

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**



**DENEYSEL DİYABETİK NÖROPATİ
MODELİNDE HUMANİNİN HÜCRE
CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUHAMMED MİRAÇ KELEŞTEMUR

2022

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU

Doç. Dr. Onur ÖZTÜRK



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Muhammed Miraç KELEŞTEMUR

20/06/2022

Danışman

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Biyofizik Anabilim Dalı

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca sonsuz desteği, paha biçilmez rehberliği, motivasyonu, engin bilgisi ile benim için bir danışmandan daha fazlası olan Sayın Prof. Dr. Mete ÖZCAN'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca hem akademik hayata hem de sosyal hayata dair engin bilgi birikimleri ve deneyimlerinden faydalandığım başta Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR olmak üzere, Sayın Prof. Dr. Sinan CANPOLAT'a, Sayın Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Emine KAÇAR'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özgür BULMUŞ'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde ve yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan desteklerini esirgemeyen yakın arkadaşlarım ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her anına anlam katan sevgili eşim Melike'ye yüksek lisans çalışmalarım boyunca bana sonsuz sevgi, destek ve sürekli teşvik sağladığı için sonsuz şükranlarımı sunarım. Her ihtiyacım olduğunda yanımda olan değerli ailem; babam Bedrettin, annem Fatma, ablam Ünzile ve abim Yusuf KELEŞTEMUR'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yüksek lisans tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde 119R084 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Diabetes Mellitus	5
3.1.1. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması.....	7
3.1.2. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları.....	9
3.2. Diyabetik Nöropati.....	11
3.2.2. Diyabetik Nöropati ve Duyusal Sinir Hücreleri.....	14
3.2.1. Deneysel Diyabetik Nöropati Modelleri	15
3.2.1.1. Diyabetik Nöropatinin <i>In Vivo</i> Modeli	16
3.2.1.1. Diyabetik Nöropatinin <i>In Vitro</i> Modeli	19
3.3. Humanin.....	20

3.3.1. Humaninin Yapısı	21
3.3.2. Humaninin Etki Mekanizması	23
3.3.2. Humanin ve Diabetes Mellitus	28
3.4. Tez Çalışmasının Amacı	29
4. GEREÇ VE YÖNTEM	30
4.1. Deney Planı	30
4.2. Diyabetik Nöropatinin <i>In Vivo</i> Modeli	32
4.2.1. Deney Hayvanları.....	32
4.2.2. Streptozotosin-İndüklü Farelerde Diyabetik Nöropati Modeli	33
4.2.3. Nöroseptif Davranış Testleri.....	34
4.2.4. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Seviyesinin Analizi	35
4.3. Diyabetik Nöropatinin <i>In Vitro</i> Modeli	40
4.3.1. Dorsal Kök Gangliyonu Primer Hücre Kültürü	40
4.3.2. Dorsal Kök Gangliyonunun Primer Hücre Kültürü Protokolü	41
4.3.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve MTT Analizi	42
4.3.4. Hücre Canlılık Analizi	43
4.4. Kullanılan İlaçlar.....	47
4.5. İstatistiksel Analizler.....	47
5. BULGULAR	49
5.1. Diyabetik Nöropatinin <i>In Vivo</i> Modeli	49

5.1.1. Streptozotosin ile Diyabet İndüklenmiş Farelerin Nosiseptif Davranış Testlerine Yanıtları.....	49
5.1.2. Humaninin Serum Kaspaz 3 Seviyesi Üzerine Etkisi	50
5.1.3. Humaninin Serum Kaspaz 9 Seviyesi Üzerine Etkisi	52
5.2. Diyabetik Nöropatinin <i>In Vitro</i> Modeli	54
5.2.1. Humaninin Hücre Canlılığına Etkisi.....	54
5.2.2. Humaninin EC50 Dozunun Belirlenmesi	55
5.2.3. Humaninin Hücre Canlılığına Yolak Üzerinden Etkisi	56
6. TARTIŞMA	58
7. KAYNAKLAR	64
8. ÖZGEÇMİŞ.....	77

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Sinir Hücre Kültür Vasatı Bileşimi 41

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar 47



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Diyabetik Nöropatinin Patogenezi.....	13
Şekil 2. Humanin peptidinin insandaki her amino asidin fonksiyonu ile temsil edilen yapısı	22
Şekil 3. Humanin Sinyal Yolları.....	24
Şekil 4. Çalışma Akış Diyagramı	32
Şekil 5. Serum Kaspaz 3 seviyesini ELISA yöntemi ile değerlendirmek için standartların hazırlanması ve plate yerleşimi.....	37
Şekil 6. Serum Kaspaz 9 seviyesini ELISA yöntemi ile değerlendirmek için standartların hazırlanması ve plate yerleşimi.....	39
Şekil 7. Humaninin farklı dozlarının (10 nM, 30 nM, 100 nM ve 300 nM) hücre canlılığına etkisini MTT analizi ile incelemek için grupların 96'lık plate üzerindeki yerleşimi.....	44
Şekil 8. Humaninin hücre canlılığına yolak üzerinden etkisini MTT analizi ile incelemek için grupların 96'lık plate üzerindeki yerleşimi.....	46
Şekil 9. Diyabetik Nöropati oluşumunun farelerde termal ve mekanik nosiseptif davranış yanıtlarının ölçülmesiyle belirlenmesi.....	50
Şekil 10. Humaninin STZ ile DM indüklenerek DN modeli oluşturulan farelerde serum kaspaz 3 seviyesine etkisi.....	52

Şekil 11. Humaninin STZ ile DM indüklenerek DN modeli oluşturulan farelerde serum kaspaz 9 seviyesine etkisi.....	53
Şekil 12. Diyabetik Nöropati'nin <i>in vitro</i> modelinde humaninin farklı dozlarının (10 nM, 30 nM, 100 nM ve 300 nM) hücre canlılığı üzerine etkisi. Deneyler farklı günlerde 10 kez tekrarlanmıştır.....	55
Şekil 13. Humaninin (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM; log olarak ifade edilmiştir) hücre canlılığı üzerine log(doz)-yanıt ilişkisi	56
Şekil 14. Humaninin Diyabetik Nöropati'nin <i>in vitro</i> modelinde yolak üzerinden etkisi. Deneyler farklı günlerde 10 kez tekrarlanmıştır.....	57

KISALTMALAR LİSTESİ

ADA	: Amerikan Diyabet Derneği
AGE	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCL-2	: B-Hücreli Lenfoma 2
CNTFR	: Siliyer Nörotrofik Faktör Reseptörü
DKA	: Diyabetik Ketoasidoz
DKG	: Dorsal Kök Gangliyonu
DM	: Diabetes Mellitus
DN	: Diyabetik Nöropati
ERK	: Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
FPRL1	: Formil Peptit Reseptörü Benzeri 1
FPRL2	: Formil Peptit Reseptörü Benzeri 2
GLUT 2	: Glukoz Taşıyıcısı 2
GLUT 4	: Glukoz Taşıyıcısı 4
gp130	: Glikoprotein Reseptörü
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri
IFG	: Bozulmuş Açlık Glukozu
IGT	: Bozulmuş Glukoz Toleransı
JNK	: c-Jun N-Terminal Kinaz
JAK2	: Janus Kinaz 2
kg	: Kilogram

KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LOX1	: Oksitlenmiş LDL Reseptörü 1
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazlar
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid
µL	: Mikrolitre
mEq	: Miliekivalen
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid, İndirgenmiş
NGF	: Sinir Büyütme Faktörü
nM	: Nanomolar
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
NOD	: Obez Olmayan Diyabetik
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PI3K	: Fosfatidil İnozitol 3-Kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
pH	: Potansiyel Hidrojen
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
STAT3	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 3 Aktivatörü
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
YG	: Yüksek Glukoz

1. ÖZET

Diyabetik nöropati (DN) bozulmuş glukoz metabolizması nedeniyle hem merkezi hem periferik sinirleri etkileyen ve mitokondri disfonksiyonuna neden olabilen multifaktöriyel bir hastalıktır. Ayrıca DN, nosiseptif sinyallerin merkezi sinir sistemine taşınmasında başlıca rol oynayan dorsal kök gangliyonu (DKG) nöronlarının fonksiyonlarında değişiklik meydana getirmektedir. Nöropatide mitokondri kökenli olarak keşfedilen ilk peptit olan humaninin antiapoptotik özellik gösterdiği bilinmektedir. Ancak uzun süreli humanin uygulamasının DN'nin *in vivo* modelinde serum kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyesini, *in vitro* modelinde hücre canlılığını nasıl ve hangi yolak üzerinden etkilediği bilinmemektedir. Bu tez çalışmasının amacı, humaninin DN'nin *in vivo* ve *in vitro* modellerinde apoptoz ve hücre canlılığı üzerine olası etkilerini ve mekanizmasını araştırmaktır.

DN'nin *in vivo* modelinde, diyabet oluşumundan 21 gün sonra 15 gün boyunca humanin (4 mg/kg, i.p.) uygulandı. Sonrasında farelerin serum kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyeleri ölçüldü. DN'nin *in vitro* modeli, DKG nöronlarının 24 saat yüksek glukoz (YG) (45 mmol/L) maruz bırakılması ile gerçekleştirildi.

DN'nin *in vivo* modelinde humaninin kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyelerini anlamlı ölçüde azalttığı bulunmuştur ($p<0.05$). DN'nin *in vitro* modelinde ise humaninin (10 nM, 30 nM, 100 nM ve 300 nM) hücre canlılığını doz bağımlı olarak anlamlı ölçüde arttırdığı ve bu etkinin JAK2/STAT3 yolağı üzerinden olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak humaninin, DN'ye bağlı gelişen apoptotik süreçlerde ve duyuşal sinir hücrelerinde hücre canlılığını koruyucu bir etkiye sahip olduğu ve bu etkiyi JAK2/STAT3 yolağı üzerinden gerçekleştirdiği ilk defa bu tez çalışması ile gösterilmiştir. Bu tez çalışmasının sonuçları humaninin önemli bir halk sağlığı sorunu olan diyabet sonucu ortaya çıkan DN'de teröpatik bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Humanin, duyuşal nöronlar, hücre canlılığı, diyabetik nöropati

2. ABSTRACT

Investigation of Effect of Humanin on Cell Viability in The Model of Experimental Diabetic Neuropathy

Diabetic neuropathy (DN) is a multifactorial disease that affects both central and peripheral nerves due to impaired glucose metabolism and can cause mitochondrial dysfunction. In addition, DN causes changes in the functions of dorsal root ganglia (DRG) neurons, which play a major role in the transport of nociceptive signals to the central nervous system. It is known that humanin, the first peptide discovered to originate from mitochondria, has antiapoptotic properties in neuropathy. However, it is not known how long-term humanin administration affects serum caspase 3 and caspase 9 levels in the *in vivo* model of DN. It is also not known how and through which pathway humanin affects cell viability *in vitro* model of DN. The aim of this thesis is to investigate the possible effects and mechanism of humanin on apoptosis and cell viability in *in vivo* and *in vitro* models of DN.

In *in vivo* model of DN, humanin (4 mg/kg, i.p.) was administered for 15 days, 21 days after diabetes onset. Afterward, the serum caspase 3 and caspase 9 levels of the mice were measured. The *in vitro* model of DN was performed by exposing DKG neurons to high glucose (HG) (45 mmol/L) for 24 hours.

Humanin was found to significantly reduce caspase 3 and caspase 9 levels in *in vivo* model of DN ($p<0.05$). In *in vitro* model of DN, it was determined that

humanin (10 nM, 30 nM, 100 nM, and 300 nM) significantly increased cell viability in a dose-dependent manner and this effect was via JAK2/STAT3 pathway.

As a result, it was shown for the first time in this thesis that humanin has a protective effect on cell viability in DN-dependent apoptotic processes and sensory nerve cells, and it exerts this effect through the JAK2/STAT3 pathway. The results of this study suggest that humanin may be a therapeutic target in DN resulting from diabetes, which is an important public health problem.

Keywords: Humanin, sensory neurons, cell viability, diabetic neuropathy

3. GİRİŞ

3.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), yüksek kan glukoz seviyesi ile karakterize insan yaşamını tehdit eden hastalıklardan biridir (1). DM, insülin hormonunun yeterli miktarda üretilmemesi ya da üretilen insülinin etkili bir şekilde kullanılamaması nedeniyle yüksek kan glukoz seviyeleri sonucunda ortaya çıkan ciddi, kronik bir hastalıktır (2, 3).

Kandaki glukoz seviyelerinin düzenlenmesi, insülin ve glukagon salınımı yoluyla hareket eden negatif bir geri besleme döngüsüne dayanır. Kandaki glukoz seviyeleri yüksek olduğunda, pankreastaki langerhans adacığının β hücreleri, insülini serbest bırakmak için tetiklenir. İnsülin, karaciğere depolaması amacıyla glukozu glikojene dönüştürmesi için sinyal gönderir; aynı zamanda vücuttaki diğer hücreleri (yağ/iskelet kası hücreleri) glukoz taşıyıcısının (GLUT4) hücre yüzeyine yer değiştirmesiyle daha fazla glukoz almaları için tetikler. Bu, dolaşımdaki glukoz konsantrasyonlarını normal seviyelere getirmeye yardımcı olur. Kandaki glukoz konsantrasyonu düşük olduğunda, pankreasın α hücreleri glukagon salgılamak için uyarılır. Glukagon, karaciğere depolanmış glikojeni, homeostazı sağlamak için kana salınan glukozu dönüştürmesi için sinyal verir (4–6).

Kandaki glukoz açlık durumunda, beyin tarafından kullanılmak üzere insüline bağımlı olmadan karaciğer tarafından sağlanır. İnsülin, glukozun depolanmasının yanı sıra, glukagonun sekresyonunu da engeller ve karaciğer glukoz üretiminde düşüşe yol açan serum yağ asitlerinin konsantrasyonunu düşürür. Vücutta yetersiz insülin veya insüline direnç, hücre içi hipoglisemi ve hücre dışı

hiperglisemi ile sonuçlanan dokularda glukoz alımının azalmasına neden olur. Hücre içi hipoglisemi, diyabetik ketoasidoza (DKA), protein sentezini ve gama globulinleri azaltan glukojenez ve glukoneogeneze neden olurken, hücre dışı hiperglisemi, hiperglisemik koma ve ozmotik diereze yol açar (7).

DM dünya çapında önemli bir ölüm nedenidir. Küresel olarak, DM ilk 10 ölüm nedeni arasında yer almaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonunun (IDF) 2021 yılı verilerine göre 2000 yılından bu yana prevalansı 3 kat artarak dünya genelinde her 10 kişiden 1'i (20-79 yaş arasında 537 milyon yetişkin) DM ile yaşamakta ve 2045 yılında bu rakamın %46 artışla 783 milyon olacağı varsayılmaktadır. 2021 yılında 20-79 yaş arasında 6,7 milyon yetişkinin DM ve komplikasyonları nedeniyle öldüğü ve bu da tüm nedenlerden kaynaklanan küresel ölümlerin %12,2'sine denk gelmektedir. DM, son 15 yılda %316 artışla en az 966 milyar dolarlık sağlık harcamalarına neden olmuştur. DM ile yaşayan insanlar, tıbbi bakım ihtiyacının artmasına, yaşam kalitesinin düşmesine, erken ölüme yol açan ve yaşamı tehdit eden komplikasyonlar geliştirme riski altındadır. DM, uzun vadede kontrol edilmezse, vücudun birçok organına zarar vererek kardiyovasküler hastalıklar (KVH), sinir hasarı (nöropati), böbrek hasarı (nefropati), alt ekstremitte amputasyonu ve görme kaybı ve hatta körlüğe neden olan göz rahatsızlıkları (esas olarak retinayı etkiler) gibi yaşamı tehdit eden sağlık sorunlarına yol açabilir. Bununla birlikte, DM'nin uygun yönetimi sağlınırsa, bu ciddi komplikasyonlar geciktirilebilir veya tamamen önlenir (3).

3.1.1. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması

DM uzun süreli hiperglisemiye yol açan bir grup hastalık için kullanılan genel bir terimdir. DM'nin sınıflandırılmasının temelini DM'nin farklı tiplerinin gelişme mekanizmasındaki farklılıklar oluşturmaktadır.

DM genel kategorilere etiyolojik ve klinik açıdan şu şekilde ayrılabilir:

1. Tip 1 DM (T1DM)
 - İmmün Aracılı
 - İdiyopatik
2. Tip 2 DM (T2DM)
3. Gestasyonel DM (GDM)
4. Diğer Spesifik Tipler
 - β Hücre Fonksiyonlarının Genetik Defekti
 - İnsülin Etkisindeki Genetik Defektler
 - Pankreasın Ekzokrin Doku Hastalıkları
 - Endokrinopatiler
 - İlaç veya Kimyasal Ajanlar
 - İmmün Aracılıklı Nadir Diyabet Formları
 - Diyabetle İlişkili Genetik Sendromlar
 - Enfeksiyonlar

T1DM, önceden “insüline bağımlı DM” veya “juvenil başlangıçlı DM” olarak adlandırılan, tüm DM vakalarının %5-10'unu oluşturur ve pankreas β hücrelerinin hücresel aracılı otoimmün yıkımından kaynaklanır. Sonuç olarak, vücut çok az insülin üretir veya hiç üretmez. Bu yıkıcı sürecin nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır, ancak genetik yatkınlık ve viral enfeksiyon gibi çevresel bir

tetikleyici kombinasyonunun otoimmün reaksiyonu başlatması olarak açıklanabilir. Durum her yaşta gelişebilir, ancak T1DM'nin başlangıcı en sık çocukluk ve erken erişkinlik döneminde (<35 yaş) ortaya çıkar (8–10). T1DM'nin tipik semptomları aşırı susama, sık idrara çıkma, yorgunluk hissi, sürekli açlık, ani kilo kaybı, bulanık görme ve DKA olarak listelenmiştir. Bununla birlikte, aşırı susama (polidipsi), sık idrara çıkma (poliüri) ve kilo kaybı gibi klasik klinik tablo mevcut olmayabilir ve tanı gecikebilir veya hatta tamamen atlanabilir (3).

T2DM, önceden “insüline bağımlı olmayan” veya “yetişkin başlangıçlı” olarak adlandırılan, dünya çapında en yaygın metabolik bozukluklardan biridir ve gelişimine iki ana faktörün bir kombinasyonu olan, pankreas β hücreleri tarafından kusurlu insülin sekresyonu ve insüline duyarlı dokuların insüline yanıt verememesi neden olur (11). T2DM, T1DM'ne benzer semptomlara sahip olabilir, ancak genel olarak semptomlar çok daha hafif ve durum tamamen semptomsuz olabilir. Tanı uzun süre ertelenirse görme bozukluğu, geç iyileşen alt ekstremitte ülserleri, kalp hastalığı veya inme gibi komplikasyonlar tanıya neden olabilir (12, 13). T2DM nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır ancak aşırı kilo ve obezite, artan yaş, etnik köken ve aile öyküsü ile güçlü bir bağlantı vardır. Obezite ve bozulmuş glukoz regülasyonu, diyet ve egzersiz müdahaleleri ve daha az ölçüde farmakolojik tedavi ile yönetilerek T2DM'nin önlenebileceği gösterilmektedir (14, 15).

GDM, gebelik esnasında spontane hipergliseminin geliştiği yaygın bir gebelik komplikasyonudur (16). IDF tahminlerine göre, GDM dünya çapında gebeliklerin yaklaşık %14'ünü etkiler ve bu da yıllık yaklaşık 18 milyon doğumu temsil eder (17). GDM genellikle doğumla birlikte sonlanırken, annede T2DM ve kardiyovasküler hastalık ve çocukta gelecekteki obezite, kardiyovasküler hastalık,

T2DM ve/veya GDM için artmış risk dâhil olmak üzere uzun süreli sağlık sonuçları olabilir. Ne yazık ki, yaşam tarzı müdahalesi (diyet ve egzersiz) ve bazen insülin tedavisi dışında GDM için şu anda yaygın olarak kabul edilen bir tedavi veya önleme stratejisi yoktur ve bu da genellikle mevcut olan insülin direncinden dolayı sadece sınırlı etkilidir (18).

3.1.2. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları

DM birtakım komplikasyonlarla ilişkili akut veya kronik dönemde ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Mortalite ile ilişkili akut metabolik komplikasyonlar arasında istisnai olarak hiperglisemiden kaynaklanan DKA ve hipogliseminin bir sonucu olarak koma yer alır (19). DKA, hiperglisemik hiperosmolar durum (HHD), laktik asidoz (LA) ve hipoglisemi DM'nin akut ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden komplikasyonlarıdır. DKA'ya dolaşımdaki çok düşük insülin seviyeleri ve buna eşlik eden glukagon, katekolaminler, kortizol ve büyüme hormonu gibi karşı düzenleyici hormon seviyelerindeki artış neden olur. Sıklıkla T1DM'li kişilerde görülür (20). Hem HHD hem de DKA'nın altında yatan mekanizma, karşı düzenleyici hormonların eşzamanlı yükselmesiyle birleşen dolaşımdaki insülinin etkisindeki azalmadır. HHD, glukozüri ile ilişkilidir ve su, sodyum, potasyum ve diğer elektrolitlerin kaybıyla birlikte ozmotik diüreze yol açar. HHD'de insülin seviyeleri, insüline duyarlı dokular tarafından glukoz kullanımı için yetersizdir ancak lipoliz ve ketogenezi önlemek için yeterlidir (21). LA, asidozlu (pH <7.3) ve ketoasidozsuz 5.0 mEq/L'nin üzerinde laktik asit yükselmesinden oluşur. Daha çok T2DM'li kişileri etkiler. Hipoglisemi, DM tedavisinin en sık görülen, yaşamı tehdit eden akut komplikasyonudur. Çoklu risk

faktörleri ve karmaşık patofizyoloji ile karakterizedir. Beyin, keton cisimlerini de kullanabilmesine rağmen, enerji için sürekli bir glukoz kaynağına bağlıdır. Küçük çocuklar ve ergenler hipoglisemi açısından daha yüksek risk altındadır ve sonuçların spektrumu hafif bilişsel bozukluktan koma, nöbet ve ani ölüme kadar uzanır (22).

