

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYABET MODELİ OLUŞTURULMUŞ AGRP
TRANSGENİK FARELERDE SİSTEMİK APELİN
UYGULAMASININ İŞTAH DÜZENLENMESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

VOLKAN ADEM BİLGİN, M.D.

İSTANBUL-2022

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYABET MODELİ OLUŞTURULMUŞ AGRP
TRANSGENİK FARELERDE SİSTEMİK APELİN
UYGULAMASININ İŞTAH DÜZENLENMESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

VOLKAN ADEM BİLGİN, M.D.

DANIŞMAN
PROF. DR. BAYRAM YILMAZ

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program : Fizyoloji Doktora Programı

Tez Başlığı : Diyabet Modeli Oluşturulmuş AgRP Transgenik Farelerde Sistemik Apelin Uygulamasının İştah Düzenlenmesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Tez Sahibi : Volkan Adem Bilgin

Sınav Tarihi : 09/12/2022

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)
Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Bayram YILMAZ (Yeditepe Üniversitesi)
Tez danışmanı:	Prof. Dr. Bayram YILMAZ (Yeditepe Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Mehtap KAÇAR (Yeditepe Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Selim KUTLU (Necmettin Erbakan Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU (İnönü Üniversitesi)
Üye:	Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL (Yeditepe Üniversitesi)

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bayram Yılmaz

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

09/12/2022

Volkan Adem Bilgin

İTHAF

Canım kızım Mila'ma...

TEŞEKKÜR

İlk olarak, henüz doktora yapma fikri aklımda yokken yapmış olduğu motivasyon konuşmasıyla beni cesaretlendiren ve başlamamı sağlayan, sonrasında da tüm süreç boyunca desteklerini esirgemeyen çok değerli bilim insanı Prof. Dr. Bayram YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Kendisini geç de olsa tanımaktan çok mutluyum.

Sadece bir hoca değil bir abla gibi, bilgisi dışında dostluğundan da sürekli faydalandığım değerli büyüğüm Prof. Dr. Mehtap KAÇAR'a ve tanımaktan ve ders almaktan keyif aldığım Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL'a çok teşekkür ederim.

Sadece çalışma arkadaşı değil yıllar içerisinde abi kardeş olduğumuz çok değerli bilim insanları Dr. Sami AĞUŞ, Dr. Yavuz YAVUZ, Ar. Gör. Cihan Süleyman ERDOĞAN ve Ar. Gör. Buğra ÖZGÜN'e başta dostlukları ve tez süresince gösterdikleri destek adına çok teşekkür ederim. Değerli kardeşim Yunus KOSİF'e ve birlikte çalışmaktan çok mutlu olduğum değerli araştırma görevlileri Deniz Öykü ÖZEN, Özge BAŞER, Meltem YALÇIN, Zehra Yağmur EROL, Dr. Tuvana US, Habibe GÖREN ve Uğur KALKAN'a arkadaşlıklarından ve desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim. Şu an yurtdışında çalışmalarını sürdüren Ar. Gör. Cihan CİVAŞ'a teşekkür ederim.

Burada geçirdiğim süre zarfında dostluğunu ve desteğini her an hissettiğim Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR ve ekibindeki değerli arkadaşlarım Dr. Tuğçe ÖNEL, Ar. Gör. Ecem YILDIRIM'a teşekkür ederim. Sevgili iş arkadaşlarım, Dr. Erdem SÖZTUTAR, Prof. Dr. Soner DOĞAN, Dr. Vet. Engin SÜMER ve tüm YÜDETAM ekibine, Yasin DELİBAŞ'a ve enstitü sekreterimiz Hasan KOÇ'a ve ekibine teşekkür ederim.

Üzerimde emekleri çok olan sayın Prof. Dr. Selim KUTLU'ya, Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU'ya, Prof. Dr. Mustafa Özilgen'e, Prof. Dr. Halil Özcan GÜLÇÜR'e, Prof. Dr. İsmail KOÇAK'a ve Prof. Dr. Metin AKAY'a tüm katkıları için teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteklerini her zaman yüreğimde hissettiğim canım ailem, başta kardeşim Sezin BİLGİN, annem Nesrin BİLGİN, babam Mustafa BİLGİN ve anneannem Hatice ÜNAL'a ve son olarak da tüm doktora süresince çok fedakarlıkta bulunan canım eşim Şebnem BİLGİN ve bu süreçte dünyaya gelen ve bana uğur getiren her şeyim canım kızım Mila BİLGİN'e varlıkları için teşekkür ederim.

Volkan Adem BİLGİN

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ABSTRACT.....	xiii
ÖZET	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diyabet	3
2.1.1. Diyabet İçin Tanı Kriterleri	4
2.1.2. Diyabet Tipleri.....	5
2.2. Streptozotosin.....	9
2.2.1. STZ'nin Diyabetojenik Etkileri	10
2.2.2. Uygulama Öncesi STZ'nin Hazırlanması	11
2.3. Adipokinler	12
2.4. Apelin ve Reseptörü APJ	13
2.4.1. Yeni APJ Ligandı (Elabela/Toddler).....	14
2.4.2. Merkezi Sinir Sisteminde Apelin	15
2.4.3. Apelin, İnsülin Direnci ve Obezite	15

2.5. İştah ve Enerji Homeostazını Düzenleyen Hipotalamik Devreler	16
2.6. Apelin ile Besin Alımı Arasındaki İlişki.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Kullanılan Deney Hayvanı	20
3.2. Farelerin Üretim Stratejisi.....	20
3.2.1. Genotipleme	20
3.3. Cre Rekombinaz Bağımlı AAV Virüslerin İntrakraniyal Enjeksiyonu	22
3.4. Beyin Kesiti Hazırlanması	24
3.5. Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması.....	24
3.6. Beslenme Davranışı	25
3.7. Lokomotor Aktivite (Home Cage Activity).....	26
3.8. Kan Şekeri, Serum İnsülin, Trigliserit ve Kolesterol Seviyelerinin Belirlenmesi. 27	
3.9. İstatistiksel Analiz.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Farelerde Vücut Ağırlığı, Besin Alımı ve Kan Şekeri Ölçümleri.....	29
4.2. Apelin Uygulamasının Farelerde Vücut Ağırlığı, Besin Alımı ve Kan Şekeri Üzerindeki Etkileri	30
4.2. Apelinin Farelerde Kafes İçi Aktiviteye Olan Etkileri	31
4.3. Apelinin STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Fareler Üzerindeki Vücut Ağırlığı, Besin Alımı ve Kan Şekeri Seviyelerine Olası Etkileri	31
4.4. Apelinin STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Farelerde Kafes İçi Aktivite Üzerine Olası Etkileri.....	33
4.5. STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Farelere IP Olarak Uygulanan Apelinin Arkuat AgRP Nöronları Üzerindeki Elektrofizyolojik Etkileri	34
4.6. STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Farelere Farklı Doz Apelin Uygulanmasının Vücut Ağırlığı, Besin Alımı ve Kan Şekeri Seviyelerine Olan Etkileri	35

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
6. KAYNAKLAR	44
7. EKLER.....	71
7.1. Etik Kurul Onayı	71
7.2. Özgeçmiş.....	72



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Çocuklarda ve ergenlerde tip 1 ve tip 2 diabetes mellitusun özellikleri ⁹³	8
Tablo 2. Kullanılan Primer Dizileri.	21
Tablo 3. Kullanılan PZR protokolü.	21



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. AgRP-Cre farelerin PZR ile genotipleme sonucu temsili jel görüntüsü.	22
Şekil 2. Stereotaktik intrakraniyal AAV enjeksiyonu.	23
Şekil 3. Elektrofizyoloji düzeneği.	25
Şekil 4. Hayvanların yeme davranışı ve lokomotor aktivite takibi.	27
Şekil 5. (A) Set 1 deney planlaması, STZ uygulaması öncesi ve sonrası (B) vücut ağırlığı, (C) besin alımı ve (D) kan şekeri değerleri (* $p<0.05$ and ** $p<0.01$).	29
Şekil 6. (A) Set 2 deney planlaması, apelin uygulaması öncesi ve sonrası (B) vücut ağırlığı, (C) besin alımı ve (D) kan şekeri değerleri (* $p<0.05$ and ** $p<0.01$).	30
Şekil 7. Hayvanların Apelin öncesi ve sonrası kafes aktiviteleri (A) tüm kat edilen mesafe, (B) hızları ve (C) ısı haritaları.	31
Şekil 8. (A) Set 3 deney planlaması Diyabet indüksiyonu öncesi, sonrası ve apelin sonrası (B) vücut ağırlığı, (C) besin alımı ve (D) kan şekeri değerleri. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$).....	33
Şekil 9. Hayvanların kafes aktiviteleri. Hayvanların diyabet indüksiyonu öncesi ve Apelin sonrası (A) tüm kat edilen mesafe, (B) hızları ve (C) ısı haritaları.	33
Şekil 10. (A) Hipotalamus arkuat çekirdek GFP ile işaretlenmiş AgRP nöron görüntüsü (B) AgRP nöronlarından alınan elektrofizyoloji kayıt örnekleri (C) gruplardan alınan aksiyon potansiyel akım grafiği (* $p<0,05$, *** $p<0.001$ ve $p<0.0001$).	35
Şekil 11. (A) Set 4 deney planlaması. Deneklerin (B) günlük ve (C) ortalama besin alımı, (D) ortalama vücut ağırlığı, (E) ortalama kan glukoz seviyeleri, serum (F) insülin ve (G) trigliserit seviyeleri, (H) toplam kat ettikleri mesafe, (I) ortalama hızları ve (J) ısı haritaları.	37

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

α -MSH	α melanosit uyarıcı hormon
β	Beta
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar
aCSF	Yapay beyin omurilik sıvısı
AgRP	Aguti ile ilişkili peptit
ARC	Hipotalamik arkuat çekirdek
BAT	Kahverengi yağ dokusu
CART	Kokain-amfetamin ile düzenlenen transkript
dL	Desilitre
DMH	Dorsomedial hipotalamus
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
GABA	γ -aminobütirik asit
GDM	Gestasyonel diyabetes mellitus
GFP	Yeşil floresan protein
GLUT2	Glukoz transporter 2
HAPO	Hiperglisemi ve Olumsuz Gebelik Sonuçları
HbA1c	Glike hemoglobin
HPA	Hipotalamik-hipofiz-adrenal
ICV	İntraserebroventriküler
IP	İntraperitoneal
IV	İntravenöz
KBB	Kan-beyin bariyeri
kg	Kilogram
L	Litre
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	Lateral hipotalamus
MC3/4R	Melanokortin 3 ve 4 reseptörü
mg	Miligram

MHC	Ana histo-uyumluluk kompleksi
mm	Milimetre
MSS	Merkezi sinir sistemi
MΩ	Mega ohm
nL	Nanolitre
NPY	Nöropeptid Y
°C	Santigrat derece
OGTT	Oral glukoz tolerans testi
PBN	Parabrakiyal çekirdek
POMC	Proopiomelanokortin
PVN	Paraventriküler hipotalamik çekirdek
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
STZ	Streptozotosin
T1DM	Tip 1 diyabetes mellitus
T2DM	Tip 2 diyabetes mellitus
TBE	Tris-Borik asit- EDTA
UDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
VKİ	Vücut kütle indeksi
VMH	Ventromedial hipotalamus
WAT	Beyaz yağ dokusu

ABSTRACT

Bilgin, V. A. (2022) Investigation of the Effects of Systemic Apelin Administration on Appetite Regulation in Diabetic AgRP Transgenic Mice, Yeditepe University, Institute of Health Sciences, Department of Physiology, PhD thesis, İstanbul.

Diabetes has become an increasingly common public health problem in recent years. The causes of type 2 diabetes (T2D) include insulin resistance developing as a result of overweight and obesity caused by mainly due to sedentary life and overeating, and less frequently aging and genetic factors, while T1D is mainly caused by the autoimmune destruction of insulin-producing beta cells. Energy homeostasis is maintained by orexigenic agouti-related peptide/neuropeptide Y (AgRP/NPY) and anorexigenic proopiomelanocortin/cocaine-amphetamine-associated transcript (POMC/CART) neurons in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC), and peripheral inputs. Apelin is an adipokine having different physiological roles including blood glucose regulation. In our study, we aimed to examine the effects of systemic apelin administration on food intake, hyperglycemia and AgRP neuronal activity in streptozotocin (STZ)-induced diabetes in transgenic mice. Following the stereotaxic AAV-CAG-Flex-GFP injection by targeting ARC in young adult AgRP-Ires-Cre animals, they were administered STZ and/or apelin, and their food intake, body weight and blood glucose were monitored. On the sacrifice day, serum was collected for ELISA measurements and brain slices were obtained to examine the electrophysiological activities of AgRP neurons. While food intake decreased significantly during STZ administration, it started to increase in the post-STZ period. Administration of 50 mg/kg apelin reduced food intake and body weight in animals independent of STZ. Food intake continued to increase significantly after discontinuation of STZ at 100 mg/kg apelin administration and long-term follow-up after apelin. Apelin did not affect STZ-induced increase in blood glucose and decreased serum insulin levels. Serum triglyceride levels elevated after STZ administration significantly decreased after 100 mg/kg apelin administration. While apelin did not change AgRP neuronal activity, STZ increased it significantly. Apelin, on the other hand, tended to decrease STZ-induced AgRP neuronal activity. These results suggest that apelin does not affect the increase in AgRP neuron activity caused by diabetes.

Key words: AgRP, Apelin, Diabetes, Electrophysiology, Streptozotocin.

ÖZET

Bilgin, V. A. (2022). Diyabet Modeli Oluşturulmuş AgRP Transgenik Farelerde Sistemik Apelin Uygulamasının İştah Düzenlenmesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.

