteropolimolibden mavisine indirgenir ve sonuçta koyu mavi bir renk oluşur. Oldukça hassas sonuçlar veren bu yöntem pH'ya bağımlıdır.

Yönteme başlamadan tepkimelerde kullanılacak olan reaktifler hazırlandı. Bu kapsamda A reaktifi olarak 1 gr Na ve 0.5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ karıştırılıp 100 ml distile suda, B reaktifi için ise 20 gr Na_2CO_3 ve 4 gr NaOH bir litre distile suda çözüldü. 1 ml A reaktifi + 50 ml B reaktifi ile birleştirilip asıl kullanılacak olan C reaktifi hazırlandı. Numune, distile su ve C reaktifi cam tüpte karıştırılarak, oda ısısında 10 dk bekletildi. Hazırlanan

bu karışıma 250 µl Folin-Ciocalteu's Phenol reaktifi eklenerek vortekslendi. Oda ısısı ve karanlık ortamda 30 dk inkübe edilip inkübasyon sonunda 96'lık well plate'lere alındı. 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo, ABD) absorbans değerleri ölçüldü. BSA ile standart çözeltiler hazırlanıp standart eğri grafiği oluşturuldu.

3.2.6.2. Histolojik Analizler

Histopatolojik incelemeler için alınan pankreas doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Tespit edilen dokulara rutin doku takip işlemleri uygulandı ve doku örnekleri parafin bloklar içine gömüldü. Hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histolojik olarak ışık mikroskopik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi, immunohistokimyasal değerlendirme için ise Kaspaz-3 boyama yöntemleri kullanıldı (160). Kesitler Leica DFC 280 Işık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd., Cambridge, İngiltere) kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal değerlendirme için pankreas doku örneklerinden polilisin kaplı lamalar üzerine kesit alındı. Numune kesitler sitrat tamponuna (pH 7.6) alındı ve 20 dakika boyunca mikrodalga fırınında ısıtıldı. Oda sıcaklığında 20 dakika soğutulduktan sonra, kesitler fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Daha sonra kesitler 7 dakika süreyle %0,3 H₂O₂'de içinde tutuldu ve PBS ile yıkandı. Kesitler iki saat boyunca poliklonal Caspase-3 antikoruna (Boster, PA1302) ile inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yıkayıp 10 dakika boyunca Sekonder Antikor ile ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında streptavidin peroksidaz ile inkübe edildi. 15 dakika boyunca aminoetil karbazol (AEC) kromojen + substrat aşaması uygulandı ve 1 dakika boyunca Mayer'in hematoksileni ile boyandı. Musluk suyu ile durulandı ve sudan arındırıldı. Kesitler aqueous mount ile kapatıldıktan sonra yine Leica DFC 280 Işık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd., Cambridge, İngiltere) kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı.

Pankreas hasarının histopatolojik incelemesi, kanama, tübüler lümende dilatasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, tübüllerde epitelyal atrofi ve hücre deskuamasyonu, tübüler epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve tübüler lümendeki silindirler gibi her parametreye göre yapıldı. Numuneleri yarı kantitatif olarak puanlamak için en az on mikroskopik bölge incelendi.

3.3. *In Vitro* Çalışmalar

3.3.1. Dorsal Kök Gangliyonu

DKG hücre izolasyon ve kültürü 1985 yılında Forda ve Kelly'nin geliştirdiği yöntemle yapıldı (161). Hücre kültürü işlemi laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Primer hücre kültürüne başlamadan önce kullanılacak tüm malzemeler otoklav (Nüve, Ankara, Türkiye) ile steril hale getirildi. Otoklavlanan malzemeler kontaminasyonu önlemek adına hemen laminar hava akımlı güvenlik kabini (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) içine etanole (%70) tabi tutularak alındı. Kabinde çalışma yapılmadığı zaman ultraviyole ışık kaynağı açık bırakılarak yine kontaminasyon oluşması engellendi. Çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan tüm solüsyonların pH'sı ve osmolaritesi, pH metre (Hanna Instruments, Woonscocket, ABD) ve ozmometre (Gonotec, Berlin, Almanya) aracılığıyla ölçüldü.

Kültür vasatı, hücre kültürünün yapılacağı gün hazırlandı. Taze hazırlanan vasatın bileşimi Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Sinir hücre kültür vasatı bileşimi

Kimyasal	Miktar
Nörobasal-A (GIBCO, ThermoFisher Scientific)	500 mL
B27 (GIBCO, ThermoFisher Scientific)	10 mL
Glutamaks (GIBCO, ThermoFisher Scientific)	5 mL
Penisilin-Streptomisin (GIBCO, ThermoFisher Scientific)	5 mL

3.3.2. Primer Hücre Kültürü

Primer hücre kültürünün hazırlanması için İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Araştırma Merkezinden temin edilen 1-2 günlük *Wistar Albino* ırkı sıçanlar kullanıldı. Dekapite edilen yavru sıçanlar petri kabına konarak alkollenip kabin içine alındı. Makas yardımıyla vertebral kolon çıkarıldı. Spinal kolonun içi kaudal uçtan başlayarak boyun kısmına kadar, yaylı küçük bir makasla açıldı. Alınan spinal kolon içerisinde PBS bulunan petri kaplarında 3 defa yıkandı. DKG'ler diseksiyon mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) altında forsepsle izole edildi. Daha sonra içerisinde kültür vasatı olan farklı bir petri kabına alındı. Bütün DKG gövdeleri çıkarılıp petri kabında toplandıktan sonra, petri kabı hassas dairesel hareketlerle sallanarak gangliyonların bir araya gelmesi sağlandı. Bir araya toplanan gangliyonların bulunduğu kültür medyumunu pastör pipet ile çekildi. Öncesinde 37 °C'de inkübe edilen 900 µL kültür vasatı ve 100 µL kollagenaz (%0.125) gangliyonlara ilave edilerek çalkalandı. 13 dakika inkübatörde bekletildi. Enzime tabi tutulan hücre 13 dakikanın sonunda hızlı bir şekilde üç defa PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra 900 µl PBS ile 100 µl tripsin (%0.25) ilave edilerek hafifçe çalkalandı. 6 dakika süreyle bu şekilde inkübe edilip 15 ml'lik steril falkonlara aktarıldı. Falkonların üzerine yaklaşık 4 ml inkübe edilmiş kültür vasatı eklendi. Gangliyonlar tüpün dibine çöktürüldükten sonra kültür vasatı pastör pipet ile uzaklaştırıldı ve bu işlem 3 defa tekrarlandı. Gangliyonların mekanik olarak hücrelere ayrıştırılması için 100 µl DNAz ve 900 µl kültür medyumunu ilave edilip steril bir pastör pipet ile hızlıca çekilip boşaltıldı. Birkaç defa tekrarlanan çek boşalt işleminde her tekrarda üstte kalan süspansiyon alınarak diğer gangliyonlara uygulanan mekanik titrasyon işlemine devam edildi. Daha sonra hücre süspansiyonunun içine 240 µl sinir büyüme faktörü (NGF) eklendi. Primer hücre kültüründen 2-3 saat önce Poly-D-lizin ve laminin ile kaplanan ve inkübatörde bekletilen 96'lık well plate'ler inkübatörden alındı. Hazırlanmış hücreler bu plate'lere ekilerek hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılmak üzere inkübasyona kaldırıldı.

3.3.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve MTT Analizi

Hücre canlılığının değerlendirilmesi, yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT yöntemi ile gerçekleştirildi (162). Bu yöntem, tetrazolium halkasının MTT boyası ile parçalanabilmesi esasına dayanmaktadır (163, 164). Bu metotta, MTT canlı olan hücrelere absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana

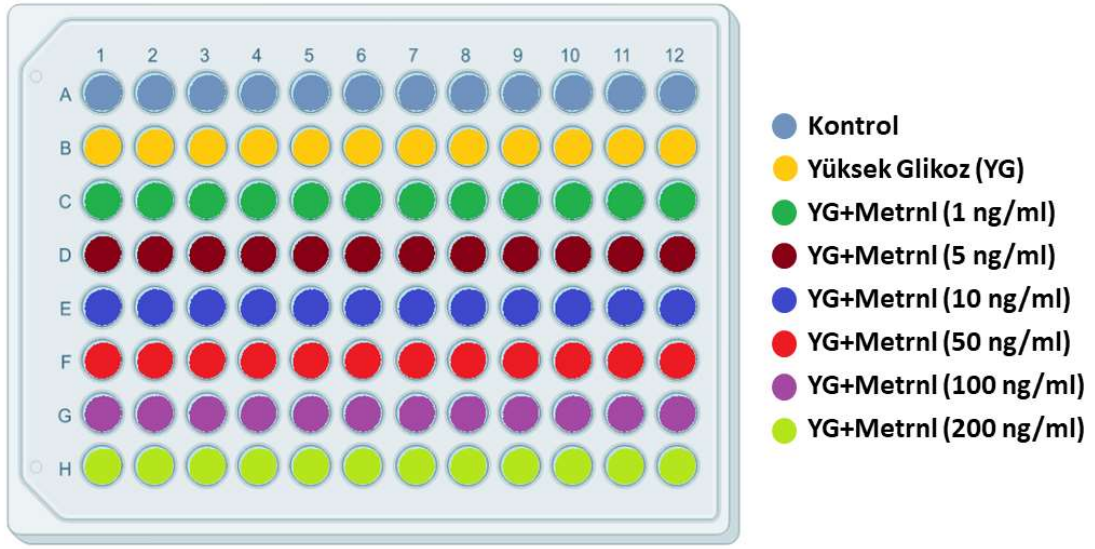
indirgenir. İndirgenen formazanın görülmesi, sadece aktif mitokondriye sahip olan canlı hücrelerde olur. Ölü hücreler tetrazolium bileşiklerini indirgeme yeteneğini kaybeder ve renk değişimi yapamazlar. Bu durum da hücre canlılığının tespiti anlamını taşımaktadır. Spektrofotometrik olarak ölçülen oran canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir.

Deneylere başlamadan önce hazırlanmış olan DKG hücrelerinin canlılık oranları %0.4'lük tripan mavisi kullanılarak belirlendi. Tripan mavisi hücre sayımında kullanılan vital bir boyadır. Tripan mavisi canlı hücrelerin membran yapısı zarar görmediği için içine giremezken cansız hücreler tarafından absorbe edilir. Bu durum da ölü ve canlı hücrelerin oranlarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Yaptığımız çalışmada hücre canlılık oranları %90'ın üstünde olduğunda deneylere başlandı.

3.3.4. Hücre Canlılık Analizi

Metnrl'nin DN'nin *in vitro* modelinde hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek için DKG nöronları Şekil 3.7'de gösterildiği gibi kontrol, YG, YG+Metnrl (1 ng/ml), YG+Metnrl (5 ng/ml), YG+Metnrl (10 ng/ml), YG+Metnrl (50 ng/ml), YG+Metnrl (100 ng/ml) ve YG+Metnrl (200 ng/ml) olmak üzere 8 gruba ayrıldı. Gruplar her bir kuyucukta en az 5×10^4 hücre olacak şekilde 96'luk well plate'lere ekildi. Her kuyucuk aşağıdaki protokole göre 200 μ L'ye tamamlandı:

- Tüm kuyucuklara 100 μ L DKG hücreleri (5×10^4) içeren medyum konuldu.
- Kontrol için belirtilen kuyucuklara 100 μ L hücre medyumunu Nörobasal-A konuldu.
- YG ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG + 80 μ L Nörobasal-A konuldu.
- YG + Metnrl (1 ng/ml) ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L) + 20 μ L Metnrl (10 ng/ml) + 60 μ L Nörobasal-A konuldu.
- YG + Metnrl (5 ng/ml) ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L) + 20 μ L Metnrl (50 ng/ml) + 60 μ L Nörobasal-A konuldu.
- YG + Metnrl (10 ng/ml) ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L) + 20 μ L Metnrl (10 ng/ml) + 60 μ L Nörobasal-A konuldu.
- YG + Metnrl (50 ng/ml) ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L) + 20 μ L Metnrl (50 ng/ml) + 60 μ L Nörobasal-A konuldu.
- YG + Metnrl (100 ng/ml) ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L) + 20 μ L Metnrl (100 ng/ml) + 60 μ L Nörobasal-A konuldu.
- YG + Metnrl (200 ng/ml) ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L) + 20 μ L Metnrl (200 ng/ml) + 60 μ L Nörobasal-A konuldu.

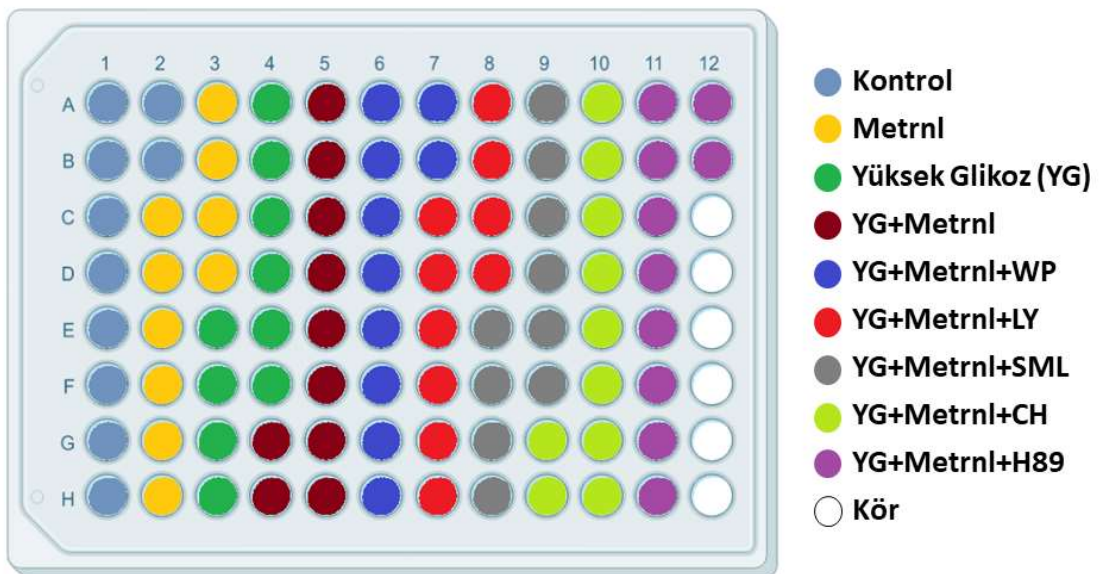


Şekil 3.7. MTT analizi için grupların 96'lık well plate üzerindeki yerleşimi

Şekil 3.7'deki gibi hazırlanan 96'lık well plate 24 saat 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ nemli inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki sıvılar vakum pompası ile uzaklaştırıldı. Plate'lere her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde tekrarlayıcı pipet yardımıyla steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan, 0.5 mg/ml MTT çalışma solüsyonu eklenerek inkübatörde 3 saat inkübasyonu sağlandı. 3 saatin sonunda kuyucuklardaki MTT ortamdan uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Kuyucuklardaki hücrelerin optik dansiteleri spektrofotometre cihazında (Thermo, ABD) 540 nm dalga boyunda okutuldu. Kontrol hücrelerinin verdiği absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. YG ve YG+Metnrl uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve çıkan sonuç yüzde canlılık olarak kabul edildi. MTT deneyi farklı günlerde en az 10 kez tekrarlandı ve ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlara göre Metnrl'in EC₅₀ analizi ile etkin dozu belirlendi ve belirlenen etkin doz kullanılarak Metnrl'in hücre canlılığı üzerine etkisi hücresel yolak üzerinden sorgulandı. JAK2/STAT3, PI3K, MAPK, PKC ve Protein Kinaz A (PKA) olmak üzere beş farklı yolak sorgulaması yapıldı. Bu bağlamda JAK2/STAT3 inhibitörü (10 µM, WP1066), PI3K inhibitörü (50 µM, LY294002), MAPK inhibitörü (100 nM, SML0543), PKC inhibitörü (10 µM, Chelerythrine chloride-CHCL) ve PKA inhibitörü (10 µM, H89) kullanıldı. Hücresel yolak sorgulaması için 9 grup oluşturularak plate düzeni Şekil 3.8'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır. Bu kapsamda 96'lık well plate'e Kontrol, Metnrl, YG,

YG+Metrl, YG+Metrl+WP, YG+Metrl+LY, YG+Metrl+SML, YG+Metrl+CH ve YG+Metrl+H89 grupları için her bir kuyucukta en az 5×10^4 olacak şekilde hücre ekilmiştir. Ekimden sonraki işlemler aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir:

- Kör hariç tüm kuyucuklara 100 μ L DKG hücreleri (5×10^4) içeren medyum konuldu.
 - Kontrol ile gösterilen kuyucuklara 100 μ L hücre medyumunu Nörobasal-A konuldu.
 - Metrl ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L Metrl (5,5 ng/ml), 80 μ L Nörobasal-A konuldu.
 - YG ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 80 μ L Nörobasal-A konuldu.
 - YG+Metrl ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L Metrl (5,5 ng/ml), 60 μ L Nörobasal-A konuldu.
 - WP ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L WP (10 μ M) konulup 2 saat beklendikten sonra 20 μ L Metrl (5,5 ng/ml), 40 μ L Nörobasal-A konuldu.
 - LY ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L LY (50 μ M) konulup 2 saat bekledikten sonra 20 μ L Metrl (5,5 ng/ml), 40 μ L Nörobasal-A konuldu.
 - SML ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L SML (50 μ M) konulup 2 saat bekledikten sonra 20 μ L Metrl (5,5 ng/ml), 40 μ L Nörobasal-A konuldu.
 - CH ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L CHCL (50 μ M) konulup 2 saat bekledikten sonra 20 μ L Metrl (5,5 ng/ml), 40 μ L Nörobasal-A konuldu.
 - H89 ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L H89 (50 μ M) konulup 2 saat bekledikten sonra 20 μ L Metrl (5,5 ng/ml), 40 μ L Nörobasal-A konuldu.
- Kör olarak belirtilen kuyucuklara ise hiçbir ekim yapılmayarak tamamen boş bırakıldı.