DM, kronik dönemde hastaların morbidite ve mortalitesine neden olan vasküler komplikasyonlar geliştirme riskinin artmasıyla ilişkilidir. Kötü glisemik ve kan basıncı kontrolü sağlanamaması, makrovasküler ve mikrovasküler veya her ikisini birden etkileyen vasküler komplikasyonlara yol açar (19). Hem T1DM hem de T2DM’de, çeşitli genetik ve çevresel faktörler, klinik olarak hiperglisemi olarak kendini gösteren β hücre fonksiyonunun ilerleyici kaybına neden olabilir. Hiperglisemi meydana geldiğinde, tüm DM formları olan hastalar, ilerleme oranları farklı olsa da aynı kronik komplikasyonları geliştirme riski altındadır (23).

DM’li hastalarda DM olmayan hastalara kıyasla en az 10-20 kat mikrovasküler ve 2-4 kat makrovasküler bozuklukların göreceli riskinin, daha yüksek olduğu tahmin edilmiştir (24). Dolaşım sisteminin büyük damarlarını etkileyen makrovasküler komplikasyonlar, inme (serebrovasküler), koroner kalp hastalığı ve ülserasyon, kangren ve alt ekstremitte amputasyonlarına yol açabilen periferik damar hastalığı insidansının 2 ila 4 kat artmasına neden olabilir (25). Bu makrovasküler komplikasyonlar, lökositlerin arteriyel hasar bölgesine göçünü içeren hızlandırılmış ateroskleroz formlarıdır (26).

Kandaki yüksek glukoz (YG) seviyesi ile karakterize bir durum olan hiperglisemi, hem T1DM hem de T2DM’nin karakteristik bir özelliğidir. İnce ve kronik doğası nedeniyle, hiperglisemi DM’nin komplikasyonların gelişmesinde

anahtar bir rol oynar (27). DM'ye bağlı komplikasyonlar, kan damarlarında herhangi bir hasar olduğunda ortaya çıkan mikro damar hastalığı ve genellikle atardamar hasarına bağlı olarak ortaya çıkan makro damar hastalığı olmak üzere ikiye ayrılır. Bu tür DM'nin komplikasyonunun patogenezinin altında yatan mekanizmanın, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimiyle oluşan oksidatif stres olduğu bulunmuştur (28). Oksidatif stresle birlikte mitokondrial fonksiyonlarda bozulma meydana gelir (29).

Artan glukoz seviyeleri, öncelikle vasküler hücreler, Schwann hücreleri ve periferik ve merkezi sinir sistemlerinin nöronları dahil olmak üzere glukoz alımını düzenleme kapasitesi sınırlı olan hücreleri etkiler. Sonuç olarak, hiperglisemi, retinopati, nefropati, hipertansiyon ve nöropati gibi büyük ölçüde inatçı komplikasyonlara yol açar. Kronik hipergliseminin neden olduğu başlıca mikrovasküler komplikasyonların, diyabetik nefropati, nöropati, retinopati, ileri glikasyon son rnlerinin (AGE'ler) retimi, proinflamatuvar bir mikro ortamın yaratılması ve oksidatif stresin indüklenmesi gibi çeşitli mekanizmalar olduğu bilinmektedir. (30, 31). Hiperglisemiye bağlı doku hasarında lipid yapısında ikinci-aracı diail gliserol (DAG) sentezine bağlı protein kinaz c (PKC) aktivasyonu, heksozamin yolağının hızlanması, AGE oluşumu ve poliol yolağının hızlanması gibi moleküler mekanizmalar rol oynar.

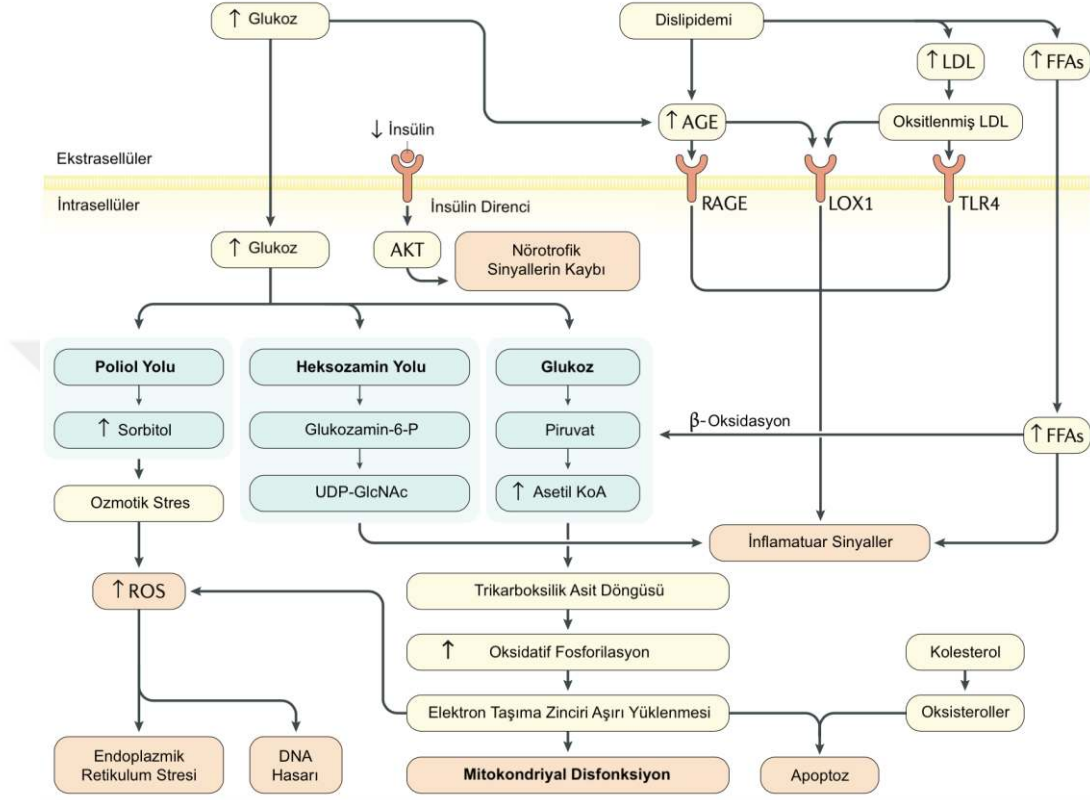
3.2. Diyabetik Nöropati

DN, DM'nin tüm uzun vadeli komplikasyonları arasında en yaygın olanıdır ve hastaların yaklaşık %60'ında bir tür sinir hasarı vardır (32, 33). DM sinir hücrelerinin kan perfüzyonunun bozulması sonucu sinir hücrelerinde işlevsellikte

azalmaya yol açıp, kalıcı sinir hasarlarıyla birlikte nöropatiye neden olabilir. DN'nin klinik belirtileri uyuşukluk, yanma ve karıncalanma hissi ve inatçı ağrıyı içerir. Karıncalanma ve duyu kaybının nedeni hasarlı sinir uçlarıdır ve refleksler genellikle önce ayaklarda görülür ve daha sonra diğer bölgeleri etkilemek için yukarı çıkar (34).

Artan glukoz seviyeleri, poliol ve heksozamin yolları yoluyla glukoz metabolizmasına yol açar, bu da büyük ölçüde devam eden sinir sistemi işlev bozukluğuna neden olan mitokondriyal hasar nedeniyle sırasıyla artan ROS ve enfeksiyon ile sonuçlanır. Artan glukoz seviyeleri, AGE'leri üretmek için çok sayıda yapısal ve fonksiyonel proteinin glikasyonuna yol açar. AGE'ler protein fonksiyonunun değişmesine veya kaybolmasına neden olur ve gen ekspresyonunu ve hücre içi sinyali değiştirmek ve proinflamatuvar moleküllerin ve serbest radikallerin salınımını teşvik etmek için AGE'ye özgü reseptör (RAGE) ile etkileşime girer (35). Paralel olarak, hiperlipidemiye yanıt olarak β oksidasyon ile katabolize edilen aşırı serbest yağ asitleri, ROS üretimi ve ardından sitokin ve kemokin üretimi ile makrofaj aktivasyonu yoluyla sistemik ve lokal inflamasyon yoluyla periferik sinir sistemine, özellikle Schwann hücrelerine zarar verebilir (36, 37). DN'de diğer lipidler periferik sinir sistemini olumsuz etkiler. Nöronlarda kolesterolün oksisterollere oksidasyonu doku hasarına aracılık ederken, plazma lipoproteinleri, özellikle düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL'ler) ROS tarafından oksitlenir ve oksitlenmiş LDL reseptörü 1 (LOX1), Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ve RAGE'yi bağlar (38–41). Oksitlenmiş LDL'lerin bu reseptörlere bağlanması, kaspaz 3 aktivasyonu ve nükleer DNA bozunması dahil olmak üzere, devam eden

ve ilerleyici sinir hasarı ile ek inflamasyon ve ROS birikimine aracılık eden bir dizi sinyalleşme kaskadı aktive eder (39, 41–43)(Şekil 1).



Şekil 1. Diyabetik Nöropatinin Patogenezi (Feldman ve ark., 2019'dan değiştirilerek alınmıştır)(44)

DM'li hastaların yaklaşık üçte ikisi klinik veya subklinik DN komplikasyonuna sahiptir (45). Genellikle kronik hipergliseminin bir sonucu olarak oluşan bir aşağı akış metabolik kaskadı, DM'li hastalarda periferik sinir disfonksiyonuna yol açar. Kaskad, enzimlerin mevcudiyetinde kullanılmayan glukozu metabolize eden poliol yolunun artan akışı yoluyla oluşturulabilir ve bu nedenle enzimatik olarak yönlendirilen bir yoldur. Sitokinlerin aşırı salınımı, protein kinaz C'nin aktivasyonu ve hipergliseminin bir sonucu olarak ortaya çıkan

aşırı oksidatif stres de periferik sinir disfonksiyonu gelişiminin arkasındaki anahtar özelliklerdir (46).

3.2.2. Diyabetik Nöropati ve Duyusal Sinir Hücreleri

DM'nin sonucu olan hiperglisemi, DKG nöronlarında oksidatif stres, pH dengesizliği gibi durumlara sebep olmaktadır (47–49). Nosisepsiyonla ilgili *in vitro* hücresel modellerde, DKG hücreleri nosisepsiyonun hücresel mekanizmasının aydınlatılması çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (50, 51). Normal koşullarda DKG nöronları spontane aksiyon potansiyeli oluşturmazlar. Yapılan bazı patch kenetleme çalışmaları, periferik sinir hasarını takiben DKG hücrelerinde uyarılabilirlikte artış olduğunu ve anormal spontane aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (52–55). Primer nöronların 45mM düzeyinde YG'ye maruz kalması ROS'nin oluşumunu hızlandırarak önce mitokondrial membran hiperpolarizasyonuna sonra mitokondrial membran depolarizasyonuna, mitokondrial disfonksiyona, kaspaz 3 ve 9 aktivasyonu ile nöronal apoptoza sebep olur (56).

Schwann hücrelerinde, DKG nöronları ve aksonlarında hem glukoz hem de yağ asitleri, glikoliz ve trikarboksilik asit döngüsü (glukoz) ve β oksidasyon (yağ asitleri) yoluyla NADH ve FADH₂ üretir. Uzun zincirli yağ asitleri, β oksidasyona uğramak üzere Schwann hücrelerine taşındığında, her β oksidasyon döngüsü, NADH ve FADH₂ oluşumu için trikarboksilik asit döngüsüne taşınan bir asetil KoA molekülü oluşturur. Bununla birlikte, DM'de olduğu gibi substrat aşırı yüklenmesi sırasında, taşıma sistemi doymuş hale gelir ve asetil KoA molekülleri açilkarnitinlere dönüştürülür. Açilkarnitinlerin birikmesi hem Schwann hücreleri

hem de DKG nöronları için toksiktir ve DN’de devam eden sinir sistemi hasarına katkıda bulunur. Birikmiş açılakarnitinler, Schwann hücrelerinden salınır ve Schwann hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon ve uyumsuz bir entegre stres tepkisi içerdığı öne sürülen aksonal dejenerasyonu indükleyebilir (57). NADH ve FADH₂, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretmek için mitokondride kompleks I-IV yoluyla taşınır. Oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünü, süperoksit dismutaz, glutatyon ve katalaz gibi doğuştan gelen hücresel antioksidanlar tarafından kolayca nötralize edilen düşük seviyelerde ROS üretimidir (58–63). Bununla birlikte, DM’de olduğu gibi aşırı substrat yükü sırasında, oksidatif fosforilasyon başarısız olur, bu da ATP üretiminin kaybına ve artan ROS seviyelerine yol açar, bu da daha sonra mitokondriyal yetmezliğe ve Schwann hücrelerinin ve DKG nöronlarının metabolik ve oksidatif hasarına yol açar (64–66). İşlevsiz mitokondri, yetersiz enerji üretir ve aksonları normal olarak aşağı taşıma yeteneğini kaybederek aksonal bozulmayı ve yaralanmayı daha da teşvik eder (67).

3.2.1. Deneysel Diyabetik Nöropati Modelleri

DM’nin tedavisi ve yönetimi günümüzde en çok araştırılan ilgi alanlarından biridir. Deneysel modeller, metabolik bozukluğun altında yatan farmakoloji ve mekanizmaların incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. DM’nin patogenezi ve retinopati, nefropati, kardiyomiyopati ve nöropati gibi komplikasyonlarını açıklamak için, bu hastalığın prevalansı ve komplikasyonu dünya çapında arttığından diyabetik modeller kilit bir rol oynamaktadır.

Hayvan modelleri DM patogenezi anlamada etkili bir rol oynar ve genel olarak deneysel DM, hayvanlarda başlatılır (68, 69). Streptozotosin (STZ) ile

indüklenen diyabetik sıçanları (70, 71), STZ ile indüklenen diyabetik fareleri (72, 73), Çin hamsterlerini ve Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) sıçanlarını (74, 75) içeren çeşitli DN hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu modellerin her biri, insanlara kısmen patolojik benzerlikleri, genetik manipülasyona ve/veya transgenik hayvanların üretilmesine yatkınlıkları nedeniyle belirli soruları ele almak için uygun şekilde kullanılmıştır (76, 77). DN'nin fizyolojik ve hücrel ayrıntılarını *in vivo* çalışmalar sağlarken, mevcut sistem karmaşıklığı, glukoz stresi altında hücre ölümüne veya hayatta kalmasına karar verebilecek kısa süreli moleküler olayların ayrıntılarını gizlemektedir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için daha basit *in vitro* sistemlerin kullanılması zorunludur (78–80). Güçlü etik gerekçelere rağmen, bu tür çok az *in vitro* model geliştirilmiştir. En yaygın olarak kullanılan *in vitro* modeller, DKG nöronlarının birincil kültürü ve nöroblastom hücre dizisidir (52, 80–85).

3.2.1.1. Diyabetik Nöropatinin *In Vivo* Modeli

DM çalışmalarında kullanılan deney hayvanı, genetik olarak diyabetik hayvanlar, çeşitli modeller ve deneysel DM'i indükleme yöntemlerine dayanan diğer modeller gibi üç tipte kategorize edilebilir (86). Deney hayvanlarında spontane yöntemlerle veya kimyasal ajanlar kullanılarak DM geliştirilebilir (87). Hayvan modelleri iki ana mekanizma ile geliştirilebilir, hastalık indüksiyonu (örneğin, spesifik ilaçlar kullanılarak) veya genetik manipülasyon. Her ikisi de hastalıkla ilgili belirli mekanizmaların analizini mümkün kıldıkları, hastalığın patogenezi, ilerlemesini anlamak ve tahminde bulunmak için önemlidir. T1DM ve T2DM, vücut sistemlerinin karmaşık entegrasyonunu yansıtan metabolik

bozukluklar olduğundan, farklı *in vivo* deneylerde kullanılacak doğru hayvan modelini seçerken dikkatli bir şekilde düşünülmesi gerekir (88).

Deney hayvanı olarak fareler, insan biyolojisini anlamamıza büyük katkılarda bulunmuştur (89). Fare modelleri, iki tür arasındaki genetik homoloji nedeniyle insan hastalıklarını incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (90). Deney hayvanlarında DM oluşturmak için bazı kimyasallar kullanılmaktadır. Bu tür kimyasallara diyabetojenik ajanlar denir. Streptozotosin ve alloksan, parenteral olarak uygulandığında DM'yi indükleyen yaygın olarak kullanılan kimyasal ajanlardır (91). Hayvan türüne ve uygulama yoluna bağlı olarak, iki ilacın dozu değişebilir (92). Alloksan (5,5-dihidroksil pirimi-din-2,4,6-trione) organik bir bileşiktir ve önerilen iki olası mekanizma ile kimyasal olarak DM'yi indüklemek için kullanılan sitotoksik bir glukoz analogudur. Alloksan, β hücresi pankreatik glukoz sensörü olan geniş glukokinaz kısıtlaması ile glukozun tetiklediği insülin emisyonunu spesifik olarak inhibe ettiği (93) ve ayrıca alloksanın süperoksit radikalleri üreten bir redoks döngüsü yaratarak, ROS oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (94). Alloksan, dialürik aşındırıcıya indirgenir ve daha sonra tekrar alloksana okside edilerek, hidrojen peroksit oluşturmak üzere dismutasyon (süperoksit dismutaz tarafından) yaşayan süperoksit radikalleri meydana gelir; yan tepkiler de benzer şekilde hidroksil radikalleri oluşturabilir. Bu oldukça reaktif oksijen türleri, apoptoza yol açan β hücre DNA fragmentasyonuna neden olabilir (93, 95, 96). Alloksan ayrıca karaciğer tarafından alınırken, karaciğerin β hücrelerinden daha üretken ROS koruma araçlarına sahip olduğu (95) ve ayrıca ksenobiyotik biyotransformasyon ve eliminasyon için çeşitli mekanizmalara sahip oldukları gerekçesiyle alloksan tarafından yönlendirilen hepatotoksisite önemsiz

veya geçersizdir. Alloksan ayrıca bazik oksidasyonu iletir; SH sınıfları, özellikle glutatyon (GSH) bileşikleri, proteinler ve benzer şekilde hücre içi kalsiyum homeostazını düzensizleştirir ve suprafizyolojik kalsiyumun merkezileşmesine ve sonuç olarak hücre hasarına neden olur (95, 96). Alloksan dozajları, seçilen suş ve organizasyonun seyrine bağlı olarak 50 ila 200 mg/kg (farelerde) ve 40 ila 200 mg/kg (kemirgenlerde) arasında değişir (96).

Kimyasal olarak N-(metilnitrosokarbamoil)- α -d-glukozamin olarak bilinen STZ, *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen ve pankreatik β hücreleri tarafından seçici olarak alınarak yıkımına neden olan antibakteriyel özelliklere sahip doğal olarak oluşan bir bileşiktir (97). Aynı zamanda alloksan gibi sitotoksik bir glukoz analogudur (93). STZ, deney hayvanlarında DM'nin indüklenmesi için en yaygın olarak kullanılan kimyasaldır (98). GLUT-2 taşıyıcı alımı yoluyla pankreas β hücrelerinde biriken, toksik bir glukoz ve bir N-asetil glukozamin analoguna sahip bir nitrozüre bileşiğidir (99, 100). STZ, doza bağlı olarak iki yolla sıçanlarda, farelerde ve tavşan ve kobay gibi diğer hayvanlarda DM'yi indükler (101). Yüksek dozda, STZ sitotoksik nitrozüre bileşiklerinin normal bir fonksiyonu olan alkalileştirici özelliği ile pankreas β hücrelerini hedefler (102). Genel olarak, nitrozüre bileşikleri doğaları gereği lipofiliktir ve bu nedenle hücreler tarafından kolayca alınır, ancak aksine, bir nitrozüre bileşiği olan STZ, heksoz ikamesi nedeniyle hidrofiliktir ve hücreler tarafından kolayca alınmaz. Bu nedenle STZ, GLUT-2 adı verilen bir Glukoz taşıyıcı proteini tarafından β hücrelerine taşınır çünkü STZ'nin kimyasal yapısı glukoz parçasına benzer (103). Pankreasın β hücresi genellikle STZ'nin seçici özelliklerine sahiptir ve bu nedenle kimyasal bileşik pankreasın α hücresini ve ekstra pankreas hücrelerini sağlam bir durumda tutar ve

onu etkilemez (93). STZ'nin β hücresi dahil pankreas hücrelerinin hiçbirini etkilemediği durum insanlarda da aynıdır (97). Genellikle çoklu maruziyet olarak verilen düşük dozlarda, STZ, glutamik asit dekarboksilaz enziminin salınımına bağlı olarak immün ve inflamatuvar yanıtı indükler (104). Bu immün ve inflamatuvar yanıt β hücresinin yok edilmesine yardımcı olur ve özellikle pankreasın lenfositleri ile inflamatuvar infiltratlarla ilişkili hiperglisemik durumun gelişmesine yol açar (104). Yüksek dozda STZ uygulanmasında, STZ'nin soliter bir kısmı, intravenöz veya intraperitoneal (i.p.) yollarla farelere (100–200 mg/kg) veya çok az insülin üretimiyle veya hiç insülin üretimi olmadan büyük pankreatik β hücre yıkımı üreten sıçanlara (35–65 mg/kg) yönlendirilir (105). Çeşitli düşük porsiyonlu STZ tekniği, insülini ilerletmek için küçük dozların (20 ila 40 mg/kg/gün) bazı tanımlanmamış zaman çerçevesine yönlendirilmesi gerektiğini öne sürer (96, 106).