Diyabet, son yıllarda giderek yaygınlaşan bir halk sağlığı problemidir. Tip 2 diyabetin sebepleri arasında ağırlıklı olarak sedenter yaşama ve aşırı yemeye bağlı gelişen aşırı kilo ve obezite sonucu gelişen insülin direnci ve daha az sıklıkla yaşlanma ve genetik faktörler gelirken, tip 1 diyabet asıl olarak, insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanmaktadır. Besin alımı, hipotalamik arkuat çekirdekte (ARC) bulunan oreksijenik agouti-ilişkili peptit/nöropeptit Y (AgRP/NPY), anoreksijenik proopiomelanokortin/kokain-amfetamin ile düzenlenen transkript (POMC/CART) nöronları ve periferik sinyallerle sağlanmaktadır. Apelin bir adipokin olup kan glukozu düzenlenmesi gibi fizyolojik rolleri bulunmaktadır. Çalışmamızda, streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş diyabet modeli oluşturulan transgenik farelerde sistemik apelin uygulamasının besin alımına, hiperglisemiye ve AgRP nöronlarının aktivitesine olası etkilerini incelemeyi amaçladık. Bu amaçla, genç erişkin AgRP-Ires-Cre hayvanları kullandık. ARC hedeflenerek stereotaktik olarak AAV-CAG-Flex-GFP enjeksiyonunu takiben STZ ve/veya apelin uygulanarak hayvanların besin alımı, vücut ağırlığı ve kan şekerleri takip edildi. Dekaptiasyon gününde ELISA ölçümleri için serum toplandı ve beyin kesitleri alınarak AgRP nöronlarının elektrofizyolojik aktiviteleri incelendi. STZ uygulaması süresince besin alımı anlamlı şekilde azalırken STZ sonrası dönemde artmaya başladı. 50 mg/kg apelin uygulaması hayvanlarda besin alımını ve vücut ağırlığını STZ'den bağımsız olarak düşürdü. 100 mg/kg apelin uygulaması ve uzun dönem apelin sonrası takipte STZ'nin kesilmesinden sonra besin alımı anlamlı şekilde yükselmeye devam etti. Apelinin STZ kaynaklı kan şekeri yükselişine ve serum insülin düşüşüne bir etkisi gözlemlenmedi. STZ sonrası yükselen serum trigliserit seviyeleri 100 mg/kg apelin sonrasında anlamlı derecede düşmüştür. Apelin AgRP nöron aktivitesini değiştirmemekte olup STZ AgRP nöron aktivitesi anlamlı şekilde arttırmıştır. Apelin ise STZ kaynaklı AgRP nöronal aktivitesindeki artışı düşürme eğilimindedir. Bu sonuçlara göre, apelinin diyabet sebepli AgRP nöron aktivitesindeki artışa etki etmediği düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: AgRP, Apelin, Diyabet, Elektrofizyoloji, Streptozotosin.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet, son yıllarda giderek artan bir ivme ile dünya nüfusunun büyük bir kısmını etkileyen ve ciddi sağlık sorunlarına sebep olabilen kronik bir hastalık haline gelmiştir ¹. Kan şekeri homeostazında en önemli yere sahip olan pankreas beta (β) hücrelerinde oluşan bir harabiyete bağlı olarak (tip 1) ve bu hücrelerden salınan insülin hormonuna ait direnç gelişmesinden kaynaklanan (tip 2) diyabet hastalığı kontrol altına alınmaz ise hastalık daha ağır sonuçlar doğurabilmektedir ^{2,3}. Pankreasta bulunan ve enerji metabolizması için de çok önemli bir role sahip olan β hücrelerinden salınan insülin hormonu, bu hücrelerde kalıtsal ya da çevresel faktörler sonucu oluşabilecek hasarlardan etkilenecek normal fizyolojik işleyişinden çıkar ^{4,5}. Bu durumda kan glukoz düzenleme metabolizması bozulur ve doğru tedavi uygulanmadığı takdirde kronik dönemde vasküler hastalıklar, körlük, böbrek yetmezliği gibi istenmeyen sonuçlar ortaya çıkarabilir ¹.

Obezite, günümüzde çocukluk çağında da artış göstermesine rağmen büyük çoğunlukla erişkinlerde görülen tip 2 diyabetin başlıca sorumlusu olarak gösterilmektedir ^{6,7}. Diyabet hastalığı, β hücrelerinin total harabiyetinde sıklıkla çocukluk çağında ortaya çıkan tip 1 diyabet ⁸, çoğunlukla obez kişilerde gelişen insülin direncine bağlı olarak ve erişkinlerde ortaya çıkan tip 2 diyabet ⁹ ve gebelik öncesinde normal olarak seyreden fakat ilerleyen dönemde insülin salınımının bozulması ile ortaya çıkan gestasyonel diyabet olarak sınıflandırılmaktadır ¹⁰. Her üç tip için de günümüzde tedavi yöntemleri vardır fakat sağlık ekonomisine çok ciddi yükler bindirmesinden ötürü diyabet için yeni tedavi yöntemleri arayışı ciddi şekilde devam etmektedir ¹¹. Bu arayış, farklı etkideki ilaçların geliştirilmesi ya da endojen olarak metabolizmada var olan bazı moleküllerin enerji metabolizması üzerine olası etkilerinin araştırılması ile olmaktadır ^{12,13}. Bu moleküllerden birisi de yağ dokusundan salınan ve dolaşım sistemi üzerindeki etkileri netleştirilmiş olup son yıllarda iştah metabolizmasında olası bir rolünün varlığı araştırılan apelin hormonudur ¹⁴. İnsülin direnci dolaşımdaki serbest yağ asitlerinin artmasına sebep olur ¹⁵. Apelin hormonunun obezitede arttığı gösterilmiştir ¹⁶. Bunun yanında, çeşitli çalışmalar obezite ve insülin direnci varlığında, serum ve yağ doku apelin düzeylerinde artış olduğunu göstermiştir ^{15,17}.

Bu çalışmamızda, AgRP-Ires-Cre transgenik fareler kullanarak streptozotosin ile indüklenmiş diyabet modeli hayvanlara apelin uygulamasının hipotalamik arkuat çekirdekte bulunan ve açlık durumunda aktifleşerek homeostatik besin alımını yukarı

yönde düzenleyen AgRP nöronları üzerine olası etkisini, beslenme davranışını ve kafes içi aktiviteyi araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet

Diabetes mellitus ilk olarak 3000 yıl önce bir Mısır el yazmasında rapor edilmiştir¹⁸. Ancak, tip 1 ve tip 2 olarak sınıflandırılması 1936 yılında gerçekleşmiştir¹⁹. Diyabet, yüksek kan şekeri seviyesine bağlı olarak, uzun vadede dolaşım sistemi, sinir sistemi, böbrekler ve gözlerde kalıcı hasar bırakabilen kronik metabolik bir hastalıktır. Diyabet, görme kaybı, kalp krizleri, inmeler, nefropati, nöropati ve alt ekstremitte amputasyonlarının ana sebeplerinden biridir¹. Diyabet hastalığı, tip 1 diyabet, tip 2 diyabet (%95 ile en yaygın tip) ve gestasyonel diyabet olarak üç tipe ayrılmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (UDF)'na göre tüm dünyada 20-79 yaş aralığındaki diyabet hastası sayısı 2021 yılında 530 milyon kişi civarında iken bu sayının 2045 yılında 700 milyon kişiye ulaşması öngörülmektedir. 1980 yılında bu sayının 100 milyon civarında olduğunu düşünürsek toplumlarda diyabetin ne hızla yayıldığını anlamamız kolaylaşır. Diyabet, tüm yaş gruplarını ve ırkları etkilemektedir. Her yıl 4 milyon kişi diyabete bağlı komplikasyonlar geliştirerek hayatlarını kaybetmektedir. 2021 yılını örnek alırsak, dünya üzerinde diyabete bağlı ölüm sayısı 7 milyon civarındaydı ve bu, her beş saniyede bir kişinin bu hastalığa bağlı olarak hayatını kaybettiği anlamına gelmekteydi. Bu yüzden diyabeti önlemede ve ondan korunmada etkili olabilecek yeni teşhis ve tedavi yöntemlerini bulmada ve diyabetten uzak tutacak hayat standardı değişikliklerini sağlamada ortak akıl yürütülmesi gerekmektedir. Tip 2 diyabet hastalığına yakalanma riski, sağlıklı beslenme, düzenli fiziksel aktivite ve tütün ürünlerinden uzak durma ile ciddi oranda düşmektedir ve hatta hastalığın varlığında dahi uygun medikal tedaviye ek olarak düzenli beslenme ve egzersiz programları ile diyabet ve sebep olduğu ilgili hastalıkların gerileyebildiği gerçeği bilinmektedir. Bunların yanında sağlık sistemi açısından da diyabet hastalığı çok ciddi bir maddi yük olmaktadır. Günümüzde tüm dünyada diyabet hastalığına yapılan sağlık harcamalarının neredeyse 1 trilyon dolara yaklaşarak son 15 yılda %300 artmış olması yakın gelecekte çok daha fazlasına ulaşacağının sinyallerini vermektedir¹.

Obezite diyabet gelişimindeki önemli unsurlardan biridir. Obezitenin tanımı, aşırı enerji alımı ve depolanması sonrasında bu enerjinin yetersiz harcanmasına bağlı olarak gelişen kilo alımıdır. Günümüzde, özellikle gelişmiş ülkelerde büyük bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bununla birlikte, bazı obez bireylerde aşırı besin alımının leptin eksikliği

gibi genetik bir etiyolojiden kaynaklı olduğu söylenebilir ²⁰⁻²². Obez bireylerin vücut kütle indeksi (VKİ) ≥ 30 kg/m² ve aşırı kilolu bireylerin VKİ'si ≥ 25 ve < 30 olarak sınıflandırılmaktadır ²⁰. Obezite ve fazla kilolu birey insidansının, 1980'den günümüze kadar iki kattan fazla arttığı ve dünya genelinde VKİ'si > 25 olan 2,1 milyardan fazla kişinin olduğu Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından gösterilmiştir. DSÖ tarafından, 2014 yılında ~600 milyon obez birey olduğu ve bu sayının her geçen sene ciddi oranda arttığı raporlamıştır ²³. Obezite, tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), hipertansiyon, dislipidemi, kardiyovasküler hastalıklar, kas-iskelet sistemi bozuklukları, belirli kanser türleri ile ilişkilendirilmiştir ^{23,24}. VKİ ile hem açlık hem de tokluk insülin seviyeleri arasında genel olarak doğrudan orantılı bir ilişki olduğu iyi bilinmektedir ²⁵⁻²⁷. Benzer bir ilişki VKİ ile insülin direncinin düzeyi arasında da vardır ²⁷. Yükselen VKİ'ye bağlı olarak gelişen hiperinsülinemi, normoglisemiyi ve gelişen insülin rezistansının üstesinden gelmeyi sağlamak için gereklidir ²⁷. Tüm obez bireylerde insülin direnci gelişmediği; yapılan çalışmalarda, VKİ'si < 30 , $\geq 30-35$ ve > 35 olan bireylerin sırasıyla %19, 34 ve %60'ının insüline dirençli olduğunu gösterilmiştir ²⁷⁻²⁹. VKİ'nin artmasıyla insülinin salınımının da arttığı, VKİ < 30 , $> 30-35$ ve > 35 olan kişileri içeren bir çalışmada sırasıyla %28, 49 ve %80 insülin salgı artışı gösterilmiştir ²⁷. Obez veya fazla kilolu 2,1 milyar kişiden $< \%25$ 'ine T2DM teşhisi konulmuştur. Son yıllarda T2DM'deki artışın, genel olarak, küresel nüfustaki aşırı kilolu bireylerin yüzdesindeki bir artışa bağlı olduğu düşünülmektedir ³⁰

2.1.1. Diyabet İçin Tanı Kriterleri

Diabetes mellitus tanısı, aşağıdaki dört anormal glukoz metabolizması belirtisinden birine dayanarak konulur ³¹⁻³³. Bunlar: (1) Farklı anlarda birden fazla ölçümde açlık plazma glukozunun ≥ 126 mg/dL (7 mmol/L) olması. (2) Klasik hiperglisemi semptomları olan bir hastada rastgele venöz plazma glukozunun ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) olması. (3) Oral glukoz tolerans testinde 1.75 g/kg'lık (maksimum doz 75 g) glukoz yüklemesinden iki saat sonra plazma glukozunun ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) olarak ölçülmesi. (4) Glike hemoglobin (HbA1c)'nin $\geq 6,5$ (Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı tarafından onaylanmış bir test kullanılarak) olması. Bu kriter yetişkinlerde tip 2 diabetes mellitus (T2DM) teşhisinde daha faydalıdır ve hiperglisemi ile doğrulanmalıdır.

2.1.2. Diyabet Tipleri

2.1.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Günümüzde tip 1 diabetes mellitus (T1DM) çocukluk çağıının en sık rastlanılan diyabet tipidir ve elde olan verilere göre her yıl yaklaşık 100 bin yeni çocuğa tip 1 diyabet teşhisi konulmaktadır ³⁴. Gelişmiş eksojen insülin teknolojilerine rağmen tip 1 diyabet teşhisi alan bireyler kardiyovasküler mortalite riski de dahil olmak üzere bir çok komplikasyon açısından risk altındadırlar ³⁵. T1DM patofizyolojisindeki genel özellik, pankreasta bulunan Langerhans adacıklarındaki insülin salınımından sorumlu β hücrelerinin yokluğu veya fonksiyonsuz oluşu sonucunda kan şekeri düzenleme mekanizmasının glukagon ile birlikte iki ana faktörden biri olan insülinin salınamaması sebebi ile kan şekeri seviyesinin olması gereken aralıktan saparak oldukça yüksek seyretmesidir ³⁶. Var olan bazı hipotezler, işlevsel beta hücre kütlesi kaybının bağışıklık sisteminden kaynaklı olduğunu söyleyerek bunu da bağışıklık sisteminin fonksiyonsuz β hücrelerini belirleyerek onlara aşırı reaksiyon verip yok etmesine dayandırmaktadır ^{37,38}. Çocukluk çağı T1DM insidansı coğrafya, yaş, cinsiyet, aile öyküsü ve etnik kökene göre değişmektedir. Aynı zamanda T1DM insidansı da dünyanın farklı bölgelerinde değişiklik göstermektedir ³². Bildirilen en yüksek T1DM insidansı Finlandiya ve Sardunya’da görülmektedir (15 yaşından küçük 100.000 çocuk için 37 ila 65) ^{32,39}. Amerika Birleşik Devletleri’nde ise, çocuklarda ve ergenlerde yıllık T1DM insidansı, ırk/etnik gruplar arasında önemli farklılıklarla birlikte, genel olarak 100.000’de 22,3’tür (İspanyol kökenli olmayan beyaz gençlerde 100.000’de 27,3, siyah gençlerde 100.000’de 20,8 ve hispanik popülasyonda 100.000’de 16,3) ⁴⁰. Çocuklukta başlayan T1DM’nin ortaya çıkışı iki ayrı yaş diliminde pik yapmaktadır: birincisi dört ila altı yaşlarında diğeri erken ergenlikte (10 ila 14 yaş) ⁴¹⁻⁴³. Genel olarak, çocukların yaklaşık %45’i 10 yaşından küçüktür ⁴⁴. Otoimmün hastalıkların çoğunun kadınlarda daha yaygın olmasına karşın, çocukluk çağı T1DM’nin genel insidansında cinsiyet farkı yok gibi görünmektedir ^{45,46}. Hatta bazı çalışmalar küresel olarak T1DM’nin erkeklerde daha sık görüldüğünü işaret etmektedir ve bu oran yaklaşık 1.5:1’dir ⁴⁷. T1DM’li bir hastanın yakın akrabalarında yaşam boyu T1DM gelişme riski önemli ölçüde artmaktadır ^{32,48,49}. Bazı raporlar, aşağıdaki faktörlerin her birini artan T1DM riskiyle ilişkilendirmiştir ancak bu ilişkilerin hiçbiri tam olarak doğrulanmamıştır ^{50,51}. Bunlar aşılar, diyet, daha yüksek sosyoekonomik durum, obezite, D vitamini eksikliği, anne yaşı, preeklampsi öyküsü ve yenidoğan sarılığı gibi

faktörlerdir. Düşük doğum ağırlığı T1DM gelişme riskini azaltırken, gebelik yaşına göre yüksek doğum ağırlığı ve doğumdaki gebelik yaşının düşük olması T1DM riskini artırabilir ⁵².