Şekil 3.8. Metrn1'in hücre canlılığına yolak üzerinden etkisini MTT analizi ile incelemek için grupların 96'lık plate üzerindeki yerleşimi

Şekil 3.8'deki gibi hazırlanan 96'lık well plate 24 saat 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ nemli inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki sıvılar vakum pompası ile uzaklaştırıldı. Plate'lere her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde tekrarlayıcı pipet yardımıyla steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan, 0.5 mg/ml MTT çalışma solüsyonu eklenerek inkübatörde 3 saat inkübasyonu sağlandı. 3 saatin sonunda kuyucuklardaki MTT ortamdan uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Kuyucuklardaki hücrelerin optik dansiteleri spektrofotometre cihazında (Thermo, ABD) 540 nm dalga boyunda okutuldu. Kontrol hücrelerinin verdiği absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. YG ve YG+Metrn1 uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve çıkan sonuç yüzde canlılık olarak kabul edildi. MTT deneyi farklı günlerde en az 10 kez tekrarlandı ve ölçümler alındı.

3.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

Analizlerde IBM SPSS Statistics 26.0 for Windows paket programı ve MedCalc 11.0 (Belçika) programı kullanıldı. Ağrı eşiği analizlerinde normal dağılıma uygunluk D'Agostino-Pearson testi, gruplar arası farklılıklar için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve post-hoc Dunnet's testleri kullanıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalar için ise two-tailed unpaired t testi kullanıldı. Oksidatif stres ve histolojik skorlama Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

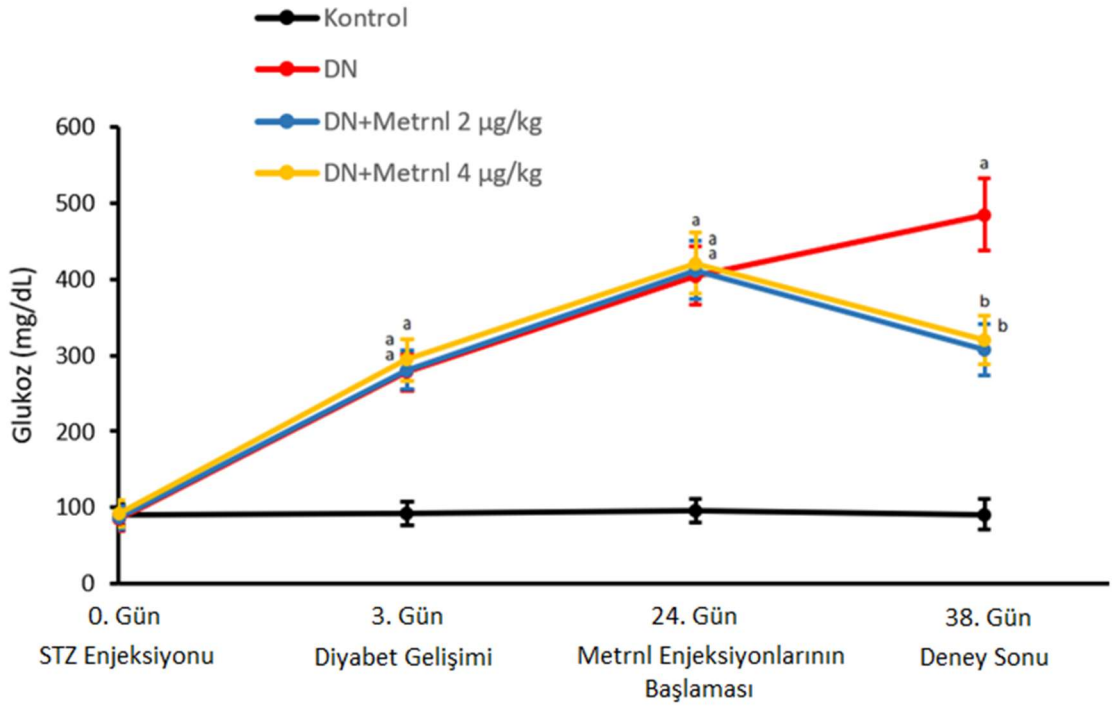
Grafikler SigmaPlot 12.0 ve GraphPad Prism 8 programları kullanılarak yapıldı. Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.6 biorender.com aracılığıyla hazırlandı.

4. BULGULAR

4.1. *In Vivo* Çalışmalar

4.1.1. Metrnl'in Kan Glukoz Düzeyleri Üzerine Etkisi

Çalışma boyunca hayvanlardaki kan glukoz düzeylerinin değişimi Şekil 4.1'de verilmiştir. STZ enjeksiyonundan önce ve 3 gün sonra kan glukoz düzeyleri ölçülerek diyabet oluşumu gözlemlendi. Diyabet oluşumundan sonra nöropati gelişmesi için 21 gün beklenilerek 24. günde ip Metrnl uygulamasına başlandı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, DN gruplarında kan glukoz düzeyinin kontrole göre anlamlı olarak yükseldiği belirlendi ($p<0.05$). 14 günlük Metrnl enjeksiyonu ile kan glukozunun tedavi gruplarında DN grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).



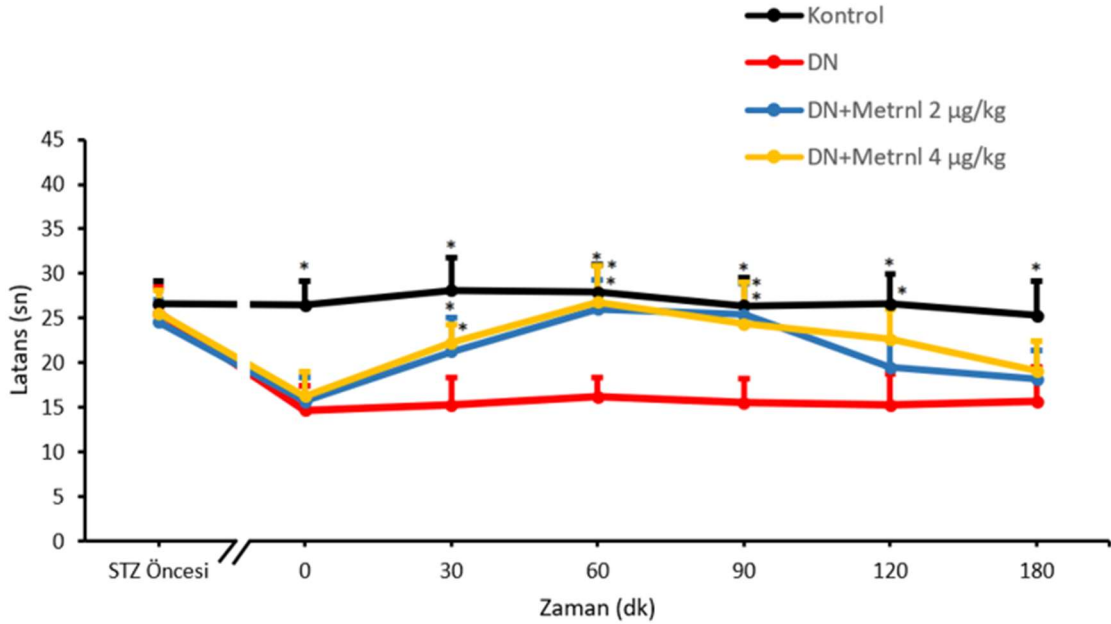
Şekil 4.1. Metrnl'in kan glukoz düzeyleri üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,bp<0.05$)

4.1.2. Diyabetik Nöropati Modelinde Nositseptif Davranış Değerleri

STZ ile indüklenen diyabetin *in vivo* modelinde hayvanlarda DN gelişimi, STZ enjeksiyonu öncesinde ve 21 gün sonrasında mekanik ve termal nosiseptif davranışlar testleri kullanılarak incelendi.

Kontrol grubundaki hayvanlara hiçbir işlem yapılmamış olup çözücü ve tedavi gruplarında ilaç enjeksiyonunun yapıldığı dakika 0. dakika kabul edilerek her yarım saatte bir 180. dakikaya kadar hot plate ve tail flick testi ile termal nosiseptif davranışları ölçüldü. 14 gün boyunca ip olarak uygulanan Metrnl'in hot plate cihazında nosiseptif davranış üzerine etkileri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

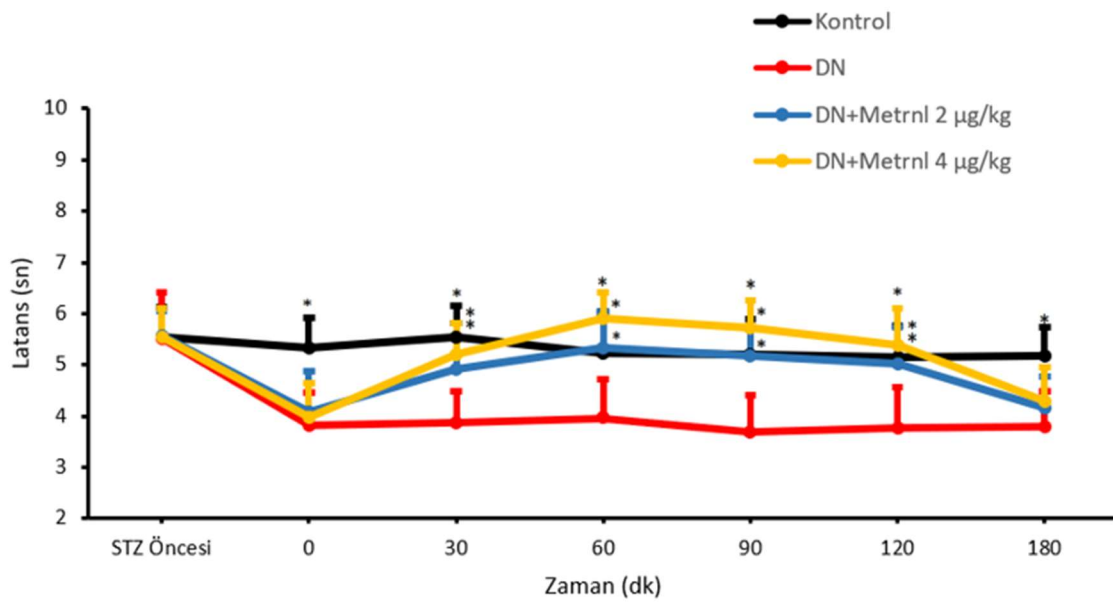
Yapılan istatistiksel değerlendirmede, DN gelişen gruplarda nosiseptif değerlerin, enjeksiyon yapılmadan önce kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Metrnl uygulaması sonrasında ise 30., 60. ve 90. dakikalarda Metrnl'in iki grubunda da nosiseptif değerlerin DN grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldiği tespit edildi ($p<0.05$). Bu anlamlılığın 120. dakikada sadece 4 $\mu\text{g/kg}$ Metrnl uygulanan grupta devam ettiği ($p<0.05$), 180. dakikada ise DN grubuna kıyasla tedavi gruplarında önemli bir farklılık olmadığı belirendi ($p>0.05$).



Şekil 4.2. Farelerde hot plate testi ile nosiseptif davranış ölçümleri. (Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ve ardından post-hoc Dunnet testi ile gerçekleştirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. *DN grubuna göre farkı göstermektedir. * $p<0.05$)

14 gün boyunca ip olarak uygulanan Metrnl'in tail flick cihazında nosiseptif davranış üzerine etkileri Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

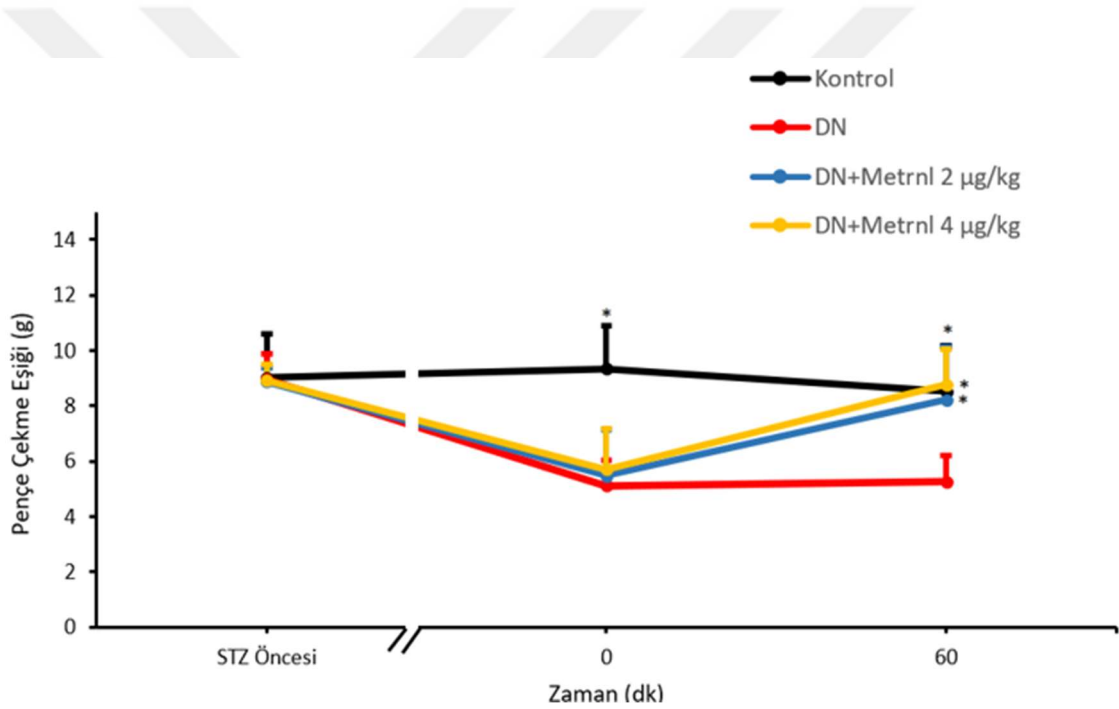
Yapılan istatistiksel değerlendirmede, DN gelişen gruplarda nosiseptif değerlerin, enjeksiyon yapılmadan önce kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Metrnl uygulaması sonrasında ise 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda Metrnl'in iki grubunda da nosiseptif değerlerin DN grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldiği tespit edildi ($p<0.05$). 180. dakikada ise DN grubuna kıyasla tedavi gruplarında önemli bir farklılık olmadığı belirendi ($p>0.05$).