3.2.1.1. Diyabetik Nöropatinin *In Vitro* Modeli

In vitro modeller, DN'nin patogeneğinde çeşitli moleküllerin karmaşık etkileşimini incelemek için oldukça kullanışlıdır. DKG nöronları, YG konsantrasyonları içeren ortamda kültürlendiklerinde apoptoza uğradıkları gösterilmiştir (52). Ayrıca bu *in vitro* model, mekanik sorulara cevap bulunmasına da olanak sağlar. Kültüre edilmiş DKG nöronlarını patolojik ve nöroprotektif mekanizmaların incelenmesi olarak sağlamakta, canlıdaki nöronların bu koşullarda meydana gelen cevap değişikliğini çok iyi bir şekilde yansıtmaktadır (54). İnflamatuvar faktörler DKG nöronlarındaki hasarda özellikle ağrı verici nöropatide önemli rol oynar. *In vitro* hiperglisemik deneyler için kontrolsüz DM hastalarında yaygın olan glukoz seviyelerine uyacak şekilde 45 mM glukoz içeren YG ortamı

kullanılır (56, 83, 107). DKG nöronlarının 24 saat YG'ye (45 mmol/L) maruz kalması DN'nin *in vitro* modeli olarak kabul edilmektedir (80, 108–110).

3.3. Humanin

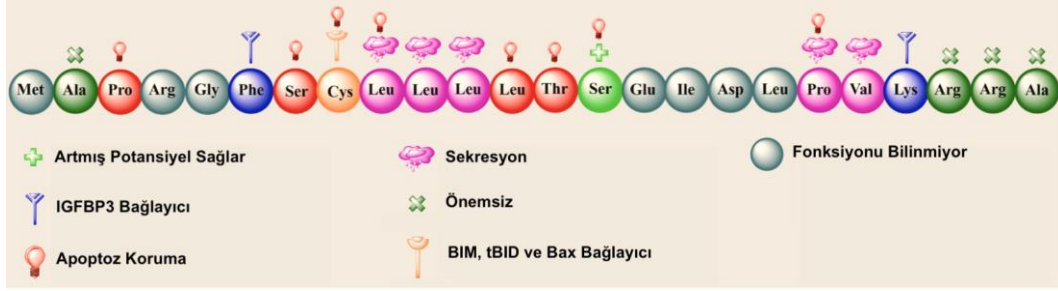
24 amino asitli bir peptit olan HN, ilk olarak 2001 yılında Hashimoto ve ark. tarafından Alzheimer hastalığı olan bir hastanın beyнинin sağlıklı bir kısmından alınan dokularda cDNA kütüphanesi kullanılarak beynin etkilenmemiş bölgelerinde hayatta kalma faktörlerinin araştırılması sırasında keşfedilmiştir. Keşfedilen ilk mitokondri kaynaklı peptit olan HN, Alzheimer hastalığı olan hastaların "insanlığını" geri kazanma potansiyeline dayanarak ismini almıştır (111–113). HN *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla, hücre sağkalımı, metabolizma, stresörlere yanıt ve inflamasyon üzerinde kanıtlanmış antiapoptotik ve nöroprotektif etkileri olan kısa bir polipeptittir. Keşfedildiğinden beri testis, kolon, hipotalamus, kalp, karaciğer, iskelet kası, böbrek ve damar duvarı gibi çok çeşitli dokularda tanımlanmıştır (114–118). HN seviyeleri plazmada, beyin omurilik sıvısında (BOS) ve seminal sıvıda ölçülebilir olup, dolaşımdaki HN seviyesine hangi doku veya dokuların katkıda bulunduğu hala belirsizdir (116, 119–121). Yapılan çalışmalar, HN'nin dolaşım seviyesinin yaşa göre değiştiğini ve birçok patolojik durum için kritik bir biyobelirteç görevi görebileceğini ileri sürmektedir (122).

Rattin adlı HN'ye homolog salgılanmış bir peptidi kodlayan bir sıçan cDNA'sı da tanımlanmıştır, bu da diğer türlerde HN'nin varlığını gösterir (123). HN için açık okuma çerçevesi ile aynı veya benzer cDNA'lar bitkilerde, nematodlarda, sıçanlarda, farelerde ve diğer türlerde bulunur (124). HN'nin mitokondri ile nükleer genom arasında hücresel homeostazı ve bütünlüğü koruyan hayati bir iletişim süreci

olan “geriye dönük sinyalleşmenin” bir parçası olduğu varsayılmaktadır. Ca^{2+} , ROS, nitrik oksit (NO), karbon monoksit (CO) ve sitokrom c dahil çok az geriye dönük sinyal molekülü ve yolu tanımlanmıştır ve HN, diğer mitokondriyal türevli peptitlerin “habercisi” olarak bildirilmiştir (125).

3.3.1. Humaninin Yapısı

HN, 75 bp açık okuma çerçevesi tarafından kodlanan her birinin ayrı işlevi olan 24 veya 21 farklı amino asitten “Met-Ala-Pro-Arg-Gly-Phe-Ser-Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Thr-Ser-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala” oluşur (Şekil 2) (126). HN, negatif yüklü C-terminali (Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala), pozitif yüklü N-terminali (Met-Ala-Pro-Arg) ve merkezi hidrofobik bölge (Gly-Phe-Ser-Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Thr-Ser-Glu-Ile-Asp-Leu) dahil olmak üzere üç bölge taşır (127). HN, hücrel strese yanıt olarak üretilen mitokondriyal türevli bir peptittir (128). İnsanda HN, mitokondri genomundaki 16S ribozomal RNA geni (MT-RNR2) içinde bulunan HN olarak küçük gen peptidinden üretilir (129). HN peptidi, mRNA'sı mitokondri içinde çevrildiğinde 21 amino asit ve peptidi sitoplazmaya hareket ettiğinde 24 amino asit içerir. Bununla birlikte, HN'deki amino asitlerin sayısı translasyon bölgesine bağlıdır (128). Ancak, çevirinin tam yeri henüz tam olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 2. Humanin peptidinin insandaki her amino asidin fonksiyonu ile temsil edilen yapısı (Xiao ve ark., 2016'den değiştirilerek alınmıştır) (126)

HN-polipeptit zincirinin sekiz pozisyonundaki Cys'in antiapoptotik etkide kritik bir amino asit olduğu, 19. konumda Pro'nun HN salgılanmasını etkili bir şekilde kolaylaştırabileceğini ve 3., 13. ve 14. konumlarda sırasıyla Pro-Thr-Ser'in reseptör bağlanmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir (122, 130). HN'nin ikincil yapısının da spesifik amino asit dizilerine bağlı olduğunu ve 7. konumdaki Ser ve 9. konumdaki Leu, nöroprotektif fonksiyon sırasında HN-polipeptit zincirinin dimerinde veya oligomerinde kendi kendine kümeleşmeyi başarılı bir şekilde önlediği bildirilmiştir (122). HN'nin 3 ila 19 arasındaki Pro kalıntılarının Alataama analizi, Cys8, Leu12, Pro3, Leu9, Pro19, Ser14 ve Thr13'ün HN'nin nöroprotektif etkileri için çok önemli kalıntılar olarak listelendiği gözlemlenmiştir. Bulgular ayrıca bu kalıntıların Ala (polar olmayan amino asit) ile ikamesinin HN konfigürasyonunu etkilemediğini, bununla birlikte, Ser14'ün Gly ile ikame edilmesi, HN'nin yapısal esnekliğinden kaynaklanabilecek olan HN'nin nöroprotektif aktivitesini önemli ölçüde arttırdığını bildirmiştir (113, 131).

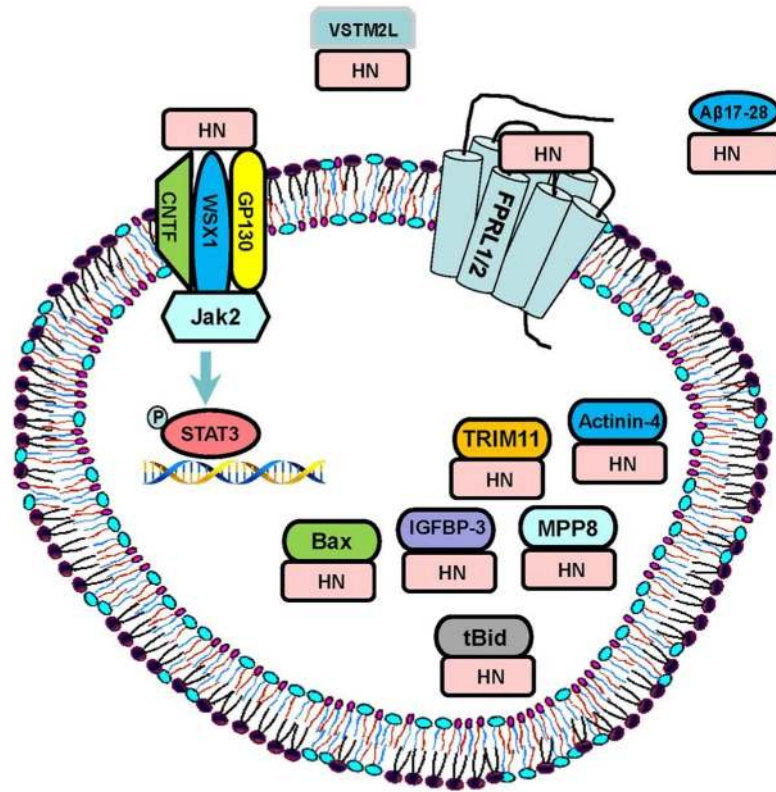
HN'nin kendisi birçok dokuda hücre ölümünü korumada önemli görünmektedir (129). HN, hücrel membranlara bağlanan hücrelerden salgılanır ve ayrıca plazmada bulunur (125). HN mekanizmasını ya membran trimerik

reseptörleri ile ya da insülin benzeri büyüme faktörleriyle (IGF)/formil peptit reseptörü 1 (FPRL1)/siliyer nörotrofik faktör reseptör α (CNTFR α)/sitokin reseptör WSX-1/heterotrimerik transmembran gp130 dahil olmak üzere hücre içi reseptörleri ile çeşitli hastalıklarda antiapoptotik aktiviteleri indükleyerek, oksidatif stresi, hücre çoğalmasını inhibe ederek ve insülin duyarlılığını arttırarak hücre hayatta kalabilme kabiliyetini düzenlemek için kullanır (127).

3.3.2. Humaninin Etki Mekanizması

HN hem hücre içi moleküllere hem de varsayılan hücre zarı reseptörlerine bağlanarak çeşitli işlevlerini gerçekleştirir (Şekil 3) (132). HN, sitokin reseptörü WSX-1, heterotrimerik transmembran gp130 ve CNTFR- α 'dan oluşan trimerik reseptörlere bağlanır. HN, formil peptit reseptörü 2'nin (FPRL-2) bir agonist peptididir (133–136). HN ayrıca, WSX-1/gp130/CNTFR'ye dahil olan ve WSX-1 ve gp130'un hücre içi alanlarında heterodimerizasyonu indükleyen ve sonuçta Janus Kinaz 2 (JAK2), Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazlar (MAPK), c-Jun N-Terminal Kinaz (JNK) ve Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 3 Aktivatörü (STAT3) yolları aracılığıyla HN sinyallerine aracılık eden reseptörlerle etkileşime girer. Dimerize STAT3, sitoprotektif etki uygulamak için gen ekspresyonunu düzenlediği çekirdeğe hareket eder. HN'nin sitoprotektif işlevini, B-Hücreli Lenfoma 2 (BCL-2) protein ailesinin hücre içi lokalizasyonuna aracılık ederek intrinsik veya mitokondriyal apoptotik yolu düzenleyerek gösterdiği bildirilmiştir. HN, BCL-2 ekspresyonunu yukarı regüle eder ve apoptozu inhibe etmek için BCL-2 ile ilişkili X apoptoz düzenleyicisi (BAX) ekspresyonunu baskılar (122, 136).

Ayrıca, HN, BID ve BAX gibi diğer BCL-2 protein ailesi üyeleri ile etkileşime girebilir ve apoptozom üretimini baskılamak ve mitokondride kaspaz-3 ekspresyonunu teşvik etmek için translokasyonlarını düzenler (137).



Şekil 3. Humanin Sinyal Yolları (Gong ve ark., 2014) (132)

HN mitokondriyal genomdan tanımlanan yeni bir sinyal molekülü sınıfının ilk üyesidir. Başlangıçta, HN nöroprotektif bir molekül olarak kabul edildi, ancak daha sonra HN'nin büyüme hormonu, kanser ve beyin ile ilgili hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarda apoptoz dahil olmak üzere birçok yolu düzenlediği fark edilmiştir (126). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada, kesin olarak antiapoptotik aktiviteler gösteren mitokondride HN translasyonunun gerçekleştirildiği ortaya

koyulmuştur (138). HN'nin nöroprotektif işlevi için 3 ila 19 arasındaki kalıntıların temel alan veya çekirdek alan olduğu ve bu bölgenin doğrudan Amiloid β proteini ($A\beta$) ile bağlandığını ve kendi kendine kümeleşmeyi önlediğini gözlemlenmiştir (139). $A\beta$ (39-43 amino asit) oligomerinin toplanması, Alzheimer hastalığı gibi nöronla ilişkili hastalıkların patojenik sürecinde, nöronal hücre ölümünü ve ardından hafıza kaybını destekleyen çok önemli bir aşamadır (140). HN ve Gly14-HN (HNG) gibi türevleri, uzaysal bellek korumasında önemli ölçüde nöroprotektif bir etki göstermiş ve tirozin kinazları aktive ederek STAT3 yolunu $A\beta$ bozulmasından korumuştur (141).

Fizyolojik koşullar altında HN; böbrek, iskelet kasları, beyin, kalp ve karaciğer dahil olmak üzere birçok organdaki dokular tarafından üretilir (142–145). HN hücreler tarafından endojen üretiminden sonra kan dolaşımına salgılanır ve hedef hücrelere taşınır (144). Endojen HN vücuttaki birkaç doku tarafından doğal olarak üretildiğinden, bu HN'nin çeşitli hücrelerde diğer sentetik ilaçlara kıyasla daha az yan etkiyle hareket etmesine izin verebilir. HN kardiyak hasar, nörodejenerasyon ve DM dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlarda hücreSEL apoptoza karşı koruyucu etkiler göstermektedir (111, 113, 146, 147). Apoptoz, nöronlar, erkek germ hücreleri ve lenfositler gibi birçok hücre dizisinde ölümün en önemli nedenidir (148,149).

Apoptozun içsel veya mitokondriyal yolu, esas olarak BCL-2 protein ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir (150). Bir BCL-2 protein ailesi hem proapoptotik hem de antiapoptotik üyeler içerir. BCL-2 ailesinin üyeleri genellikle apoptoza katılımlarına ve farklı BCL-2 homoloji (BH) alanlarının varlığına göre düzenlenir. BH, BCL-2 aile üyelerinin etkileşimlerinin antiapoptotik ve

proapoptotik işlevleri kolaylaştırmasını sağlar (151). Genel olarak, BCL-2 protein ailesi, proapoptotik (BID, BIM, BAD ve BMF), antiapoptotik (BCL-XL, BCL-W, BCL-B, MCL-1 ve MCL-1L) ve gözenek oluşturan infaz proteinler (BAX, BAK ve BOK) dahil olmak üzere üç ana alt ailede sınıflandırılır. Sadece proapoptotik ve antiapoptotik alt gruplar genellikle apoptoz düzenlenmesinde yer alır ve infazcı proteinler sadece gözenek oluşumunun aktivasyonuna katılır (151, 152). Dikkatli düzenleme, bir hücrenin yaşamla ölüm arasındaki kaderini belirler (153, 154). BCL-2 patolojileri, apoptozun yanlış düzenlendiği hastalık durumları için büyük önem taşımaktadır (153, 155). Hücre ölümünün içsel apoptotik yolunu indüklemek için, proapoptotik BCL-2 homoloji alanı (BHD) proteinleri, apoptoz ile sonuçlanan mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP) tetiklemek için yalnızca BH3 alanı (BOD) proteinleri ile etkileşime girer (153, 156). HN, BCL-2 protein ailesinin ekspresyonunu ve hücre içi translokasyonunu modüle ederek içsel bir mitokondriyal mekanizma yoluyla antiapoptotik etki uygular. HN analogları, BCL-2 ekspresyonunu yukarı regüle etmek için proapoptotik protein, yani BAX ile etkileşime girebilir (137, 157). HN, sitoplazmada BAX ve tBID'ye etkili bir şekilde bağlanabilir ve proapoptotik BCL-2 proteinleri tarafından kolaylaştırılan gözenek oluşumunu engelleyen mitokondriyal membran boyunca translokasyonu önleyebilir. HN bu proteinleri zardan dışarı çıkaramasa da zara bağlı BAX veya tBID ile HN etkileşimi, sitozolik BAX'ın ek alımını bozar. BAX, içsel apoptoz yolunu başlatmak için kritik bir faktördür. Bir çalışma, HN'nin apoptozu önlemek için mitokondrinin dış zarında BAX'ın yer değiştirmesini bloke ettiğini ortaya koydu, ancak moleküler mekanizma hala bilinmiyor (158). Son zamanlarda, bir *in vitro* çalışma, BAX ve HN'nin ikincil ve üçüncül yapısal yeniden düzenlemelere

uğradığını ve lifler oluşturduğunu göstermiştir. Bir çalışma ayrıca, fibrilasyon sürecinin, BAX'ın MOMP'ı başlatmasını ve hücreleri apoptoza maruz bırakmasını önleyen HN'nin antiapoptotik özelliklerindeki değişikliklere uğradığını ortaya koymuştur (159). HN ayrıca, sitokrom c ve diğer kaspaz aktive edici faktörlerin mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği (mPTP) tarafından düzenlenen sitoplazmaya salınmasını destekleyen tBID tarafından indüklenen bir membranda BAX oligomerizasyonunu önler (158, 160, 161). Sitokrom c ve diğer kaspaz faktörlerinin salınımı, sitoplazmada “apoptozom” olarak adlandırılan bir kompleks oluşturur ve kaspaz 9 gibi yeni bir kaspaz aktive eder. Bu kaspaz 9, apoptoza bağlı efektör kaspazları daha da aktive eder (162). İntrinsik apoptotik yola benzer şekilde, HN ayrıca hücre dışı reseptörler (gp130, WSX-1, CNTFR ve FPLR-1) yoluyla bir antiapoptotik etki gösterebilir ve bu daha sonra BCL-2 ailesinin proteinlerinin ekspresyonunu modüle eder. HN sitoprotektif etkisini hücre yüzeyindeki FPRL1 ve trimerik kompleks reseptörü gibi bağlayıcı reseptörler aracılığıyla hücre dışı boşluktan gösterir. HN, ERK1/2 sinyal yolu boyunca aşağı akış sinyalizasyon kaskadını aktive eden ve daha sonra hücre sağkalımını iyileştiren bir antiapoptotik etkiye yol açan FPRL1 ile bağlanır (132). Bir trimerik reseptör, CNTFR- α , WSX-1 ve glikoprotein 130 kDa (gp130) alt birimleri (122, 144, 163, 164) için reseptör dahil olmak üzere farklı alt birimlerden oluşur. Reseptörlerin trimerizasyonu, daha sonra STAT aktivatörlerini aktive eden JAK1 ve JAK2 aktivasyonunu indükler. Dimerize STAT'ler, hücrenin hayatta kalması sırasında transkripsiyonun düzenlenmesine yardımcı oldukları çekirdeğe yer değiştirir (137).