Çoklu genlerin polimorfizmlerinin tip 1A diyabet riskini etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (HLA-DQalpha, HLA-DQbeta, HLA-DR, preproinsülin, PTPN22 geni, CTLA-4, interferon ile indüklenen helikaz, IL2 reseptörü (CD25), lektin benzeri bir gen (KIAA0035), ERBB3e ve 12q'da tanımlanmamış bir gen gibi ^{51,53-58}. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarından elde edilen verilere bağlı olarak yapılan bir meta-analiz, bu ilişkileri doğrulamış ve artan tip 1 diyabet riski ile ilişkili dört ek risk lokusunu (BACH2, PRKCQ, CTSH, C1QTNF6) tanımlamıştır ⁵⁹. Tip 1 diyabet için majör duyarlılık genleri (ana histo-uyumluluk kompleksi (MHC) lokusu için IDDM1 olarak adlandırılır) kromozom 6p üzerindeki HLA bölgesindedir. Bu bölge, makrofajlar gibi antijen sunan hücrelerin hücre yüzeyinde ifade edilen MHC sınıf II moleküllerini kodlayan genleri içerir. Bu MHC molekülleri, tip 1 diyabetin patogeneğinde yer alan antijenlerin bağlandığı peptit bağlayıcı bir oluk oluşturan alfa ve beta zincirlerinden oluşur. Antijenin MHC'ye bağlanması, yıkıcı otoimmün sürecin ana efektör hücreleri olan T hücreleri üzerindeki antijen reseptörlerine sunulmasına izin verir ^{60,61}.

2.1.2.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus

T2DM, diyabetin açık ara en yaygın görülen şeklidir ve diyabet vakalarının neredeyse %90'ını oluşturmaktadır ^{62,63}. T2DM, son yıllarda küresel bir pandemi haline gelen ve birçok organı tutan kronik metabolik multifaktöriyel bir hastalıktır. T2DM, pankreas β hücre disfonksiyonu, artmış pankreas alfa hücre fonksiyonu ve periferik doku insülin direnci ile karakterizedir ^{64,65}. Oluşan bu değişiklikler sonucunda şu durumlar ortaya çıkabilir: (1) hasarlanmış periferik glukoz alımına bağlı gelişen hiperglisemi, (2) hasarlanmış periferik yağ alımına bağlı gelişen dislipidemi (artmış trigliseritler, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve total kolesterol miktarı), (3) hasarlanmış besin alımına bağlı gelişen iskelet kası gibi periferik dokulara amino asit alımının ve enerji üretiminin bozulması ve son olarak (4) hiperglisemi ve hiperlipidemiye daha da arttıran yükselmiş glukagon üretimi ⁶⁶⁻⁶⁹. Batılı ülkelerdeki hastaların ~%90'ının obez veya aşırı kilolu olması, T2DM'nin aşırı besin tüketimini içeren diyetler tarafından büyük ölçüde tetiklendiğini düşündürmektedir ⁷⁰. Batı ülkelerinde gözlenenin aksine, Çin'de yapılan bir araştırma, T2DM hastalarının %50,3'ünün aşırı kilolu olmadığı ve diğer Asya ülkelerinde

de VKİ'si <25 olan birçok T2DM'li hastaların varlığını göstermiştir ^{71,72}. Henüz önemli bir risk geni tanımlanmamış olmasına rağmen, genetik faktörlerin de duyarlılık kazandırmada rol oynadığı netlik kazanmıştır ^{73,74}. T2DM, insülin eksikliğinin şiddeti, tedavi gereksinimleri ve prognozunun hastalar arasında farklılık göstermesinden ötürü heterojen bir hastalık olarak kabul edilmektedir ^{75,76}. Tedaviler mevcut olmasına rağmen diyabet körlük, son dönem böbrek hastalığı, alt ekstremitte amputasyonu ve kardiyovasküler hastalığın önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir ⁷⁷. Birleşik Krallık'ta yapılan bir araştırmada, 2007'den 2010'a kadar gerçekleştirilen amputasyonların %48,9'unun diyabetli kişilere yapıldığını ve diyabetlilerin amputasyon riskinin 23,3 kat fazla olduğu bulundu ⁷⁸. Ek olarak, diyabetik hastalar genellikle bozulmuş yara iyileşmesi, enfeksiyonlara yatkınlık, nöropati ve iktidarsızlık sorunlarına daha açıktırlar ⁷⁸. T2DM ayrıca Alzheimer ve Parkinson hastalıkları için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır ^{79,80}. Kardiyovasküler hastalıklar, diyabetik hastalarda gerçekleşen tüm ölümlerin %75'inden sorumludur ve T2DM'li bireylerde ortalama yaşam beklentisi normale göre daha düşüktür ^{81,82}. İnsülin sekresyonu ile periferik doku insülin direncini iyileştirmeye ve hiperglisemiye düzenlemeye yönelik bir dizi tedavi mevcuttur ^{83,84}. Bununla birlikte, hastalarda glisemik kontrolün sürdürülmesi çok kolay olmamaktadır çünkü günümüzde kullanılan mevcut tedavilerin uygulanmasından kaynaklanarak hipoglisemi veya hiperglisemi gelişmesi riski olduğu gibi, fazla ya da yetersiz bir anti-hiperglisemik bir sonuç ile karşılaşmak gayet beklenen bir durumdur ^{85,86}. Tedavi rejiminden bağımsız olarak, insanlarda yapılan uzun vadeli çalışmalar, β hücre fonksiyonunun genellikle zaman ilerledikçe bozulduğunu göstermiştir ^{87,88}.

2.1.2.3. Tip 1 ve Tip 2 Diyabet Farklılıkları

T1DM, esas olarak insülin eksikliği ile karakterize edilirken, T2DM, göreceli insülin eksikliği ile birlikte esas olarak bir insülin direnci ile ifade edilir. T2DM'nin çocuklar ve adolesanlarda insidansı arttıkça, uzun dönem tedavi yönetimleri farklılık gösterdiğinden dolayı, tip 1 tip 2 diyabeti birbirinden ayırt etmek daha önemli hale gelmektedir. Bununla birlikte hiçbir kriter seti veya tanı testi, T1DM ve T2DM arasında tutarlı bir şekilde ayırım yapamaz. Bu nedenle, iki tip arasındaki ayırım, genellikle laboratuvar çalışmalarıyla desteklenen klinik sunum ve öykünün bir kombinasyonuna dayanır. T2DM'li hastalar genellikle obezdir (yaşa ve cinsiyete göre VKİ $\geq$ 95. persentil). Buna karşın, T1DM'li çocuklar genellikle obez değildir ve %25 kadarı fazla kilolu

olmasına rağmen (VKİ ≥ 85 ila 95 persentil) sıklıkla yakın zamanda kilo kaybı öyküsü vardır ⁸⁹. T2DM'li hastalar kliniğe genellikle ergenliğin başlangıcı ile birlikte gelirken, T1DM'li hastalar daha erken yaşta belirti gösterir. T1DM'li çocukların yaklaşık yüzde 45'i 10 yaşından önce başvururken, neredeyse tüm T2DM vakaları 10 yaşından sonra ortaya çıkar ⁴⁴. T2DM'li hastalarda sıklıkla akantozis nigrikans (deride sertleşme-insülin direncinin bir işareti), hipertansiyon, dislipidemi ve polikistik over sendromu (kızlarda) bulunurken bu bulguların T1DM'li çocuklarda görülmesi daha az olasıdır. Örnek olarak, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çalışmalarda, T2DM tanısı konan gençlerin yüzde 50 ila 90'ında akantozis nigrikans varken ^{90,91} klinik olarak T1DM tanısı konanların %25'i kadarında insülin direncinin biyokimyasal kanıtı vardır ve yaklaşık % 12'sinde akantozis nigrikans vardır ⁹⁰. T1DM'li hastaların %10 kadarında etkilenmiş bir yakın akraba bulunurken, T2DM'li hastaların %75 ila 90'ında etkilenmiş bir yakın akraba vardır ^{91,92}. Tüm bu farklılıklar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Çocuklarda ve ergenlerde tip 1 ve tip 2 diabetes mellitusun özellikleri ⁹³.

	Tip 1 diyabet	Tip 2 diyabet
Prevalans	Yaygın, artışta	Yaygın
Görülme yaşı	Çocukluk çağında	Ergenlikten itibaren
Başlangıçta	Tipik olarak akut, şiddetli	Sinsice ilerleyen, şiddetli
Başlangıç ketozu	Yaygın	%5-10
Etkilenen aile bireyi	%5-10	%75-90
Kadın:erkek	1:1	Neredeyse 2:1
Kalıtım	Poligenik	Poligenik
HLA-DR3/4	Güçlü ilişki	İlişki yok
İrk	Hispanik olmayan beyazlarda	Tüm ırklar
İnsülin salınımı	Azalmış/yok	Değişken
İnsülin duyarlılığı	Kontrol altındayken normal	Azalmış
İnsüline bağımlılık	Her zaman	Değişken
Obezite veya fazla kiloluluk	%20-25 fazla kilolu	>%80 obez
Pankreatik antikor	Evet	Hayır

2.1.2.4. Gestasyonel Diyabetes Mellitus

Gestasyonel diyabetes mellitus (GDM), geleneksel olarak ilk kez gebelik sırasında saptanan başlangıç seviyesi değişken olan bir karbonhidrat intoleransı olarak tanımlanır ⁹⁴. Bu tanım, doğumdan sonra normale dönen anormal glukoz toleransını ve gebelik öncesinde tanı konulmamış veya gebelik sırasında başlamış olan DM'yi kapsar. GDM'nin daha güncel bir tanımı, “gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde teşhis edilen ve gebelik öncesinde belirgin olmayan diyabet” şeklinde açıklanmıştır ⁹⁵. GDM prevalansı, popülasyon özelliklerine ve kullanılan tanı kriterlerine bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. 2010 yılından önce Birleşik Krallık ve İrlanda'da yapılan kohort çalışmaları, gebeliklerin %1-3'ünün GDM ile komplike olduğunu göstermiştir ⁹⁶. Buna karşılık, daha sıkı tanı kriterleri uygulandığında, Hiperglisemi ve Olumsuz Gebelik Sonuçları (HAPO) çalışmasına dahil olan 15 merkezde GDM prevalansı %9 ile %26 (ortalama %18) arasında değişiyordu ⁹⁷. 2017 yılında dünya genelinde her yedi canlı doğumdan birinin GDM'den etkilendiği tahmin edilmekteydi ⁹⁸. GDM prevalansındaki artışın temel nedenleri arasında obezite salgını, fiziksel hareketsizlik (sedanter yaşam) ve artan anne yaşı yer almaktadır ⁹⁹. GDM, şu risklerin artmasıyla ilişkilendirilmiştir: Gebeliğin hipertansif bozuklukları (örn. preeklampsi, gestasyonel hipertansiyon), anne veya yenidoğanda doğum travması, operatif doğum (sezaryen, yardımcı vajinal doğum), perinatal mortalite, fetal/neonatal hipertrofik kardiyomiyopati, yenidoğan solunum problemleri ve metabolik komplikasyonlar (örn. hipoglisemi, hiperbilirubinemi, hipokalsemi, polisitemi) ve polihidramnios ¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. Daha da önemlisi, maternal açlık plazma glukoz seviyeleri 75 mg/dL'nin (4,2 mmol/L) üzerine çıktıkça ve bir ve iki saatlik oral glukoz tolerans testi (OGTT) değerleri en düşük septilden en yüksek seviyeye çıktıkça belirtilen sonuçların riskleri artmaktadır. Bu sürekli bir etkidir; artmış olumsuz obstetrik sonuç riski altındaki hastaları tanımlayan net bir eşik yoktur ^{103,105,106}. GDM ayrıca uzun vadede bazı risklerin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Annelerde tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalığın gelecekteki gelişimi ve GDM varlığı ile doğan bireylerde adolesan ve yetişkin döneme ulaştıklarında obezite, anormal glukoz toleransı, hipertansiyon ve metabolik sendrom gelişebilme ihtimali yüksektir ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

2.2. Streptozotosin

Streptozotosin (STZ), 1950'lerin sonlarında *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen bir antibiyotik olarak tanımlanan bir bileşiktir ¹¹⁰. Üç farklı prosedür

kullanılarak sentezlenmektedir ¹¹¹: (1) tetra-O-asetil glukozamin hidroklorürden ¹¹²; (2) d-glukozamin + N-nitrozometil karbamil-azidden ¹¹³ ve (3) d-glukozamin N-metilüreden ¹¹³. STZ'nin pankreatik β hücreleri üzerindeki genotoksik etkileri, deney hayvanlarında diabetes mellitus hastalığını indüklediği bilgisine çalışmacıların ulaşmasını sağlamıştır ¹¹⁴. DM hayvan modellerini üretmeye yönelik bu yaklaşımın güvenilir olduğu gösterildikten sonra bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

2.2.1. STZ'nin Diyabetojenik Etkileri

STZ hem insüline bağımlı hem de insüline bağımlı olmayan diabetes mellitusu indüklemek için kullanılabilir. STZ bir N-asetilglukozamin analogu olduğundan, bir hücre zarı glukoz transporter 2 (GLUT2) yoluyla β hücrelerine girebilmektedir. STZ'nin üç ana diyabetojenik etkisi vardır: (1) DNA'nın alkilasyonu ¹¹⁵, (2) süperoksit radikallerinin oluşumu ¹¹⁶ ve (3) süperoksit dismutazın inhibisyonu ¹¹⁶.