Şekil 4.3. Farelerde tail flick testi ile nosiseptif davranış ölçümleri. (Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ve ardından post-hoc Dunnet testi ile gerçekleştirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. *DN grubuna göre farkı göstermektedir. * $p<0.05$)

STZ ile indüklenen diyabetin *in vivo* modelinde DN gelişiminin mekanik nosiseptif davranış yanıtları ile belirlenmesi için hayvanlar Von Frey testine tâbi tutuldu. Uygulanan Metrn1'in nosiseptif davranışlar üzerine en etkin zamanının ilaç enjeksiyonundan 60 dakika sonra olarak belirlenmesinden dolayı von frey testi 0. ve 60. dakikalarda gerçekleştirildi. 14 gün boyunca ip olarak uygulanan Metrn1'in von frey cihazında nosiseptif davranış üzerine etkileri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

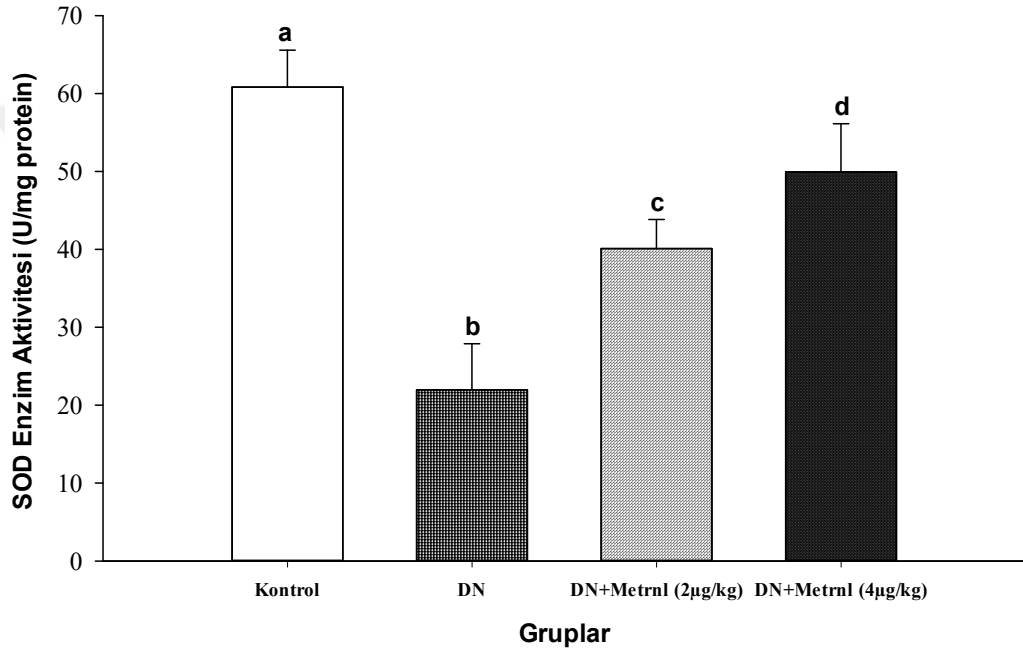
Yapılan istatistiksel değerlendirmede, DN gelişen gruplarda mekanik olarak ölçülen nosiseptif değerlerin, enjeksiyon yapılmadan önce kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Metrn1 enjeksiyonundan 60 dk sonra Metrn1'in iki grubunda da nosiseptif değerlerin DN grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldiği tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.4. Farelerde von frey testi ile nosiseptif davranış ölçümleri. (Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ve ardından post-hoc Dunnet testi ile gerçekleştirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. *DN grubuna göre farkı göstermektedir. * $p<0.05$).

4.1.3. Metrnl'in SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

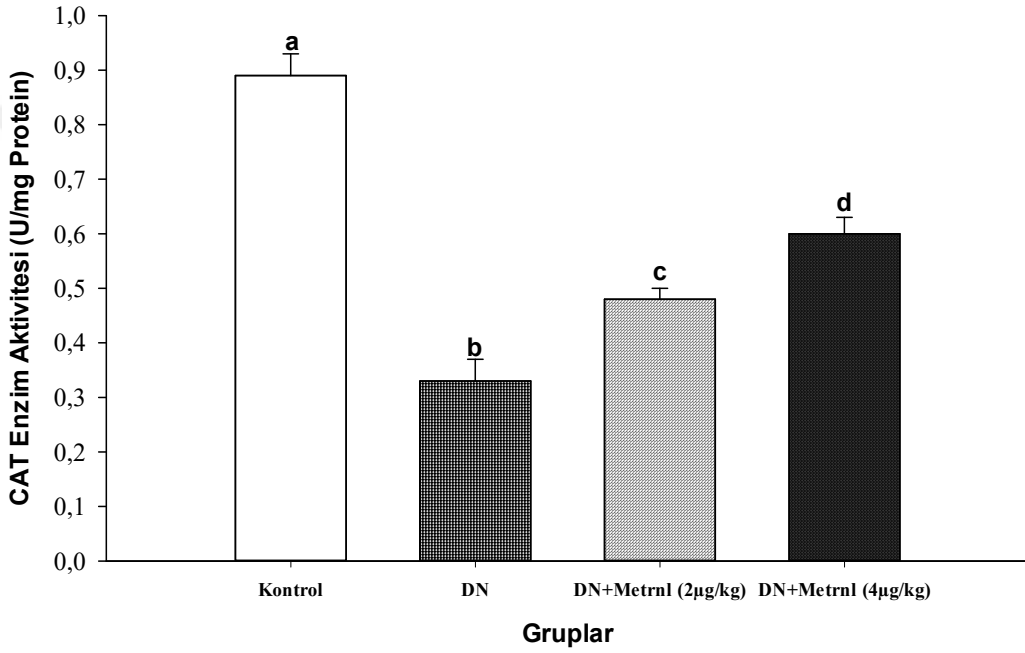
Hayvanların pankreas dokuları üzerinde yapılan analizler sonucu grupların SOD enzim aktiviteleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir. DN grubunda kontrole kıyasla SOD aktivitesinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0.05$). DN gelişen gruplara ip olarak uygulanan 2 $\mu\text{g/kg}$ ve 4 $\mu\text{g/kg}$ Metrnl'in, azalmış olan SOD aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı tespit edildi ($p<0.05$). Tespit edilen bu anlamlı artışın doz bağımlı olarak gerçekleştiği görüldü ($p<0.05$).



Şekil 4.5. Metrnl'in SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Harfler birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,b,c,d,p<0.05$)

4.1.4. Metrnl'in CAT Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

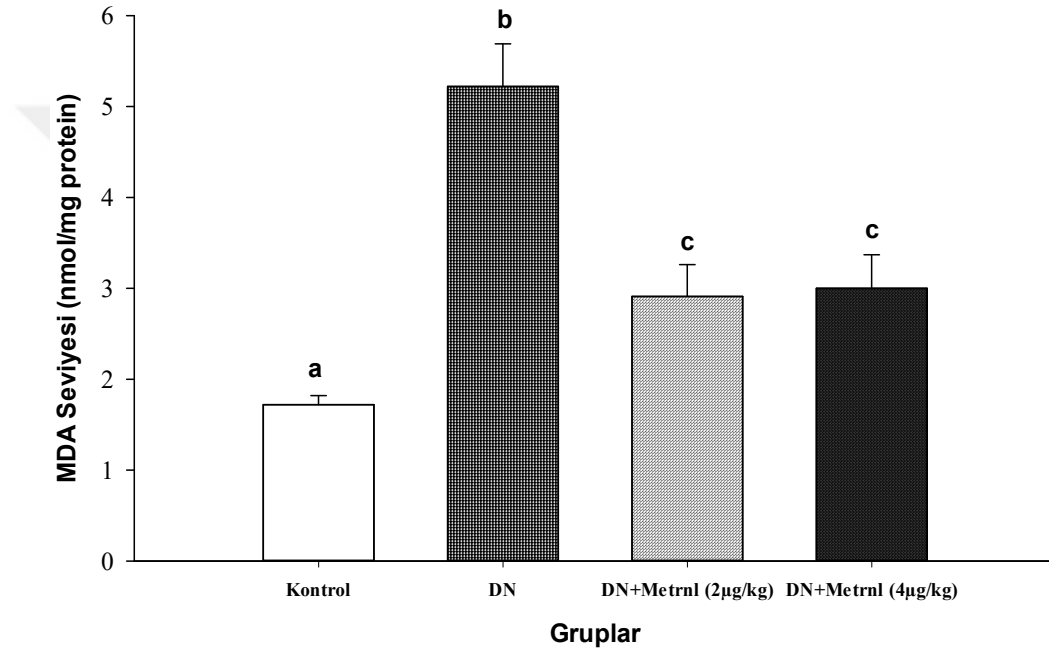
Hayvanların pankreas dokuları üzerinde yapılan analizler sonucu grupların CAT enzim aktiviteleri Şekil 4.6'te gösterilmiştir. DN grubunda kontrole kıyasla CAT aktivitesinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0.05$). DN gelişen gruplara ip olarak uygulanan 2 $\mu\text{g/kg}$ ve 4 $\mu\text{g/kg}$ Metrnl'in, azalmış olan CAT aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı tespit edildi ($p<0.05$). Tespit edilen bu anlamlı artışın doz bağımlı olarak gerçekleştiği görüldü ($p<0.05$).



Şekil 4.6. Metrnl'in CAT enzim aktivitesi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Harfler birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,b,c,d,p<0.05$)

4.1.5. Metrnl'in MDA Seviyesi Üzerine Etkisi

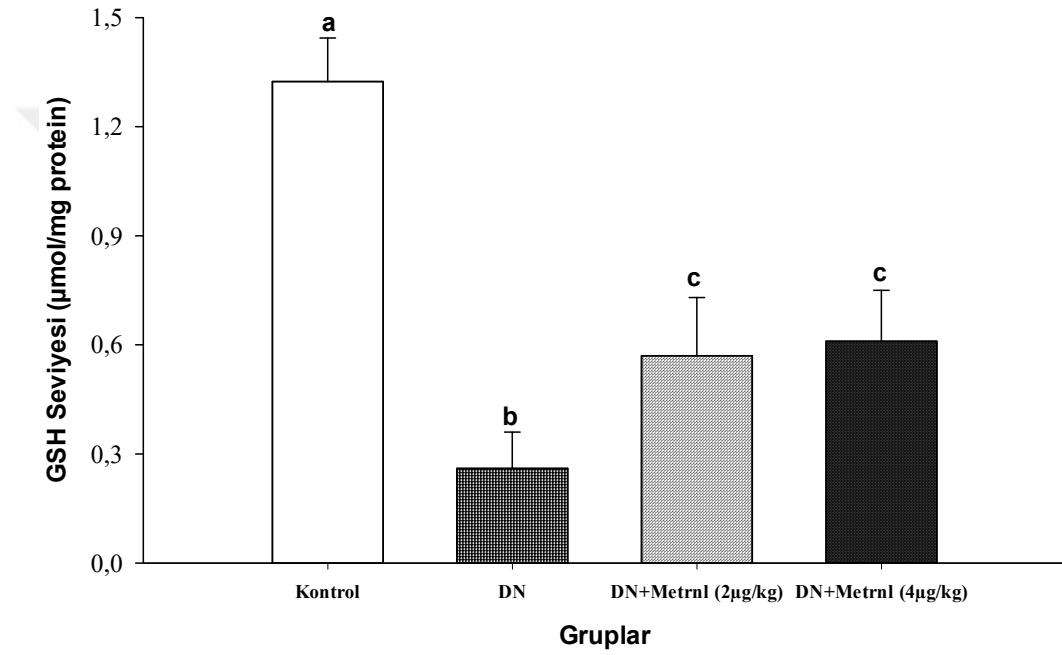
Hayvanların pankreas dokuları üzerinde yapılan analizler sonucu grupların MDA seviyeleri Şekil 4.7'te gösterilmiştir. DN grubunda kontrole kıyasla MDA seviyesinin anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0.05$). DN gelişen gruplara ip olarak uygulanan 2 $\mu\text{g/kg}$ ve 4 $\mu\text{g/kg}$ Metrnl'in, artmış olan MDA düzeyini anlamlı olarak azalttığı tespit edildi ($p<0.05$). Fakat tespit edilen bu anlamlı azalmanın doz bağımlı olmadığı görüldü ($p>0.05$).



Şekil 4.7. Metrnl'in MDA seviyesi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Harfler birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,b,c p<0.05$)

4.1.6. Metrn1'in GSH Seviyesi Üzerine Etkisi

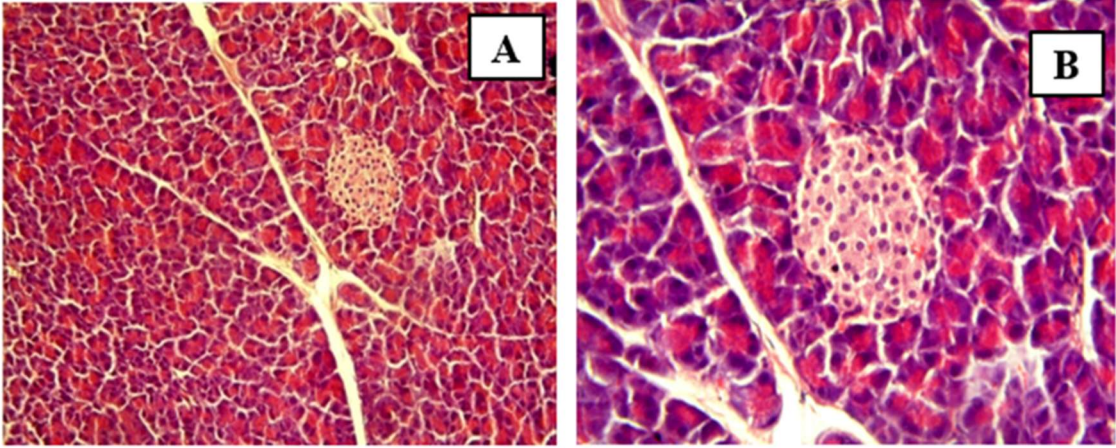
Hayvanların pankreas dokuları üzerinde yapılan analizler sonucu grupların GSH seviyeleri Şekil 4.8'te gösterilmiştir. DN grubunda kontrole kıyasla GSH seviyesinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0.05$). DN gelişen gruplara ip olarak uygulanan 2 $\mu\text{g/kg}$ ve 4 $\mu\text{g/kg}$ Metrn1'in, azalmış olan GSH düzeyini anlamlı olarak arttırdığı tespit edildi ($p<0.05$). Fakat tespit edilen bu anlamlı artışın doz bağımlı olmadığı görüldü ($p>0.05$).



Şekil 4.8. Metrn1'in GSH seviyesi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Harfler birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,b,c p<0.05$)

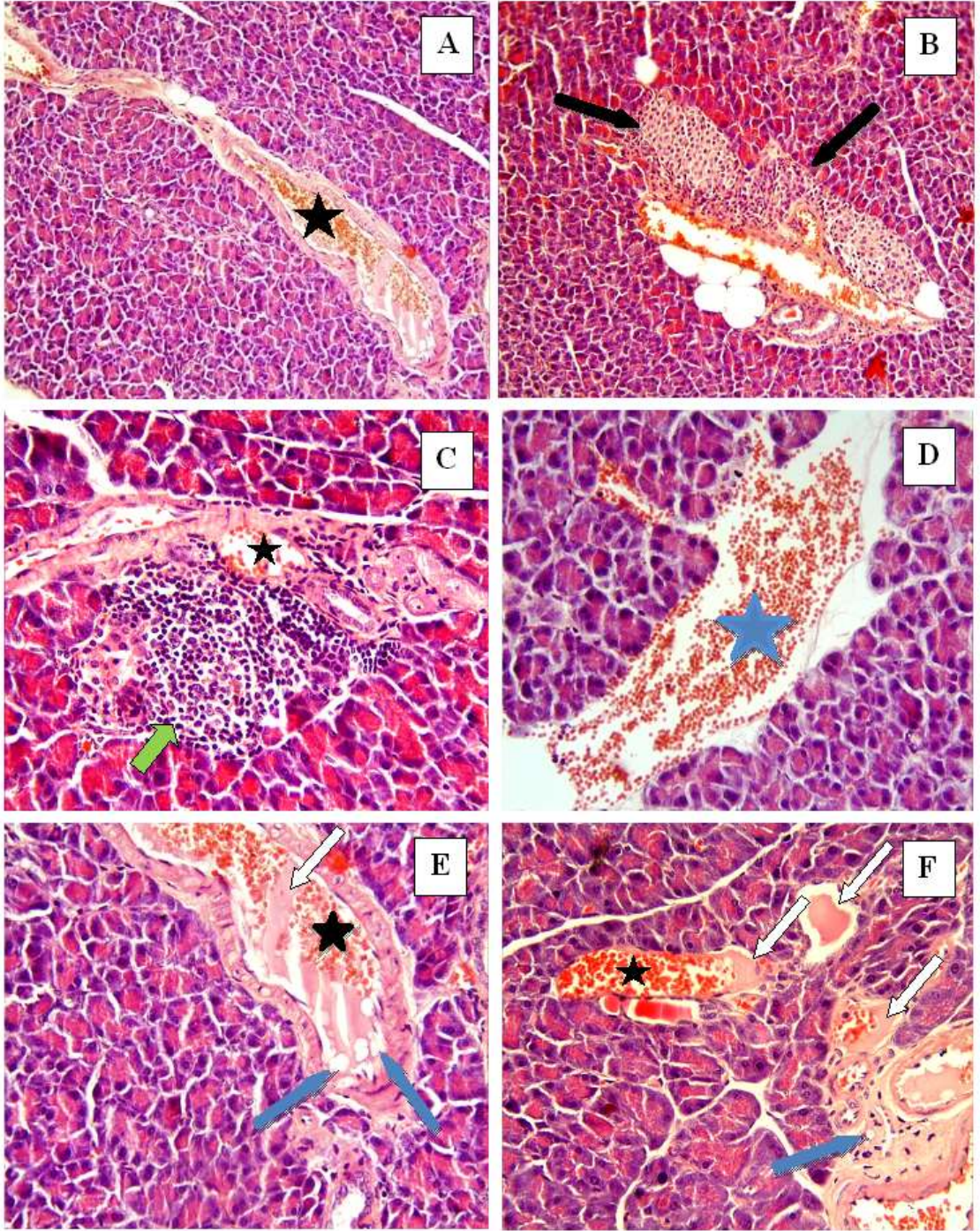
4.1.7. Histolojik Bulgular

Kontrol grubunda pankreas doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde normal histolojik görünümde olduğu izlendi (Şekil 4.9.). Normal histolojik görünüme sahip pankreas lobüllerinin ince bağ doku septalarla ayrıldığı gözlemlendi. Asinus hücrelerinin normal piramidal yapıda olduğu, Langerhans adacıklarının ise çeşitli hücre gruplarından oluştuğu tespit edildi.