3.3.2. Humanin ve Diabetes Mellitus

HN, DM'de β hücresi apoptozunda koruyucu bir rolü temsil eden, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda glukoz toleransını iyileştiren yeni bir sitoprotektif hormon olarak kabul edilir (143, 165, 166). Pankreas β hücreleri disfonksiyonu, DM patofizyolojisinde kilit rol oynayan en önemli faktörlerden biridir. YG seviyesi hücre apoptozunu ve insülin sekresyonu bozukluklarını indükler (167). β hücrelerinin apoptozu, T1DM'nin patogenezi ve tedavisi için hayati önem taşıyan birincil hücre ölümü tipidir (168). Kwon ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, sistemik HN uygulamasının, obez olmayan diyabetik farelerde β hücre apoptozunu ve β hücre iltihabını inhibe ettiğini ve DM'nin patolojik ilerlemesini geciktirdiği gösterilmiştir (143). Bir başka çalışmada, HN'nin glukoz toleransını etkin bir şekilde kontrol ettiğini, obez olmayan diyabetik farelerde DM'nin başlamasını 20 hafta boyunca geciktirdiğini ve sitokin tarafından indüklenen *in vitro* β hücrelerinde apoptozu inhibe ettiğini gözlemlenmiştir (168). HN'nin, monosit THP-1 hücrelerinin insan umbilikal endotel hücrelerine (HUVEC'ler) yüksek glukoz kaynaklı etkilenmesini etkileyici bir şekilde önleyerek hiperglisemiye engellediğini ve ayrıca hiperglisemi ile ilişkili endotel disfonksiyonunu tedavi etmek için yüksek glukoz kaynaklı interlökin-1 β (IL-1 β) ve tümör nekroz faktörü-a (TNF-a) salgısını başarıyla bloke ettiği bildirilmiştir (169). Muzumdar ve ark. HN'nin intraserebroventriküler uygulamasının, karaciğer dahil olmak üzere farklı vücut organlarında insülin duyarlılığını önemli ölçüde desteklediğini ve bunun da yağ asidi metabolizmasını ve Akt sinyal yolunu indükleyerek hepatik glukoz üretiminin azalmasına neden olduğunu bildirmiştir (146). Etki mekanizmasının değerlendirilmesi, HN'nin insülin duyarlılaştırıcı etkisi için hipotalamik STAT

aktivasyonunun gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Hipotalamusta STAT sinyalizasyonu ve aktivasyonunun DM ve DM'nin komplikasyonlarının tedavisinde merkezi rol oynadığı iyi bilinmektedir (128, 146, 168).

3.4. Tez Çalışmasının Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, “mitokondri kaynaklı bir peptit olan ve apoptoz, hücre sağkalımı, oksidatif stres gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynayan HN'nin, DM kaynaklı hiperglisemi sonucu ortaya çıkan oksidatif stres ve hücre ölümünün sebep olduğu DN'nin *in vivo* modelinde serum kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyeleri ile DN'nin *in vitro* modelinde hücre canlılığı üzerine etkisi nelerdir ve hangi yolak üzerinden gerçekleştirmektedir?” araştırma sorusuna yanıt aramaktır.

Bu tez çalışmasının hipotezi ise antiapoptotik ve nöroprotektif etkileri olan HN'nin STZ ile DM indüklenerek oluşturulan DN'nin *in vivo* modelinde apoptozis ile ilişkili olan artmış serum kaspaz 3 ve serum kaspaz 9 seviyelerini düşüreceği, DN'nin *in vitro* modelinde ise DKG hücrelerinde hücre canlılığını koruyacağı ve bunu JAK2/STAT3 yolağı aracılığı ile gerçekleştireceği yönündedir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

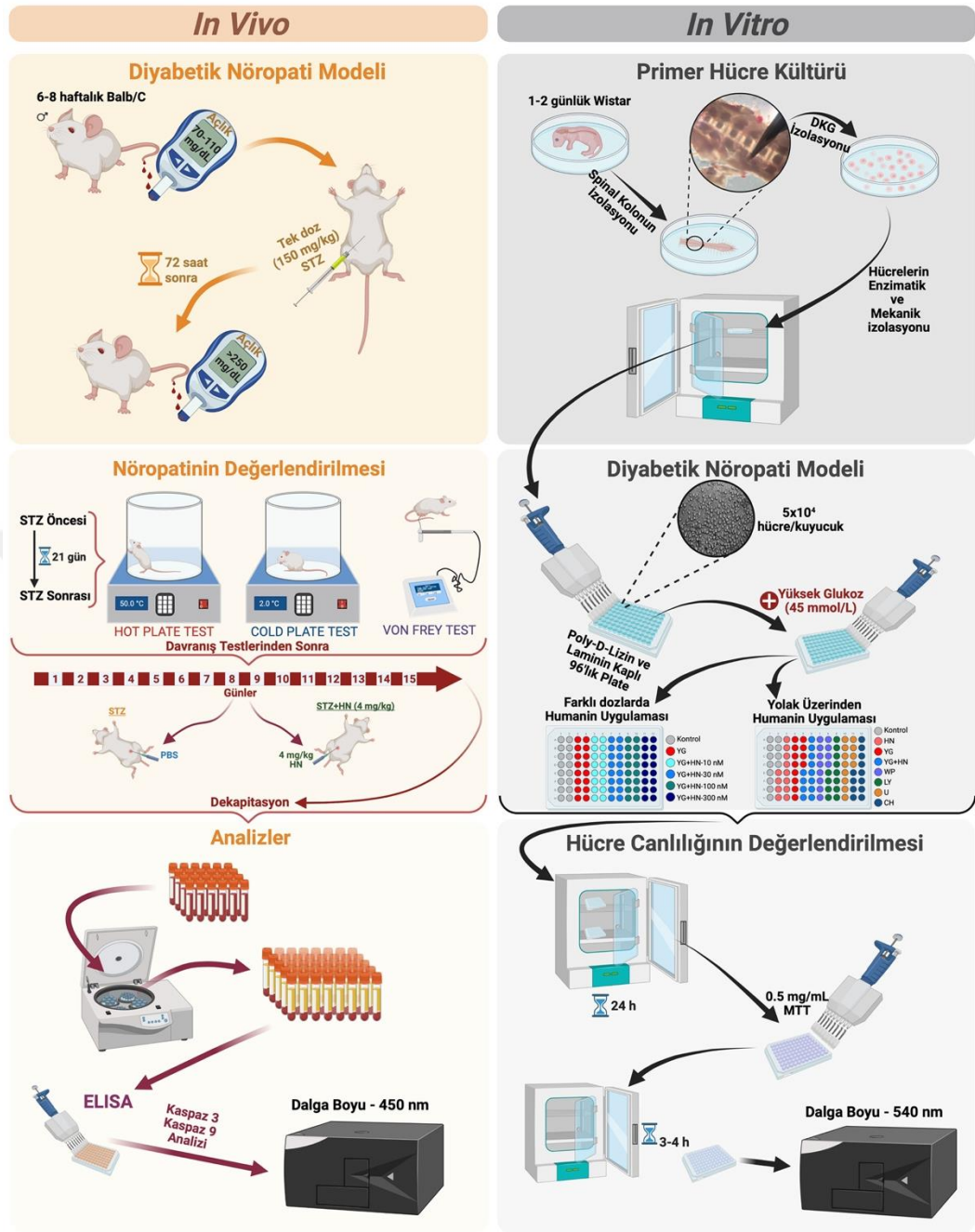
Çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 20.03.2019 tarih ve 2019/06 sayılı 69 no'lu kararı gereğince etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarı ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmanın bütçesi 119R084 no'lu Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından karşılandı.

4.1. Deney Planı

Bu tez çalışmasında HN'nin hücre canlılığına etkinliğini incelemek için DN'nin *in vivo* ve *in vitro* modelleri oluşturuldu. *In vivo* model için 40 erkek, 6-8 haftalık, Balb/C fare randomize bir şekilde 4 gruba ayrıldı; kontrol, HN (4 mg/kg), STZ, STZ+HN (4 mg/kg) (n=10). STZ ve STZ+HN gruplarına tek doz STZ (150 mg/kg, i.p.) enjeksiyonu yapıldı. STZ enjeksiyonu ile DM indüklenen fareler 21 gün sonra DN oluşup oluşmadığını belirlemek için nosiseptif davranışları testlerine tabi tutuldu. DN gelişimi gözlemlendikten sonra 15 gün boyunca günde 1 kez STZ+HN grubundaki farelere HN (AnaSpec, Inc., Fremont, CA) (4 mg/kg, i.p.) enjeksiyonu ve STZ grubundaki farelere HN'nin çözücüsü olan PBS (i.p.) enjeksiyonu yapıldı. Son enjeksiyondan 1 saat sonra fareler dekapite edildi. HN grubundaki sağlıklı farelere tek sefer HN enjeksiyonu yapıldıktan 1 saat sonra fareler dekapite edildi. Dekapite edilen hayvanların kanları alınıp santrifüj edilerek deneylerde kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi. HN'nin apoptoz üzerine etkinliği incelemek için Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

yöntemi ile deney sonunda farelerden alınan serum numunelerinde kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyeleri ölçüldü.

HN'nin DN'nin *in vitro* modelinde hücre canlılığı üzerine etkinliğini incelemek için 1-2 günlük Wistar (n=20) cinsi sıçanlar kullanıldı Dekapitasyon sonrası DKG'ları diseke edildi. Enzimatik ve mekanik işlemlerle DKG nöronları izole edilerek tek 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 (Heracell, Heraeus, Almanya) hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılıncaya kadar inkübe edildi. Primer hücre kültürü yapılarak hazırlanan DKG hücreleri 24 saat süreyle YG'ye (45 mmol/L) maruz bırakılarak DN'nin *in vitro* modeli oluşturuldu. 24 saatlik inkübasyonun ardından HN'nin farklı dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi farklı günlerde en az 10 kez tekrarlanarak; kontrol, HN, YG, YG+HN-10 nM, YG+HN-30 nM, YG+HN-100 nM ve YG+HN-300 nM gruplarında MTT yöntemi ile değerlendirildi. Ayrıca HN'nin yolak üzerinden DN'nin *in vitro* modeli oluşturulan DKG hücrelerinde farklı günlerde 10 kez tekrarlanarak; kontrol, HN, YG, YG+HN, YG+HN+WP, YG+HN+LY, YG+HN+U ve YG+HN+CH gruplarında MTT analizi ile hücre canlılığına etkisi de değerlendirildi (Şekil 4).



Şekil 4. Çalışma Akış Diyagramı

4.2. Diyabetik Nöropatinin *In Vivo* Modeli

4.2.1. Deney Hayvanları

40 yetişkin erkek Balb/C fare, 6-8 haftalık, 25-30 g ağırlığında, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edildi. Hayvanlar

kafeslerde en fazla beşerli gruplar halinde, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde, sabit sıcaklık (23 ± 2 °C) ve nemde ($60 \pm \%5$), ad libitum su ve standart pellet halindeki fare yemleri ile beslenerek standart laboratuvar koşulları altında tutuldu.

Hayvanlar ortam koşullarına alıştırdıktan 7 gün sonra randomize şekilde 4 gruba ayrıldı; Kontrol, HN (4 mg/kg), STZ ve STZ+HN (4 mg/kg) (n=10, her grupta).

4.2.2. Streptozotosin-İndüklü Farelerde Diyabetik Nöropati Modeli

Çalışmaya başlamadan tüm hayvanların ağırlıkları ve kan glukoz seviyeleri ölçüldü. STZ (Sigma, Steinheim, Almanya) 0.4 mL (0.1 M) Na+sitrat tamponu (pH 4.5) içinde çözüldü. 8 saat öncesinde önlerinden yemleri alınan hayvanların kuyruk veninden alınan kan ile ölçülen açlık kan glukoz seviyesi normoglisemik (kan glukoz seviyesi 70-110 mg/dL arasında) olduğu belirlenen hayvanlara tek doz olacak şekilde 150 mg/kg STZ (i.p.) enjeksiyonu yapıldı. Üç gün sonra farelerin tekrar açlık kan glukoz seviyeleri manuel glukometre (Optima, Tayvan) ile ölçüldü. Kan glukozu ölçümleri sabah saat 08.00'de yapıldı. Farelerin kuyruk veninden alınan kanda glukoz düzeyi 250 mg/dL'nin üzerinde olanlar çalışmaya dahil edildi. Ayrıca, hayvanların genel sağlık durumlarına dikkat edilerek; vücut ağırlığında %10'dan fazla kayıp olan, aktivitesinde belirgin şekilde azalma olan veya tüylerinde anormal şekilde sertleşme gözlemlenen hayvanlar çalışmaya dahil edilmedi.

4.2.3. Nositseptif Davranış Testleri

Tek doz STZ enjeksiyonundan 21 gün sonra farelerde DN'nin gelişimini termal ve mekanik hipersensitiviteyi test ederek 3 farklı davranış testi gerçekleştirildi. Termal nositseptif davranışları incelemek için sıcak plaka (*Hot plate*) ve soğuk plaka (*Cold plate*) testleri farelerde gerçekleştirildi. Mekanik nositseptif davranışların değerlendirilmesinde ise *Von Frey* testi kullanıldı. Hayvanların ortam koşullarına alışması ve standardizasyonu sağlamak için testler farklı günlerde aynı saatlerde aynı araştırmacılar tarafından 5 kez tekrarlanmıştır.

Hot plate testi; şeffaf bir pleksiglas silindir ile hayvanların dışarı çıkmaları engellenerek sıcak bir zemin üzerine yerleştirilmesiyle yapılmıştır (Ugo Basile, ugobasile.com, Hot/Cold Plate ng, Cat. No. 35150). Fareler 50 ± 0.5 °C sıcaklığa ayarlanmış sıcak bir plakanın üzerine bırakılarak hayvanların 40 sn (kesme süresi-Cut-off) içinde pençelerini hızla çekip titretme, yalama veya zıplama davranışları gözlemlendiği anda deney sonlandırılarak geçen süre kaydedildi. Testler 4 gün boyunca hayvanların ortama alışmalarını sağlamak için tekrarlanmıştır. Hayvanların doku hasarını önlemek için 40 sn içinde nositseptif yanıt göstermeyen hayvanlar sıcak tabla üzerinden alındı. STZ enjeksiyonundan önce ve 21 gün sonra nositseptif davranış yanıtları kaydedildi.

Cold plate testi; şeffaf bir pleksiglas silindir ile hayvanların dışarı çıkmaları engellenerek soğuk bir zemin (Ugo Basile, ugobasile.com, Hot/Cold Plate ng, Cat. No. 35150) üzerine yerleştirilmesiyle yapılmıştır. Fareler 2 ± 0.5 °C sıcaklığa ayarlanmış soğuk bir plakanın üzerine bırakılarak hayvanların 30 saniye (kesme süresi/Cut-off) içinde pençelerini hızla çekip titretme, yalama veya zıplama davranışları gözlemlendiği anda deney sonlandırılarak geçen süre kaydedildi.

Testler 4 gün boyunca hayvanların ortama alışmalarını sağlamak için tekrarlanmıştır. Hayvanların doku hasarını önlemek için 30 sn içinde nosiseptif yanıt göstermeyen hayvanlar soğuk tabla üzerinden alındı. STZ enjeksiyonundan önce ve 21 gün sonra nosiseptif davranış yanıtları kaydedildi.

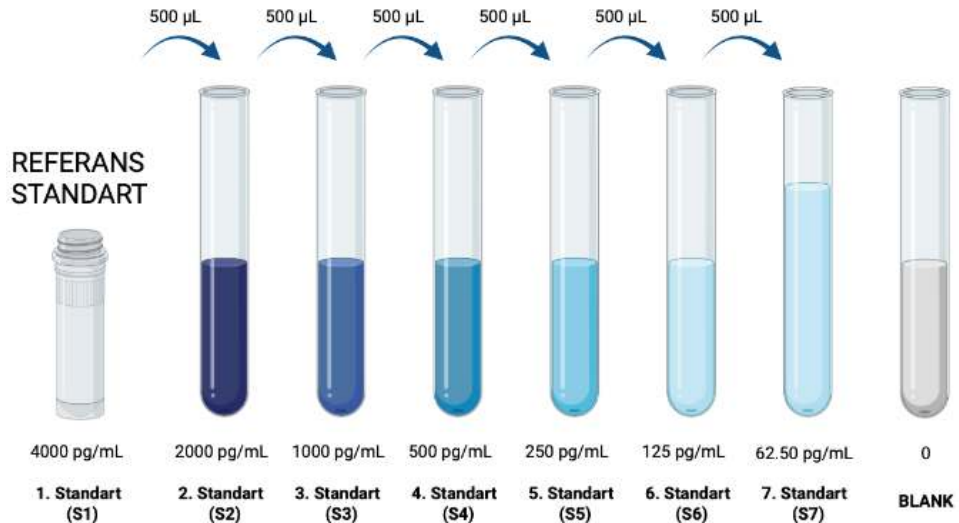
Von Frey Testi; Mekanik nosiseptif davranış yanıtlarını ölçmek için *Von Frey* filamentleri kullanılarak test gerçekleştirilmiştir. Fareler yükseltilmiş delikli düz paslanmaz çelik bir plaka (100x50 cm, 5 mm daire delikli ve delik sınırları arası 2.5 mm) üzerinde delikli pleksiglas kutular (7x9x7 cm) içine yerleştirilmiştir. 15 dakika boyunca ortama alışmaları beklenmiştir. Belirli dizi artan kuvvette kalibre edilmiş çaplarda plastik olan *Von Frey* filamentleri (0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 g) kullanılmıştır. Farelerin sağ arka pençelerinin plantar yüzeyine en düşük kuvvetten başlayıp uygulayarak nosiseptif davranış olan pençeyi geri çekme, yalama veya ani irkilme davranışını aynı filament için 5 kez denemeden en az 3 kez gösterdiğinde yanıt olumlu olarak kabul edilmiştir. Dördüncü ve beşinci denemeler yalnızca ilk üç test sırasında 1 veya 2 olumlu yanıt verildiği zaman gerçekleştirilmiştir. STZ enjeksiyonu öncesi ve 21 gün sonrasında testler yapılmış ve yanıtlar kaydedilmiştir.

4.2.4. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Seviyesinin Analizi

STZ ve STZ+HN (4 mg/kg) gruplarına DN'nin gelişimi test edildikten sonra 15 gün boyunca STZ grubuna HN çözücüsü olan PBS ve STZ+HN (4 mg/kg) grubuna HN (4 mg/kg) uygulaması yapıldı. Son enjeksiyondan 1 saat sonra dekapite edilerek kanları alınan farelerde HN uygulamasının apoptotik süreçler

üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, ELISA yöntemiyle serum kaspaz 3 ve serum kaspaz 9 seviyeleri ölçülmüştür.

Kaspaz 3 seviyesi ölçümü fare kaspaz 3 ELISA kitinin (E-EL-M0230; Elabscience, ABD) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kit içinde bulunan kaspaz 3 antikoru kaplı olan bir mikropate kullanılarak serumdaki kaspaz 3 miktarı belirlenir. Deney sonunda oluşan renk değişimi antijenin varlığına işaret eder. Elisa kitinin hassasiyeti 0.10 ng/mL, ölçüm aralığı 0.16-10 ng/mL'dir. ELISA kiti ile birlikte gelen deney protokolü uygulandı. Standartlar ve numuneler, 96 kuyucuklu ELISA kit plağına Şekil 5'de gösterildiği gibi pipetlendi.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLNK	BLNK	N1	N1	N9	N9	N17	N17	N25	N25	N33	N33
B	S1	S1	N2	N2	N10	N10	N18	N18	N26	N26	N34	N34
C	S2	S2	N3	N3	N11	N11	N19	N19	N27	N27	N35	N35
D	S3	S3	N4	N4	N12	N12	N20	N20	N28	N28	N36	N36
E	S4	S4	N5	N5	N13	N13	N21	N21	N29	N29	N37	N37
F	S5	S5	N6	N6	N14	N14	N22	N22	N30	N30	N38	N38
G	S6	S6	N7	N7	N15	N15	N23	N23	N31	N31	N39	N39
H	S7	S7	N8	N8	N16	N16	N24	N24	N32	N32	N40	N40

Şekil 5. Serum Kaspaz 3 seviyesini ELISA yöntemi ile değerlendirmek için standartların hazırlanması ve plate yerleşimi

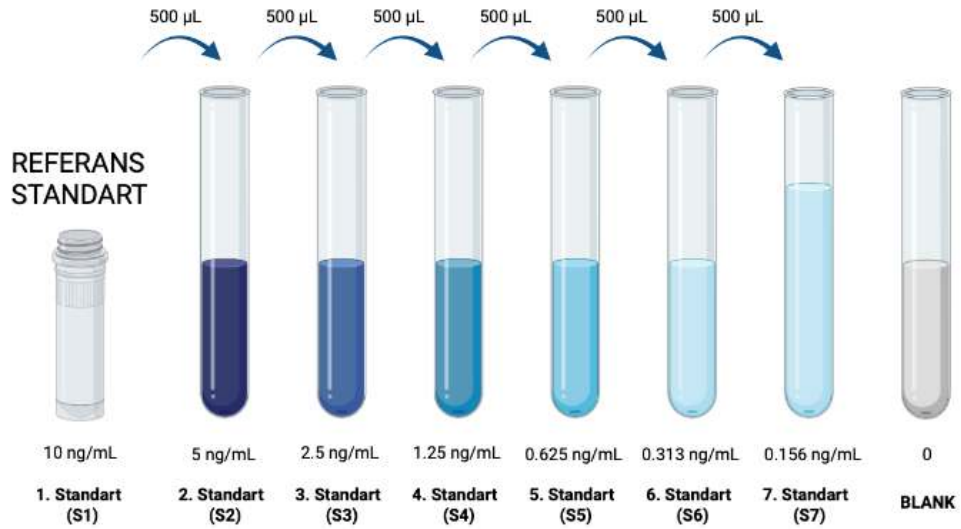
Analiz için kit plağının düzeni sağlandıktan sonra aşağıda belirtilen deney protokolü uygulandı:

- Standartlar, blank ve numuneler için kuyucuklar belirlendi. Standartlar ve numuneler 100 µL hacminde plate düzeninde gösterildiği şekilde pipetlendi. Blank kuyucuğuna ise 100 µL hacminde örnek dilüsyon solüsyonu koyuldu.