2.2.1.1. DM'nin Deneysel Olarak STZ ile İndüklenmiş Modelleri

STZ ile indüklenen diyabet üzerine primatlar, domuzlar, köpekler, kediler, tavşanlar, sıçanlar ve fareler dahil olmak üzere çok çeşitli memeli modelleri geliştirilmiştir ¹¹⁷. Hayvan modellerini karşılaştırırken, hayvanların STZ uygulamasından önce aç olup olmadığı, hayvanların yaşı, suşu, uygulanan STZ dozu, uygulama yolu, ilaç etkileşimleri ve yan etkiler dahil olmak üzere dikkate alınması gereken birçok değişken vardır. Kemirgen modelleri genellikle daha küçük vücut boyutları, omnivor doğası ve sakin davranışları, düşük diyet ve barınma maliyetleri ve araştırmacılar tarafından kullanımı kolaylaştıran özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir ¹¹⁷. Ancak, STZ uygulanan kemirgen modellerinde DM'nin indüklenmesine yönelik protokoller oldukça değişkendir. Literatürde tanımlanan üç yaklaşım vardır: (1) ardışık günlerde küçük dozlarda STZ enjeksiyonu, (2) tek bir yüksek doz STZ enjeksiyonu ve (3) yüksek yağlı bir diyetle birlikte küçük dozlarda veya tek doz STZ uygulanması.

Albino Wistar ve Sprague-Dawley sıçan türleri, STZ ile indüklenen DM modelleri arasında en yaygın kullanılan kemirgenlerdir. Her ikisi de yaygın olarak kullanılmaktadır ve bilimsel araştırmalara büyük katkı sağlamışlardır ¹¹⁸⁻¹²⁰. İnsanlarda DM prevalansı erkeklerde kadınlardan daha yüksektir ¹²¹. Bunun nedeni, kadın cinsiyet steroidlerinin β hücrelerini yaralanmadan korumasıdır ¹²². Bu durum kemirgen modellerinde de geçerlidir, çünkü farelerin her iki cinsiyetinin de östradiol üretimi baskılandığında STZ

ile indüklenen insülin eksikliğine karşı bir hassasiyet geliştirdiği gösterilmiştir ¹²². Bu nedenle çoğu çalışmada erkek hayvanlar kullanılmaktadır ¹²³. Rodentlerin deney boyunca *ad libitum* olarak beslendiği ^{124,125} ve STZ enjeksiyonundan önce 4-6 saat aç bırakıldığı ¹²⁶ iki tip STZ ile indüklenmiş DM protokolü vardır.

Bununla birlikte, aç hayvanlara tek bir STZ dozunun uygulanması avantajlı olabilir. Çünkü uzun süreli açlıkta β hücreleri üzerindeki düşük afiniteli GLUT2 taşıyıcıları için STZ ve glukoz arasındaki rekabet en aza inmektedir ¹²⁷. Bu nedenle, birkaç araştırmacı, STZ uygulamasından önce gece boyunca hayvanları aç bırakmayı önermektedir ¹¹⁸.

2.2.2. Uygulama Öncesi STZ'nin Hazırlanması

DM'yi indüklemek için kullanılmadan önce STZ'nin tampon solüsyonda seyreltilmesi gerekmektedir. Filtrelenmiş 0.1 M sitrat tamponunun (pH 4,5) kullanılması gerektiği konusunda bir fikir birliği vardır ¹²⁸. Ayrıca genel olarak STZ'nin ışığa maruz kalmasını önlemek ve çözeltideki kararsızlığı nedeniyle hazırlanan solüsyonun 10 dakika içinde uygulanması şeklindedir ¹²⁹⁻¹³¹.

STZ, kullanılan doza bağlı olarak hafif ya da şiddetli diyabet türleri üretebilir. T1DM'yi indüklemek için yaygın olarak tek bir STZ dozu kullanılır, ancak bu aynı zamanda T2DM'yi indüklemek için de kullanılmıştır ^{132,133}. Yüksek kan şekeri ve STZ toksisitesi nedeniyle deney hayvanlarının yaklaşık %10-20'sinde ani ölüm görülmesi sık karşılaşılan bir durumdur ¹³⁴. Önerilen doz, farklı kemirgen türleri arasında değişir. Genel doz Wistar veya Sprague-Dawley sıçanlarında 50 ila 85 mg/kg arasındadır ¹³⁵⁻¹³⁷. Farklı fare suşlarını içeren bir çalışma, yaklaşık 100 mg/kg'nin T2DM'nin indüklenmesi için ideal olduğunu, 200 mg/kg'nin ise T1DM'yi indüklediğini göstermiştir ¹³². STZ'nin çoklu dozları, özellikle T2DM modellerinde ¹³³ yaygın olarak kullanılmıştır, ancak bu yaklaşım aynı zamanda T1DM oluşturmak için de kullanılabilir ¹³⁸. Bu yöntemin ana avantajları, tek doz STZ ile karşılaştırıldığında pankreatik β hücrelerinin ilerleyici yıkımı ve hayvan morbidite ve mortalitesinin azalmasıdır ¹³⁸. Araştırmacının önerilen araştırma türü ve mevcut kaynaklar için en uygun protokolü seçmesi gerektiği açıktır. Ancak, STZ ile indüklenen DM'nin tüm deneysel kemirgen modelleri için bazı önemli hususlar vardır: (1) STZ ile indüklenen DM modelleri için en iyi hayvan suşu üzerinde genel bir fikir birliği yoktur ¹³⁹. (2) STZ'ye daha yoğun tepki verdikleri için ideal olarak daha genç hayvanlar seçilmelidir ¹⁴⁰. (3) Çalışma dişi cinsiyet hormonlarıyla ilgili değilse,

çalışmaların çoğunda erkek hayvanlar kullanılmalıdır. (4) Önerilen STZ seyreltme tamponu, steril filtrelili 0,1 M sitrat tamponudur (pH = 4,5). Ayrıca, bu çözelti karanlıkta tutulmalı ve 10 dakika içinde uygulanmalıdır ¹²⁸.

2.3. Adipokinler

Endokrin bir organ olarak kabul edilen adipoz doku, sadece yağ depolama görevine sahip değildir, aynı zamanda topluca “adipokinler” olarak adlandırılan bazı biyoaktif polipeptidlerinin salınmasında yer alan karmaşık bir yapıdır ¹⁴¹. Adipokinler metabolizmada vücut ağırlığının düzenlenmesi, iştahın regülasyonu, glukoz homeostazının sağlanması, inflamasyonun sağlanması ve kan basıncının düzenlenmesi gibi çeşitli şekillerde görev alırlar ¹⁴²⁻¹⁴⁶. Öte yandan, bağırsak ve kardiyovasküler sistem gibi farklı organlarda üretilen hormonlar yağ dokusu merkezli karmaşık bir ağ içinde bütünleşmektedirler ¹⁴¹. Adipokinler adipositlerden (en genel örnek leptin ve adiponektindir), preadipositlerden, yağ dokusuna sızmış bağışıklık hücrelerinden ya da yağ dokusu içindeki diğer hücre tipleri tarafından salınırlar. Adipositler ayrıca proinflamatuvar (özellikle kronik subinflamatuvar obezite durumunda) ve antiinflamatuvar sitokinler üretebilirler ¹⁴⁷. Ek olarak yağ dokusu içindeki çeşitli bağışıklık hücre tipleri de bu salınmaya katkıda bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerde tip 2 doğuştan gelen lenfoid hücreler ve diğer Th2 bağışıklık hücreleri, adipositlerde insülin duyarlılığını ve kahverengi yağ dokusu (BAT) aktivasyonunu artırarak adipoz glukoz homeostazını desteklerler. Öte yandan, obezite sonrası beyaz yağ dokusunun (WAT) patojenik inflamasyonu, adipositlerde ve yerleşik bağışıklık hücrelerinde proinflamatuvar yolların aktivasyonuna yol açarak, proinflamatuvar üretimini artırır ve antiinflamatuvar sitokin ve adipokinlerin salınımını inhibe eder. Bununla birlikte kahverengi yağ dokusundaki lokal proinflamatuvar sinyalizasyonun termojenik fonksiyonu baskılayabildiği ve böylece diyetle ilgili termojenez bozabileceği de gösterilmiştir ¹⁴⁷. Adipoz doku kaynaklı bu faktörlerin, insülin direnci, T2DM ve obeziteye bağlı kardiyovasküler hastalık gelişiminde kritik bir öneme sahip olabileceği çeşitli yazarlar tarafından gösterilmiştir ^{148,149}. Çok yakın tarihlerde, chemerin, lipokalin-2, vaspin ve omentin-1 gibi yeni adipokinler nöroendokrin-bağışıklık etkileşimlerinde yer alan sinyal molekülleri olarak tanımlanmıştır. Bu adipokinler yağ dokusunun yanı sıra eklemlere yakın lokalize olmuş sinoviyositler, osteoklastlar, osteoblastlar, kondrositler ve inflamatuvar hücreler tarafından da üretilir ve osteoartrit ve romatoid artrit gibi romatizmal hastalıklarda güçlü

immünomodülatör aktiviteler gösterebilirler ^{150,151}. Tüm bunlara ek olarak, FSTL1, SPARC, SFRP5, CTRP, FAM195A, WISP1, PGRN, nesfatin-1, visfatin/PBEF/NAMPT, apelin, RPB4 ve PAI-1 yağ dokusunda yakın zamanda ortaya çıkarılan yeni adipokinler olarak tanımlanmışlardır ¹⁵². Ayrıca bu adipokinlerin moleküler ve fizyolojik etkilerinin altında yatan mekanizmalar tamamen açık değildir ve bu hedeflere yönelik yeni terapötik ajanlar geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

2.4. Apelin ve Reseptörü APJ

1993 yılında O'Dowd ve arkadaşları insana ait G protein-bağlı özel bir reseptörü izole etti ve "APJ" adını verdi. Bu reseptör, 380 amino asitten oluşur ve transmembrandaki insan anjiyotensin II reseptörü tip 1 ile %54 özdeşlik paylaşır ¹⁵³. APJ reseptörü daha sonra amfibiler ve kemirgenlerde de izole edilmiştir ^{154,155}. APJ geni, kodlama bölgesinde herhangi bir intron olmaksızın, kromozom 11 (11q12) üzerinde bulunur. Bununla birlikte, anjiyotensin II, APJ reseptörü ile etkileşime girmez ve bir APJ endojen ligandı olan apelin Tatemoto ve arkadaşları tarafından sığır midesinden izole edildiği 1998 yılına kadar hiçbir APJ ligandı tanımlanmamıştır ¹⁵⁶.

Apelin geni Xq25-q26.3 kromozomu üzerinde bulunur ve bir salgı sinyali dizisi içeren ve apelin-36, apelin-17, apelin-13 ve apelin-12 gibi farklı aktif formlara bölünebilen 77 amino asitlik bir prepropeptit kodlar ¹⁵⁶. Apelin-36 en çok ifade edilen form iken apelin-13 daha güçlü ve dolaşımda daha fazla olarak bulunur ¹⁵⁷. İnsan, sığır ve kemirgen preproapelin arasında, özellikle son 22 C-terminal amino asitleri arasında yüksek bir dizi homolojisi olduğu gösterilmiştir ^{156,158}. Apelinin tüm izoformları APJ'ye bağlanabilir, ancak farklı biyolojik güçlere sahiptirler. Farklı organların farklı apelin izoformları vardır. Apelin ve APJ beyin, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, gastrointestinal sistem, endotel ve yağ dokuları dahil olmak üzere birçok doku ve organda yaygın olarak eksprese edilmektedir ¹⁵⁹. Apelin-12, miyokardiyal kontraktileti artırma ve ortalama arter basıncını düşürme gibi kardiyoprotektif özellikleri ile APJ reseptörüne yüksek afiniteye sahiptir ¹⁶⁰. Apelin-13, plazmada en yüksek bolluğa sahip ana nöroprotektif peptittir ^{161,162}. Önceki araştırmalar, apelin-13'ün vaskülopati, enerji metabolizması ve humoral homeostazda yer aldığını bildirmiştir ^{161,163,164}. Yaşlanma üzerine apelin-13'ün aşağı yönde düzenlenmesinin gösterildiği bir çalışma da bulunmakta olup Apelin-13 ve APJ geninin nakavt edilmesi, bir fare modelinde yaşlanmayı hızlandırabilirken, apelin-13'ün yukarı regülasyonu, uyaranlara ve sirkadiyen ritme bir yanıt olan canlılığı geri

kazandırmıştır ¹⁶⁵. Glutamin siklaz, piroglutamidasyonu modifiye etmek ve apelin-13'ün [pyr1]-apelin-13 olarak adlandırılan piroglutamid formunu üretmek için apelin-13'ün çevrilmiş N terminali glutamin kalıntılarını katalize edebilir. Apelin-13'ün ekzopeptidaz tarafından bozulmasını önleyebilir ve uzun vadeli biyolojik etkiler gösterebilir ¹⁶⁶. Bu nedenle [pyr1]-apelin-13, yüksek anti-degradasyon özelliklerinden dolayı APJ için fizyolojik bir ligand olarak kabul edilir ¹⁶⁷. Apelin-17'nin APJ internalizasyonunun en güçlü indükleyicisi olduğu ve C-terminalinde tek bir amino asidin çıkarılmasının bu süreci ortadan kaldırabileceği gösterilmiştir ¹⁶⁸. Apelin-36 başlıca akciğer, testis ve uterusu eksprese edilmektedir ¹⁶⁹. Apelin-13 ve apelin-36, kardiyovasküler sistem üzerinde en büyük etkiye sahip en aktif izoformlar olarak kabul edilmiştir ¹⁷⁰. Apelin-13 ve apelin-36, farklı reseptör bağlanma afiniteleri nedeniyle diğerlerinden farklı hücre içi APJ trafiğine sahiptir. Daha kısa apelin izoformu olan apelin-13, apelin-36'dan daha güçlü APJ aktivatörü gibi görünmektedir ¹⁷¹. APJ silinmiş farelerde gelişmemiş bir kalp sebebine bağlı olarak doğum öncesi ölümle sonuçlandığını gösteren bir çalışma bulunurken ¹⁷² bunun aksine apelin silinmiş farelerin kalp gelişiminin normal olduğunu gösteren başka bir çalışma bulunmaktadır ¹⁷³. Tüm bunlar bize APJ için başka ligandlar da olabileceğini göstermektedir.

2.4.1. Yeni APJ Ligandı (Elabela/Toddler)

Apelin, 2013 yılında Chang ve arkadaşları ile Pauli ve arkadaşları embriyonik gelişim sırasında zebra balıklarında (*Danio rerio*) apelin reseptörü için "Elabela" adı verilen ikinci bir endojen ligandı keşfedene kadar tek APJ ligandı olarak kabul edilmiştir ^{174,175}. Daha sonra, Elabela'yı kodlayan cDNA, omurgalılarda ve memelilerde de keşfedilmiştir ¹⁷⁶. Elabela, 32 amino asit içeren bir salgı sinyaliyle sahip 54 amino asitlik bir peptittir ¹⁷⁴. Bu öncü peptit 32, 21 ve 11 aminoasitlik daha kısa dizilere bölünür ve tüm bu kısa diziler APJ'yi aktive edebilir ve ayrıca apelin reseptör antagonistleri tarafından bloke edilebilir ¹⁷⁷. Kanıtlar, Elabela'nın homeostaz, hücre sinyalizasyonu, enerji metabolizması ve hücre yaşlanmasındaki rolünü ortaya koymuştur. Serumdan elde edilen Elabela, diyabet ¹⁷⁸, miyokard enfarktüsü ¹⁷⁹, hipertansiyon ¹⁸⁰ ve böbrek hastalıkları ¹⁸¹ gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Özellikle Elabela düzeyinin bu hastalıkların prognozu ile doğrudan ilişkili olduğu bu çalışmalarda gösterilmiştir. Elabela'nın mitokondriyal fonksiyonu düzenleyerek apoptozu iyileştirebildiği bildirilmiştir ¹⁸². Son zamanlarda, Elabela'nın böbrek hasarını azalttığı ¹⁸³ ve tip 2 diyabet

hastalarında serum Elabela seviyesinin böbrek hasarının şiddeti ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir ¹⁸⁴.