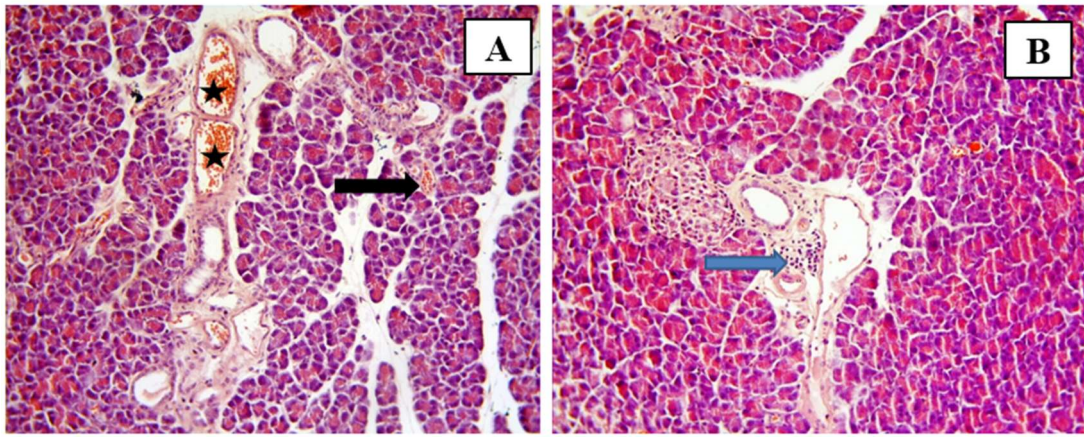
Şekil 4.9. Kontrol grubunda pankreasın histolojik görünümü. (Histopatolojik hasarın olmadığı gözlemlendi. Normal histolojik görünüme sahip pankreas lobülleri, septaları (A), Normal histolojik görünüme sahip asinus hücreleri ve Langerhans adacıkları (B). A: H-E; X20, B: H-E; X40)

DN grubunda pankreas kesitlerinde histopatolojik değişiklikler ve belirgin yaralanma görüldü. Bu değişiklikler vasküler konjesyon (Şekil 4.10A, C, E, F), asinus yapılarında ve Langerhans adacıklarının yapısında bozulma (Şekil 4.10B), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (Şekil 4.10C), hemoraji (Şekil 4.10D), vakuolizasyon (Şekil 4.10E, F), ödem (Şekil 4.10E, F) olduğu gözlemlendi.

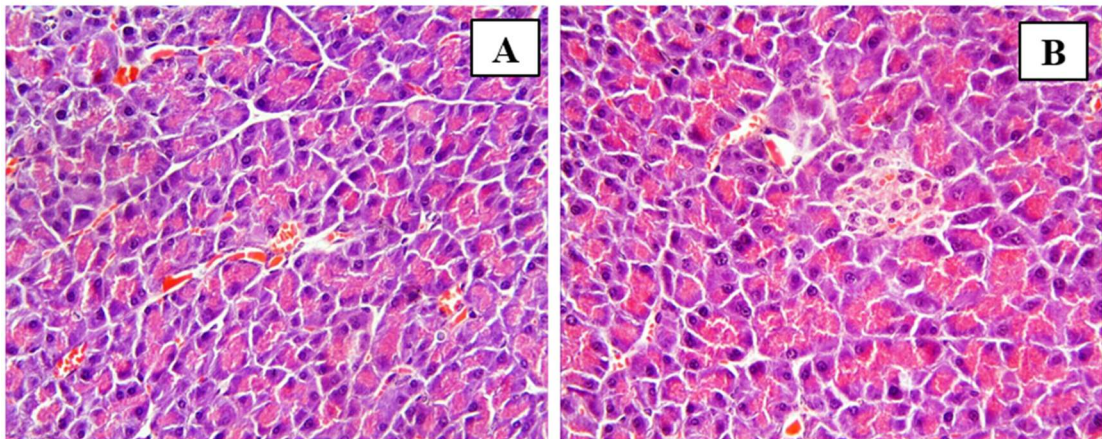


Şekil 4.10. DN grubunda pankreasın histolojik görünümü. (Histopatolojik hasarın çok yüksek olduğu gözlemlendi. Vasküler konjesyon (siyah yıldız) (A, C, E, F). Asinus ve Langerhans adacıklarının yapısında bozulma (siyah oklar) (B). İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (yeşil ok) (C). Hemoraji (mavi yıldız) (D). Vakuolizasyon (mavi oklar) ve Ödem (beyaz oklar) (E, F). A, B: H-E; X20, C, D, E, F: H-E; X40.)

Tedavi gruplarında (DN+Metrl 2 µg/kg ve DN+Metrl 4 µg/kg) pankreas doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde ise histopatolojik hasarın DN'ye kıyasla azaldığı ve bu azalmanın özellikle DN+Metrl 4 µg/kg grubunda belirgin derecede olduğu görüldü. DN+Metrl 2µg/kg grubunda az miktarda vasküler konjesyon (Şekil 4.11A), az miktarda hemoraji (Şekil 4.11A) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (Şekil 4.11B) olduğu tespit edildi. DN+Metrl 4µg/kg grubunda ise hemoraji ve vasküler konjesyonun oldukça azaldığı (Şekil 4.12A) ve asinus yapıları ile langerhans adacıklarının düşük doz grubuna göre daha düzenli görünümüne sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.12B).

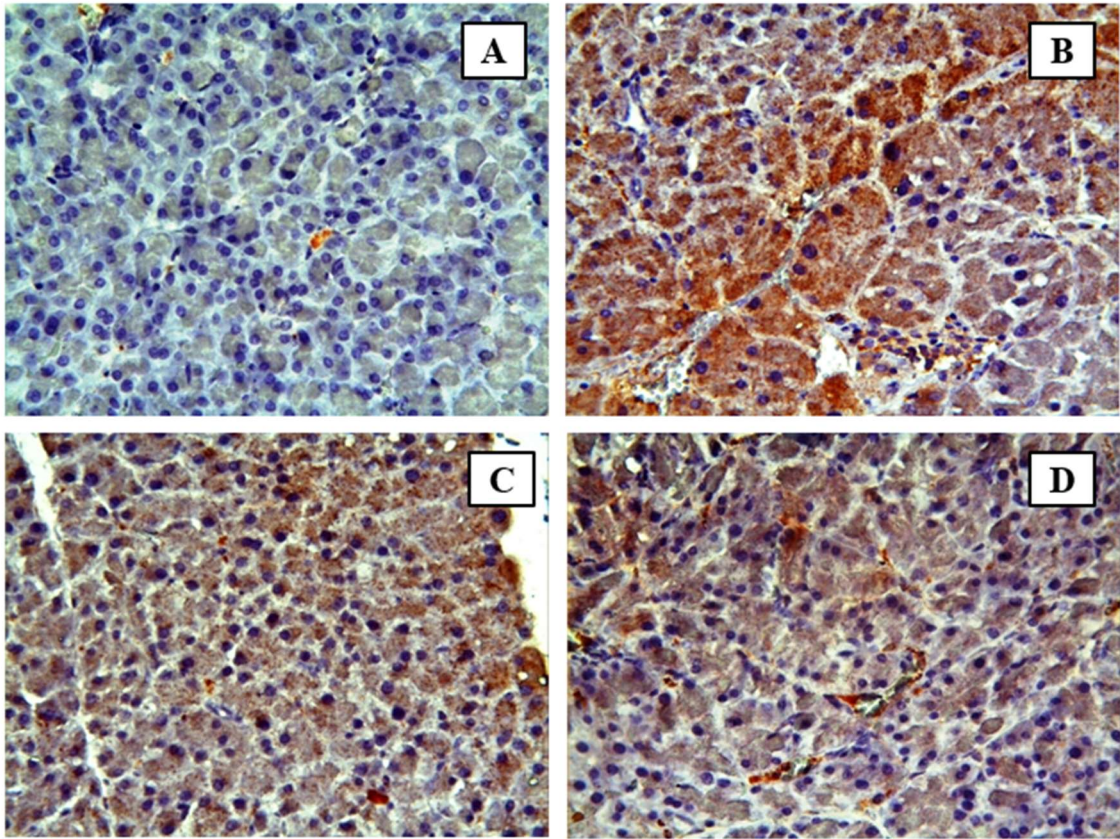


Şekil 4.11. DN+Metrl (2 µg/kg) grubunda pankreasın histolojik görünümü. (Histopatolojik hasarın azaldığı gözlemlendi. Az miktarda hemoraji (siyah ok) ve vasküler konjesyon (siyah yıldız) (A). Az miktarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (mavi ok) (B). A, B: H-E; X20.)



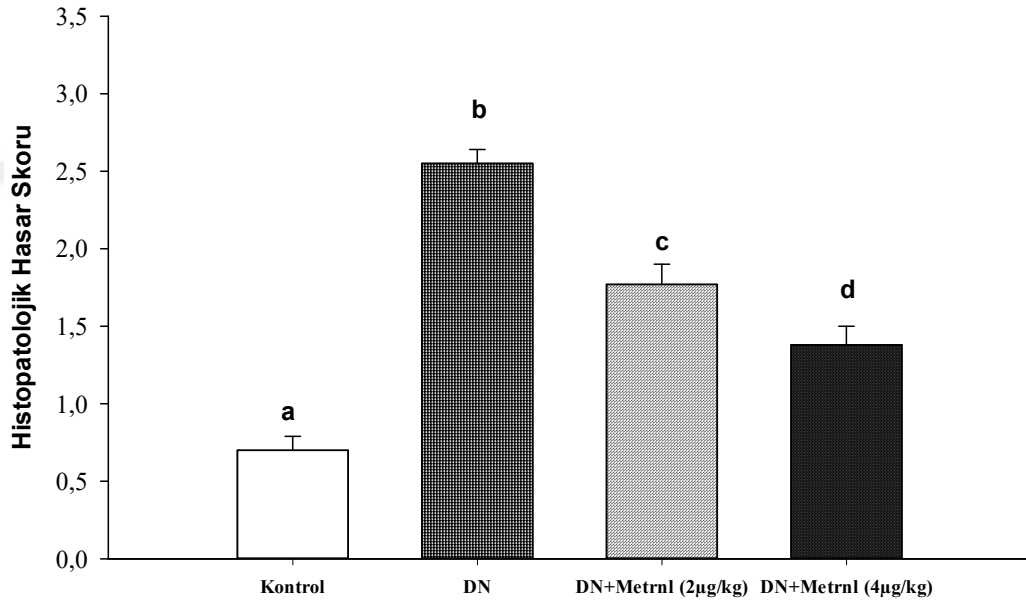
Şekil 4.12. DN+Metrl (4 µg/kg) grubunda pankreasın histolojik görünümü. (Histopatolojik hasarın belirgin derecede azaldığı gözlemlendi. Az miktarda hemoraji ve vasküler konjesyon (A). Düzenli görünüme sahip asinus yapıları ve Langerhans adacıkları (B). A: H-E; X20, B: H-E; X40.)

Tüm gruplarda yapılan Kaspaz-3 immunreaktivite değerlendirilmesinde kontrol grubunda immünohistokimyasal olarak Kaspaz-3 pozitif boyalı hücelere rastlanmadı (Şekil 4.13A). DN grubunda belirgin derecede yoğun olarak boyanmış Kaspaz-3 pozitif hücreler tespit edildi (Şekil 4.13B). Tedavi gruplarında ise Kaspaz-3 pozitif boyanmış hücrelerin sayısında ve boyanma yoğunluğunda belirgin derecede azalma olduğu belirlendi (Şekil 4.13C, D). Bu immunreaktivitedeki azalmanın özellikle DN+Metrnl 4µg/kg grubunda belirgin derecede olduğu tespit edildi (Şekil 4.13D).



Şekil 4.13. Pankreas kesitlerinde Kaspaz-3'ün immünohistokimyasal boyanması. (Kontrol grubu (A), DN grubu (B), DN+Metrnl 2 µg/kg grubu (C), DN+Metrnl 4 µg/kg grubu (D). Kontrol grubunda Kaspaz-3 pozitif boyalı hücreler görülmedi. Pozitif boyalı hücre sayısı DN+Metrnl gruplarında DN grubuna kıyasla azaldı. A, B, C, D: Kaspaz-3; X 40.)

Histolojik inceleme sonucu elde edilen görüntülerin histopatolojik hasar skorlaması Şekil 4.14'te sunulmuştur. DN grubunda histopatolojik hasarın ($2,55 \pm 0,09$) kontrol grubuna ($0,70 \pm 0,09$) göre anlamlı olarak arttığı ($p < 0,05$), tedavi gruplarında ise sırasıyla $1,77 \pm 0,13$ ve $1,38 \pm 0,12$ olan histopatolojik hasarın DN grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). Tedavi gruplarında hasardaki bu azalmanın doz bağımlı olarak gerçekleştiği görülmüştür ($p < 0,05$).

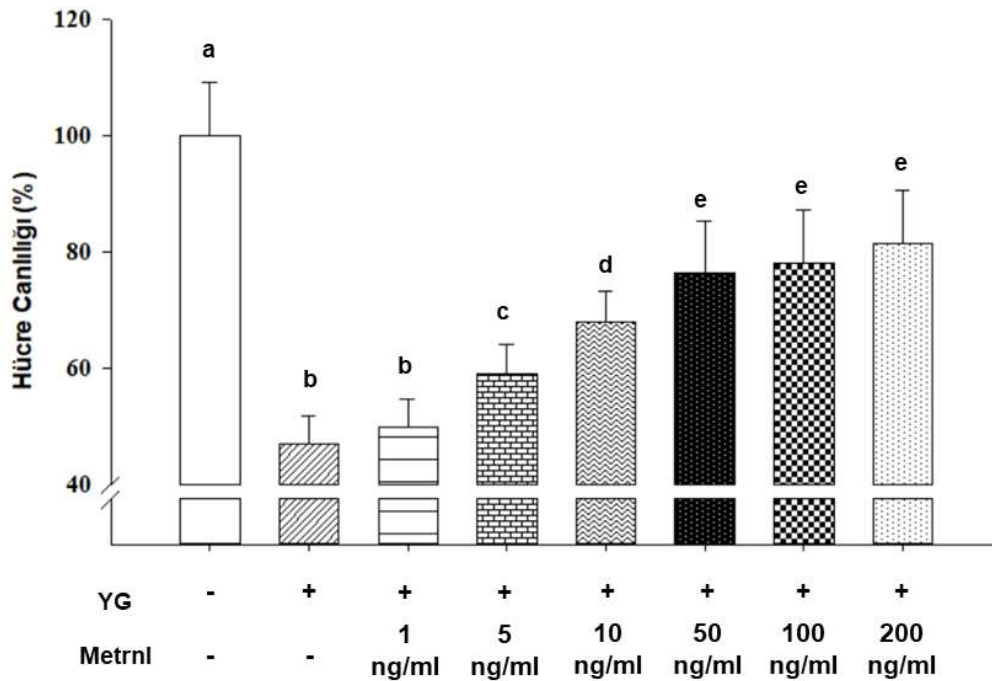


Şekil 4.14. Histopatolojik hasar skoru. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Harfler birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,b,c,d p < 0,05$).