- Standart ve numuneler iki kez çalışıldı. Pipetlemeden sonra 37 °C’de 90 dakika inkübe edildi.
- Kuyulardaki sıvılar boşaltıldı. Her kuyuya 100 µL Biotinylated Detection Ab solüsyonu eklendi, hafifçe karıştırıldı. 37°C’de 1 saat inkübe edildi.
- Kuyulardaki sıvılar boşaltıldı. Her kuyucuğa 350 µL yıkama tamponu eklendi ve 1 dk beklenip aspire edildi. Sonrasında temiz emici kağıda hafifçe vurarak kurutuldu. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
- Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendikten sonra 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Yıkama işlemi daha önce anlatıldığı gibi 5 kez tekrarlandı.
- Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklendi. Işıktan koruyarak 37 °C’de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi.

Deney sonunda standartlar ve serum numunelerinden elde edilen optik dansiteler otomatik ELISA plate okuyucuda (Thermo Scientific, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

Kaspaz 9 seviyesinin ölçümü fare kaspaz 9 ELISA kitinin (E-EL-M0241; Elabscience, ABD) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kit içinde bulunan kaspaz 9 antikoru kaplı olan bir mikropate kullanılarak serumdaki kaspaz 9 miktarı belirlenir. Deney sonunda oluşan renk değişimi antijenin varlığına işaret eder. Elisa kitinin hassasiyeti 0.094 ng/mL, ölçüm aralığı 0.156-10 ng/mL’dir. ELISA kiti ile birlikte gelen deney protokolü uygulandı. Standartlar ve numuneler, 96 kuyucuklu ELISA kit plağına şekil 6’da gösterildiği gibi pipetlendi.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLNK	BLNK	N1	N1	N9	N9	N17	N17	N25	N25	N33	N33
B	S1	S1	N2	N2	N10	N10	N18	N18	N26	N26	N34	N34
C	S2	S2	N3	N3	N11	N11	N19	N19	N27	N27	N35	N35
D	S3	S3	N4	N4	N12	N12	N20	N20	N28	N28	N36	N36
E	S4	S4	N5	N5	N13	N13	N21	N21	N29	N29	N37	N37
F	S5	S5	N6	N6	N14	N14	N22	N22	N30	N30	N38	N38
G	S6	S6	N7	N7	N15	N15	N23	N23	N31	N31	N39	N39
H	S7	S7	N8	N8	N16	N16	N24	N24	N32	N32	N40	N40

Şekil 6. Serum Kaspaz 9 seviyesini ELISA yöntemi ile değerlendirmek için standartların hazırlanması ve plate yerleşimi

Analiz için kit plağının düzeni sağlandıktan sonra aşağıda belirtilen deney protokolü uygulandı:

- Standartlar, blank ve numuneler için kuyucuklar belirlendi. Standartlar ve numuneler 100 µL hacminde plak düzeninde gösterildiği şekilde pipetlendi. Blank kuyucuğuna ise 100 µL hacminde örnek dilüsyon solüsyonu koyuldu.

- Standart ve numuneler iki kez çalışıldı. Pipetlemeden sonra 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
- Kuyulardaki sıvılar boşaltıldı. Her kuyuya 100 µL Biotinylated Detection Ab solüsyonu eklendi, hafifçe karıştırıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Sıvılar kuyulardan aspire edildi. Her kuyucuğa 350 µL yıkama tamponu eklendi ve aspire edildi. Sonrasında temiz emici kağıda hafifçe vurarak kurutuldu. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
- Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendikten sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Yıkama işlemi daha önce anlatıldığı gibi 5 kez tekrarlandı.
- Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklendi. Işıktan koruyarak 37°C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi.

Deney sonunda standartlar ve serum numunelerinden elde edilen optik dansiteler otomatik ELISA plate okuyucuda (Thermo Scientific, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

4.3. Diyabetik Nöropatinin *In Vitro* Modeli

4.3.1. Dorsal Kök Gangliyonu Primer Hücre Kültürü

Forda ve Kelly (1985) adlı araştırmacıların geliştirdiği metoda göre DKG hücre izolasyon ve kültürü gerçekleştirildi (170). Primer hücre kültürü yapılması esnasında ve hücrelerin saklanması kontaminasyonu önlemek amacıyla gerekli önlemler alındı. Hücre kültürüne başlamadan tüm cerrahi malzemeler, cam saklama kapları, pastör pipeti, pipet ve pipet uçları otoklav (Nüve, Ankara) kullanılarak

steril hale getirildi. Malzemeler otoklavdan alındıktan hemen sonra hücre kültürünün yapılacağı laminar hava akımlı güvenlik kabini (Thermo Scientific, type Safe 2020) içine etanole (%70) tabi tutularak yerleştirildi. Hücre kültürü yapılmadığı zaman aralıklarında laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisindeki ultraviyole ışık kaynağı açık bırakıldı. Hazırlanan tüm solüsyonların pH'sı pH metre (Thermo Orion, Beverly, ABD), osmolaritesi ozmometre (Gonotec, Berlin, Almanya) kullanılarak ölçüldü.

Kültür vasatı hücre kültürünün yapılacağı gün taze olarak tablo 1'de verilen bileşimde hazırlandı ve 10 mL PBS ile ısınması amacıyla inkübatörde bekletildi.

Tablo 1. Sinir Hücre Kültür Vasatı Bileşimi

Kimyasal	Miktarı
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

4.3.2. Dorsal Kök Gangliyonunun Primer Hücre Kültürü Protokolü

FÜDAM'dan temin edilen 1-2 günlük Wistar cinsi sıçanlar dekapite edilerek geniş bir petri kutusuna alındı ve alkollenerek kabin içine yerleştirildi. Küçük bir makas kullanılarak vertebral kolon çıkarıldı. Spinal kolonun içi kaudal uçtan başlayarak boyun kısmına kadar, yaylı küçük bir makasla açıldı. Spinal kolon PBS bulunan petri kutularında 3 defa yıkandı. DKG'ler diseksiyon mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) altında forsepsle izole edilerek içerisinde kültür vasatı bulunan küçük bir petri kutusuna yerleştirildi. Bütün DKG gövdeleri çıkarılıp petri

kutusunda toplandıktan sonra, bütün gangliyonların bir araya toplanması için petri kutusu hassas dairesel hareketlerle sallandı. Bir araya toplanan gangliyonların bulunduğu kültür medyumu pastör pipet ile çekildi. 37 °C’de inkübe edilmiş 900 µL kültür vasatı ve 100 µL kollagenaz (%0.125) ilave edilerek çalkalandıktan sonra 13 dakika boyunca inkübatörde tutuldu. 13 dakikanın sonunda enzimle muamele edilmiş hücre inkübatörden alınarak hızlıca üç defa PBS ile yıkandı. Daha sonra 900 µL PBS ve 100 µL tripsin (%0.25) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 6 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 15 mL’lik steril plastik tüpe aktarıldı ve yaklaşık 4 mL inkübe edilmiş kültür vasatı ilave edildi. 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 medyumu ilave edilip steril bir pastör pipet ile hızla çekilip boşaltıldı. Birkaç defa kademeli olarak yapılan çekilip boşaltma işleminde her kademedede üstte kalan süspansiyon alınarak diğer gangliyonlara uygulanan mekanik titrasyon işlemine devam edildi. Daha sonra hücre süspansiyonunun içine 240 µL sinir büyütme faktörü (NGF) eklendi. Hücre kültürüne başlamadan 2-3 saat önce Poly-D-lizin ve laminin ile kaplanan 96’lık plate’ler inkübatörden alındı ve hücreler 96’lık plate’lere ekilerek hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılmak üzere inkübasyona kaldırıldı.

4.3.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve MTT Analizi

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır.

Yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir.

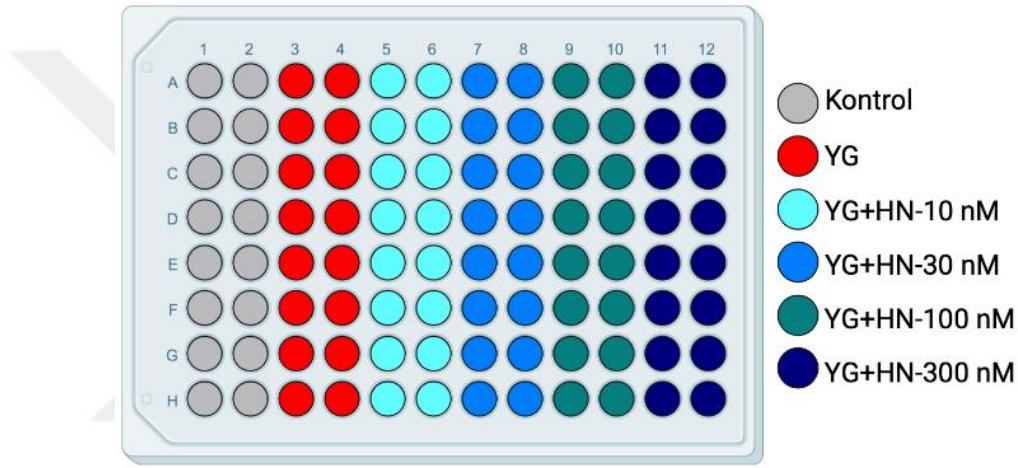
Primer hücre kültürü ile hazırlanan DKG hücrelerinin canlılık oranları %0.4 tripan mavisi kullanılarak belirlendi. Tripan mavisi canlı hücrelerin membran yapısı zarar görmediği için içine giremezken cansız hücreler tarafından absorbe edilir. Canlılık oranları %90'ın üstünde olduğunda deneylere başlandı.

4.3.4. Hücre Canlılık Analizi

HN'nin DN'nin *in vitro* modelinde hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek için DKG nöronları Şekil 9'da gösterildiği gibi kontrol, YG, YG+HN-10 nM, YG+HN-30 nM, YG+HN-100 nM ve YG+HN-300 nM grupları şeklinde her bir kuyucukta en az 5×10^4 hücre/kuyucuk içeren 96'lık plate'lere ve her bir kuyucuk 200 μ L'ye tamamlanacak şekilde aşağıdaki protokole göre ekilmiştir:

- 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+HN-10 nM ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L HN (10 nM), 60 μ L Nörobasal-A konuldu.

- YG+HN-30 nM ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L HN (30 nM), 60 μ L Nörobasal-A konuldu.
- YG+HN-100 nM ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L HN (100 nM), 60 μ L Nörobasal-A konuldu.
- YG+HN-300 nM ile gösterilen kuyucuklara 20 μ L YG (45 mmol/L), 20 μ L HN (300 nM), 60 μ L Nörobasal-A konuldu.

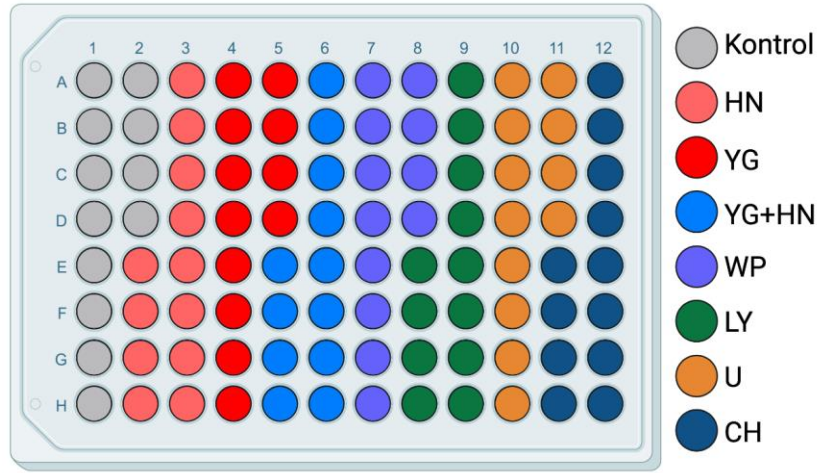


Şekil 7. Humaninin farklı dozlarının (10 nM, 30 nM, 100 nM ve 300 nM) hücre canlılığına etkisini MTT analizi ile incelemek için grupların 96'lık plate üzerindeki yerleşimi

HN'nin DN'nin *in vitro* modelinde hücre canlılığı üzerine etkisi JAK2/STAT3 inhibitörü (10 μ M, WP1066,), Fosfatidil İnoзитol 3-kinaz (PI3K) inhibitörü (50 μ M, LY294002), MAP Kinaz inhibitörü (100 nM, SML0543) ve PKC inhibitörü (10 μ M, Chelerythrine chloride-CHCL) kullanılarak yolak üzerinden incelemek için DKG nöronları Şekil 8'de gösterildiği gibi kontrol, HN, YG, YG+HN, WP, LY ve U grupları şeklinde her bir kuyucukta en az 5×10^4

hücre/kuyucuk içeren 96'lık plate'lere ve her bir kuyucuk 200 µl'ye tamamlanacak şekilde aşağıdaki protokole göre ekilmiştir:

- Tüm kuyucuklara 100 µL DKG hücreleri (5×10^4) içeren medyum konuldu.
- Kontrol ile gösterilen kuyucuklara 100 µL hücre medyumu Nörobasal-A konuldu.
- HN ile gösterilen kuyucuklara 20 µl HN (20 nM), 80 µL Nörobasal-A konuldu.
- YG ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 80 µL Nörobasal-A konuldu.
- YG+HN ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 20 µL HN (20 nM), 60 µL Nörobasal-A konuldu.
- WP ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 20 µL WP (10 µM) konulup 2 saat beklendikten sonra 20 µL HN (20 nM), 40 µL Nörobasal-A konuldu.
- LY ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 20 µL LY (50 µM) konulup 2 saat bekledikten sonra 20 µL HN (20 nM), 40 µL Nörobasal-A konuldu.
- U ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 20 µL SML (50 µM) konulup 2 saat bekledikten sonra 20 µL HN (20 nM), 40 µL Nörobasal-A konuldu.
- CH ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 20 µL CHCL (50 µM) konulup 2 saat bekledikten sonra 20 µL HN (20 nM), 40 µL Nörobasal-A konuldu.



Şekil 8. Humaninin hücre canlılığına yolak üzerinden etkisini MTT analizi ile incelemek için grupların 96'lık plate üzerindeki yerleşimi

Maddelerin 24 saat inkübasyonu sonunda inkübatörden alınan plate'lerdeki medium ve maddeler vakum pompası yardımıyla ortamdaki 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 inkübasyon için 3 saat süreyle inkübatöre konuldu. 3 saat sonunda eklenen MTT ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra üzerine her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde Nörobasal-A eklenerek hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında (Thermo, ABD) 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Kontrol hücreleri okutularak elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edilmiştir. Çözücü ve ajan uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlanmış ve yüzde canlılık olarak kabul edilmiştir. MTT denemeleri farklı günlerde en az 10 kez tekrarlanmış ve ölçümler alınmıştır.

4.4. Kullanılan İlaçlar

HN çözücüsü olarak *in vivo* çalışmalarda PBS, *in vitro* çalışmalarda ise Nörobasal-A kullanıldı. STZ Na+sitrat tamponun (pH 4.5) içinde çözdürüldü. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	Marka
Humanin	AnaSpec, Inc., Fremont, CA
PBS	Sigma, Steinheim, Almanya
Streptozotosin	Sigma, Steinheim, Almanya
Laminin-poli-L-ornitin	Sigma, Steinheim, Almanya
poli-D-lizin	Sigma, Steinheim, Almanya
2-Deoxy-D-glucose	Sigma, Steinheim, Almanya
Nörobasal-A	GIBCO, ThermoFisher Scientific
B27	GIBCO, ThermoFisher Scientific
Glutamaks	GIBCO, ThermoFisher Scientific
Penisilin-Streptomisin	GIBCO, ThermoFisher Scientific
Kollegenaz	Sigma, Steinheim, Almanya
Tripsin	Sigma, Steinheim, Almanya
DNAaz	Sigma, Steinheim, Almanya
JAK2/STAT3 inhibitörü (WP1066)	EMD Millipore Corporation, Calbiochem, USA
PI3K inhibitörü (LY294002)	EMD Millipore Corporation, Calbiochem, USA
MAPK inhibitörü (SML0543)	EMD Millipore Corporation, Calbiochem, USA
PKC inhibitörü (Chelerythrine chloride)	Sigma, Steinheim, Almanya

4.5. İstatistiksel Analizler

Bütün veriler ortalama ve standart sapma ($\text{ort} \pm \text{SS}$) şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel analizler ve grafikler GraphPad yazılımı (GraphPad Prism version 9.2.0 for macOS, GraphPad Software, San Diego, California USA) kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7 ve Şekil 8 biorender.com kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Verilerin normal dağılıma uygunluğu D'Agostino-Pearson testi, gruplar arası farklılıklar için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve post-hoc Tukey testleri kullanılmıştır. İki grup arasındaki karşılaştırmalar için two-tailed unpaired t testi kullanılmıştır. MTT deneyleri en az 10 defa tekrarlanmıştır. Tüm analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



5. BULGULAR

5.1. Diyabetik Nöropatinin *In Vivo* Modeli

5.1.1. Streptozotosin ile Diyabet İndüklenmiş Farelerin Nosiseptif Davranış Testlerine Yanıtları

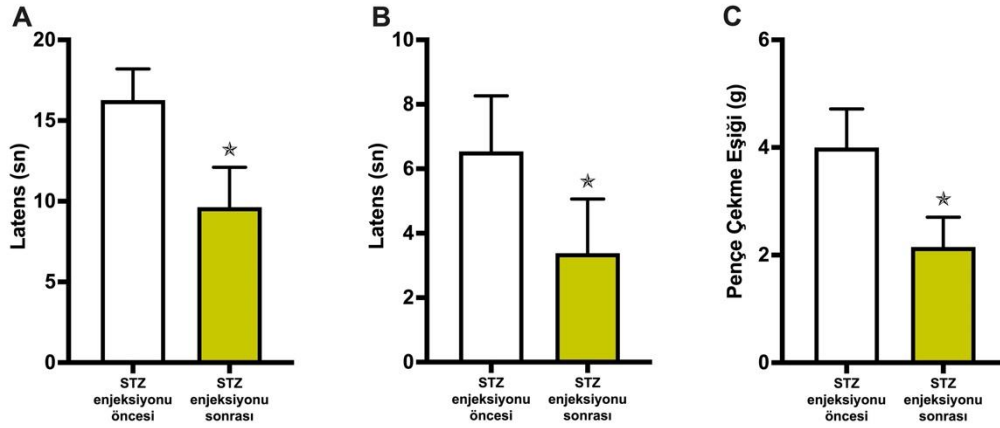
DN'nin *in vivo* modeli olan STZ ile DM indüklenmiş farelerde DN gelişimi STZ enjeksiyonu öncesinde ve 21 gün sonrasında mekanik ve termal nosiseptif davranışları yanıtları *Hot plate*, *Cold plate* ve *Von Frey* testleri kullanılarak incelendi.

STZ enjeksiyonu öncesi *Hot plate* testi gerçekleştirilen hayvanların sıcak termal nosiseptif yanıtları 16.27 ± 1.93 sn olarak kaydedildi. STZ enjeksiyonundan 21 gün sonra *Hot plate* testi tekrar gerçekleştirildiğinde fareler STZ enjeksiyonunda önce alınan yanıtlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha erken nosiseptif davranış yanıtı (9.63 ± 2.47 sn) gösterdiği bulunmuştur ($p < 0.05$, Şekil 9A).

Farelerin STZ enjeksiyonu öncesinde ve enjeksiyondan 21 gün sonrasında *Cold plate* testi ile nosiseptif davranış yanıtları kaydedildi. STZ enjeksiyonu öncesi 6.54 ± 1.72 sn olarak kaydedilirken STZ enjeksiyonundan 21 gün sonrasında nosiseptif davranış yanıtları 3.38 ± 1.68 sn olarak anlamlı bir şekilde daha erken gerçekleşmiştir ($p < 0.05$, Şekil 9B).

Mekanik nosiseptif davranış yanıtları *Von Frey* testi ile kaydedilen fareler de STZ enjeksiyonu öncesinde 4 ± 0.72 g şeklinde yanıtlar kaydedilirken STZ enjeksiyonundan 21 gün sonrasında *Hot plate* ve *Cold plate* testlerinde

gözlemlendiği gibi anlamlı olarak daha erken nosiseptif davranış yanıtı (2.15 ± 0.55 g) göstermiştir ($p<0.05$, Şekil 9C).