2.4.2. Merkezi Sinir Sisteminde Apelin

Apelin ve reseptörü APJ insan merkezi sinir sisteminde, daha yoğun olarak oligodendrositlerde ve nöronlarda ve daha az yoğunlukta ise astrositlerde eksprese edilmektedir ¹⁸⁵. Apelin-APJ sistemi hipofiz bezinde de gözlenmekte olup, bu durum hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) eksenini regülasyonunda da bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Bir çalışma, APJ'nin akut stres uyaranlarından sonra HPA eksenini aktivitesini modifiye etmede bir nöromodulator olarak hareket ettiğini göstermektedir ¹⁸⁶. APJ eksikliği olan farelerin hipoglisemik stres altında adrenokortikotropik hormon salınımını azalttığı ve santral apelinin nöroendokrin fonksiyonlardaki rolünü doğruladığı bildirildi. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, santral apelinin normal sağlıklı bireyden diyabetik duruma geçişte rol oynadığını ileri sürmektedir ¹⁸⁷. Bu bulgular santral apelinin glukoz salınımını ve glukoz metabolizmasını kontrol edebileceğini göstermiştir. Aynı çalışmada intraserebroventriküler (ICV) apelin enjeksiyonunun sempatik sinir sisteminin aşırı aktivasyonu sonucu açlık kan şekerini arttırdığı ¹⁸⁷, bir başka çalışmada ise bunu takiben karaciğerde glikojenolizin ve glukoneogenezin devreye girdiği gösterilmiştir ¹⁸⁸. Ayrıca obezite ve diyabette hipotalamik apelinin aşırı ekspresyonu gösterilmiştir ¹⁸⁹. Bu sonuçlar merkezi sinir sistemindeki apelin-APJ sisteminin glukoz metabolizmasını kontrol etmek için yeni bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

2.4.3. Apelin, İnsülin Direnci ve Obezite

Obezitede, adipositler daha fazla serbest yağ asidi salgırlar ve bu da insülin direncinin gelişmesine katkıda bulunur ve insüline dirençli bireylerin dolaşımındaki serbest yağ asitlerinin daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir ¹⁵. Apelin bir adipokin olarak obezitede yukarı yönde düzenlenir. Klinik ve deneysel çalışmalarda, obezite ve insülin direnci varlığında, serum apelin düzeyi veya yağ dokusundaki apelin ekspresyonu artmaktadır ^{15,17}. Patrick Yue ve arkadaşları apelin silinmiş hayvanların gliserol, leptin ve serbest yağ asitlerinin serum konsantrasyonlarının önemli ölçüde arttığını, ekzojen apelin uygulanmasının ise bu düzeyleri azalttığını bildirmiştir ¹⁹⁰. Apelin takviyesinin obez farelerde *in vitro* insülinotropik aktiviteyi, adipositler tarafından glukoz alımını, glukoz eliminasyonunu ve insülin salınımını iyileştirdiği bildirilmiştir ¹⁹¹. Bolus intravenöz apelin uygulanmasının, obez ve insüline dirençli farelerde hiperinsülinemik-öglisemik

klemp sırasında glukoz toleransını ve insülin duyarlılığını iyileştirdiği, yüksek plazma apelin düzeyine rağmen ekzojen apelinin etkili olduğunu göstermiştir ¹⁹². Obez ve insüline dirençli farelere 28 gün apelin uygulanması sonrasında, insülin duyarlılığında belirgin bir iyileşme ve vücut yağlarında bir azalma gözlenmiştir ¹⁹³. Ancak, obez farelerde 4 haftalık Fc-apelin-13 (IgG Fc fragmanı ile kaynaşmış apelin-13) uygulaması, kardiyak ve hepatik fibrozu azaltıp, glukoz toleransı, atım hacmini ve kalp debisini önemli ölçüde iyileştirirken gıda alımını ve vücut ağırlığını değiştirmede gösterilmiştir ¹⁹⁴. Sekiz haftalık apelin^{-/-} fareler normal diyetle beslendiğinde, insülin seviyesinin önemli ölçüde arttığı ve plazma adiponektin konsantrasyonu ile glukoz intoleransının azaldığı görüldü. Ek olarak, bu fareler artan karın ve epididim yağı oluştururken, vücut ağırlıklarında bir fark görülmedi ¹⁹⁰. Başka bir çalışmada, apelin^{-/-} fareler, yüksek yağlı bir diyet ve yüksek şekerli içme suyu ile beslendiklerinde kontrole göre daha fazla glukoz ve insülin intoleransı geliştirdiler ¹⁹⁵. Stabil apelin-13 peptit analogları, diyetle bağlı gelişen obezite ve diyabetli farelerde kısa vadede umut verici antidiyabetik etkiler göstermiştir ¹⁹⁶. Bazı insan çalışmaları, obez hastalarda Pyr1-apelin-13 enjeksiyonunun insülin duyarlılığını iyileştirdiğini ortaya koymuştur ¹⁹⁷. Ancak aşırı kilolu veya obez çocuklarda 6,5 yıl süren bir çalışmada apelin düzeyinin pubertal gelişim sırasında önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir ¹⁹⁸. Ayrıca Cavallo ve arkadaşları, T2DM'li obez hastaların diyabetik olmayan obez hastalara göre anlamlı düzeyde daha yüksek apelin düzeyine sahip olduklarını bildirmişlerdir ¹⁹⁹. Dayem ve arkadaşları, diyabetik hastalarda apelin düzeyinin vücut kitle indeksi üzerine etkisinin olmadığını bulmuşlardır ²⁰⁰. Bu sonuçlar, artan apelin düzeyinin obezitenin kendisinden çok eşlik eden diyabetle doğrudan ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

2.5. İştah ve Enerji Homeostazını Düzenleyen Hipotalamik Devreler

Hipotalamus, canlının beslenmesinde ve enerji harcamasında rol alan merkezi sinir sistemine ait önemli beyin bölgelerinden oldukça detaylı çalışılmış bir tanesidir. Özellikle hipotalamik arkuat çekirdek (ARC), beslenme ve metabolizmanın düzenlenmesi için kritik bir öneme sahiptir ²⁰¹. ARC çekirdek, geçirgen bir kan-beyin bariyerine (KBB) sahip, fenestreli kılcal damarlardan zengin olan medyan eminens komşuluğunda bulunmaktadır. Medyan eminens, periferik hormonal ve besin sinyallerinin taşınmasını ve bunların ARC nöronları tarafından algılanmasını kolaylaştırmaktadır ²⁰². Bu sayede ARC, periferik dolaşım yoluyla gelen hormonal ve

besinsel metabolik sinyallerin işlenmesinin yanısıra periferik ve merkezi nöronal girdileri de bunlarla birlikte işleyip geribildirim için en doğru cevabı oluşturmaya çalışır. ARC'de işlevsel olarak antagonist etki eden iki nöron türü vardır: Oreksijenik (iştahı uyaran) nöropeptid Y (NPY) ve aguti ile ilişkili peptit (AgRP) eksprese eden AgRP/NPY nöronları ile anoreksijenik (iştah bastırıcı) proopiomelanokortin (POMC)/kokain-amfetamin ile düzenlenen transkript (CART) eksprese eden POMC nöronları ^{203,204}. POMC nöronları genel olarak paraventriküler hipotalamik çekirdek (PVN), lateral hipotalamus (LH), dorsomedial hipotalamus (DMH) ve ventromedial hipotalamustaki (VMH) ikincil nöronlara projeksiyon yapmaktadırlar ^{205,206}. Bu ikincil nöronlar, alınan bilgiyi daha güçlü işlemek adına hipotalamusun dışındaki diğer beyin bölgelerine projeksiyon yaparak enerji alımı ve harcaması üzerinde daha entegre bir cevabın oluşmasını sağlarlar ²⁰⁷. PVN nöronları, periferik organlara ait sempatik aktiviteyi kontrol ederken ²⁰⁸, bunun yanında pek çok düzenleyici nöropeptit salgılanmasından sorumludurlar ²⁰⁷. PVN'nin hasarlanması aşırı yeme ve obeziteye yol açmaktadır ve bu da PVN nöronlarının gıda alımının inhibe edici rolünün önemli bir göstergesidir ²⁰⁹. Ayrıca, VMH'nin hasarlanması hiperfaji ve obezite ile sonuçlanırken ²¹⁰, DMH'nin ²¹¹ ve LH'nin hasarlanması ²¹² hipofajik ve zayıf bir vücut tipiyle sonuçlanmaktadır. Besin alımı sonrası POMC nöronları PVN'deki nöronlarda eksprese edilen melanokortin 3 ve 4 reseptörlerini (MC3/4R) aktive etmek için POMC aksonlarından salınan α melanosit uyarıcı hormona (α -MSH) bağlanırlar ve gıda alımı ve enerji harcanmasında bir azalmaya neden olurlar ²¹³. MC4R farklı birçok beyin bölgesinde yüksek oranda eksprese olmasına ^{214,215} rağmen, en yüksek ekspresyonunu hipotalamus PVN'de gösterir ve merkezi sinir sistemi (MSS) içindeki en baskın enerji alımı düzenleyici popülasyonunun PVN'deki MC4R olduğu kabul edilir ^{216,217}. Buna uyumlu olarak, yapılan fare çalışmalarında, PVN MC4R reseptörlerinin bozulması sonrası hiperfaji ve enerji metabolizmasının yavaşlaması sonucunda obezitenin geliştiği gösterilmiştir ^{204,218}. Gıda alımının hipotalamik melanokortinerjik nöronlar tarafından sabit bir şekilde inhibe edildiğine inanılırken ²¹⁹, BAT aktivasyonuna yol açan sempatik sinir sisteminin artan aktivitesinin, MC4R aktivasyonunu artırarak enerji harcamasını arttırdığı gösterilmiştir ^{220,221}. Bunların dışında, ARC AgRP/NPY nöronlarının PVN ve LH'ye yaptığı sinaptik bağlantılar açlık durumunda bu bölgelerde lokalize olan nöronların aktivasyonunu indüklemektedir ²²². AgRP/NPY nöronları hem NPY hem de AgRP peptidini sentezlemektedir. NPY peptidi, Y1 ²²³ ve Y5 ²²⁴⁻²²⁶ reseptörleri aktivasyonu üzerinden doğrudan etki ederek besin alımını

uyarır^{227,228}. Ayrıca NPY, Y1 reseptörleri üzerinden PVN ve beyin sapında tirozin hidroksilaz ekspresyonunu değiştirerek enerji tüketimi azaltır, bu da BAT'nin sempatik çıktısının azalmasına ve buna bağlı olarak BAT aktivitesinin azalmasına yol açar²²⁹. AgRP, MC3/4R'nin ters agonisti olarak etki gösterir, böylece α -MSH'nin ikincil nöronlar üzerinde anoreksijenik etkisini önler²³⁰. Ayrıca AgRP/NPY nöronları, inhibitör γ -aminobütirik asit (GABA) sentezi de gerçekleştirerek hipotalamus ARC'de lokalize olan POMC nöronlarını doğrudan inhibe eder²³¹. İlginç olarak, AgRP→POMC sinaptik bağlantılarının optogenetik aktivasyonu, POMC nöron aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ederken, AgRP nöronları tarafından POMC nöron aktivitesinin baskılanmasının, akut beslenme indüksiyonu için gerekli olmadığı gösterilmiştir²³². Ancak aynı çalışma ARC→PVN bağlantı aktivasyonunun, besin alımını güçlü bir şekilde indüklediğini de göstermiştir²³². AgRP/NPY→parabrakiyal çekirdek (PBN) bağlantısının aktivasyonunun besin alımını başlatmak için yeterli olmasa da²³², AgRP/NPY projeksiyonlarından PBN'de ekstrapotalamik nöronlara GABA salınımı gıda alımının uyarılmasında rol oynar^{233,234}. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, AgRP nöronlarının somatik aktivasyonu sonrası farklı AgRP nöron alt popülasyonlarının farklı beyin bölgelerine projeksiyonunun besin alımını indükleyebildiği gösterilmiştir²²². POMC ve AgRP/NPY nöronları ayrıca VMH ve PVN gibi diğer hipotalamik çekirdeklerden aktive edici glutamaterjik input girdisi alırken, PVN nöronları besin alımını düzenlenmesinde rolü olan LH nöronlarından inhibe edici inputlar alır ve bu da gıda alımı ile sonuçlanır²⁰⁶. Çarpıcı bir şekilde son zamanlarda yapılan bir çalışmada, herhangi bir besin maddesi alınmadan sadece gıdanın görselinin veya kokusunun, açlık durumunda POMC ve AgRP/NPY nöronlarının elektriksel aktivitelerini tersine çevirmek için yeterli olduğu gösterilmiştir²³⁵. ARC nöronlarından PVN'ye yapılan intrahipotalamik projeksiyonlar sadece gıda alımının düzenlenmesinde değil, aynı zamanda enerji harcanmasında da rol oynar: enerji metabolizmasında POMC nöronları kahverengi yağ dokusunun elektriksel aktivitesi artırırken²³⁶, AgRP/NPY nöronları bu aktiviteyi azaltır²²⁹. Böylece açlık durumunda enerji harcaması azalır ve gıda alımını takiben enerji harcaması artar^{206,237}.