4.2. In Vitro Çalışmalar

4.2.1. Metrn1'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

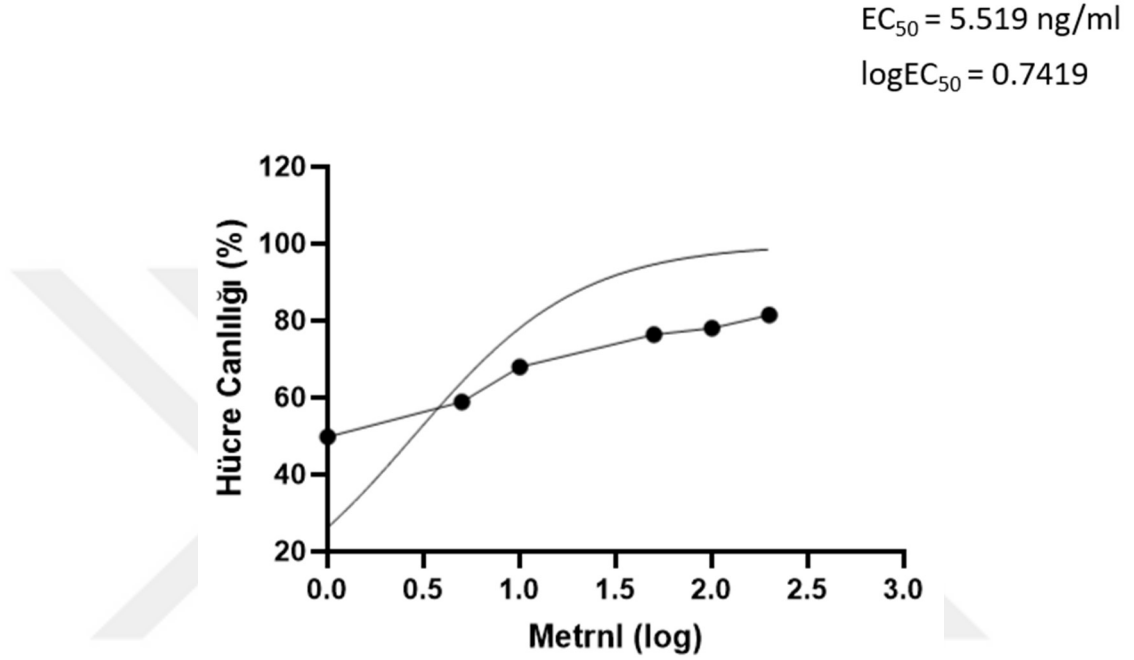
DKG hücreleri 24 saat YG'ye (45 mmol/L) maruz bırakılarak DN'nin *in vitro* modeli oluşturuldu. Hücre canlılığın değerlendirilmesi için YG'ye maruz bırakılan hücrelere çeşitli dozlarda Metrn1 (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml) uygulaması yapıldı. Metrn1'in hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.15'te gösterilmiştir. YG grubunda hücre canlılığının (47.01 ± 4.81) kontrol grubuna kıyasla (100 ± 9.1) anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). Metrn1'in 1 ng/ml dozunda hücre canlılığında (49.87 ± 4.94) YG grubuna göre önemli bir farklılık olmadığı tespit edildi ($p > 0.05$). Metrn1'in diğer dozlarının uygulandığı gruplarda ise (5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml) sırasıyla 58.97 ± 5.02 , 68.07 ± 5.14 , 76.49 ± 8.81 , 78.15 ± 9.11 ve 81.58 ± 9.18 olan hücre canlılığının YG'ye karşı anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p < 0.05$). Bu artışın ise 5, 10 ve 50 ng/ml dozlarında doz bağımlı olduğu görüldü ($p < 0.05$).



Şekil 4.15. Metrn1'in DKG hücrelerinde canlılık üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Harfler birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,b,c,d,e p < 0.05$)

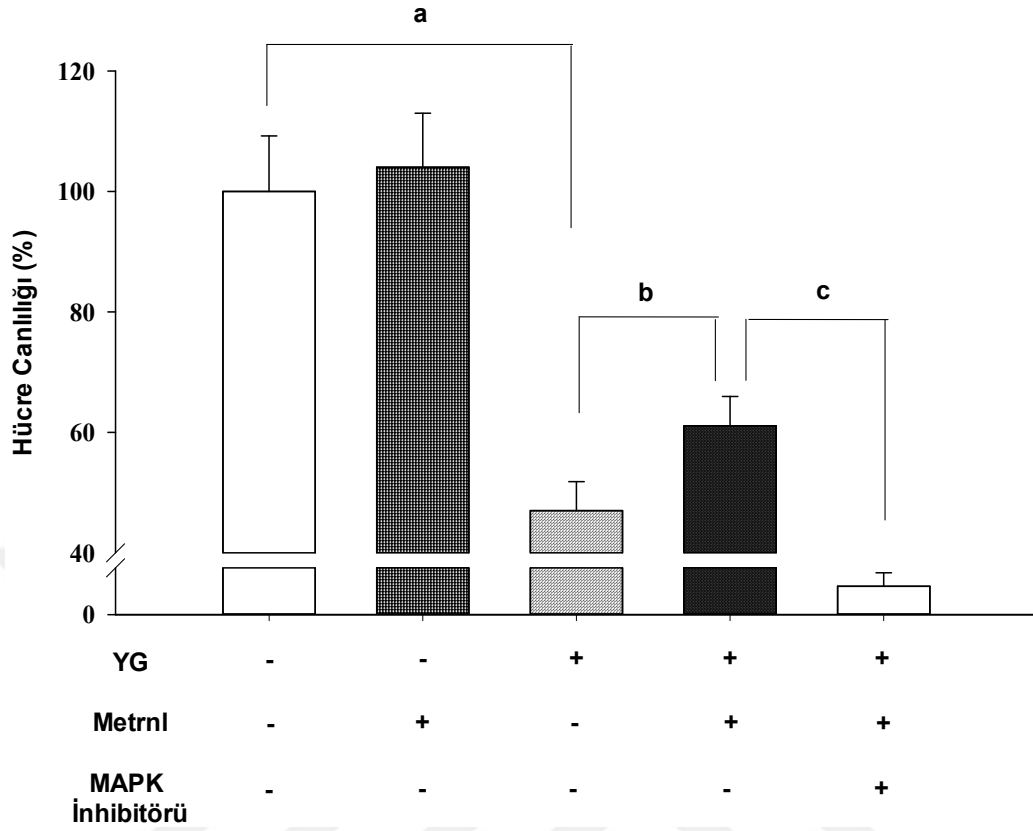
4.2.1. Metrnl'in Hücre Canlılığına Yolak Üzerinden Etkisi

Metrnl'in, DKG'de YG ile indüklenen DN'nin *in vitro* modelinde hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi sonucu canlılık oranının yüzdesel değişimi dikkate alınarak log(doz)-yanıt eğrisi oluşturuldu. Metrnl'in etkin dozu $\log EC_{50} = 0.7419$ ($EC_{50} = 5.519$ ng/ml) olarak bulundu (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Metrnl'in hücre canlılığı üzerine log(doz)-yanıt ilişkisi grafiği. (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml dozları log olarak ifade edilmiştir.)

JAK2/STAT3, PI3K, MAPK, PKA ve PKC inhibitörleri kullanılarak bu yollar üzerinden Metrnl'in hücre canlılığı üzerine etkisi incelendi (Şekil 4.17). DKG hücrelerinde tek başına Metrnl uygulamasının (104.01 ± 8.98) kontrol grubuna kıyasla (100 ± 9.21) hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). YG uygulamasının hücre canlılığını (48.41 ± 4.34) kontrole göre anlamlı olarak azalttığı ($p < 0.05$), YG ile birlikte Metrnl uygulandığında ise canlılığın (61.07 ± 4.97) YG grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p < 0.05$). Metrnl'in yolak üzerinden canlılığa etkisi için kullanılan inhibitör gruplarında, MAPK inhibitörünün kullanıldığı grupta hücre canlılığının (9.07 ± 4.35), YG+Metrnl grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). Bu sonuç, Metrnl'in YG ile indüklenmiş DKG hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini MAPK yolağı üzerinden gerçekleştirdiğini ifade etmektedir.



Şekil 4.17. Metrnl'in DKG hücrelerinde canlılığa yolak üzerinden etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Harfler birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir. ^a $p < 0.05$; kontrol grubuna kıyasla, ^b $p < 0.05$; YG grubuna kıyasla, ^c $p < 0.05$; YG+Metrnl grubuna kıyasla.)

5. TARTIŞMA

Diyabet, prevalansı gittikçe artan ciddi bir halk sağlığı problemidir. Temelde insüline bağlı olarak nitelendirilen diyabet metabolizmada ciddi komplikasyonlara sebebiyet vermesi nedeniyle metabolik bir hastalık olarak tanımlanır. Bu komplikasyonların vücut kan glukoz düzeylerindeki artış ile dokuların uzun süreli hiperglisemiye maruz kalmasından kaynaklandığı bilinmektedir.

Endojen ve peptid yapılı bir hormon olan Metnrl için (10), sahip olduğu çeşitli fizyolojik etkiler sebebiyle adipomiyokin, hepatosit, miyosit, sitokin ve kardiyosit gibi tanımlamalar yapılmıştır. (11, 13, 135). Metnrl'in günümüzde araştırmacılar için popüler bir ajan olması temelde vücut ağırlığını arttırmadan insülin direncini regüle ettiği için özellikle Tip2 diyabet ve obezite için terapötik bir aday olabilme ihtimali taşımasından kaynaklanmaktadır (9, 117). Yaptığımız bu tez çalışmasında Metnrl'in *in vivo* ve *in vitro* diyabet modelinde etkileri araştırıldı. *In vivo* olarak Metnrl'in, STZ ile indüklenen deneysel diyabet modelinde analjezik etkinliği, pankreas hasarı, oksidatif stres ve kan glukoz seviyeleri ile *in vitro* DKG nöronlarında hücre canlılığı ve kullandığı hücresel yolak incelendi.

Metnrl'in sağlıklı ve T2DM oluşmuş farelerde kan glukoz seviyesini düşürdüğü ve glukoz toleransını düzenlediği ifade edilmiştir (117). Biz de bu çalışma kapsamında STZ ile indüklediğimiz diyabetik farelerde yaptığımız 14 günlük ip Metnrl tedavisinin hayvanların kan glukoz seviyesini anlamlı olarak azalttığı belirledik. Elde ettiğimiz bu ilk veri Metnrl'in literatüre paralel bir şekilde kan glukoz regülasyonunu sağladığını göstermektedir. Metnrl'in bu etkisini AMPK ve HDAC5 fosforilasyonu üzerinden GLUT4'ü etkilemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Metabolik hastalıklar olarak ifade edilen diyabet, obezite ve ateroskleroz birbirleri ile yakın ilişki içerisinde. Özellikle obezitede artan beden kitle indeksinin diyabetle ilişkisi rapor edilmiştir (165). Bu ilişkinin; birçok faktörün yanı sıra azalmış mitokondriyal kütle ve/veya fonksiyonla kendini gösteren mitokondriyal disfonksiyon ile ilgili olduğu belirtilmiştir (166). Mitokondriyal disfonksiyon, hem insülin duyarlılığını azaltarak hem de β -hücre fonksiyonunu tehlikeye atarak obeziteyi diyabete bağlayan birçok önemli kusurdan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca mitokondriyal fonksiyon ve disfonksiyonun, diyabetik nöropatik ve inflamatuvar ağrıda önemli roller oynayabileceği belirlenmiştir. Diyabetik nöropati uzun süreli diyabet ile ilişkili en yaygın

komplikasyonlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır (167). Bunun sebebi diyabette meydana gelen hiperglisemik durumların, hem schwann hücre metabolik aktivitesinin bozulmasına hem de miyelin dejenerasyonuna neden olmasıdır (7). Bu defektler sonucunda ise “somatosensoriyel sinir sisteminin bir lezyonu veya hastalığının neden olduğu ağrı” olarak tanımlanan nöropatik ağrı meydana gelmektedir (7, 8). Allodini ve hiperaleji ile seyreden nöropatik ağrı, hastaların günlük aktivitelerini ve sosyal yaşamlarını ciddi şekilde sınırlamaktadır (168-170). Nöropatik ağrı için çok sayıda farmakolojik ajan (trisiklik antidepresanlar, serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri, gabapentinoidler, opioidler vb.) kullanılmakta, ancak net bir tedavi sağlanamamaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı diyabete ve sebep olduğu diyabetik nöropatik ağrıya gereken tıbbi önemin verilmesi ve yapılacak her türlü çalışma ile de korunma ve tedavi mekanizmalarının aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Diyabet kökenli nöropatinin patofizyolojisini daha iyi anlayabilmek, tedavi stratejilerini aydınlatmak ve DN gelişimini önlemek için *in vivo* deney modelleri büyük öneme sahiptir (171). Bu nedenle, prelinik çalışmalarda diyabet oluşumunu incelemek için bazı kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Bu kimyasal ajanlar arasında, literatürde diyabet araştırmalarında en yaygın olarak kullanılan STZ de bulunmaktadır ve bu tez çalışmasında kullanılmıştır (172). STZ uygulanan kemirgenlerde termal hiperaleji ve mekanik allodini geliştiği bilinmektedir (173, 174). STZ ile indüklenen diyabetik periferik nöropatinin patofizyolojisinde önemli rol oynayan faktörler arasında mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres bulunmaktadır (175). Bu bilgi ışığında, mitokondri ile direkt ilişkili ve mitokondri fonksiyonlarını düzenleyen birçok farmakolojik ajan STZ ile oluşturulan allodini üzerinde test edilmiş ve edilmektedir. Hiperaleji ve allodini üzerine yapılan çalışmalarda spor aktivitelerinin geçici analjeziye yol açabileceği ve akut ağrıyı azaltabileceği gösterilmiştir (176). Ayrıca, fiziksel aktivitelerle aktive olan sinyal sistemlerinin insanlarda ve hayvanlarda kronik ağrı yollarını düzenlediği bilinmektedir (177, 178). Bu bağlamda fiziksel aktivite sırasında ekspres edilip diğer dokuların fonksiyonunu etkileyen maddelerin salgılanmasına yol açan PGC-1 α dikkat çekmektedir.

Yukarıda bahsedilen tüm çalışmalardan anlaşılmaktadır ki nöropatik ağrının iyileştirilmesinde, mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesi, ROS miktarının azalması ve egzersiz ilişkili moleküler düzenlemelerden sorumlu faktörler rol oynamaktadır. Biz de bu tez çalışmasında egzersiz ve soğuğa maruziyette artarak kas içi PGC-1 α ve UCP ekspresyonlarını arttıran ve termojenez uyararak mitokondriyal biyogenezde etkin bir rol

oynadığı düşünölen Metrnl'in diyabetik nöropati ve nöropatik ağrıdaki etkinliğı sorguladık. Elde ettiğimiz sonuçlar ile ilk kez Metrnl'in, STZ indöklü diyabetik nöropati oluşturulmuş farelerde termal hiperaljeziyi ve mekanik allodiniyi azalttığını belirledik. Belirlediğimiz bu analjezik etkinliğın, nöropatik ağrı patogenezinde yer alan ve fazla glikozun sebep olduğı PKC yolu aktivasyonu ya da AGE'ler ile çeşitli sinyal yolaklarının aktivasyonunun Metrnl tarafından inhibe edilmesinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Diğer taraftan mitokondriyal biyogenezin düzenleyicisi olan PGC-1 α 'nın oksidatif stres üzerinden dolaylı olarak nöropatik ağrı patogeneziini etkilediğı bilinmektedir. İlginç şekilde PGC-1 α 'nın Metrnl tarafından uyarılabildiğı bilgisi, Metrnl'in bu analjezik etkinliğinde PGC-1 α 'nın rol oynayabileceğini de düşöndürmektedir.

Nöropati gibi bazı hastalık veya patofizyolojik süreçlerde vücutta reaktif oksijen türlerinde artış görünmektedir (175). Bu reaktif oksijen türleri lipid, DNA ve protein ile etkileşime girerek oksidatif hasara neden olmaktadır (179). Oksidatif hasarda, ilişkili yolların aktivasyonunun sürdürölmesinde PGC-1 α önemli bir rol oynar. Oluşan ROS'lara detoksifiye edici enzimlerin aracılık etmesi için gereklidir (180). Azalan PGC-1 α , antioksidan enzimlerin ve proteinlerin yeteneğini zayıflatır (181). PGC-1 α ekspresyonu ROS'u baskılar ve antioksidan enzim ekspresyonunu artırır (182, 183). Ayrıca PGC-1 α önemli antioksidan gen ekspresyonunu düzenleyerek inflamasyon sırasında ROS üretimi ve bunun detoksifikasyonu arasındaki dengeyi geliştirir (184). PGC-1'in iskelet kasında GLUT4 ekspresyonunda karaciğerde ise glukoneogenezin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (185, 186). Ayrıca insölin duyarlılığının bir göstergesi olan bazal insölin konsantrasyonlarının, PGC-1 geninin bulunduğı kromozom bölgesine bağlandığı rapor edilmiştir (187, 188). Bu sebeplerle obezite ve diyabet ile ilişkili olduğı ifade edilmiştir (189). Literatürde diyabette oksidatif parametrelerin değeriendirildiğı çalışmalara bakıldığında, STZ indöklü nöropatik ağrıda lokal olarak hayvanların pençesinde MDA düzeyinde artış olduğı belirlenmiştir (190). Farklı bir çalışmada yine diyabetik sıçanların serum, DKG ve siyatik sinirinde MDA seviyesinde artış olduğı ifade edilmiştir (191). Cheng ve ekibinin yaptığı STZ-nikotinamid indöksiyonlu diyabet çalışmasında SOD, CAT ve GSH seviyesinin azaldığı ortaya konmuştur (192). Başka bir çalışmada ise diyabetik sıçanların serum, DKG ve siyatik sinirinde SOD ve CAT aktivitesinde azalma olduğı ifade edilmiştir (191). Biz de çalışmamızda STZ ile indöklediğimiz diyabetik nöropati modelinde, oksidan parametre olarak pankreas dokusunda MDA seviyesinin DN grubunda kontrole göre arttığını belirledik. Diyabet gelişmiş hayvanlarda MDA

seviyelerindeki bu artış literatür ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca farelerin pankreas CAT, GSH ve SOD seviyelerine bakılarak antioksidan parametreler incelenmiştir. Yine literatürle uyumlu şekilde, DN grubunda kontrole göre CAT, SOD ve GSH seviyelerinde azalma olduğu ortaya konmuştur.