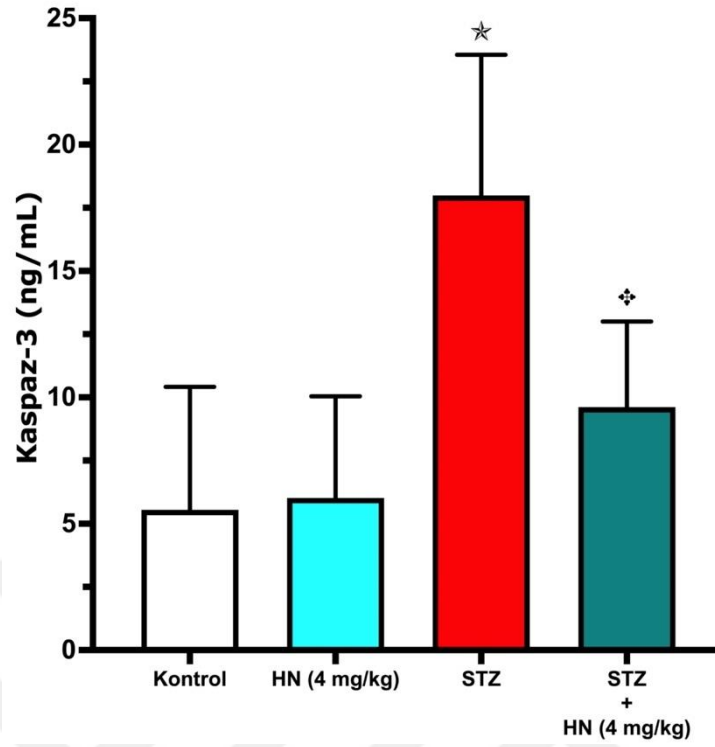
Şekil 9. Diyabetik Nöropati oluşumunun farelerde termal ve mekanik nosiseptif davranış yanıtlarının ölçülmesiyle belirlenmesi. **A)** *Hot Plate* Testi ile kaydedilen nosiseptif davranış yanıtları, **B)** *Cold Plate* Testi ile kaydedilen nosiseptif davranış yanıtları, **C)** *Von Frey* Testi ile kaydedilen nosiseptif davranış yanıtları. Veriler $\pm$ SS olarak gösterilmiştir. * $p<0.05$; STZ enjeksiyonu öncesi verileriyle karşılaştırıldığında.

5.1.2. Humaninin Serum Kaspaz 3 Seviyesi Üzerine Etkisi

Serum kaspaz 3 seviyesi üzerine HN'nin etkisini incelemek için kan numuneleri alınan farelerin HN enjeksiyonu yapılmadan önce termal ve mekanik nosiseptif davranış yanıtları *Hot plate*, *Cold plate* ve *Von Frey* testleri ile kaydedilerek STZ ile DM indüklenmiş farelerde DN oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 9). STZ ile DM indüklenerek DN'nin *in vivo* modeli oluşturulan STZ+HN (4 mg/kg) grubundaki farelere 15 gün boyunca HN (4 mg/kg) uygulaması

yapıldıktan sonra dekapite edilerek farelerden alınan kanlarda serum kaspaz 3 seviyesi ölçülmüştür.

Kontrol grubundaki sağlıklı farelerin serum kaspaz 3 seviyeleri 5.54 ± 4.87 ng/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 10). Tek doz HN uygulanan grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak bir değişiklik olmadığı ve kontrol grubu ile benzer şekilde kaspaz 3 seviyesi 6.02 ± 4.02 ng/mL olarak bulunmuştur. STZ grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum kaspaz 3 seviyesi (17.99 ± 5.56 ng/mL) istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmışken 15 gün boyunca HN (4 mg/kg) uygulanan STZ+HN (4 mg/kg) grubunda kaspaz 3 seviyesi STZ grubuyla kıyaslandığında HN'nin antiapoptotik bir etki gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı şekilde kaspaz 3 seviyesini düşürdüğü bulunmuştur. ($p < 0.001$, Şekil 10).



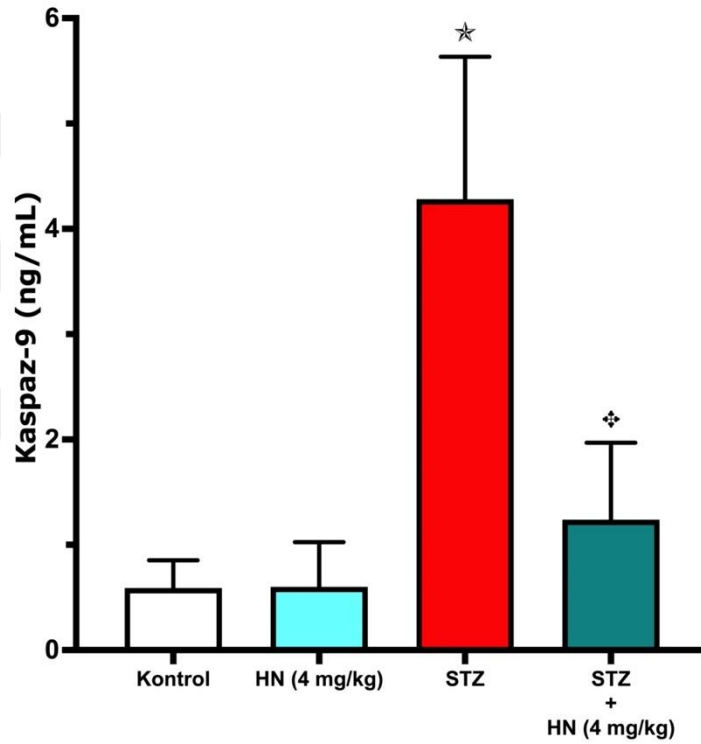
Şekil 10. Humaninin STZ ile DM indüklenerek DN modeli oluşturulan farelerde serum kaspaz 3 seviyesine etkisi. Veriler ort $\pm$ SS olarak gösterilmiştir. * $p < 0.001$; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ve $\dagger p < 0.001$; YG grubuyla karşılaştırıldığında.

5.1.3. Humaninin Serum Kaspaz 9 Seviyesi Üzerine Etkisi

STZ ile DM indüklenmiş farelerde DN modeli oluşturulduktan sonra STZ+HN (4 mg/gk) grubundaki farelere 15 gün boyunca HN (4 mg/kg) uygulaması yapıldı ve fareler dekapite edilerek alınan kan örneklerinde HN'nin serum kaspaz 9 seviyesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Serum kaspaz 9 seviyesi tek doz HN (4 mg/kg) uygulanan HN grubundaki sağlıklı farelerde 0.60 ± 0.42 ng/mL olarak ölçülmüş ve kontrol grubu (0.59 ± 0.26 ng/mL) ile karşılaştırıldığında bir farklılık olmadığı bulunmuştur (Şekil 11). STZ

grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum kaspaz 9 seviyesi (4.28 ± 1.35 ng/mL) istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmışken 15 gün boyunca HN (4 mg/kg) uygulanan STZ+HN (4 mg/kg) grubunda kaspaz 9 seviyesi STZ grubuyla kıyaslandığında HN'nin antiapoptotik bir etki gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı şekilde kaspaz 9 seviyesini düşürdüğü bulunmuştur. ($p<0.001$, Şekil 11).

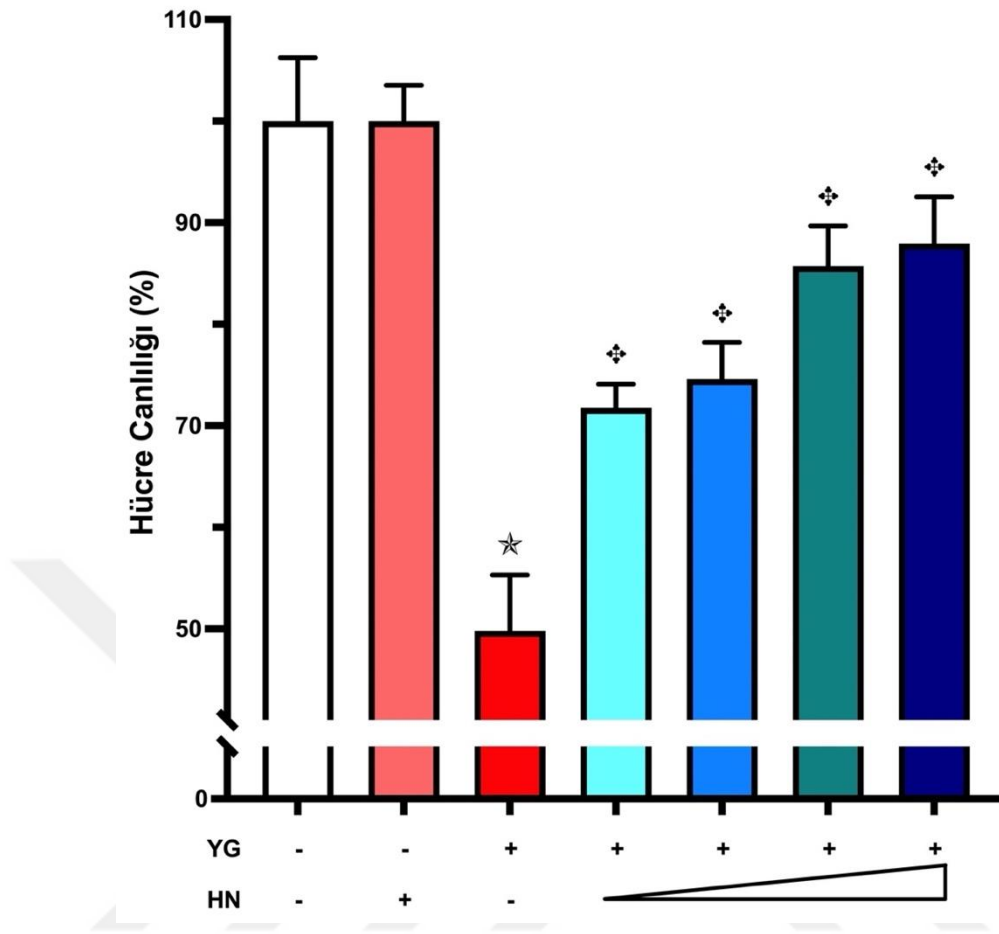


Şekil 11. Humaninin STZ ile DM indüklenerek DN modeli oluşturulan farelerde serum kaspaz 9 seviyesine etkisi. Veriler ort $\pm$ SS olarak gösterilmiştir. * $p<0.001$; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ve $\clubsuit p<0.001$; YG grubuyla karşılaştırıldığında.

5.2. Diyabetik Nöropatinin *In Vitro* Modeli

5.2.1. Humaninin Hücre Canlılığına Etkisi

DKG hücrelerinin 24 saat YG'ye (45 mmol/L) maruz bırakılarak oluşturulan DN'nin *in vitro* modelinde hücrelere YG ile birlikte HN'nin (10 nM, 30nM, 100 nM ve 300 nM) farklı dozlarda uygulanmasıyla HN'nin hücre canlılığı üzerine etkisi incelendi. YG uygulanmış gruptaki hücre canlılığı oranı (49.79 ± 5.51) hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubuna (100 ± 6.23) göre anlamlı ölçüde azalmıştır ($p < 0.001$, Şekil 12). YG ile birlikte HN'nin farklı dozlarının (10 nM, 30 nM, 100 nM ve 300 nM) uygulandığı gruplarda hücre canlılığı (sırasıyla, 76.07 ± 3.69 , 74.59 ± 3.61 , 85.74 ± 3.95 , 87.93 ± 4.62) YG grubu ile karşılaştırıldığında doz bağımlı olarak HN'nin koruyucu bir etki gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$, Şekil 12).

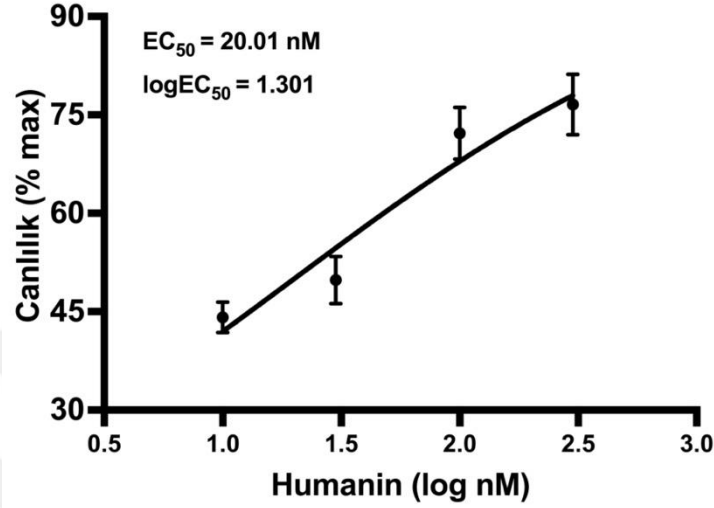


Şekil 12. Diyabetik Nöropati'nin *in vitro* modelinde humaninin farklı dozlarının (10 nM, 30 nM, 100 nM ve 300 nM) hücre canlılığı üzerine etkisi. Deneyler farklı günlerde 10 kez tekrarlanmıştır. Veriler ort $\pm$ SS olarak gösterilmiştir. * $p < 0.001$; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ve † $p < 0.001$; YG grubuyla karşılaştırıldığında.

5.2.2. Humaninin EC50 Dozunun Belirlenmesi

HN'nin farklı dozlarının (10 nM, 30 nM, 100 nM ve 300 nM) DKG'lerin YG ile indüklenerek DN'nin *in vitro* modeli oluşturulmuş gruplarına uygulanmasının ardından canlılık oranının yüzdesel değişimi dikkate alınarak

log(doz)-yanıt eğrisi oluşturulmuş ve HN için $\log EC_{50} = 1,301$ ($EC_{50} = 20 \text{ nM}$) olarak bulunmuştur (Şekil 13).

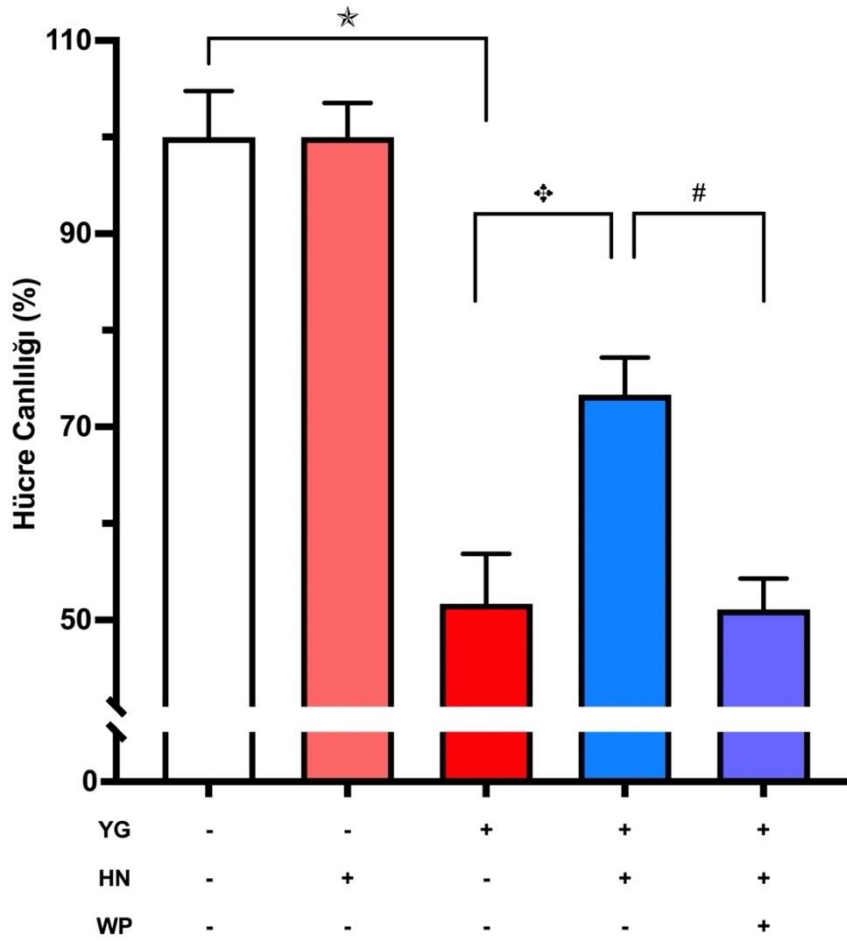


Şekil 13. Humaninin (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM; log olarak ifade edilmiştir) hücre canlılığı üzerine log(doz)-yanıt ilişkisi.

5.2.3. Humaninin Hücre Canlılığına Yolak Üzerinden Etkisi

DN'nin *in vitro* modeli oluşturulmuş DKG hücrelerinde JAK2/STAT3 inhibitörü, PI3K inhibitörü, MAPK inhibitörü ve PKC inhibitörü kullanılarak bu yolaklar üzerinden HN'nin hücre canlılığı üzerine etkisi incelendi. DKG hücrelerine tek başına HN (20 nM) uygulaması yapılan HN grubu (100 ± 3.53) kontrol grubu (100 ± 4.77) ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. YG ile indüklemiş DKG hücrelerinde hücre canlılığı (51.67 ± 5.18) kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalırken YG ile birlikte HN (20 nM) uygulandığında (73.32 ± 3.85) yalnızca YG uygulanmış gruba göre HN istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre canlılığını koruyucu bir etki göstermiştir.

HN'nin yolak üzerinden hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek için YG+HN+WP grubu (51.09 ± 3.20) YG+HN grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı ve YG grubu ile benzer bir etki gösterdiği bulunmuştur. HN'nin YG ile indüklenmiş DKG hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini JAK2/STAT3 yolağı üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektedir (Şekil 14).



Şekil 14. Humaninin Diyabetik Nöropati'nin *in vitro* modelinde yolak üzerinden etkisi. Deneyler farklı günlerde 10 kez tekrarlanmıştır. Veriler ort $\pm$ SS olarak gösterilmiştir. *p<0.001; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, *+p<0.001; YG grubuyla karşılaştırıldığında ve #p<0.001; YG+HN grubuyla karşılaştırıldığında.

6. TARTIŞMA

DN, dünya çapında prevalansı giderek artan önemli bir halk sağlığı sorunu olan DM'nin uzun süreli en yaygın mikrovasküler komplikasyonlarından biridir (171). DN'nin gelişiminde ve ilerlemesinde anahtar rol alan hiperglisemi ROS aşırı üretimi ile oluşan oksidatif strese, mitokondriyal disfonksiyona ve nöronlarda apoptozise neden olmaktadır (79). HN özellikle hücresel stres koşullarına yanıt olarak antiapoptotik ve nöroprotektif etki gösteren 24 amino asitli mitokondriyal türevli bir peptittir (111, 112, 127). Bu tez çalışmasında HN'nin nöroprotektif ve antiapoptotik etkisini incelemek için DN'nin *in vivo* ve *in vitro* modeli oluşturulmuştur. DN'nin *in vivo* modelinde HN uygulaması yapılan farelerden alınan kan örneklerinden ELISA yöntemi ile serum kaspaz 3 ve kaspaz 9 sevipleri, DN'nin *in vitro* modelinde farklı dozlarda HN uygulamasının ve MTT analizi ile hücre canlılığı üzerine etkileri incelenmiştir. Ayrıca DN'nin *in vitro* modelinde HN'nin yolak üzerinden hücre canlılığı etkisi MTT analizi ile incelenmiştir.

DN'nin patofizyolojisini anlamak, tedavi stratejilerini aydınlatmak ve gelişimini önlemek için *in vivo* fare modelleri kritik öneme sahiptir (172). Nosiseptif davranış testlerinden elde edilen bu çalışmanın bulgularına göre farelerin verdikleri nosiseptif davranış yanıtları STZ enjeksiyonu yapılan farelerde DN gelişimi olduğunu göstermektedir. DN patogenezinde önerilen yollar arasında YG tarafından indüklenen apoptoz, nöronal disfonksiyon ve ölüm için muhtemel olan çok önemli bir mekanizmadır (56, 173). YG'nin hem *in vivo* (174) hem de primer DKG nöronları (56), PC12 hücreleri (175) ve SH-SY5Y (176) insan nöroblastoma hücreleri gibi *in vitro* nöronlarda apoptozu indüklediği bulmuştur. Apoptoz,

programlanmış hücre ölümü sürecidir ve hücre gelişiminin normal bir bileşenidir, ancak aşırı apoptoz birçok hastalık durumunun nedeni veya göstergesidir (177). Apoptoz, kaspaz enzimleri ve Bcl-2 ailesi dahil olmak üzere iki önemli protein ailesinin, onu düzenlemede çok önemli bir rol oynadığı, yüksek düzeyde düzenlenmiş ve içsel bir hücre intihar programıdır. Kaspaz enzimleri kaskad görevi görür ve bu ailenin en önemli üyesi kaspaz 3'tür (178, 179). Zhao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kortikal nöronlara kalikulin A tedavisinin kaspaz 3 aktivitesini arttırdığını, HN tedavisinin ise kaspaz 3 seviyesini azalttığını ve Kalikulin A indüklü apoptozis ve oksidatif strese koruduğunu bildirmişlerdir (180). Sreekumar ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada, HN'nin kısmen JAK2/STAT3 sinyal aktivasyonu ve kaspaz 3 inhibisyonu yoluyla insan retinal pigment epitel hücrelerini oksidatif stres, yaşlanma ve mitokondriyal işlev bozukluğundan koruma işlevi gördüğünü göstermiştir (181). Yuan ve ark. HN'nin A β kaynaklı STAT3 bozulmasını ve kaspaz 3 aktivasyonunu bloke ettiğini, böylece HN'nin nöroprotektif eylemlerde yer aldığını önermişlerdir (141). Guo ve ark. HN'nin kaspaz-3 aktivitesini baskılayarak PC12 hücrelerini A β 'nin neden olduğu sitotoksiteye karşı koruduğunu bildirmiştir (182). Çalışmamızda, 15 gün boyunca HN uygulanan DN'nin *in vivo* modeli oluşturulmuş farelerden alınan serum örnekleriyle gerçekleştirilen ELISA testi bulgularına göre HN uygulamasının yapılan çalışmalarla tutarlı olarak antiapoptotik etki gösterdiği ve serum kaspaz 3 ve serum kaspaz 9 seviyesini anlamlı şekilde azalttığı bulunmuştur.