2.6. Apelin ile Besin Alımı Arasındaki İlişki

Apelin'in besin alımının kontrolünde rolü tam olarak bilinmemektedir, bu nedenle çok daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Yapılan bir çalışmada apelin-13'ün intravenöz (IV) ve ICV enjeksiyonunun Wistar sıçanlarında besin alımı üzerine etkileri

araştırıldığında, 1 ve 3 nmol apelin-13'ün ICV enjeksiyonunun, hem tok hem de aç sıçanlarda besin alımını azalttığı, fakat 10 nmol IV olarak uygulanan apelin-13' enjeksiyonunun tok ve aç bırakılmış sıçanlarda besin alımında herhangi bir değişiklik yapmadığı gösterilmiştir ²³⁸. Ayrıca Lin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada balıklarda intraperitoneal (IP) olarak uygulanan apelin-13'ün besin alımını arttırdığı ve apelin-13'ün balıklarda oreksijenik bir faktör olarak etki ettiği gösterilmiştir ²³⁹. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, C57BL/6 farelerinde üçüncü ventriküle apelin-13'ün kronik 10 günlük ICV infüzyonunun besin alımı üzerindeki etkilerini araştırılmıştır ²⁴⁰. Elde edilen sonuçlar apelin-13 (1 µg/gün) infüzyonunun 3-7. günlerinde gıda alımını önemli ölçüde arttırdığı ve infüzyon sonrası tedavi edilen bu farelerin kontrol grubu farelerle benzer oranlarda besin alımı gösterdiği bildirilmiştir. Apelin-13'ün besin alımı üzerine göstermiş olduğu bu farklılıkların, enjekte edilen apelin-13'ün miktarı, enjeksiyon yolu ve hayvan türleri ile doğrudan ilişkili olduğu savunulabilir ²⁴¹. Apelin'in besin alımı üzerindeki etkilerinin daha fazla araştırılmasının, obezite tedavisi için yeni fikirler sağlayabileceği düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tüm deneyler, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Beyin Araştırmaları Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Deney protokolü Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (YÜDHEK) 20.01.2021 tarihinde 2021/01-3 no'lu kararla onaylanmıştır.

3.1. Kullanılan Deney Hayvanı

Bu tez çalışmasında, yirmi adet erkek ve on adet dişi toplamda 30 adet (6-8 haftalık) transgenik AgRP-Ires-Cre (Jax. Lab. #012899) fare kullanıldı. Bu fareler Jackson Laboratuvarı'ndan (ABD) ithal edildi ve Yeditepe Üniversitesi Laboratuvarları'nda üretimlerine devam edildi. Deney hayvanları $21\pm1^{\circ}\text{C}$ oda ısısı ve 12 saat aydınlık-karanlık ortamda tutuldu. Farelere yeme davranışı takibi başlayana kadar standart fare yemi ile normal musluk suyu *ad libitum* verildi. Deney grupları şu şekilde belirlenmiştir: Grup 1: Streptozotosin (STZ) (n=7 erkek fare), Grup 2: Apelin (n=8 erkek fare), Grup 3: STZ+Apelin (50 mg/kg) (n=10; 5 erkek, 5 dişi fare) ve Grup 4: STZ+Apelin (100 mg/kg) (n=5 dişi fare).

3.2. Farelerin Üretim Stratejisi

Bu tez çalışmasında kullanılan Agrp-Ires-Cre (Jax. Lab. #012899) transgenik fare hattı Jackson Laboratuvarı'ndan (Amerika Birleşik Devletleri) ilk olarak 1 erkek ve 1 dişi fare olacak şekilde ithal edilmiştir. Bu laboratuvarın araştırmacılara önermiş olduğu şekilde homozigot x homozigot çiftleşme stratejisi uygulandı. Buna uygun olan bir erkek ve iki dişiden oluşan çiftleşme kafesleri oluşturuldu. Farelerin siklus takibi yapılarak gebe kalanlar bireysel kafeslere alındı. Tüm bu hattın üretimi ve bakımı Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (YÜDETAM) ilgili profesyoneller tarafından yapıldı.

3.2.1. Genotipleme

Yeni doğan yavruların laktasyon döneminin sonlanması beklendi ve 22. günde hayvanlar cinsiyetlerine göre ayrıldı. Yavrular kulaklarına küpe takılarak kimliklendirildi ve her birinden genotipleme amacıyla dokular alındı. Kulaklarından alınan dokular $+4^{\circ}\text{C}$ 'de DNase'den arındırılmış deney tüplerine konuldu. Her bir örneğe 100 μL 25 mM NaOH/0,2 mM EDTA solüsyonu eklendi. Bu örnekler 98°C 'de 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 19°C 'ye alınan dokular 100 μL 40 mM Tris-HCl solüsyonu

ile 4000 rpm’de 3 dakika santrifüj (Mikrosantrifüj, Sigma 1-14) edildi. Hazırlanan solüsyon genotipleme için yeni tüplere aktarıldı. Elde edilen yeni solüsyondaki DNA polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) karışımına (1X tampon çözeltisi, iç pozitif kontrol geri primer (0,5 µM) / transgenik geri primer (0,5 µM), ortak primer (0,5 µM) dNTP solüsyon karışımı (200 µM), Taq Polimeraz (1,25 U/50 PCR)) eklendi. Kullanılan primer dizileri Tablo 2’de belirtilmiştir. Her bir PZR deneyi için kontrol ve transgenik PZR karışımı oluşturuldu. Reaksiyonların son hacimleri 12 µL olacak şekilde tüplere ddH₂O eklendi ve PZR reaksiyonu Multigene Optimax (TC9610) cihazında gerçekleştirildi.

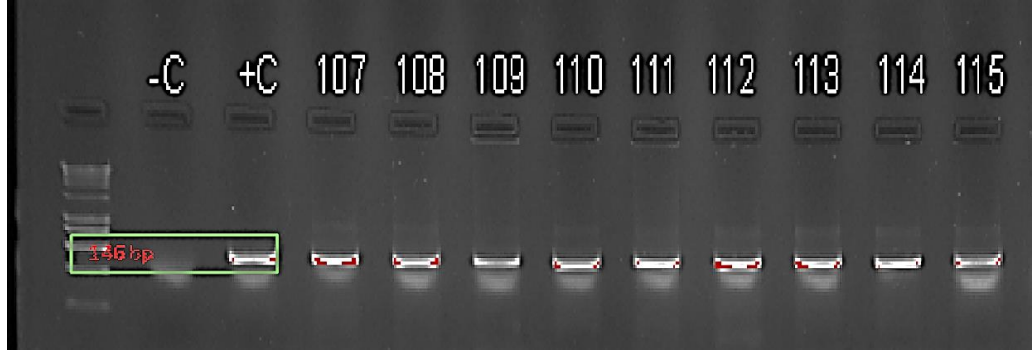
Tablo 2. Kullanılan Primer Dizileri.

Primer	Dizi (5’→3’)
Ortak	GAAAAGATAAGGCCTTCAAGTGCT
İç pozitif kontrol geri	GATCTTTCTGCACTATCTTCCTTC
Transgenik	ATCGACCGGTAATGCAGGCAA

Tablo 3. Kullanılan PZR protokolü.

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)
1	95	30
38	95	30
38	60	30
38	68	60
1	68	300

PZR reaksiyonu sonrası örnekler %2’lik agaroz jele (1 X Tris-Borik asit- EDTA (TBE) (40 mM Tris-Cl, 45 mM borik asit, 1 mM EDTA)) yüklendi ve elektroforez işlemi (120 volt, 300 mA, 25 dakika) gerçekleştirildi. Deney sonrası görüntüleme ultraviyole transillüminatör (ChemiDoc XRS+, BioRad) kullanılarak gerçekleştirildi Alınan görüntü Şekil 5’te gösterilmiştir.



Şekil 1. AgRP-Cre farelerin PZR ile genotipleme sonucu temsili jel görüntüsü.

3.3. Cre Rekombinaz Bağımlı AAV Virüslerin İntrakraniyal Enjeksiyonu

ABD’de bulunan AddGene firmasından (www.addgene.org) intrakraniyal virüs enjeksiyonu için AAV-CAG-Flex-GFP virüsü satın alındı. Bu virüsün tercih edilme sebebi genetik haritasında yeşil floresan protein (GFP) geni ile Cre enziminin bağlandığı LoxP genlerini de bulundurmasıdır. Cre bağımlı transgenik fare hatlarında cre rekombinat enzimini içeren spesifik nöronları işaretleyerek, bu nöronların GFP sentezlemesine olanak sağlaması bir avantajdır. Genotiplemeden pozitif alınan AgRP-Cre farelere AAV-CAG-Flex-GFP virüsü enjekte edilerek AgRP nöronlarının GFP ile işaretlenmesi gerçekleştirildi. Enjeksiyonlar stereotaksi (David Kopf) cihazı ve operasyon suresince farelerin anestezi altında kalmalarını sağlayacak ona bağlı anestezi cihazı kullanılarak yapıldı (Şekil 2). Enjeksiyon yapılacak deney fareleri düşük doz izofluran ile bayıltılıp stereotaksi cihazına yerleştirildi. Altlarında operasyon süresince yerleşik olacak olan 37 derece vücut sıcaklığında çalışan taban ısıtması açıldı. Fareler stereotaksi cihazına kulak barları ile sabitlenerek yerleştirildikten sonra, %1,5-2 izofluran ve solunabilir oksijen uygulanarak operasyon süresince derin anesteziye alındı. Farelerin derin anesteziye girdiklerinden refleks kontrolü ile emin olundu. Farelerin gözlerine ortam ışıklarından etkilenmemeleri adına tobramisin etken maddeli ajanlar uygulandı. Operasyonu başlatmak adına farelerin kafa derisine önden arkaya doğru insizyon yapıldı. İntrakraniyal enjeksiyon yapılacak deney hayvanlarının enjeksiyon koordinatlarının daha kolay belirlenmesi için Bregma–Lambda noktalarının görünürlüğü H₂O₂ uygulanarak arttırıldı. Bregma-Lambda noktaları cerrahi kalem ile işaretlenerek, elektrot tutucu ile iki mesafe arası ölçüldü. ARC bölgesinin koordinat noktaları fare beyin atlasında belirtildiği gibi 1,35 mm posterior, ±0,35 mm lateral ve 5,85 mm vertikal olarak belirlendi. Bu koordinatlar farelerin büyüklüklerine göre küçük farklılıklar göstermektedir. Her deney

faresinin Bregma-Lambda noktaları arasındaki mesafe ölçümü yapılarak, standart fare beyin atlasındaki koordinatlara göre oranlaması yapıldı. Beyin içi enjeksiyonlarda kullanılan mikro pipetlerin (Drummond Scientific, Wiretrol, Broomall-PA) uçları beyin dokusuna daha az zarar vermesi için pipet çekme cihazı (Narishige, Japonya) ile uçları daha ince (50 μ m) olacak şekilde ayarlandı. Pipetlerin içleri mineral yağ ile dolduruldu ve mikro manipülatör cihazına yerleştirildi. Daha sonra, belirlenen koordinatlarda bir diş hekimi drill'i kullanılarak (1,4 mm cap) kafatasına çift taraflı kranyotomi yapıldı. Pipet içindeki mineral yağın bir kısmı dışarı çıkartılarak, yerine küçük bir parafilm parçası üzerine alınan 1,2 μ L virüs çekildi. Hipotalamik ARC bölgesine intrakraniyal olarak 600 nL virüs çift taraflı olarak enjekte edildi. Her iki bölgeye de enjeksiyon yapıldıktan sonra 10 dakika beklendi. Daha sonra yavaş bir şekilde pipet beyinden çıkartılarak beyin dokusu rehidratasyon ve rahat sütürleme sağlamak adına Ringer solüsyonu ile yıkandı. Tüm işlemler bittikten sonra kafa derisine 5.0 cerrahi iplikle dikiş atıldı. Dikiş sonrası manipülasyona uğrayan bölge tekrar antiseptik kullanılarak temizlendi. Enjeksiyon sonrasında AgRP nöronlarının GFP üretmeleri için yaklaşık iki hafta beklendi. Sonrasında fareler deney protokolüne göre kafeslere ayrıldı.



Şekil 2. Stereotaktik intrakraniyal AAV enjeksiyonu.

3.4. Beyin Kesiti Hazırlanması

GFP virüsü ile enjeksiyonları yapılan AgRP-Cre fareler etik kurul başvurusunda belirtildiği gibi uygun şekilde anestezi altına alınıp dekapite edildi. Vibratom cihazı (Campden Instruments 5100 mz) yardımı ile hızlı bir şekilde kesme (cutting) solüsyonuna alınan beyinlerden 250 µm kalınlığında arkuat çekirdeği içeren kesitler alındı. Kullanılan kesme (cutting) solüsyon içeriği: 92 mM NMDG, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaHPO₄, 30 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 25 mM Glukoz, 2 mM Tiyoüre, 5mM Na-askorbat, 3 mM Na-piruvat, 0,5 mM CaCl₂·2H₂O ve 10 mM MgSO₄·7H₂O. Alınan kesitler, pastör pipet kullanılarak HEPES içeren yapay beyin omurilik sıvısı (aCSF) solüsyonuna aktarıldı. Bu solüsyonun içeriği: 92 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 30 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 25 mM Glukoz, 2 mM Tiyoüre, 5mM Na-askorbat, 3 mM Na-piruvat, 2 mM CaCl₂·2H₂O ve 2 mM MgSO₄·7H₂O. Beyin dokuları vibratom cihazında henüz kesilirken ve sonrasında kullanılmayı beklerken daima %95 O₂ / %5 CO₂ gazı ile havalandırılmıştır. Kesitler aCSF içerisinde minimum 1 saat inkübe edildi. Sonrasında elektrofizyoloji banyosunda perfüze edilen kayıt solüsyonu içerisine alınan kesitlerden, ilgili bölgedeki işaretlenmiş nöronlardan elektrofizyoloji patch clamp tekniği kullanılarak, gevşek kayıt (cell-attach) kayıtları alındı. (Kayıt solüsyonu (recording aSCF) içeriği): 124 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 12,5 mM Glukoz, 5 mM HEPES, 2 mM CaCl₂·2H₂O ve 2 mM MgSO₄·7H₂O)

3.5. Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması

Deney protokolüne uyarak dekapite edilen farelerden alınan beyin dokularından elde edilen kesitler patch clamp (MultiClamp 700B Axon CNS) banyosuna alındı. Şekil 3'te deneylerde elde edilen elektrofizyolojik kayıtların alındığı sistem görülmektedir. Sistemde kullanılan aCSF solüsyonu kesitlerin sürekli olarak perfüze olmasını ve gazlanmasını sağlamaktadır. Virüs enjeksiyonu ile işaretlenmiş olan arkuat çekirdekteki AgRP nöronlarından elektrofizyoloji gevşek kayıt (cell-attach) tekniği kullanılarak kayıtlar alındı. Elektrofizyoloji grubunda bulunan farelerden elde edilen beyin kesitlerinden yaklaşık 15-20 farklı nörondan kayıtlar alındı. Alınan kayıtlar sırasında kullanılan elektrofizyoloji pipeti içerisinde aCSF solüsyonu kullanıldı ve pipet dirençleri 7-9 MΩ olacak şekilde ayarlandı. Bu teknik ile alınan kayıtlar STZ ve Apelin hormonunun AgRP nöronları üzerinde oluşturduğu ateşleme frekansına olan etkilerini

göstermektedir. AgRP nöronlarından alınan tüm kayıtların frekans değerlerini analiz etmek için Clampfit 10.7 programı kullanıldı.