İnsülin duyarlılığının düzenlenmesinde oksidatif stresin rol oynadığı bilinmektedir (193). Peptid yapılı bir hormon olan Metnrl'in de insülin direncini regüle ettiği ve diyabet ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (9, 117). Bu bağlamda STZ ile indüklenen diyabetik kardiyomiyopatide Metnrl blokajı ile oksidatif hasarın arttığı rapor edilmiştir (138). Yapılan bir başka çalışmada ise doksorubisinin kalpte sebep olduğu oksidatif hasar sonucu MDA seviyesinin arttığı iki önemli antioksidan enzim olan SOD ve CAT'ın ise azaldığı, ancak bu durumun Metnrl aşırı ekspresyonu ile düzeldiği bildirmiştir. Metnrl'in bu etkilerini önemli bir kardiyoprotektif molekül olarak tanımlanan ve oksidatif stres ile apoptozun düzenlenmesinde hayati roller üstelenen SIRT1 aracılığıyla gerçekleştirmesi oksidatif stres sürecinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (194-196). Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler Metnrl'in diyabete bağlı pankreas dokularındaki azalmış olan CAT, SOD ve GSH düzeylerini artırdığı, artmış olan MDA seviyesini de azalttığı yönündedir. Bulgularımız literatürle paralel olarak Metnrl'in oksidatif hasarı iyileştirdiği ve pankreas dokularında antioksidan bir etkiye sahip olduğunu ilk defa göstermiştir. Pankreastaki Metnrl'in bu antioksidan etkisinin, kalpteki gibi SIRT1 aracılığı ile ya da ikinci bir seçenek olarak PGC-1 α fosforilasyonunu arttırarak sağladığını düşünmekteyiz.

Hücrel ölümün programlanmış bir türü olan apoptoz, normal hücre gelişiminin bir parçasıdır, ancak aşırı apoptoz birçok hastalığın sebebi veya belirtisi olabilir (197). Apoptoz, kaspaz enzimleri ve Bcl-2 ailesi gibi iki kritik protein ailesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu durum yüksek derecede düzenlenmiş ve hücrel öz-intihar programı olarak kabul edilir. Kaskad görevi üstlendiği bilinen kaspaz enzimlerinden kaspaz-3 bu ailenin önemli bir üyesidir. (198, 199). Hipergliseminin dokularda aşırı apoptoza sebep olduğu bilinmektedir. β hücre apoptozu üzerine Metnrl etkinliğinin incelendiği bir çalışmada beklenildiği gibi *in vitro* yüksek glikozun ve *in vivo* modelde hipergliseminin β hücre apoptozuna sebep olduğu bildirilmiştir (112). Metnrl tedavisinin, yüksek glukozun neden olduğu apoptozu ve kaspaz-3 ekspresyonunu hem *in vivo* hem *in vitro* olarak iyileştirdiği gösterilmiştir (112). Farklı bir çalışmada ise Metnrl blokajının primer neonatal sıçan kardiyomiyositlerinde YG'nin sebep olduğu apoptozu şiddetlendirdiği rapor edilmiştir (138). Biz de çalışmamızda literatürle paralel olarak

diyabetik fare pankreasında yaptığımız histopatolojik kaspaz-3 boyamasında DN grubunda apoptozun kontrole göre oldukça fazla olduğunu rapor ettik. 14 günlük Metnrl tedavisinin ise bu apoptozu azalttığını tespit ettik. Ayrıca pankreas dokusunda, STZ indüklü diyabette beklenildiği gibi asinüs ve langerhans bütünlüğünde bozulma, hemorajiler ve konjesyonlar görülmüş olup Metnrl'in bu histopatolojik durumları iyileştirerek pankreas bütünlüğünü korumaya yardımcı olduğunu belirledik. Bu sonuçlar Metnrl'in β hücre proliferasyonunu arttırarak inflamasyon yolakları inhibisyonuyla ya da kan glukoz miktarını azaltıp hücrelere aşırı glukoz girişini önlemesiyle apoptozu regüle ettiğini düşündürmektedir.

DM kaynaklı hipergliseminin neden olduğu iç veya dış stres karşısındaki DKG hücrelerinin hassasiyeti, nörodejeneratif hastalıkların gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunur (200). DM komplikasyonlarını incelemek için genellikle hayvan deney modelleri kullanılır, ancak son ilerlemeler, bu komplikasyonlarda farklı hücre tipleri veya primer hücre kültürü gibi *in vitro* modellerin ortaya çıkmasına yol açmıştır (201). Bu nedenle, *in vitro* modellerin kullanımı, yöntem pratikliği ve bir hastalığın patogenezinde önemli olan çeşitli faktörleri araştırmak için uygunluğu nedeniyle artmaktadır. DKG hücreleri, nöronal toksisiteyi ve nöropatiyi incelemek için yapılan çalışmalarda üstün özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. YG seviyelerinin birçok hücre türünde hücresel fonksiyonları bozarak ve hücre apoptozunu tetikleyerek zararlı etkilere sahip olduğu bilinmektedir (202). YG'ye maruz bırakılan DKG nöronları, *in vitro* diyabetik nöropatiyi araştırmak için en sık kullanılan modeldir. YG, artan ROS üretimi ile ilişkilendirilmiş olup DKG nöronlarının apoptozuna yol açar (203, 204). DKG nöronlarının apoptozunun diyabetik duysal nöropatinin patogenezinde *in vivo* olarak yer aldığı konusu tartışmalı olsa da YG'nin nöronlarda zararlı ROS oluşturarak aksonal atrofi, demiyelinizasyon, sinir liflerinin kaybı ve sinir liflerinin yetersiz yenilenmesine neden olabildiği elde edilen literatür verileri arasındadır (204-206). Biz de çalışmamızda YG ile muamele edilen DKG'de Metnrl'in *in vitro* DN üzerine etkinliğini inceledik. Yapılan bir çalışmada izole edilen DKG'ye Metnrl ve homoloğu Metrn farklı konsantrasyonlarda 24 saat uygulanmış ve nörit büyümesini teşvik ettiği rapor edilmiştir (10). Biz de 6 farklı (1, 5, 10, 50, 100 ve 200 ng/ml) Metnrl konsantrasyonunu YG ile indüklenen DKG'de hücre sağkalımı üzerinde test ettik. Elde ettiğimiz sonuçlar Metnrl'in, YG'nin sebep olduğu hücre ölümünü geriye çevirip DKG nöronlarının hücre sağkalımını arttırdığını ilk defa göstermektedir. Bu etki bize hücre içi fazla glukoz alımının Metnrl tarafından engellenmesiyle ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Antiapoptotik, nöroprotektif, termojenez, antioksidan ve insülin direnci regülasyonu gibi birçok fizyolojik etkiye sahip olduğu rapor edilen Metnrl'in bu etkilerini çeşitli hücre için sinyal yolları ile gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar Metnrl'in Ca^{2+} -CaMKK2-AMPK-HDAC5-GLUT4-MAPK-TBC1D1 sinyal yolağıyla glukoz alımı ve antidiyabetik etki (117), PPAR- γ yoluyla insülin duyarlılığını (13, 110), AMPK-mTOR-p70S6K ve LKB1/AMPK/ULK1/STING/TRAF2 yollarıyla otofaji regülasyonu (138, 207), WNT/ β -katenin yolağıyla β hücre proliferasyonu (112), PI3K/Akt/NF- κ B, ERK ve MAPK yolağıyla anti-inflamatuar (131, 132), NLRP3/kaspaz-1/GSDMD yolağıyla antipiroptotik etki (132), JAK-STAT3/MEK-ERK kinazları aracılığıyla nörotrofik etki (10), AKT/eNOS yolağıyla endotelial anjiyogenezi (208), cAMP/PKA/SIRT1 yolağıyla kardiyotoksiteyi düzenlemeyi (196), STAT3/IGF-1 mekanizması yoluyla iskelet kası onarımını (209), IL-4/IL-13, PGC-1 α , PGC-1 α 4 ve UCP ile termojenezi ve enerji metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir (12, 110). Biz de çalışmamızda Metnrl'in DKG'de hücre canlılığını arttırmasını hangi yolk üzerinden sağladığını sorguladık. Kullandığımız 6 farklı (1, 5, 10, 50, 100 ve 200 ng/ml) Metnrl konsantrasyonundan Doz-Yanıt analizi yaparak EC₅₀ (5.51 ng/ml) değerini belirledik. Bu etkin doz ile yaptığımız MTT testleri sonucu Metnrl'in DKG'de hücre sağkalımını MAPK yolağını kullanarak gerçekleştirdiğini tespit ettik.

Özetle, bu tez çalışmasının sonuçları Metnrl'in YG ile indüklenen diyabetik nöropatide *in vitro* olarak antiapoptotik ve nöroprotektif bir etki gösterdiğini ilk defa ifade etmektedir. Ayrıca STZ ile indüklenen deneysel diyabet modeli oluşturulmuş farelerde nöropatik ağrı üzerine ilk kez hiperaljezi ve allodini üzerinde Metnrl'in analjezik bir etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak bu çalışma DM'nin uzun süreli ve en yaygın komplikasyonu olan DN'nin ve nöropatik ağrının önlenmesinde ve tedavisinde Metnrl'in teröpatik bir aday olabileceğini düşündüren kritik ön kanıtlar sunmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda STZ ile indüklenen deneysel diyabet modelinde gelişen diyabetik nöropatinin pankreas dokusunda sebep olduğu oksidatif hasarın Metnrl tedavisi ile iyileştiği ve bu iyileşmenin doz bağımlı olarak gerçekleştiğini tespit ettik. Ek olarak yine hipergliseminin neden olduğu pankreas bütünlüğü ile langerhans adacıklarındaki bozulmanın Metnrl tedavisi ile düzeldiğini, ortaya çıkan histopatolojik durumların azaldığını belirledik. Bu azalmanın da yine doz bağımlı olarak gerçekleştiğini tespit ettik. Diyabetik nöropatiye bağlı şekillenen nöropatik ağrıda Metnrl'in etkinliğinin ilk defa değerlendirildiği çalışmamızda Metnrl'in STZ'nin sebep olduğu termal hiperaljezi ve mekanik allodiniyi iyileştirdiğini belirledik. Yine DKG'yı YG'ye maruz bırakarak oluşturduğumuz diyabetik nöropatinin *in vitro* modelinde de Metnrl'in nöronlarda hücre sağkalımını arttırdığını ve bu etkiyi MAPK yolağını kullanarak gerçekleştirdiğini rapor ettik.

Bulgularımız Metnrl'in DN üzerinde oldukça etkin fizyolojik roller üstlenebilecek bir hormon olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu bulgular mevcut literatürde yer alan Metnrl'in insülin direncini ve oksidatif hasarı azaltıcı etkilerinin olduğunu destekleyici niteliktedir.

Çağımızın en büyük sorunlarından olan diyabetin ve komplikasyonlarının önlenmesi için yeni ajan ve yöntemlerin keşfedilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu alanda yapılacak her çalışmanın oldukça kıymetli olduğu açıktır. Çalışma sonuçlarımız literatürde önemli bir eksikliği giderecek verilere sahip olup yeni ve daha ileri çalışmalar için önemli bir basamak teşkil edecektir.

KAYNAKLAR

1. Papatheodorou K, Banach M, Bekiari E, Rizzo M, Edmonds M. Complications of diabetes 2017. *J Diabetes Research Clinical Practice*. 2018.
2. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther*. 2008, 88(11):1254-64.
3. Ali A, Iqbal F, Taj A, Iqbal Z, Amin MJ, Iqbal QZ. Prevalence of microvascular complications in newly diagnosed patients with type 2 diabetes. *Pak J Med Sci*. 2013, 29(4):899.
4. Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DLH. New horizons in diabetic neuropathy: Mechanisms, bioenergetics, and pain. *Neuron*. 2017, 93(6):1296-313.
5. Zhang Y, Zhao S, Rodriguez E, Takatoh J, Han BX, Zhou X, Wang F. Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *J Clin Invest*. 2015, 125(10):3782-94.
6. Zochodne DW, Verge VM, Cheng C, Sun H, Johnston J. Does diabetes target ganglion neurones? Progressive sensory neurone involvement in long-term experimental diabetes. *Brain*. 2001, 124(Pt 11):2319-34.
7. Mizisin AP. Mechanisms of diabetic neuropathy: Schwann cells. *Handb Clin Neurol*. 2014, 126:401-28.
8. Merskey H, Bogduk N. Part III: Pain Terms: A current list with definitions and notes on usage in: Classification of chronic pain, second edition. *IASP Task Force on Taxonomy*. 1994:209-14.
9. Zheng SL, Li ZY, Song J, Liu JM, Miao CY. Metrnl: a secreted protein with new emerging functions. *Acta Pharmacol Sin*. 2016, 37(5):571-9.
10. Jørgensen JR, Fransson A, Fjord-Larsen L, Thompson LH, Houchins JP, Andrade N, Torp M, Kalkkinen N, Andersson E, Lindvall O, Ulfendahl M, Brunak S, Johansen TE, Wahlberg LU. Cometin is a novel neurotrophic factor that promotes neurite outgrowth and neuroblast migration in vitro and supports survival of spiral ganglion neurons in vivo. *Exp Neurol*. 2012, 233(1):172-81.
11. Li ZY, Zheng SL, Wang P, Xu TY, Guan YF, Zhang YJ, Miao CY. Subfatin is a novel adipokine and unlike Meteorin in adipose and brain expression. *CNS Neurosci Ther*. 2014, 20(4):344-54.

12. Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, Jedrychowski MP, Ruas JL, Wrann CD, Lo JC, Camera DM, Lachey J, Gygi S, Seehra J, Hawley JA, Spiegelman BM. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*. 2014, 157(6):1279-91.
13. Li ZY, Song J, Zheng SL, Fan MB, Guan YF, Qu Y, Xu J, Wang P, Miao CY. Adipocyte metrn1 antagonizes insulin resistance through PPAR γ signaling. *Diabetes*. 2015, 64(12):4011-22.
14. Ozougwu J, Obimba K, Belonwu C, Unakalamba C. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol*. 2013, 4(4):46-57.
15. Cho NH, Shaw J, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes J, Ohlrogge A, Malanda B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018, 138:271-81.
16. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019, 157:107843.
17. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Ogurtsova K, Pinkepank M, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JC, Mbanya JC. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022, 183:109119.
18. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JC, Mbanya JC. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for. *World*. 2021, 965:1053.7.
19. IDF Diabetes Atlas 2021 <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>, Son Erişim Tarihi 23.10.2023.
20. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. American Diabetes Association 2014.
https://diabetesjournals.org/care/article/37/Supplement_1/S81/37753/Diagnosis-and-Classification-of-Diabetes-Mellitus.
21. Draznin B, Aroda VR, Bakris G, Benson G, Brown FM, Freeman R, Green J, Huang E, Isaacs D, Kahan S. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022, 45(S1):S17-S38.