DN'nin moleküler temelini altında yatan ana biyolojik mekanizmalar/yollar henüz ortaya çıkarılmamış ve anlaşılmamıştır. Bununla birlikte DN, süperoksitin aşırı üretimi, ROS, hücre içi sinyal yollarının aşağı akışı

ve bunların modölatörleri gibi belirli patofizyolojilere göre sınıflandırılabilir (183). Hiperglisemi, uzun süre devam eden DM’de nöropati gelişimine neden olan önemli bir rol oynar (19). Hiperglisemik koşullar altında hücreler, fazla glukozun çoğunu mitokondriye aktarabilir ve fazla miktarda reaktif oksijen türü üretebilir (184). Çalışmalar, mitokondriyal oksidatif stresin nöronal hasara yol açan ana nedenlerden biri olduğunu kanıtlamıştır (58, 184, 185). DKG hücrelerinin hiperglisemiye bağlı iç veya dış strese duyarlılığı, nörodejeneratif bozuklukların patogeneze ve ilerlemesine katkıda bulunur (186). DM’nin komplikasyonları için deneysel modeller genellikle hayvanların kullanımını içerir, ancak son gelişmeler bu komplikasyonlarda çeşitli hücre dizilerinin veya *in vitro* modeller olarak primer hücre kültürünün ortaya çıkmasına yol açmıştır (187). Böylece *in vitro* modellerin doğal basitlikleri ve bir hastalığın patogenezinde yer alan çeşitli parametreleri gereksiz zorluklar olmadan inceleme yetenekleri nedeniyle kullanımları artmaktadır. DKG hücreleri, daha önce bileşiğin nöronal toksisitesini ve nöropatik etkilerini araştırmak için kullanılan nöronal sistemi ve nöropatiyi hedef alan çalışmalarda mükemmel özellikler göstermiştir. YG konsantrasyonlarının, hücre fonksiyonları bozarak ve hücre apoptozunu indükleyerek birçok hücre tipi üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir (188). YG’nin, kemik iliği kaynaklı endotelial progenitör hücrelerin proliferasyonunu, göçünü ve *in vitro* anjiyojenik kapasitesini inhibe ettiği ve mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif potansiyelini değiştirdiği gösterilmiştir (189). Ayrıca YG, farklı çalışmalarda bildirildiği gibi kalp, nöronal ve endotelial hücrelerde oksidatif stres ve apoptozu indükler ve şiddetlendirir (190). Yapılan çalışmalar, hipergliseminin diyabetik nöronlarda oksidatif stresi ve ROS’u indüklediğini, nöronal hasara, işlev bozukluğuna ve son olarak da

nörotoksisiteye yol açtığını göstermektedir (80). Oksidatif stres ve bunu takiben ROS oluşumu, DN'nin başlangıcı, patogenezi ve ilerlemesinde rol oynayan iki kritik unsurdur (191). YG ile inkübe edilmiş DKG nöronu, *in vitro* DN'yi incelemek için en yaygın modeldir. YG, artan ROS mitokondriyal üretimi ve ardından DKG nöronlarının apoptozisi ile ilişkilidir (78, 192, 193). DKG nöronal apoptozunun *in vivo* olarak diyabetik duyuşal nöropatinin patogenezinde yer aldığı tartışmalı olmakla birlikte, YG, nörona zararlı ROS oluşturarak aksonal atrofiye, demiyelinizasyona, sinir liflerinin kaybına ve sinir liflerinin yetersiz rejenerasyonuna neden olur (78, 194–197). Süperoksitler, hidrojen peroksit ve nitrik oksit, normal fizyoloji için gerekli olan üç serbest ROS'tur, ancak hücre içi mitokondriyal membran potansiyelinin hiperpolarizasyonu ile hücre içinde aşırı ROS birikimi, sitokrom C'nin salınması ve mitokondriyalden kaspaz-9/3 aktive edebilen diğer düzenleyici proteinler hücre apoptozisine neden olur (56). Primer nöronların 45mM düzeyinde YG'ye maruz kalması ROS'nin oluşumunu hızlandırarak önce mitokondrial membran hiperpolarizasyonuna sonra mitokondrial membran depolarizasyonuna, mitokondrial disfonksiyona, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonu ile nöronal apoptoza sebep olmaktadır (56). Bu çalışmada elde ettiğimiz verilere göre DKG nöronları 24 saat YG'ye maruz bırakıldığında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma olduğu bulunmuştur.

Başlangıçta, dolaşımdaki HN seviyesi, yaşlı sıçan modellerinde artan bir yaşam süresi ile ilişkilendirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarla, HN'nin ömrü, metabolik olayları kontrol etmek için karaciğer, böbrek ve kalp dahil olmak üzere çeşitli organlarda apoptozis ve oksidatif strese kadar değişen bir dizi biyolojik aktiviteye harcandığı görülmüştür(198). Ortaya çıkan kanıtlar, HN ve analoglarının

(HN-S14G) Alzheimer hastalığı, yaşa bağlı hastalık, kanser, DM ve Creutzfeldt-Jakob hastalığı dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel terapötik hedefler olarak araştırıldığını ileri sürdü (165). Sistemik HN uygulamasının obez olmayan diyabetik farelerde β hücre apoptozu ve β hücre enfeksiyonunu inhibe ettiğini ve diyabetin patolojik ilerlemesini geciktirdiği gösterilmiştir (143). HN'nin glukoz toleransını etkin bir şekilde kontrol ettiğini, obez olmayan diyabetik farelerde diyabetin başlamasını 20 hafta boyunca geciktirdiğini ve sitokin tarafından indüklenen *in vitro* β hücrelerinde apoptozu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (168). Muzumdar ve ark., HN'nin intraserebroventriküler uygulamasının, karaciğer dahil olmak üzere farklı vücut organlarında insülin duyarlılığını önemli ölçüde desteklediğini ve bunun da yağ asidi metabolizmasını ve Akt sinyal yolunu indükleyerek hepatik glukoz üretiminin azalmasına neden olduğunu bildirmiştir (146). Etki mekanizmasının değerlendirilmesi, HN'nin insülin duyarlılaştırıcı etkisi için hipotalamik STAT aktivasyonunun gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Hipotalamusta STAT sinyalizasyonu ve aktivasyonunun DM tedavisinde merkezi rol oynadığı iyi bilinmektedir (146, 168, 199).

Yapılan çalışmalarla tutarlı bir şekilde bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular HN'nin DN'nin *in vitro* modelinde nöroprotektif bir etkisi olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte bilindiği kadarıyla bu çalışma ile ilk defa HN'nin nöroprotektif etkisi 1-2 günlük sıçanlardan elde edilen DKG nöronlarının 24 saat YG'ye maruz bırakılarak oluşturulan DN'nin *in vitro* modelinde gösterilmiştir. Farklı kontrasyonlarda (10 nM, 30 nM, 100 nM ve 300 nM) HN uygulaması 24 saat YG'ye maruz bırakılan DKG nöronlarına uygulandığında tüm dozlarda doz bağımlı

olarak hücre canlılığını koruduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve HN'nin etkin dozunun belirlenmesi için logDoz-Yanıt analizi yapıldığında EC₅₀ değeri 20 nM olarak belirlenmiştir. Ayrıca HN'nin DN'nin *in vitro* modelinde yolak üzerinden hücre canlılığına etkisi değerlendirildiğinde MTT testinden elde edilen bulgulara göre HN'nin JAK2/STAT3 yolağı üzerinden etki ettiği bulunmuştur.

Özetle, bu çalışmanın sonuçları ilk kez HN'nin DN'nin neden olduğu apoptotik süreçler ve hücre sağkalımı üzerine DN'nin *in vivo* ve *in vitro* modellerinde antiapoptotik ve nöroprotektif bir etki uyguladığını göstermektedir. DN'nin *in vivo* modelinde 15 gün boyunca kronik HN uygulaması serum kaspaz 3 ve serum kaspaz 9 seviyelerini önemli ölçüde azaltarak antiapoptotik bir etki göstermektedir. DN'nin *in vitro* modelinde HN'nin hücre canlılığı üzerine nöroprotektif bir etkisi olduğu ve bu etkiyi JAK2/STAT3 aracılığı ile yaptığı bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışma DM'nin uzun süreli ve en yaygın mikrovasküler komplikasyonu olan DN'nin önlenmesinde ve tedavisinde HN'nin teröpatik bir aday olabileceğini düşündüren kritik ön kanıtlar sunmaktadır.

DN, dünya genelinde hastaların yaşam kalitelerini olumsuz yönde etkileyen kesin bir tedavisi bulunmayan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bazı semptomatik tedaviler, nöropatik ağrıyı azaltmak için bir şekilde etkilidir ancak DN'nin ilerlemesini durdurmaz, bu nedenle DN için terapötik stratejiler geliştirmek önemlidir. DM'nin önemli bir komplikasyonu olan DN'nin önlenmesinde ve tedavisinde terapötik bir aday olarak kullanılabilecek olan HN'nin rollerinin daha detaylı araştırılması ve mekanizmalarının aydınlatılması önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Ceriello A, Monnier L, Owens D. Glycaemic variability in diabetes: clinical and therapeutic implications. *The Lancet Diabetes and Endocrinology* 2019; 7(3): 221–30.
2. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014; 37(1): S81–90.
3. IDF Diabetes Atlas 10th edition. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition> 27.04.2022.
4. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106(2): 165–9.
5. Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *Journal of Diabetes Investigation* 2013; 4(6): 511–6.
6. Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum* 2004; 17(3): 183–90.
7. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2016; 24(5): 547–53.
8. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *The Lancet* 2014; 383(9911): 69–82.
9. Craig ME, Jefferies C, Dabelea D, et al. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes* 2014; 15(S20): 4–17.
10. Phillips JM, Parish NM, Bland C, et al. Type 1 Diabetes Development Requires Both CD4+ and CD8+ T cells and Can Be Reversed by Non-Depleting Antibodies Targeting Both T Cell Populations. *The Review of Diabetic Studies* 2009; 6(2): 97–103.
11. Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature* 2019; 576(7785): 51–60.
12. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1999; 48(5): 643–8.
13. Gregg EW, Li Y, Wang J, et al. Changes in Diabetes-Related Complications in the United States, 1990–2010. *New England Journal of Medicine* 2014; 370(16): 1514–23.
14. Merlotti C, Morabito A, Pontiroli AE. Prevention of type 2 diabetes; a systematic review and meta-analysis of different intervention strategies. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2014; 16(8): 719–27.
15. Orozco LJ, Buchleitner AM, Gimenez-Perez G, et al. Exercise or exercise and diet for preventing type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008.
16. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* 2018; 41(1): S13–27.
17. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2019; 157: 107843.

18. Plows J, Stanley J, Baker P, Reynolds C, Vickers M. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(11): 3342.
19. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews* 2013; 93(1): 137–88.
20. Rewers A. Acute Metabolic Complications in Diabetes. In Cowie CC, Casagrande SS, Menke A, et al. (Editors). *Diabetes in America*. 3rd edition, 2018: Chapter 17.
21. Hyperglycemic Crises in Patients With Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2001; 24(11): 1988–1996.
22. Cryer PE. Hypoglycemia in diabetes: pathophysiological mechanisms and diurnal variation. *Progress in Brain Research* 2006; 153: 361–365.
23. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2021. *Diabetes Care* 2021; 44(1): 15–33.
24. Gregg EW, Sattar N, Ali MK. The changing face of diabetes complications. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2016; 4(6): 537–547.
25. Boyle PJ. Diabetes Mellitus and Macrovascular Disease: Mechanisms and Mediators. *The American Journal of Medicine* 2007; 120(9): 12–17.
26. Ceriello A. Hyperglycaemia and the vessel wall: the pathophysiological aspects on the atherosclerotic burden in patients with diabetes. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 2010; 17: 15–19.
27. Giacco F, Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research* 2010; 107(9): 1058–1070.
28. Hassan RH. Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. *World Journal of Diabetes* 2014; 5(3): 244.
29. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 212(2): 167–178.
30. Nguyen D v., Shaw LC, Grant MB. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Frontiers in Endocrinology* 2012; 3.
31. Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A “glycoxidation-centric” point of view. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2013; 23(10): 913–919.
32. Casellini CM, Vinik AI. Clinical Manifestations and Current Treatment options for Diabetic Neuropathies. *Endocrine Practice* 2007; 13(5): 550–566.
33. Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: Mechanisms to management. *Pharmacology & Therapeutics* 2008; 120(1): 1–34.
34. Vinik AI, Mehrabyan A. Diabetic neuropathies. *Medical Clinics of North America* 2004; 88(4): 947–999.
35. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 2014; 18(1): 1.

36. Padilla A, Descorbeth M, Almeyda AL, Payne K, de Leon M. Hyperglycemia magnifies Schwann cell dysfunction and cell death triggered by PA-induced lipotoxicity. *Brain Research* 2011; 1370: 64–79.
37. Legrand-Poels S, Esser N, L’homme L, et al. Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochemical Pharmacology* 2014; 92(1): 131–41.
38. Jang ER, Lee CS. 7-Ketocholesterol induces apoptosis in differentiated PC12 cells via reactive oxygen species-dependent activation of NF- κ B and Akt pathways. *Neurochemistry International* 2011; 58(1): 52–59.
39. Vincent AM, Hayes JM, McLean LL, et al. Dyslipidemia-Induced Neuropathy in Mice. *Diabetes* 2009; 58(10): 2376–2385.
40. Nowicki M, Müller K, Serke H, et al. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL)-induced cell death in dorsal root ganglion cell cultures depends not on the lectin-like oxLDL receptor-1 but on the toll-like receptor-4. *Journal of Neuroscience Research* 2010; 88(2): 403–412.
41. Vincent AM, Perrone L, Sullivan KA, et al. Receptor for Advanced Glycation End Products Activation Injures Primary Sensory Neurons via Oxidative Stress. *Endocrinology* 2007; 148(2): 548–558.
42. Cotter MA, Cameron NE. Effect of the NAD(P)H oxidase inhibitor, apocynin, on peripheral nerve perfusion and function in diabetic rats. *Life Sciences* 2003; 73(14): 1813–1824.
43. Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Neuronal Death. *Journal of Neurochemistry* 2002; 72(6): 2601–2609.
44. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, et al. Diabetic neuropathy. *Nature Reviews Disease Primers* 2019; 5(1): 41.
45. Yagihashi S, Mizukami H, Sugimoto K. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *Journal of Diabetes Investigation* 2011; 2(1): 18–32.
46. Jakobsen J, Lundbaek K. Neuropathy in experimental diabetes: an animal model. *BMJ* 1976; 2(6030): 278–279.
47. Devor M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain* 1999; 82(1): 27–35.
48. Guisado R, Arief AI. Neurologic manifestations of diabetic comas: Correlation with biochemical alterations in the brain. *Metabolism* 1975; 24(5): 665–679.
49. Segal MB. Extracellular and cerebrospinal fluids. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1993; 16(4): 617–638.
50. Vyklický L, Knotková-Urbancová H. Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res.* 1996; 45(1): 1–9.
51. Passmore GM. Dorsal root ganglion neurones in culture: A model system for identifying novel analgesic targets? *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2005; 51(3): 201–208.
52. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons Undergo Apoptosis in Animal and Cell Culture Models of Diabetes. *Neurobiology of Disease* 1999; 6(5): 347–363.

53. Burchiel KJ. Spontaneous impulse generation in normal and denervated dorsal root ganglia: Sensitivity to alpha-adrenergic stimulation and hypoxia. *Experimental Neurology* 1984; 85(2): 257–272.
54. Devor M, Janig W, Michaelis M. Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *Journal of Neurophysiology* 1994; 71(1): 38–47.
55. Dichter MA, Fischbach GD. The action potential of chick dorsal root ganglion neurones maintained in cell culture. *The Journal of Physiology* 1977; 267(2): 281–298.
56. Russell JW, Golovoy D, Vincent AM, et al. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *The FASEB Journal*. 2002; 16(13): 1738–1748.
57. Viader A, Sasaki Y, Kim S, et al. Aberrant Schwann Cell Lipid Metabolism Linked to Mitochondrial Deficits Leads to Axon Degeneration and Neuropathy. *Neuron* 2013; 77(5): 886–898.
58. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nature Reviews Neurology* 2011; 7(10): 573–583.
59. Vincent AM, Kato K, McLean LL, Soules ME, Feldman EL. Sensory Neurons and Schwann Cells Respond to Oxidative Stress by Increasing Antioxidant Defense Mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling* 2009; 11(3): 425–438.
60. Russell JW, Berent-Spillson A, Vincent AM, et al. Oxidative injury and neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurobiology of Disease* 2008; 30(3): 420–429.
61. Vincent A, Edwards J, Sadidi M, Feldman E. The Antioxidant Response as a Drug Target in Diabetic Neuropathy. *Current Drug Targets* 2008; 9(1): 94–100.
62. Vincent AM, Calabek B, Roberts L, Feldman EL. Biology of diabetic neuropathy. *Handbook of clinical neurology* 2013; 115: 591–606.
63. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews* 2004; 25(4): 612–628.
64. Fernyhough P. Mitochondrial Dysfunction in Diabetic Neuropathy: a Series of Unfortunate Metabolic Events. *Current Diabetes Reports* 2015; 15(11): 89.
65. Fernyhough P, McGavock J. Mechanisms of disease: mitochondrial dysfunction in sensory neuropathy and other complications in diabetes. *Handbook of clinical neurology* 2014; (126): 353–377.
66. Chowdhury SKR, Smith DR, Fernyhough P. The role of aberrant mitochondrial bioenergetics in diabetic neuropathy. *Neurobiology of Disease* 2013; 51: 56–65.
67. Rumora AE, Lentz SI, Hinder LM, Jackson SW, Valesano A, Levinson GE, et al. Dyslipidemia impairs mitochondrial trafficking and function in sensory neurons. *The FASEB Journal* 2018; 32(1): 195–207.
68. Arndt T, Jörns A, Weiss H, et al. A Variable CD3+ T-Cell Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Associated with Type 1 Diabetes Mellitus Development in the LEW.1AR1-iddm Rat. *PLoS ONE* 2013; 8(5): e64305.

69. Roep BO, Atkinson M. Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 1. In support of this proposal. *Diabetologia* 2004; 47(10): 1650–1656.
70. Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative Injury and Apoptosis of Dorsal Root Ganglion Neurons in Chronic Experimental Diabetic Neuropathy. *Diabetes* 2003; 52(1): 165–171.
71. Fernyhough P, Gallagher A, Averill SA, et al. Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes* 1999; 48(4): 881–889.
72. Uehara K, Yamagishi SI, Otsuki S, Chin S, Yagihashi S. Effects of Polyol Pathway Hyperactivity on Protein Kinase C Activity, Nociceptive Peptide Expression, and Neuronal Structure in Dorsal Root Ganglia in Diabetic Mice. *Diabetes* 2004; 53(12): 3239–3247.
73. Kennedy JM, Zochodne DW. Experimental Diabetic Neuropathy With Spontaneous Recovery. *Diabetes* 2005; 54(3): 830–837.
74. Nakamura J, Hamada Y, Sakakibara F, et al. Physiological and morphometric analyses of neuropathy in sucrose-fed OLETF rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2001; 51(1): 9–20.
75. Kamenov Z, Higashino H, Todorova M, Kajimoto H, Suzuki A. Physiological characteristics of diabetic neuropathy in sucrose-fed otsuka long-evans tokushima fatty (OLETF) rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 2006; 28(1): 13.
76. Elias KA, Cronin MJ, Stewart TA, Carlsen RC. Peripheral neuropathy in transgenic diabetic mice: restoration of C-fiber function with human recombinant nerve growth factor. *Diabetes* 1998; 47(10): 1637–1642.
77. Song Z. Transgenic mice overexpressing aldose reductase in Schwann cells show more severe nerve conduction velocity deficit and oxidative stress under hyperglycemic stress. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2003; 23(4): 638–647.
78. Leininger GM, Backus C, Sastry AM, et al. Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiology of Disease* 2006; 23(1): 11–22.
79. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *European Journal of Pharmacology* 1999; 375(1–3): 217–23.
80. Vincent AM, Mclean LL, Backus C, Feldman EL. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *The FASEB Journal*. 2005 Apr 27;19(6):1–24.
81. VINCENT AM, BROWNLEE M, RUSSELL JW. Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Diabetic Neuropathy. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 959(1): 368–383.
82. Vincent AM, Stevens MJ, Backus C, Mclean LL, Feldman EL. Cell Culture Modeling to Test Therapies Against Hyperglycemia-Mediated Oxidative Stress and Injury. *Antioxidants & Redox Signaling* 2005; 7(11–12): 1494–1506.