Şekil 3. Elektrofizyoloji düzeneği.

3.6. Beslenme Davranışı

Enjeksiyon yapılan fareler (n=30) farklı zamanlarda dört ayrı deney grubu oluşturacak şekilde tekli davranış kafeslerine alındı. Deney grupları, Grup 1: Streptozotosin (STZ) (n=7 erkek fare), Grup 2: Apelin (n=8 erkek fare), Grup 3: STZ+Apelin (50 mg/kg) (n=10; 5 erkek, 5 dişi fare) ve Grup 4: STZ+Apelin (100 mg/kg) (n=5 dişi fare) olarak belirlendi. Tüm gruplarda 7 gün habitüasyon (yeni ortama alisma süreci) sonrasında ise deney protokolüne göre diyabeti indüklemek adına ilgili gruplarda hayvanlara beş gün STZ uygulandı. Modelin doğrulanması adına farelerden son uygulamadan üç gün sonra alınan kan numunesinden 250 mg/dL kan şekeri glukometrede gösterilerek (diyabet +) o farenin deneye devamı sağlandı. Ardından apelin uygulaması yapılacak gruplarda hayvanlara on gün boyunca apelin enjeksiyonu yapıldı. Farelerden 24 saatlik periyotlarda beslenme davranışı alındı. Kafeslere ayrılan farelerin her gün aynı saatte kalan besinleri tartılarak not alındı ve tekrardan tartılarak yeni yem verildi. Tüm deneyler süresince tüketilen yem miktarları bu şekilde belirlendi. İlk gruptaki hayvanlara beş gün boyunca streptozotosin 50 mg/kg IP olarak yapıldı İkinci grupta sadece Apelin

IP olarak 50 mg/kg olarak verildi. Üçüncü gruptaki hayvanlara STZ erkeklerle 50 mg/kg dişilere ve 75 mg/kg dozlarında IP olarak verildi ve sonrasında apelin 50 mg/kg on gün boyunca uygulandı. Dördüncü gruptaki hayvanlara ise önce 75 mg/kg STZ uygulaması sonrası 100 mg/kg apelin IP olarak uygulandı. Bu grupta bir önceki gruptan farklı olarak apelin dozu iki katına çıkartılırken pst-apelin dönem önceki gruba göre daha uzun süre takip edildi. Her dört grupta da tüm deneyler boyunca uygulamaların etkilerinin araştırılması adına fareler tekli kafeslerde barındırılarak hem yem tüketimleri hem de farelerin ağırlıkları düzenli olarak kayıt altına alındı (Şekil 4).

3.7. Lokomotor Aktivite (Home Cage Activity)

AAV-GFP enjeksiyonu yapılmış AgRP-Cre fareler (n=30) 15 günlük virüs enfeksiyon süresi sonrasında her dört grup için de davranış kafeslerine yerleştirildi (Şekil 4). Bu tekli kafesler sayesinde farelerin bireysel yem ve su tüketimleri, ağırlıkları ve kan şekeri farklı zamanlarda ölçülerek kayıt altına alındı. Ayrıca kafeslerin üstten kamera takılabilen yapıda olmaları, davranış deneylerinde özellikle lokomotor aktivite takibinde oldukça kolaylık sağladı (Şekil 4). STZ ve/veya apelin uygulamalarından önce bir hafta boyunca farelerin normal davranışları kaydedildi. Sonrasında enjeksiyonların lokomotor aktiviteye etkisi deney boyunca kayıt altına alındı. Alınan tüm görüntü kayıtları Noldus EthoVision XT 15.0 davranış programında analiz edilerek hayvanların habitüasyon, uygulamalar sırasında ve sonrasında kafes içindeki hızları ve kat ettikleri mesafeler belirlendi.



Şekil 4. Hayvanların yeme davranışı ve lokomotor aktivite takibi.

3.8. Kan Şekeri, Serum İnsülin, Trigliserit ve Kolesterol Seviyelerinin Belirlenmesi

Farelerde diyabet modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu doğrulamak için STZ uygulaması öncesi ve sonrasında kan şekerleri Vivacheck Eco glukometre kullanılarak tespit edildi. Serum insülin seviyeleri Mercodia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA kiti (Mercodia, 10-1249-01) kullanılarak üreticinin yönlendirmelerine uygun olarak belirlendi. Temel olarak, “enzim konjugatı, yıkama tamponu ve numuneler hazırlandı. Kalibratörler, kontroller ve numuneler duplike olarak mikropalak kuyucuklarına 25 μ L/kuyucuk olacak şekilde yerleştirildi. Her kuyucuğa 100 μ L enzim konjugat eklendi ve plaka, 700 rpm’de çalkalanarak 2 saat boyunca oda sıcaklığında

inkübe edildi. Sonrasında 350 µL yıkama tamponu ile her kuyucuk altı defa yıkandı. Ardından her kuyucuğa 200 µL TMB substrat eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyon sonrasında kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklendi. Plaka 5 saniye çalkalandıktan sonra spektrofotometre (Synergy HT) kullanılarak optik yoğunluk 450 nm’de okunarak sonuçlar hesaplandı.

Deney sırasında hayvanlardan farklı zamanlarda (habitüasyon sırasında, STZ veya Apelin uygulandığı günler içerisinde ve uygulamalar sonrasında) toplanan kanlardan elde edilen serumlardan trigliserit (6801905; IDEXX laboratories) ve kolesterol (6801906; IDEXX laboratories) analizleri IDEXX VetTest 8008 biyokimya analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

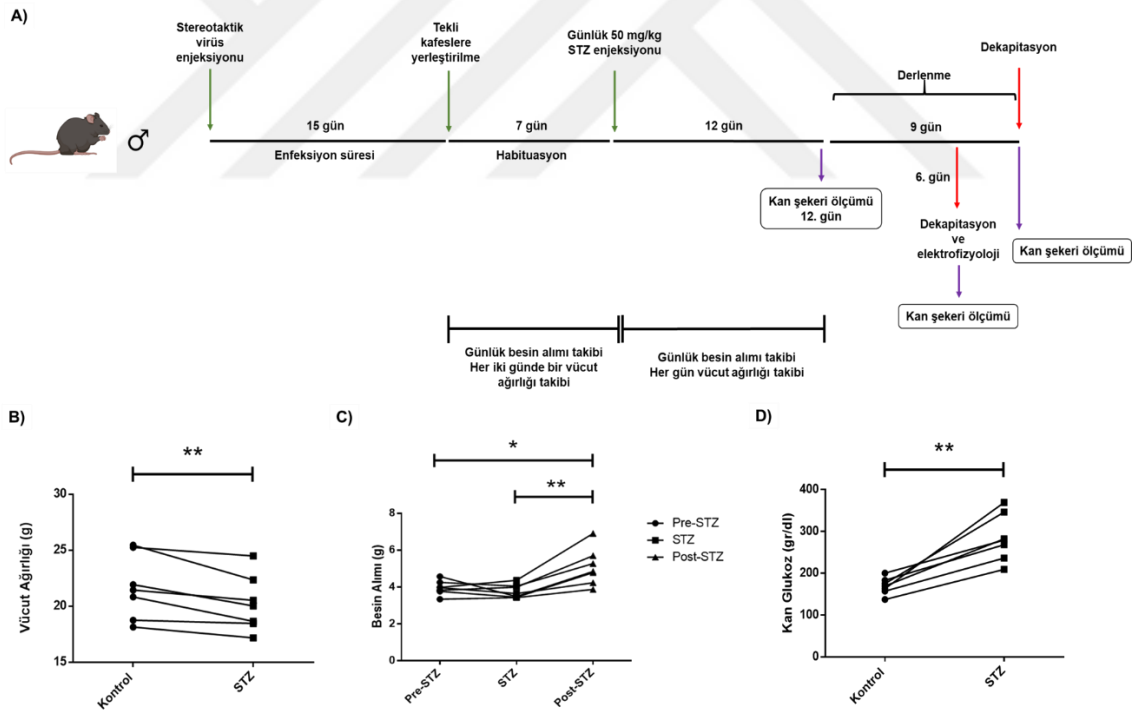
3.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, ABD). Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Grup içi uygulama öncesi ve sonrası karşılaştırmalarda tekrarlı tek yönlü varyans analizini takiben Tukey’in çoklu karşılaştırma testi kullanılırken elektrofizyoloji verilerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizini takiben Tukey’in çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Farelerde Vücut Ağırlığı, Besin Alımı ve Kan Şekeri Ölçümleri

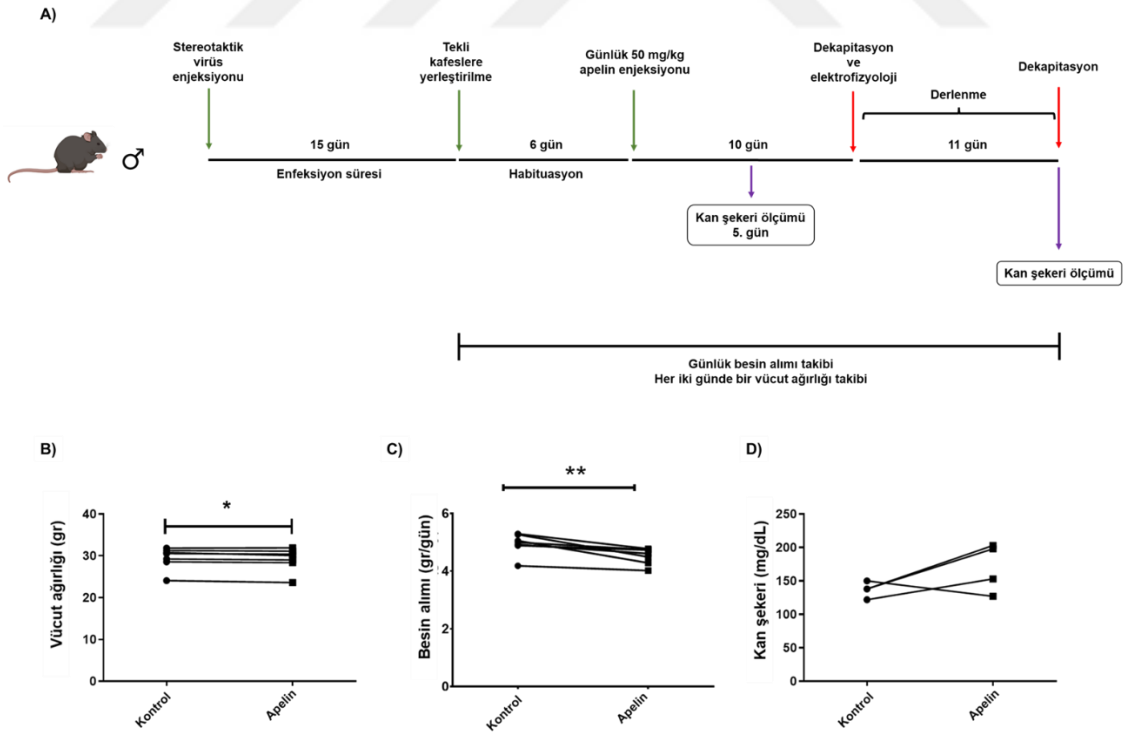
STZ, pankreas β hücre harabiyetine sebep olarak diyabet oluşturmaktadır. Çalışmamızda STZ uygulanmış farelerde vücut ağırlığı, besin alımı ve kan şekeri seviyeleri ölçümleri yapılmıştır. STZ uygulanmış hayvanların vücut ağırlıklarında kontrole göre anlamlı derecede düşüş görülmüştür ($p<0,01$; Şekil 5A ve B). STZ öncesi (pre-STZ) ve STZ uygulaması süresince besin alımı anlamlı olarak değişmezken, post-STZ (diyabetik) dönemde besin alımı hem pre-STZ (kontrol) hem de STZ uygulama dönemine göre anlamlı olarak yükselmiştir (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,01$; Şekil 5A ve C). Ayrıca kan glukoz seviyelerinin STZ uygulaması sonrasında kontrole oranla anlamlı derecede arttığı da gösterilmiştir ($p<0,01$; Şekil 5A ve D).



Şekil 5. (A) Set 1 deney planlaması, STZ uygulaması öncesi ve sonrası (B) vücut ağırlığı, (C) besin alımı ve (D) kan şekeri değerleri (* $p<0.05$ and ** $p<0.01$).

4.2. Apelin Uygulamasının Farelerde Vücut Ağırlığı, Besin Alımı ve Kan Şekeri Üzerindeki Etkileri

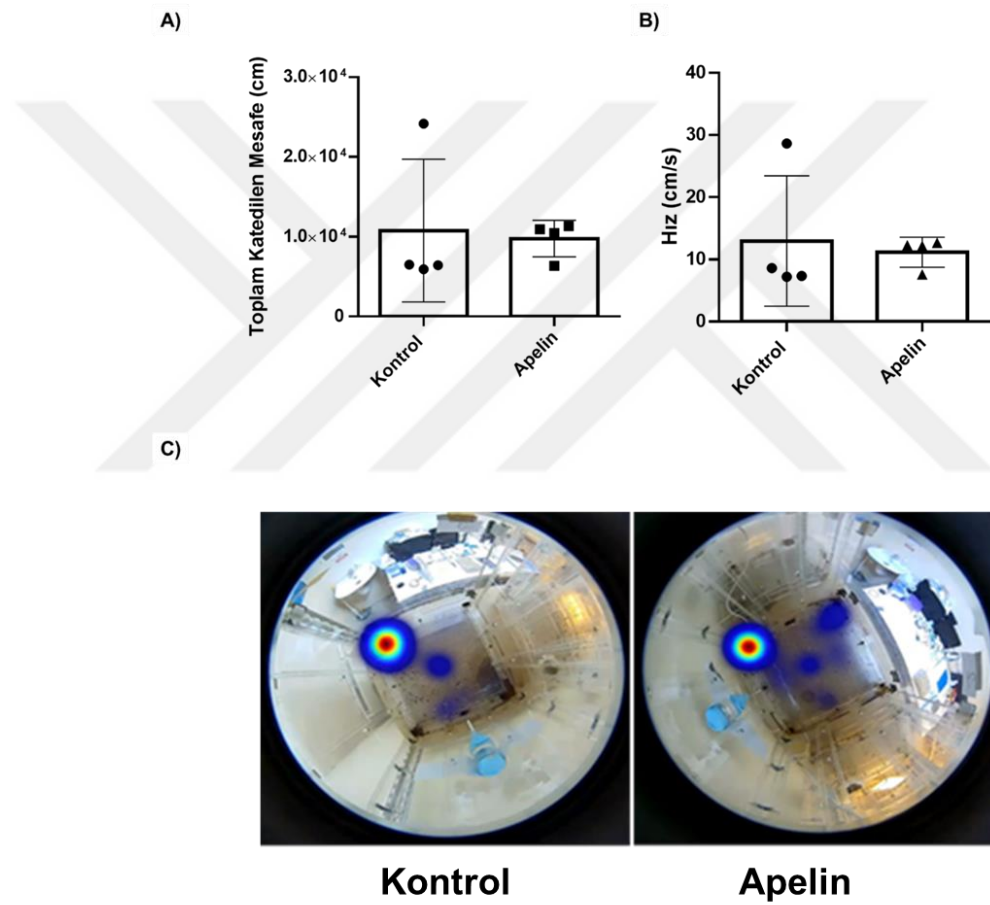
Son yıllarda ağırlık verilen apelinin besin alımı üzerine olan etkileri farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızda intraperitoneal olarak uygulanan apelinin farelerde vücut ağırlığı, besin alımı ve kan şekeri seviyeleri üzerinde olası değişiklikleri incelenmiştir. Öncelikle hipotalamus arkuat çekirdekte lokalize olan AgRP nöronları intrakranyal olarak GFP virüsü ile işaretlenmiştir. Beyin içi enjeksiyon yapılan farelerin iyileşmesi beklenilerek sağlıklı olan fareler tekli kafeslere ayrılmıştır. Altı gün habitüasyon süresi sonrasında farelere günlük 50 mg/kg apelin intraperitoneal olarak on gün boyunca uygulanmıştır. Bu süre zarfında farelerden vücut ağırlığı, besin alımı ve kan şekeri ölçümleri alınmıştır. Bu deney süreci detaylı olarak Şekil 6A’da gösterilmiştir. Deney sonucu elde edilen verilere göre, eksojen apelin uygulanmasının vücut ağırlıklarında ve besin alımında uygulama sonrası kontrole göre anlamlı derecede düşüşe sebep olduğu görülürken (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,01$; Şekil 6B ve C), kan glukoz seviyelerinde kontrole göre uygulama sonrasında anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı gözlenmiştir (Şekil 6D).