22. Gregory GA, Robinson TI, Linklater SE, Wang F, Colagiuri S, de Beaufort C, Donaghue KC, Magliano DJ, Maniam J, Orchard TJ. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022, 10(10):741-60.
23. Eisenbarth GS. Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007, 92(7):2403-7.
24. Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*. 2019, 576(7785):51-60.
25. McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2019, 5(1):47.
26. Egan AM, Dinneen SF. What is diabetes? *J Med*. 2019, 47(1):1-4.
27. Wållberg M, Cooke A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol*. 2013, 34(12):583-91.
28. Östenson C. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiol Scand*. 2001, 171(3):241-7.
29. Christensen AA, Gannon M. The beta cell in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019, 19:1-8.
30. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020, 21(17):6275.
31. Ogboo BC, Grabovyy UV, Maini A, Scouten S, van der Vliet A, Mattevi A, Heppner DE. Architecture of the NADPH oxidase family of enzymes. *Redox Biol*. 2022, 52:102298.
32. Cao X, Wu L, Zhang J, Dolg M. Density functional studies of coenzyme NADPH and its oxidized form NADP⁺: structures, UV–Vis spectra, and the oxidation mechanism of NADPH. *J Comput Chem*. 2020, 41(4):305-16.
33. Esser N, Utzschneider KM, Kahn SE. Early beta cell dysfunction vs insulin hypersecretion as the primary event in the pathogenesis of dysglycaemia. *Diabetologia*. 2020, 63:2007-21.
34. Stephenie S, Chang YP, Gnanasekaran A, Esa NM, Gnanaraj C. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *J Funct Foods*. 2020, 68:103917.
35. Zhao H, Zhang R, Yan X, Fan K. Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation. *J Mater Chem B*. 2021, 9(35):6939-57.

36. Galasso M, Gambino S, Romanelli MG, Donadelli M, Scupoli MT. Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. *Free Radic Biol Med*. 2021, 172:264-72.
37. Averill-Bates DA. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm*. 2023, 121:109-41.
38. Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, Jiang F, Peng Z-Y. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019, 2019.
39. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie*. 2004, 57(9-10):453-5.
40. Gunawardena H, Silva K, Sivakanesan R, Katulanda P. Increased lipid peroxidation and erythrocyte glutathione peroxidase activity of patients with type 2 diabetes mellitus: Implications for obesity and central obesity. *Obes Med*. 2019, 15:100118.
41. Asbaghi O, Naeini F, Ashtary-Larky D, Kaviani M, Kelishadi MR, Eslampour E, Moradi S, Mirzadeh E, Clark CC, Naeini AA. Effects of chromium supplementation on blood pressure, body mass index, liver function enzymes and malondialdehyde in patients with type 2 diabetes: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Complement Med Res*. 2021, 60:102755.
42. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *Clin Invest*. 2005, 115(3):485-91.
43. Hu FB. Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *J Lipids*. 2003, 38(2):103-8.
44. Mayer-Davis EJ, Costacou T. Obesity and sedentary lifestyle: modifiable risk factors for prevention of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2001, 1(2):170-6.
45. Tiew KF, Chan YM, Lye MS, Loke SC. Factors associated with dietary diversity score among individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Health Popul Nutr*. 2014, 32(4):665.
46. Xiong X-f, Wei L, Xiao Y, Han Y-C, Yang J, Zhao H, Yang M, Sun L. Family history of diabetes is associated with diabetic foot complications in type 2 diabetes. *Sci Rep*. 2020, 10(1):17056.
47. Ng R, Sutradhar R, Yao Z, Wodchis WP, Rosella LC. Smoking, drinking, diet and physical activity—modifiable lifestyle risk factors and their associations with age to first chronic disease. *Int J Epidemiol*. 2020, 49(1):113-30.
48. Balaji R, Duraisamy R, Kumar M. Complications of diabetes mellitus: A review. *Drug Invention Today*. 2019, 12(1).

49. Ramachandran A. Know the signs and symptoms of diabetes. *Indian J Med Res.* 2014, 140(5):579.
50. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Hilliard ME, Isaacs D, Johnson EL. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of care in diabetes. *Diabetes Care.* 2023, 46(S1):S19-S40.
51. *American Diabetes Association.* Standards of medical care in diabetes—2022 abridged for primary care providers. 2022.
52. *American Diabetes Association.* Standards of care in diabetes—2023 abridged for primary care providers. 2023.
53. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2005, 28(4):956-62.
54. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care.* 2003, 26(5):1553-79.
55. Obrosova IG. Update on the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep.* 2003, 3(6):439-45.
56. Lu Y, Xing P, Cai X, Luo D, Li R, Lloyd C, Sartorius N, Li M. Prevalence and risk factors for diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetic patients from 14 countries: estimates of the INTERPRET-DD study. *Front Public Health.* 2020, 8:534372.
57. Yovera-Aldana M, Velásquez-Rimachi V, Huerta-Rosario A, More-Yupanqui M, Osores-Flores M, Espinoza R, Gil-Olivares F, Quispe-Nolazco C, Quea-Vélez F, Morán-Mariños C. Prevalence and incidence of diabetic peripheral neuropathy in Latin America and the Caribbean: A systematic review and meta-analysis. *PloS one.* 2021, 16(5):e0251642.
58. Berrone E, Beltramo E, Solimine C, Ape AU, Porta M. Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J Biol Chem.* 2006, 281(14):9307-13.
59. Niimi N, Yako H, Takaku S, Chung SK, Sango K. Aldose reductase and the polyol pathway in schwann cells: old and new problems. *Int J Mol Sci.* 2021, 22(3):1031.
60. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 1999, 13(1):23-30.

61. Obrosova IG, Fathallah L, Lang H-J. Interaction between osmotic and oxidative stress in diabetic precataractous lens: studies with a sorbitol dehydrogenase inhibitor. *Biochem Pharmacol*. 1999, 58(12):1945-54.
62. Srikanth KK, Orrick JA. Biochemistry, polyol or sorbitol pathways. *StatPearls*. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2022.
63. Lv Y, Yao X, Li X, Ouyang Y, Fan C, Qian Y. Cell metabolism pathways involved in the pathophysiological changes of diabetic peripheral neuropathy. *Neural Regen Res*. 2023.
64. Evcimen ND, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res*. 2007, 55(6):498-510.
65. Kuzan A. Toxicity of advanced glycation end products. *Biomed Rep*. 2021, 14(5):1-8.
66. Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*. 2013, 47(S1):3-27.
67. Kim HJ, Jeong MS, Jang SB. Molecular characteristics of RAGE and advances in small-molecule inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2021, 22(13):6904.
68. Nedić O, Rattan S, Grune T, Trougakos I. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radic Res*. 2013, 47(S1):28-38.
69. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol*. 2012, 11(6):521-34.
70. Sui BD, Xu TQ, Liu JW, Wei W, Zheng CX, Guo BL, Wang YY, Yang YL. Understanding the role of mitochondria in the pathogenesis of chronic pain. *Postgrad Med J*. 2013, 89(1058):709-14.
71. Shi TJ, Zhang MD, Zeberg H, Nilsson J, Grünler J, Liu SX, Xiang Q, Persson J, Fried KJ, Catrina SB, Watanabe M, Arhem P, Brismar K, Hökfelt TG. Coenzyme Q10 prevents peripheral neuropathy and attenuates neuron loss in the db-/db-mouse, a type 2 diabetes model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013, 110(2):690-5.
72. Devor M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain*. 1999, S6:27-35.
73. Segal MB. Extracellular and cerebrospinal fluids. *J Inheri Metab Dis*. 1993, 16(4):617-38.

74. Vyklícký L, Knotková-Urbancová H. Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res*. 1996, 45(1):1-9.
75. Passmore GM. Dorsal root ganglion neurones in culture: a model system for identifying novel analgesic targets? *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005, 51(3):201-8.
76. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis*. 1999, 6(5):347-63.
77. Burchiel KJ. Spontaneous impulse generation in normal and denervated dorsal root ganglia: sensitivity to alpha-adrenergic stimulation and hypoxia. *Exp Neurol*. 1984, 85(2):257-72.
78. Dichter MA, Fischbach GD. The action potential of chick dorsal root ganglion neurones maintained in cell culture. *J Physiol*. 1977, 267(2):281-98.
79. Viader A, Sasaki Y, Kim S, Strickland A, Workman CS, Yang K, Gross RW, Milbrandt J. Aberrant Schwann cell lipid metabolism linked to mitochondrial deficits leads to axon degeneration and neuropathy. *Neuron*. 2013, 77(5):886-98.
80. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neuro*. 2011, 7(10):573-83.
81. Vincent AM, Kato K, McLean LL, Soules ME, Feldman EL. Sensory neurons and schwann cells respond to oxidative stress by increasing antioxidant defense mechanisms. *Antioxi Redox Signal*. 2009, 11(3):425-38.
82. Russell JW, Berent-Spillion A, Vincent AM, Freimann CL, Sullivan KA, Feldman EL. Oxidative injury and neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurobiol Dis*. 2008, 30(3):420-9.
83. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*. 2004, 25(4):612-28.
84. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primer*. 2017, 3:17002.
85. Themistocleous AC, Ramirez JD, Shillo PR, Lees JG, Selvarajah D, Orengo C, Tesfaye S, Rice ASC, Bennett DLH. The Pain in Neuropathy Study (PiNS): a cross-sectional observational study determining the somatosensory phenotype of painful and painless diabetic neuropathy. *Pain*. 2016, 157(5):1132-45.

86. Watson JC, Sandroni P. Central neuropathic pain syndromes. *Mayo Clin Proc.* 2016, 91(3):372-85.
87. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol.* 2014, 13(9):924-35.
88. Binder A. Human surrogate models of neuropathic pain: validity and limitations. *Pain.* 2016, 157(S1):S48-s52.
89. Klein T, Magerl W, Rolke R, Treede RD. Human surrogate models of neuropathic pain. *Pain.* 2005, 115(3):227-33.
90. Vollert J, Magerl W, Baron R, Binder A, Enax-Krumova EK, Geisslinger G, Gierthmühlen J, Henrich F, Hüllemann P, Klein T, Lötsch J, Maier C, Oertel B, Schuh-Hofer S, Tölle TR, Treede RD. Pathophysiological mechanisms of neuropathic pain: comparison of sensory phenotypes in patients and human surrogate pain models. *Pain.* 2018, 159(6):1090-102.
91. Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med.* 2010, 16(11):1248-57.
92. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature.* 1992, 355(6355):75-8.
93. Hains BC, Waxman SG. Sodium channel expression and the molecular pathophysiology of pain after SCI. *Prog Brain Res.* 2007, 161:195-203.
94. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, Madugundu AK, Kelkar DS, Isserlin R, Jain S, Thomas JK, Muthusamy B, Leal-Rojas P, Kumar P, Sahasrabuddhe NA, Balakrishnan L, Advani J, George B, Renuse S, Selvan LD, Patil AH, Nanjappa V, Radhakrishnan A, Prasad S, Subbannayya T, Raju R, Kumar M, Sreenivasamurthy SK, Marimuthu A, Sathe GJ, Chavan S, Datta KK, Subbannayya Y, Sahu A, Yelamanchi SD, Jayaram S, Rajagopalan P, Sharma J, Murthy KR, Syed N, Goel R, Khan AA, Ahmad S, Dey G, Mudgal K, Chatterjee A, Huang TC, Zhong J, Wu X, Shaw PG, Freed D, Zahari MS, Mukherjee KK, Shankar S, Mahadevan A, Lam H, Mitchell CJ, Shankar SK, Satishchandra P, Schroeder JT, Sirdeshmukh R, Maitra A, Leach SD, Drake CG, Halushka MK, Prasad TS, Hruban RH, Kerr CL, Bader GD, Iacobuzio-Donahue CA, Gowda H, Pandey A. A draft map of the human proteome. *Nature.* 2014, 509(7502):575-81.
95. Ramialison M, Bajoghli B, Aghaallaei N, Ettwiller L, Gaudan S, Wittbrodt B, Czerny T, Wittbrodt J. Rapid identification of PAX2/5/8 direct downstream targets

- in the otic vesicle by combinatorial use of bioinformatics tools. *Genome Biol.* 2008, 9(10):R145.
96. Surace C, Piazzolla S, Sirleto P, Digilio MC, Roberti MC, Lombardo A, D'Elia G, Tomaiuolo AC, Petrocchi S, Capolino R, El Hachem M, Claps Sepulveda D, Sgura A, Angioni A. Mild ring 17 syndrome shares common phenotypic features irrespective of the chromosomal breakpoints location. *Clin Genet.* 2009, 76(3):256-62.
 97. Chung J, Kubota H, Ozaki Y, Uda S, Kuroda S. Timing-dependent actions of NGF required for cell differentiation. *PLoS One.* 2010, 5(2):e9011.
 98. Nishino J, Yamashita K, Hashiguchi H, Fujii H, Shimazaki T, Hamada H. Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO J.* 2004, 23(9):1998-2008.
 99. Jørgensen JR, Thompson L, Fjord-Larsen L, Krabbe C, Torp M, Kalkkinen N, Hansen C, Wahlberg L. Characterization of Meteorin--an evolutionary conserved neurotrophic factor. *J Mol Neurosci.* 2009, 39(1-2):104-16.
 100. Bridgewood C, Russell T, Weedon H, Baboolal T, Watad A, Sharif K, Cuthbert R, Wittmann M, Wechalekar M, McGonagle D. The novel cytokine Metrn/IL-41 is elevated in Psoriatic Arthritis synovium and inducible from both enthesal and synovial fibroblasts. *Clin Immunol.* 2019, 208:108253.
 101. Ushach I, Arrevillaga-Boni G, Heller GN, Pone E, Hernandez-Ruiz M, Catalan-Dibene J, Hevezi P, Zlotnik A. Meteorin-like/Meteorin- β Is a Novel Immunoregulatory Cytokine Associated with Inflammation. *J Immunol.* 2018, 201(12):3669-76.
 102. Ushach I, Burkhardt AM, Martinez C, Hevezi PA, Gerber PA, Buhren BA, Schrumpf H, Valle-Rios R, Vazquez MI, Homey B, Zlotnik A. Meteorin-Like is a cytokine associated with barrier tissues and alternatively activated macrophages. *Clin Immuno.* 2015, 156(2):119-27.
 103. Bridgewood C, Alase A, Watad A, Wittmann M, Cuthbert R, McGonagle D. The IL-23p19/EBI3 heterodimeric cytokine termed IL-39 remains a theoretical cytokine in man. *Inflamm Res.* 2019, 68(6):423-6.
 104. Genecards, Weizmann Institute of Science, <https://genecards.weizmann.ac.il/v3/cgi-bin/carddisp.pl?gene=METRNL>, Son Erişim Tarihi 17.01.2023.

105. Qi Q, Hu WJ, Zheng SL, Zhang SL, Le YY, Li ZY, Miao CU. Metrnl deficiency decreases blood HDL cholesterol and increases blood triglyceride. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020:1-8.
106. Zheng SL, Li ZY, Zhang Z, Wang DS, Xu J, Miao CY. Evaluation of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of human circulating Metrnl. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2018:c17-00846.
107. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000176845-METRNL/tissue>, Son Erişim Tarihi 12.07.2023.
108. Berghoff M, Höpfinger A, Rajendran R, Karrasch T, Schmid A, Schäffler A. Evidence of a muscle–brain axis by quantification of the neurotrophic myokine metrnl (meteorin-like protein) in human cerebrospinal fluid and serum. *J Clin Med*. 2021, 10(15):3271.
109. Watanabe K, Akimoto Y, Yugi K, Uda S, Chung J, Nakamuta S, Kaibuchi K, Kuroda S. Latent process genes for cell differentiation are common decoders of neurite extension length. *J Cell Sci*. 2012, 125(Pt 9):2198-211.
110. Jung TW, Lee SH, Kim HC, Bang JS, Abd El-Aty AM, Hacımuftüoğlu A, Shin YK, Jeong JH. METRNL attenuates lipid-induced inflammation and insulin resistance via AMPK or PPAR δ -dependent pathways in skeletal muscle of mice. *Exp Mol Med*. 2018, 50(9):122.
111. Şekerci G. Sıçanlara meteorin-like protein uygulamasının hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ve periferik uncoupling proteinler üzerindeki etkileri, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Malatya: İnönü Üniversitesi, 2021.
112. Hu W, Wang R, Sun B. Meteorin-like ameliorates β cell function by inhibiting β cell apoptosis of and promoting β cell proliferation via activating the wnt/ β -catenin pathway. *Front Pharmacol*. 2021, 12:627147.
113. Yao Z, Lin P, Wang C, Wang K, Sun Y. Administration of metrnl delays the onset of diabetes in non-obese diabetic mice. *Endocr J*. 2020.
114. Bae JY. Aerobic exercise increases meteorin-like protein in muscle and adipose tissue of chronic high-fat diet-induced obese mice. *Bio Med Res Int*. 2018:6283932.
115. Huang S, Cao L, Cheng H, Li D, Li Y, Wu Z. The blooming intersection of subfatin and metabolic syndrome. *Rev Cardiovasc Med*. 2021, 22(3):799-805.