83. Vincent AM, Olzmann JA, Brownlee M, Sivitz WI, Russell JW. Uncoupling Proteins Prevent Glucose-Induced Neuronal Oxidative Stress and Programmed Cell Death. *Diabetes*; 53(3): 726–734.
84. Guleria RS, Pan J, DiPette D, Singh US. Hyperglycemia Inhibits Retinoic Acid-Induced Activation of Rac1, Prevents Differentiation of Cortical Neurons, and Causes Oxidative Stress in a Rat Model of Diabetic Pregnancy. *Diabetes* 2006; 55(12): 3326–3334.
85. Leininger GM, Russell JW, van Golen CM, Berent A, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I regulates glucose-induced mitochondrial depolarization and apoptosis in human neuroblastoma. *Cell Death & Differentiation* 2004; 11(8): 885–896.
86. Kumar S, Singh R, Vasudeva N, Sharma S. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. *Cardiovascular Diabetology* 2012; 11(1): 9.
87. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 2009; 23(2): 245–258.
88. Vieira, Souto, Sánchez-López, Machado, Severino, Jose, et al. Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome—Strategies for In Vivo Administration: Part-II. *Journal of Clinical Medicine* 2019; 8(9): 1332.
89. Peltonen L, McKusick VA. Dissecting Human Disease in the Postgenomic Era. *Science* (1979) 2001; 291(5507): 1224–9.
90. Heydemann A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research* 2016; 2016: 1–14.
91. Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med* 2004; 54(3): 252–257.
92. Ighodaro OM, Adeosun AM, Akinloye OA. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina (Kaunas)* 2017; 53(6): 365–374.
93. KATOH M, SAKURAI K, FUJIMOTO Y. Alloxan Radical-Induced Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction System of Alloxan with Ascorbate. *YAKUGAKU ZASSHI* 2002; 122(10): 831–839.
94. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001; 50(6): 537–546.
95. Eileen Dolan M. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 26(2–3): 105–118.
96. King AJF. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol.* 2012; 166(3): 877–894.
97. Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2015; 8: 181–188.

98. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2013; 12(1): 60.
99. Graham ML, Janecek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Schuurman HJ. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med.* 2011; 61(4): 356–360.
100. Ventura-Sobrevilla J, Boone-Villa VD, Aguilar CN, et al. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proc West Pharmacol Soc.* 2011; 54: 5–9.
101. Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, et al. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *Transplantation* 2006; 81(1): 36–45.
102. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000; 43(12): 1528–1533.
103. Paik SG, Fleischer N, Shin SI. Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1980; 77(10): 6129–6133.
104. Ellis TM, Atkinson MA. The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nat Med.* 1996; 2(2): 148–153.
105. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology* 2015; 70(1).
106. Thayer TC, Wilson SB, Mathews CE. Use of Nonobese Diabetic Mice to Understand Human Type 1 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2010; 39(3): 541–561.
107. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, et al. Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2005; 54(2): 97–107.
108. Yamakawa I, Kojima H, Terashima T, et al. Inactivation of TNF- α ameliorates diabetic neuropathy in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2011; 301(5): E844–852.
109. Ma W, Chabot JG, Vercauteren F, Quirion R. Injured nerve-derived COX2/PGE2 contributes to the maintenance of neuropathic pain in aged rats. *Neurobiology of Aging* 2010; 31(7): 1227–1237.
110. McHugh JM, McHugh WB. Diabetes and Peripheral Sensory Neurons. *AACN Clinical Issues: Advanced Practice in Acute and Critical Care* 2004; 15(1): 136–149.
111. Hashimoto Y, Ito Y, Niikura T, et al. Mechanisms of Neuroprotection by a Novel Rescue Factor Humanin from Swedish Mutant Amyloid Precursor Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 283(2): 460–468.

112. Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, et al. Detailed Characterization of Neuroprotection by a Rescue Factor Humanin against Various Alzheimer's Disease-Relevant Insults. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21(23): 9235–9245.
113. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98(11): 6336–6341.
114. Zhang X, Urbietta-Caceres VH, Eirin A, et al. Humanin prevents intra-renal microvascular remodeling and inflammation in hypercholesterolemic ApoE deficient mice. *Life Sciences* 2012; 91(5–6): 199–206.
115. Muzumdar RH, Huffman DM, Calvert JW, Jha S, Weinberg Y, Cui L, et al. Acute Humanin Therapy Attenuates Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2010; 30(10): 1940–1948.
116. Moretti E, Giannerini V, Rossini L, et al. Immunolocalization of humanin in human sperm and testis. *Fertility and Sterility* 2010; 94(7): 2888–2890.
117. Brookmeyer R, Gray S, Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *American Journal of Public Health* 1998; 88(9): 1337–1342.
118. Colón E, Strand ML, Carlsson-Skwirut C, et al. Anti-apoptotic factor humanin is expressed in the testis and prevents cell-death in leydig cells during the first wave of spermatogenesis. *Journal of Cellular Physiology* 2006; 208(2): 373–385.
119. Chin YP, Keni J, Wan J, et al. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Humanin and Its Analogues in Male Rodents. *Endocrinology* 2013; 154(10): 3739–3744.
120. Hashimoto Y, Kurita M, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. Humanin Inhibits Neuronal Cell Death by Interacting with a Cytokine Receptor Complex or Complexes Involving CNTF Receptor α /WSX-1/gp130. *Molecular Biology of the Cell* 2009; 20(12): 2864–2873.
121. Widmer RJ, Flammer AJ, Herrmann J, et al. Circulating humanin levels are associated with preserved coronary endothelial function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2013; 304(3): H393–397.
122. Zuccato CF, Asad AS, Nicola Candia AJ, et al. Mitochondrial-derived peptide humanin as therapeutic target in cancer and degenerative diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2019; 23(2): 117–126.
123. Caricasole A, Bruno V, Cappuccio I, et al. A novel rat gene encoding a Humanin-like peptide endowed with broad neuroprotective activity. *The FASEB Journal* 2002; 16(10): 1331–1333.
124. Guo B, Zhai D, Cabezas E, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 2003; 423(6938): 456–61.
125. Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2013; 24(5): 222–228.
126. Xiao J, Kim SJ, Cohen P, Yen K. Humanin: Functional Interfaces with IGF-I. *Growth Hormone & IGF Research* 2016; 29: 21–27.

127. Zapala B, Kaczyński Ł, Kieć-Wilk B, et al. Humanins, the neuroprotective and cytoprotective peptides with antiapoptotic and anti-inflammatory properties. *Pharmacological Reports* 2010; 62(5): 767–777.
128. Popov LD. Mitochondrial peptides—appropriate options for therapeutic exploitation. *Cell and Tissue Research* 2019; 377(2): 161–165.
129. S. Logan I. Pseudogenization of the Humanin gene is common in the mitochondrial DNA of many vertebrates. *Zool Res.* 2017; 38(4): 198–202.
130. Bodzioch M, Lapicka-Bodzioch K, Zapala B, et al. Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms. *Genomics* 2009; 94(4): 247–256.
131. Benaki D, Zikos C, Evangelou A, et al. Solution structure of humanin, a peptide against Alzheimer's disease-related neurotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 329(1): 152–160.
132. Gong Z, Tas E, Muzumdar R. Humanin and Age-Related Diseases: A New Link? *Frontiers in Endocrinology* 2014; 5.
133. Hashimoto Y, Nawa M, Kurita M, et al. Secreted calmodulin-like skin protein inhibits neuronal death in cell-based Alzheimer's disease models via the heterotrimeric Humanin receptor. *Cell Death & Disease* 2013; 4(3): e555–e555.
134. Nawaz MI, Rezzola S, Tobia C, et al. d-Peptide analogues of Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe-COOH induce neovascularization via endothelial N-formyl peptide receptor 3. *Angiogenesis* 2020; 23(3): 357–369.
135. Matsuoka M, Hashimoto Y. Humanin and the Receptors for Humanin. *Molecular Neurobiology* 2010; 41(1): 22–28.
136. Gottardo MF, Pidre ML, Zuccato C, et al. Baculovirus-based gene silencing of Humanin for the treatment of pituitary tumors. *Apoptosis* 2018; 23(2): 143–151.
137. Gottardo MF, Moreno Ayala M, Ferraris J, et al. Humanin inhibits apoptosis in pituitary tumor cells through several signaling pathways including NF-κB activation. *Journal of Cell Communication and Signaling* 2017; 11(4): 329–340.
138. Paharkova V, Alvarez G, Nakamura H, Cohen P, Lee KW. Rat Humanin is encoded and translated in mitochondria and is localized to the mitochondrial compartment where it regulates ROS production. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2015; 413: 96–100.
139. Maftai M, Tian X, Manea M, et al. Interaction structure of the complex between neuroprotective factor humanin and Alzheimer's β-amyloid peptide revealed by affinity mass spectrometry and molecular modeling. *Journal of Peptide Science* 2012; 18(6): 373–382.
140. Wisniewski T, Goñi F. Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. *Neuron* 2015; 85(6): 1162–1176.
141. Yuan L, Liu XJ, Han WN, et al. [Gly14]-Humanin Protects Against Amyloid β Peptide-Induced Impairment of Spatial Learning and Memory in Rats. *Neuroscience Bulletin* 2016; 32(4): 374–382.

142. Liu C, Gidlund EK, Witasp A, et al. Reduced skeletal muscle expression of mitochondrial-derived peptides humanin and MOTS-C and Nrf2 in chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2019; 317(5): 1122–1131.
143. Kwon C, Sun JL, Jeong JH, Jung TW. Humanin attenuates palmitate-induced hepatic lipid accumulation and insulin resistance via AMPK-mediated suppression of the mTOR pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2020; 526(2): 539–545.
144. Charunontakorn ST, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Potential Roles of Humanin on Apoptosis in the Heart. *Cardiovascular Therapeutics* 2016; 34(2): 107–114.
145. Peng T, Wan W, Wang J, et al. The Neurovascular Protective Effect of S14G-Humanin in a Murine MCAO Model and Brain Endothelial Cells. *IUBMB Life* 2018; 70(7): 691–699.
146. Muzumdar RH, Huffman DM, Atzmon G, et al. Humanin: A Novel Central Regulator of Peripheral Insulin Action. *PLoS ONE* 2009; 4(7): e6334.
147. Klein LE, Cui L, Gong Z, Su K, Muzumdar R. A humanin analog decreases oxidative stress and preserves mitochondrial integrity in cardiac myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; 440(2): 197–203.
148. Fraser C, Ryan J, Sarosiek K. BH3 Profiling: A Functional Assay to Measure Apoptotic Priming and Dependencies. In: Gavathiotis E. (Editors). *Methods in Molecular Biology. BCL-2 Family Proteins*. Humana Press, New York 2019: 61–76.
149. Grilo AL, Mantalaris A. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances* 2019; 37(3): 459–475.
150. Moldoveanu T, Czabotar PE. BAX, BAK, and BOK: A Coming of Age for the BCL-2 Family Effector Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2020; 12(4): a036319.
151. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death & Disease* 2019; 10(3): 177.
152. Certo M, Moore VDG, Nishino M, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 2006; 9(5): 351–365.
153. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2019; 20(3): 175–193.
154. Knight T, Luedtke D, Edwards H, Taub JW, Ge Y. A delicate balance – The BCL-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics. *Biochemical Pharmacology* 2019; 162: 250–261.
155. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15(1): 49–63.
156. Adams JM. BAX and BAK become killers without a BH3 trigger. *Cell Research*. 2019; 29(12): 967–968.
157. Zaman F, Zhao Y, Calvin B, et al. Humanin is a novel regulator of Hedgehog signaling and prevents glucocorticoid-induced bone growth impairment. *The FASEB Journal* 2019; 33(4): 4962–4974.

158. Ma Z wei, Liu D xiang. Humanin decreases mitochondrial membrane permeability by inhibiting the membrane association and oligomerization of Bax and Bid proteins. *Acta Pharmacologica Sinica* 2018; 39(6): 1012–1021.
159. Morris DL, Kastner DW, Johnson S, et al. Humanin induces conformational changes in the apoptosis regulator BAX and sequesters it into fibers, preventing mitochondrial outer-membrane permeabilization. *Journal of Biological Chemistry* 2019; 294(50): 19055–19065.
160. Gurunathan, Jeyaraj, Kang, Kim. Mitochondrial Peptide Humanin Protects Silver Nanoparticles-Induced Neurotoxicity in Human Neuroblastoma Cancer Cells (SH-SY5Y). *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(18): 4439.
161. Zhai D, Luciano F, Zhu X, et al. Humanin Binds and Nullifies Bid Activity by Blocking Its Activation of Bax and Bak. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(16): 15815–15824.
162. Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO, Wang MJ. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *Journal of Cell Death* 2016; 9: JCD.S39824.
163. Kim SJ, Guerrero N, Wassef G, et al. The mitochondrial-derived peptide humanin activates the ERK1/2, AKT, and STAT3 signaling pathways and has age-dependent signaling differences in the hippocampus. *Oncotarget* 2016; 7(30): 46899–46912.
164. Kang N, Kim KW, Shin DM. Humanin suppresses receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-induced osteoclast differentiation *via* AMP-activated protein kinase activation. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 2019; 23(5): 411.
165. Kuliawat R, Klein L, Gong Z, et al. Potent humanin analog increases glucose-stimulated insulin secretion through enhanced metabolism in the β cell. *The FASEB Journal* 2013; 27(12): 4890–4898.
166. Ma Y, Li S, Wei X, et al. Comparison of serum concentrations of humanin in women with and without gestational diabetes mellitus. *Gynecological Endocrinology* 2018; 34(12): 1064–1067.
167. Frank JA, Broichhagen J, Yushchenko DA, et al. Optical tools for understanding the complexity of β -cell signalling and insulin release. *Nature Reviews Endocrinology* 2018; 14(12): 721–737.
168. Hoang PT, Park P, Cobb LJ, et al. The neurosurvival factor Humanin inhibits β -cell apoptosis via signal transducer and activator of transcription 3 activation and delays and ameliorates diabetes in nonobese diabetic mice. *Metabolism* 2010; 59(3): 343–349.
169. Wang X, Wu Z, He Y, et al. Humanin prevents high glucose-induced monocyte adhesion to endothelial cells by targeting KLF2. *Molecular Immunology* 2018; 101: 245–250.
170. 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. *Developmental Brain Research* 1985; 22(1): 55–65.
171. Sloan G, Shillo P, Selvarajah D, et al. A new look at painful diabetic neuropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2018; 144: 177–191.
172. O'Brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse Models of Diabetic Neuropathy. *ILAR Journal* 2014; 54(3): 259–272.

173. Guo C, Quobadari A, Shangguan Y, et al. Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis in situ in the rat. *Neurogastroenterology and Motility* 2004; 16(3): 335–345.
174. Hosseini A, Abdollahi M, Hassanzadeh G, et al. Protective Effect of Magnesium-25 Carrying Porphyrin-Fullerene Nanoparticles on Degeneration of Dorsal Root Ganglion Neurons and Motor Function in Experimental Diabetic Neuropathy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2011; 109(5): 381–386.
175. Ghaznavi H, Najafi R, Mehrzadi S, et al. Neuro-protective effects of cerium and yttrium oxide nanoparticles on high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in undifferentiated PC12 cells. *Neurological Research* 2015; 37(7): 624–632.
176. Serra-Prez A, Verdaguer E, Planas AM, Santaluca T. Glucose promotes caspase-dependent delayed cell death after a transient episode of oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry* 2008; 106(3): 1237–1247.
177. 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. *Neurotoxicity Research* 2014; 25(1): 110–123.
178. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* (1979) 1998; 281(5381): 1312–1316.
179. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine* 1997; 3(6): 614–620.
180. Zhao J, Zeng Y, Wang Y, et al. Humanin protects cortical neurons from calyculin A-induced neurotoxicities by increasing PP2A activity and SOD. *International Journal of Neuroscience* 2021; 131(6): 527–535.
181. Sreekumar PG, Ishikawa K, Spee C, et al. The Mitochondrial-Derived Peptide Humanin Protects RPE Cells From Oxidative Stress, Senescence, and Mitochondrial Dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2016; 57(3): 1238.
182. Guo F, Jing W, Ma CG, et al. [Gly¹⁴]-humanin rescues long-term potentiation from amyloid β protein-induced impairment in the rat hippocampal CA1 region in vivo. *Synapse* 2010; 64(1): 83–91.
183. Jensen TS, Baron R. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. *Pain* 2003; 102(1): 1–8.
184. Leininger GM, Edwards JL, Lipshaw MJ, Feldman EL. Mechanisms of Disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nature Clinical Practice Neurology* 2006; 2(11): 620–8.
185. Yerra VG, Kalvala AK, Kumar A. Isoliquiritigenin reduces oxidative damage and alleviates mitochondrial impairment by SIRT1 activation in experimental diabetic neuropathy. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2017; 47: 41–52.
186. Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW. Early Painful Diabetic Neuropathy Is Associated with Differential Changes in Tetrodotoxin-sensitive and -resistant Sodium

- Channels in Dorsal Root Ganglion Neurons in the Rat. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(28): 29341–29350.
187. 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. *The AAPS Journal* 2008; 10(2): 289–299.
 188. King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochemistry and Cell Biology* 2004; 122(4): 333–338.
 189. Kim YS, Kwon JS, Hong MH, et al. Restoration of angiogenic capacity of diabetes-insulted mesenchymal stem cells by oxytocin. *BMC Cell Biology* 2013; 14(1): 38.
 190. Peng C, Ma J, Gao X, et al. High Glucose Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiac Microvascular Endothelial Cells Are Regulated by FoxO3a. *PLoS ONE* 2013; 8(11): e79739.
 191. Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2006; 22(4): 257–273.
 192. Berent-Spillson A, Russell JW. Metabotropic glutamate receptor 3 protects neurons from glucose-induced oxidative injury by increasing intracellular glutathione concentration. *Journal of Neurochemistry* 2007; 101(2): 342–354.
 193. Vincent AM, Edwards JL, McLean LL, et al. Mitochondrial biogenesis and fission in axons in cell culture and animal models of diabetic neuropathy. *Acta Neuropathologica* 2010; 120(4): 477–489.
 194. Zochodne DW. Does diabetes target ganglion neurones?: Progressive sensory neurone involvement in long-term experimental diabetes. *Brain* 2001; 124(11): 2319–2334.
 195. Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 2000; 49(11): 1932–1938.
 196. Kamiya H, Zhangm W, Sima AAF. 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): 3288–3295.
 197. Cheng C, Zochodne DW. Sensory Neurons With Activated Caspase-3 Survive Long-Term Experimental Diabetes. *Diabetes* 2003; 52(9): 2363–2371.
 198. Okada AK, Teranishi K, Lobo F, et al. The Mitochondrial-Derived Peptides, HumaninS14G and Small Humanin-like Peptide 2, Exhibit Chaperone-like Activity. *Scientific Reports* 2017; 7(1): 7802.
 199. Kim SJ, Xiao J, Wan J, Cohen P, Yen K. Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism. *The Journal of Physiology* 2017; 595(21): 6613–6621.

8. ÖZGEÇMİŞ

MUHAMMED MİRAC KELEŞTEMUR

Öğrenim Bilgisi

Yüksek Lisans 2019-2022	FIRAT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ/BİYOFİZİK (YL) (TEZLİ) (TIP)
Lisans 2017-2018	UNIVERSITY OF MARIBOR FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMPUTER SCIENCE (ERASMUS+ PROGRAMME)
Lisans 2013-2019	FIRAT ÜNİVERSİTESİ MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ/ELEKTRİK-ELEKTRONİK MÜHENDİSLİĞİ PR.

İş Deneyimi:

Araştırma Görevlisi 2021-	İSTANBUL AREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ/BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
------------------------------	--

Yabancı Diller:

- İngilizce (Okuma: Çok İyi, Yazma: İyi, Dinleme: Çok İyi, Konuşma: İyi)

Sertifikalar:

- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (ELAZIĞ-2019)

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

- Türk Biyofizik Derneği (2021)

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Humaninin Akut ve Nöropatik Ağrı Üzerine Etkisinin Davranışsal Ağrı ve Duyusal Nöron Nosisepsiyon Modelinde İncelenmesi, 1001-Araştırma, Burslu, SBAG-Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, (30.09.2020-20.09.2021)

Eserler

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Ozcan S, Kelestemur MM, Hekim MG, et al. Asprosin, a novel therapeutic candidate for painful neuropathy: an experimental study in mice. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2022; 1-11.
2. Hekim MG, Kelestemur MM, Gülcü BF, et al. Asprosin, a novel glucogenic adipokine: a potential therapeutic implication in diabetes mellitus. Archives of Physiology and Biochemistry 2021; 1-7

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

1. Bilgin B, Hekim MG, Bulut F, Kelestemur MM, Ulker N. Effects of Irisin on Ghrelin Levels in High-Fat Diet Induced Obese Female Rats. 4th International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society 2021; 111(1): 36-36.