116. Wang C, Pan Y, Song J, Sun Y, Li H, Chen L, Hou X. Serum Metrnl level is correlated with insulin resistance, but not with β -cell function in type 2 diabetics. *Med Sci Monit*. 2019, 25:8968-74.
117. Lee JO, Byun WS, Kang MJ, Han JA, Moon J, Shin MJ, Lee HJ, Chung JH, Lee JS, Son CG. The myokine meteorin-like (metrnl) improves glucose tolerance in both skeletal muscle cells and mice by targeting AMPK α 2. *FEBS J*. 2020, 287(10):2087-104.
118. McGee SL, Van Denderen BJ, Howlett KF, Mollica J, Schertzer JD, Kemp BE, Hargreaves M. AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes Care*. 2008, 57(4):860-7.
119. McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Natur*. 2000, 408(6808):106-11.
120. Grander C, Grabherr F, Enrich B, Meyer M, Mayr L, Schwärzler J, Pedrini A, Effenberger M, Adolph TE, Tilg H. Hepatic meteorin-like and krüppel-like factor 3 are associated with weight loss and liver injury. *Exp Clin Endocrin Diabetes*. 2022, 130(6):406-14.
121. Yavuzkir S, Ugur K, Deniz R, Ustebay DU, Mirzaoglu M, Yardim M, Sahin İ, Baykus Y, Karagoz ZK, Aydin S. Maternal and umbilical cord blood subfatin and spexin levels in patients with gestational diabetes mellitus. *Peptides*. 2020, 126:170277.
122. Yavuz A, Aydin MA, Ugur K, Aydin S, Senol A, Baykus Y, Deniz R, Sahin İ, Yalcin MH, Gencer BT, Deniz YK, Ustebay S, Karagoz ZK, Emre E, Aydin S. Betatrophin, elabela, asprosin, glucagon and subfatin peptides in breast tissue, blood and milk in gestational diabetes. *Biotech Histochemi*. 2023, 98(4):243-54.
123. Song L, Chang X, Hu L, Liu L, Wang G, Huang Y, Xu L, Jin B, Song J, Hu L, Zhang T, Wang Y, Xiao Y, Zhang F, Shi M, Liu L, Chen Q, Guo B, Zhou Y. Accelerating wound closure with metrnl in normal and diabetic mouse skin. *Diabetes*. 2023.
124. Wang W, Liu Y, Hao J, Zheng S, Wen Y, Xiao X, He A, Fan Q, Zhang F, Liu R. Comparative analysis of gene expression profiles of hip articular cartilage between non-traumatic necrosis and osteoarthritis. *Gene*. 2016, 591(1):43-7.
125. Stephens AS, Stephens SR, Hobbs C, Hutmacher DW, Basic-Welsh D, Woodruff MA, Morrison NA. Myocyte enhancer factor 2c, an osteoblast transcription factor

- identified by dimethyl sulfoxide (DMSO)-enhanced mineralization. *J Biol Chem*. 2011, 286(34):30071-86.
126. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Scienc*. 1999, 284(5411):143-7.
 127. Gong W, Liu Y, Wu Z, Wang S, Qiu G, Lin S. Meteorin-like shows unique expression pattern in bone and its overexpression inhibits osteoblast differentiation. *PLoS One*. 2016, 11(10):e0164446.
 128. Sobieh BH, Kassem DH, Zakaria ZM, El-Mesallamy HO. Potential emerging roles of the novel adipokines adipolin/CTRP12 and meteorin-like/METRNL in obesity-osteoarthritis interplay. *Cytokine*. 2021, 138:155368.
 129. Cherian P, Al-Khairi I, Jamal M, Al-Sabah S, Ali H, Dsouza C, Alshawaf E, Al-Ali W, Al-Khaledi G, Al-Mulla F, Abu-Farha M, Abubaker J. Association between factors involved in bone remodeling (osteoactivin and opg) with plasma levels of irisin and meteorin-like protein in people with t2d and obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021, 12:752892.
 130. Huang R, Balu AR, Molitoris KH, White JP, Robling AG, Ayturk UM, Baht GS. The role of Meteorin-like in skeletal development and bone fracture healing. *J Orthop Res*. 2022, 40(11):2510-21.
 131. Javaid HMA, Sahar NE, ZhuGe DL, Huh JY. Exercise inhibits NLRP3 inflammasome activation in obese mice via the anti-inflammatory effect of meteorin-like. *Cells*. 2021, 10(12).
 132. Liu J, Jia S, Yang Y, Piao L, Wang Z, Jin Z, Bai L. Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling. *Biomed Pharmacot*. 2023, 158:114118.
 133. Dadmanesh M, Aghajani H, Fadaei R, Ghorban K. Lower serum levels of meteorin-like/subfatin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus are negatively associated with insulin resistance and inflammatory cytokines. *PLoS One*. 2018, 13(9):e0204180.
 134. Chung HS, Hwang SY, Choi JH, Lee HJ, Kim NH, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi KM. Implications of circulating meteorin-like (Metrl) level in human subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018, 136:100-7.

135. Rupérez C, Ferrer-Curriu G, Cervera-Barea A, Florit L, Guitart-Mampel M, Garrabou G, Zamora M, Crispi F, Fernandez-Solà J, Lupón J, Bayes-Genis A, Villarroya F, Planavila A. Meteorin-like/Meteorin- β protects heart against cardiac dysfunction. *J Exp Med*. 2021, 218(5).
136. Reboll MR, Klede S, Taft MH, Cai CL, Field LJ, Lavine KJ, Koenig AL, Fleischauer J, Meyer J, Schambach A, Niessen HW, Kosanke M, van den Heuvel J, Pich A, Bauersachs J, Wu X, Zheng L, Wang Y, Korf-Klingebiel M, Polten F, Wollert KC. Meteorin-like promotes heart repair through endothelial KIT receptor tyrosine kinase. *Science*. 2022, 376(6599):1343-7.
137. Giden R, Yasak IH. Meteorin-like protein decreases in acute coronary syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2023, 27(1):208-14.
138. Lu QB, Ding Y, Liu Y, Wang ZC, Wu YJ, Niu KM, Li KX, Zhang JR, Sun HJ. Metrnl ameliorates diabetic cardiomyopathy via inactivation of cGAS/STING signaling dependent on LKB1/AMPK/ULK1-mediated autophagy. *J Adv Res*. 2023, 51:161-79.
139. Wang R, Hu D, Zhao X, Hu W. Correlation of serum meteorin-like concentrations with diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020, 169:108443.
140. Zhou Y, Liu L, Jin B, Wu Y, Xu L, Chang X, Hu L, Wang G, Huang Y, Song L, Zhang T, Wang Y, Xiao Y, Zhang F, Shi M, Liu L, Wang T, Yan R, Guo B. Metrnl alleviates lipid accumulation by modulating mitochondrial homeostasis in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2023, 72(5):611-26.
141. Gao X, Leung TF, Wong GW, Ko WH, Cai M, He EJ, Chu IM, Tsang MS, Chan BC, Ling J, Fan X, Lu L, Lam CW, Wong CK. Meteorin- β /Meteorin like/IL-41 attenuates airway inflammation in house dust mite-induced allergic asthma. *Cell Mol Immunol*. 2022, 19(2):245-59.
142. Kocaman N, Yuksel EI, Demir B, Calik I, Cicek D. Two novel biomarker candidates for differentiating basal cell carcinoma from trichoblastoma; asprosin and meteorine like peptide. *Tissue Cell*. 2022, 76:101752.
143. Chen X, Chen X, Yang Y, Luo N, Yang J, Zhong L, Guo T, Yuan Z, Wei Q, Wang C. Protective role of the novel cytokine Metrnl/ interleukin-41 in host immunity defense during sepsis by promoting macrophage recruitment and modulating Treg/Th17 immune cell balance. *Clin Immunol*. 2023, 254:109690.

144. Guo J, Tao W, Tang D, Zhang J. Th17/regulatory T cell imbalance in sepsis patients with multiple organ dysfunction syndrome: attenuated by high-volume hemofiltration. *Int J Artif Organs*. 2017, 40(11):607-14.
145. Loffler D, Landgraf K, Rockstroh D, Schwartz JT, Dunzendorfer H, Kiess W, Korner A. METRNL decreases during adipogenesis and inhibits adipocyte differentiation leading to adipocyte hypertrophy in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2017, 41(1):112-9.
146. Huh JY. The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism. *Arch Pharm Res*. 2018, 41(1):14-29.
147. Şekerci G, Erden Y, Tekin S. Effects of meteorin-like hormone on endocrine function of hypothalamo-hypophyseal system and peripheral uncoupling proteins in rats. *Mol Biol Rep*. 2022, 49(7):5919-25.
148. Ozcan S, Kelestemur MM, Hekim MG, Bulmus O, Bulut F, Bilgin B, Canpolat S, Ozcan M. Asprosin, a novel therapeutic candidate for painful neuropathy: an experimental study in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2022, 395(3):325-35.
149. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983, 16(2):109-10.
150. Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008, 51(2):216-26.
151. Zychowska M, Rojewski E, Pilat D, Mika J. The role of some chemokines from the CXC subfamily in a mouse model of diabetic neuropathy. *J Diabetes Res*. 2015, 2015.
152. Murakami T, Iwanaga T, Ogawa Y, Fujita Y, Sato E, Yoshitomi H, Sunada Y, Nakamura A. Development of sensory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Behav*. 2013, 3(1):35-41.
153. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988, 34(3):497-500.
154. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984, 105:121-6.
155. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979, 95(2):351-8.
156. Liebman JF, Greenberg A. *Mechanistic principles of enzyme activity*. New York, VCH Publishers, 1988.
157. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959, 82(1):70-7.

158. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968, 25(1):192-205.
159. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193(1):265-75.
160. Çetin A, Çiftçi O, Otlu A. Protective effect of hesperidin on oxidative and histological liver damage following carbon tetrachloride administration in Wistar rats. *Archives of medical science.* 2016, 12(3):486-93.
161. Forda S, Kelly JS. The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion cells by the presence of 5-HT-containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Brain Res.* 1985, 354(1):55-65.
162. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods.* 1983, 65(1-2):55-63.
163. Altman FP. Tetrazolium salts and formazans. *Progress in histochemistry cytochemistry.* 1976, 9(3):III-51.
164. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry.* 1997, 69(2):581-93.
165. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA.* 2003, 289(1):76-9.
166. Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010, 17(5):446-52.
167. Westlake S, Jones M, Sharma KD, Xie JY. Letters to the editor: Nicotinic acetylcholine receptor ligands as potential targets for managing neuropathic pain induced by diabetic peripheral neuropathy. *eNeurologicalSci.* 2022, 28:100416.
168. Lönnstedt M, Häckter Ståhl C, Hedman AMR. Living with long-lasting pain—patients' experiences of neuropathic pain. *J Nurs Healthc Chronic Illn.* 2011, 3(4):469-75.
169. Amin B, Hosseinzadeh H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Fitoterapia.* 2012, 83(5):888-95.

170. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. 1999, 353(9168):1959-64.
171. O'Brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR J*. 2014, 54(3):259-72.
172. King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012, 166(3):877-94.
173. Chu Q, Moreland R, Yew NS, Foley J, Ziegler R, Scheule RK. Systemic insulin-like growth factor-1 reverses hypoalgesia and improves mobility in a mouse model of diabetic peripheral neuropathy. *Mol Ther*. 2008, 16(8):1400-8.
174. Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain*. 1993, 53(1):81-8.
175. Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *J Diabetes Res*. 2016, 2016:3425617.
176. Koltyn KF, Garvin AW, Gardiner RL, Nelson TF. Perception of pain following aerobic exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1996, 28(11):1418-21.
177. Shen J, Fox LE, Cheng J. Swim therapy reduces mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by chronic constriction nerve injury in rats. *J Pain medicine*. 2013, 14(4):516-25.
178. Anand P. Neurotrophic factors and their receptors in human sensory neuropathies. *Progress in Brain Research*. 2004, 146:477-92.
179. Wang L, Fan W, Yu C, Lang M, Sun G. Clinical effects of electrical stimulation therapy on lumbar disc herniation-induced sciatica and its influence on peripheral ROS level. *J Musculoskelet Neuronal Interac*. 2018, 18(3):393-8.
180. Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2005, 66(3):562-73.
181. Chen SD, Yang DI, Lin TK, Shaw FZ, Liou CW, Chuang YC. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*. 2011, 12(10):7199-215.
182. Aquilano K, Baldelli S, Pagliei B, Cannata SM, Rotilio G, Ciriolo MR. p53 orchestrates the PGC-1 α -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance. *Antioxid Redox Signal*. 2013, 18(4):386-99.

183. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006, 127(2):397-408.
184. Kang C, Li Ji L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2012, 1271(1):110-7.
185. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98(7):3820-5.
186. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 2001, 413(6852):131-8.
187. Pratley RE, Thompson DB, Prochazka M, Baier L, Mott D, Ravussin E, Sakul H, Ehm MG, Burns DK, Foroud T, Garvey WT, Hanson RL, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. An autosomal genomic scan for loci linked to prediabetic phenotypes in Pima Indians. *J Clin Invest*. 1998, 101(8):1757-64.
188. Esterbauer H, Oberkofler H, Krempler F, Patsch W. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*. 1999, 62(1):98-102.
189. Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia*. 2002, 45(5):740-3.
190. Mert T, Oksuz H, Tugtag B, Kilinc M, Sahin E, Altun I. Anti-hypernociceptive and anti-oxidative effects of locally treated dobutamine in diabetic rats. *Pharmacol Rep*. 2015, 67(5):1016-23.
191. Kiasalari Z, Rahmani T, Mahmoudi N, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Diosgenin ameliorates development of neuropathic pain in diabetic rats: Involvement of oxidative stress and inflammation. *Biomed Pharmacothe*. 2017, 86:654-61.

192. Cheng YC, Chiu YM, Dai ZK, Wu BN. Loganin ameliorates painful diabetic neuropathy by modulating oxidative stress, inflammation and insulin sensitivity in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Cells*. 2021, 10(10).
193. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003, 52(1):1-8.
194. Lai L, Yan L, Gao S, Hu C-L, Ge H, Davidow A, Park M, Bravo C, Iwatsubo K, Ishikawa Y. Type 5 adenylyl cyclase increases oxidative stress by transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase via the SIRT1/FoxO3a pathway. *Circulation*. 2013, 127(16):1692-701.
195. Hsu C-P, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N, Shao D, Takagi H, Oka S, Sadoshima J. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation*. 2010, 122(21):2170-82.
196. Hu C, Zhang X, Song P, Yuan YP, Kong CY, Wu HM, Xu SC, Ma ZG, Tang QZ. Meteorin-like protein attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating cAMP/PKA/SIRT1 pathway. *Redox Biol*. 2020, 37:101747.
197. Renaud J, Bournival J, Zottig X, Martinoli MG. Resveratrol protects DAergic PC12 cells from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis: effect on p53 and GRP75 localization. *Neurotox Res*. 2014, 25(1):110-23.
198. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998, 281(5381):1312-6.
199. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997, 3(6):614-20.
200. Hong S, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J Biological Chemistry*. 2005, 280(1):618-27.
201. Polli JE. In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *AAPS J*. 2008, 10(2):289-99.
202. King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histoche Cell Biol*. 2004, 122(4):333-8.
203. Vincent AM, Edwards JL, McLean LL, Hong Y, Cerri F, Lopez I, Quattrini A, Feldman EL. Mitochondrial biogenesis and fission in axons in cell culture and animal models of diabetic neuropathy. *Acta Neuropatho*. 2010, 120(4):477-89.

204. Leininger GM, Backus C, Sastry AM, Yi YB, Wang CW, Feldman EL. Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis.* 2006, 23(1):11-22.
205. Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes.* 2000, 49(11):1932-8.
206. Kamiya H, Zhangm W, Sima AA. Apoptotic stress is counterbalanced by survival elements preventing programmed cell death of dorsal root ganglions in subacute type 1 diabetic BB/Wor rats. *Diabetes.* 2005, 54(11):3288-95.
207. Zhang SL, Li ZY, Wang DS, Xu TY, Fan MB, Cheng MH, Miao CY. Aggravated ulcerative colitis caused by intestinal Metrnl deficiency is associated with reduced autophagy in epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2020, 41(6):763-70.
208. Xu TY, Qing SL, Zhao JX, Song J, Miao ZW, Li JX, Yang FY, Zhao HY, Zheng SL, Li ZY, Wang SN, Miao CY. Metrnl deficiency retards skin wound healing in mice by inhibiting AKT/eNOS signaling and angiogenesis. *Acta Pharmacol Sin.* 2023, 44(9):1790-800.
209. Baht GS, Bareja A, Lee DE, Rao RR, Huang R, Huebner JL, Bartlett DB, Hart CR, Gibson JR, Lanza IR, Kraus VB, Gregory SG, Spiegelman BM, White JP. Meteorin-like facilitates skeletal muscle repair through a Stat3/IGF-1 mechanism. *Nat Metab.* 2020, 2(3):278-89.