Şekil 6. (A) Set 2 deney planlaması, apelin uygulaması öncesi ve sonrası (B) vücut ağırlığı, (C) besin alımı ve (D) kan şekeri değerleri (* $p<0.05$ and ** $p<0.01$).

4.2. Apelinin Farelerde Kafes İçi Aktiviteye Olan Etkileri

Kronik (10 gün) olarak apelin uygulanmasının fareler üzerindeki lokomotor aktivite değişikliklerine olası etkilerini belirlemek için fareler tekli kafeslere alınmıştır. Dekapitasyona kadar geçen süre boyunca kafes içi aktivitelerinin değerlendirilebilmesi adına tüm deney hayvanları gece görüş özelliği de olan kamera sistemleri ile takip edilmiştir. Uygulanan apelinin farelerin kafes içi aktiviteleri olarak kabul edilen, kat edilen mesafe ve hız parametrelerinde kontrole göre herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (Şekil 7A-C).

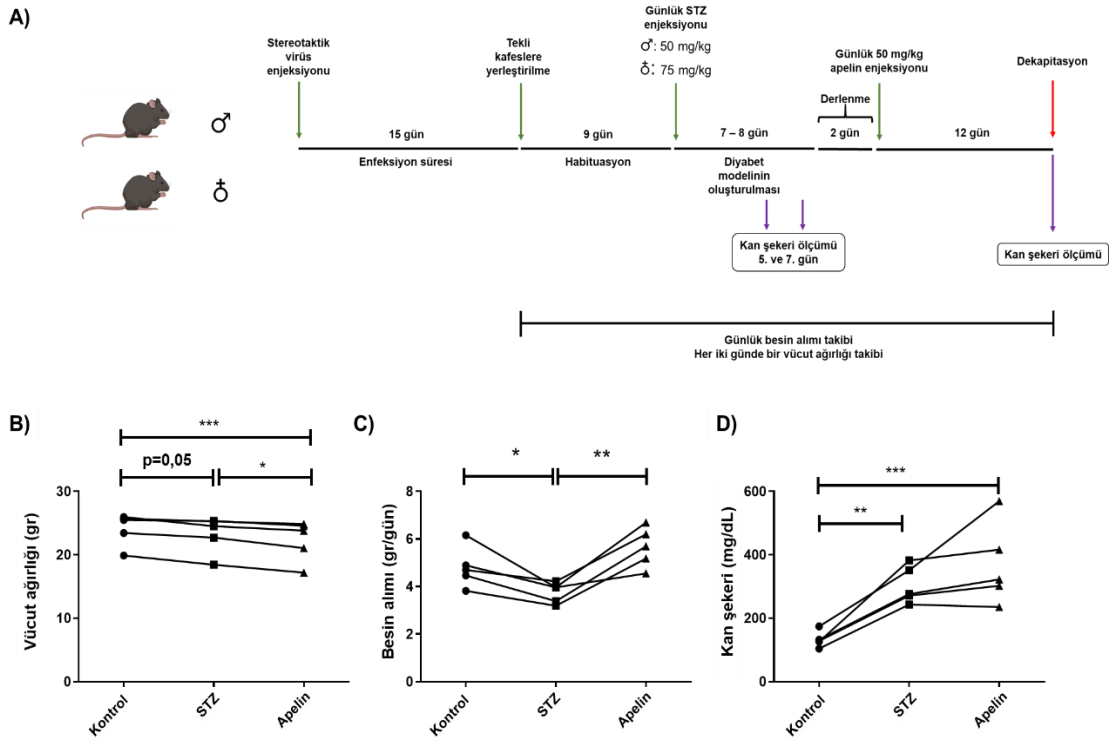


Şekil 7. Hayvanların Apelin öncesi ve sonrası kafes aktiviteleri (A) tüm kat edilen mesafe, (B) hızları ve (C) ısı haritaları.

4.3. Apelinin STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Fareler Üzerindeki Vücut Ağırlığı, Besin Alımı ve Kan Şekeri Seviyelerine Olası Etkileri

Yukarıda ayrı ayrı sonuçları açıklanan STZ ve apelin grubu farelerden elde edilen sonuçlara ek olarak STZ uygulanarak diyabet modeli oluşturulmuş farelere sonrasında

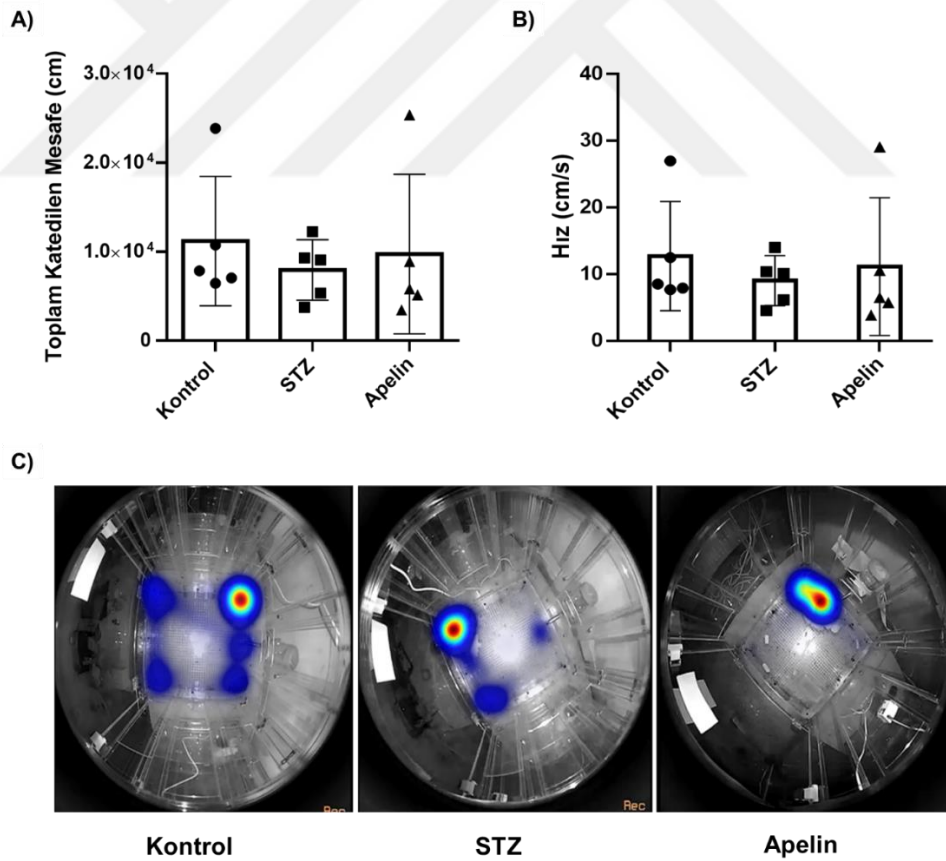
kronik IP Apelin uygulanmasının etkilerini araştırılmıştır. Aşağıda şekil 8’de detaylı olarak gösterilen protokol bu grup farelerde uygulanmıştır. Kısaca, AgRP-Cre fareler ilk olarak tekli kafeslere ayrılarak dokuz gün habituasyon süreci sonrasında beş gün boyunca aynı saatte erkekler 50 mg/kg, dişilere ise 75 mg/kg STZ uygulanarak diyabet modeli oluşturulmuştur (Şekil 8A). İki gün beklenerek kan şekeri 250 mg/dL ve üzeri olduğu glukometre ile doğrulanan farelere on gün boyunca 50 mg/kg apelin uygulanmıştır (Şekil 8A). Tüm deney boyunca vücut ağırlıkları, besin alımı ve kan şekeri seviyeleri kayıt altına alınarak apelinin olası etkileri araştırılmıştır (Şekil 8A). STZ ile indüklenerek diyabet oluşturulmuş hayvanlarda vücut ağırlığı kontrole göre neredeyse anlamlı derecede düşmüş, bu düşüş apelin uygulandıktan sonra da devam etmiştir ($p<0,05$; Şekil 8B). STZ ile indüklenerek diyabet oluşturulmuş hayvanlarda besin alımı kontrole göre anlamlı derecede azalırken ($p<0,05$; Şekil 8C), bu hayvanlarda apelin uygulanması sonrasında besin alımı STZ uygulaması sonrası döneme kıyasla anlamlı derecede artarken ($p<0,05$; Şekil 8C), diyabet öncesi (kontrol) seviyelere dönmüştür (Şekil 8C). Kan glukoz seviyeleri STZ uygulaması sonrasında kontrole göre anlamlı derecede yükselmiştir ($p<0,01$; Şekil 8D). Bu değişim apelin uygulandıktan sonra da STZ sebepli diyabet varlığına bağlı olarak kontrole göre yükselmeye devam etmiştir (Şekil 8D).



Şekil 8. (A) Set 3 deney planlaması Diyabet indüksiyonu öncesi,sonrası ve apelin sonrası **(B)** vücut ağırlığı, **(C)** besin alımı ve **(D)** kan şekeri değerleri. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$)

4.4. Apelinin STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Farelerde Kafes İçi Aktivite Üzerine Olası Etkileri

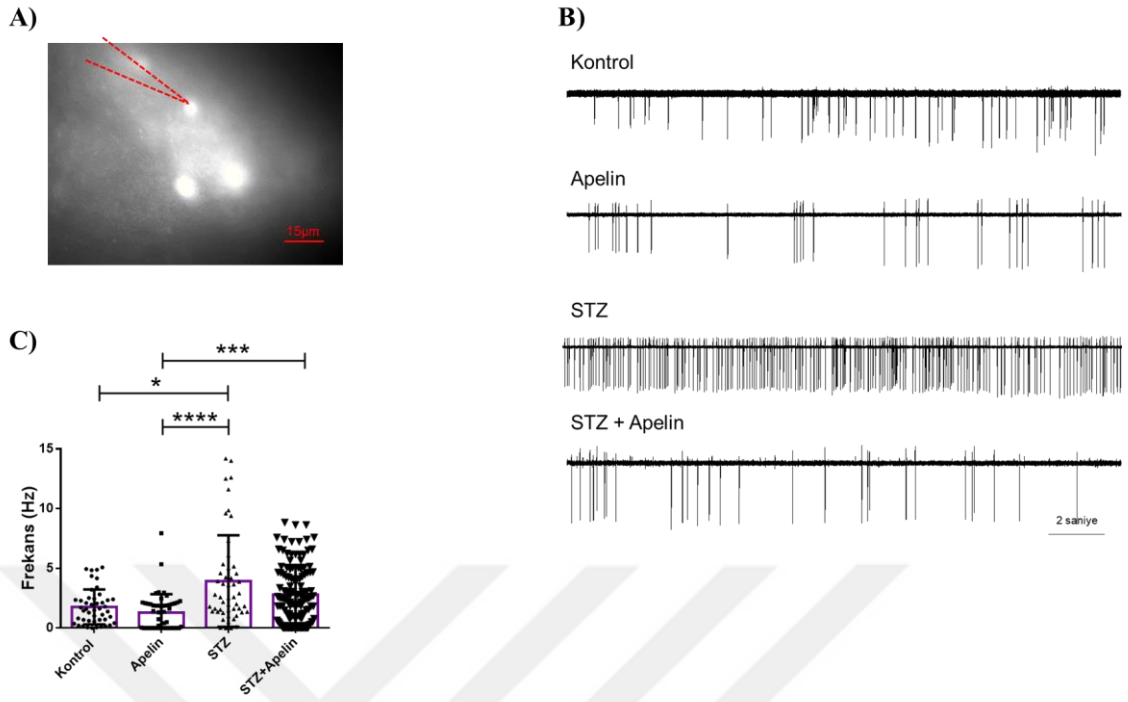
STZ ile indüklenmiş diyabetik farelere kronik (10 gün) apelin uygulanması sırasında kafeslere yerleştirilen gece görüş özelliği olan kameralar ile farelerin davranışları 24 saat boyunca kayıt altına alınmıştır. Bu sayede elde edilen görüntülerle farelerin kafes içi hareketleri aldıkları mesafe ve hızları yönünden analiz edilmiştir. Bu sonuçlara göre, STZ ile diyabet modeli oluşturulmuş farelere IP olarak uygulanan apelinin oluşan lokomotor aktivite parametrelerinden mesafe ve hız anlamında uygulamalar öncesinde, sırasında ve sonrasında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 9A-C).



Şekil 9. Hayvanların kafes aktiviteleri. Hayvanların diyabet indüksiyonu öncesi ve Apelin sonrası **(A)** tüm kat edilen mesafe, **(B)** hızları ve **(C)** ısı haritaları.

4.5. STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Farelere IP Olarak Uygulanan Apelinin Arkuat AgRP Nöronları Üzerindeki Elektrofizyolojik Etkileri

4-6 haftalık AgRP-Cre farelere Cre bağımlı GFP virüsü intrakranyal olarak uygulanmıştır. Bu uygulama ile arkuat çekirdekte lokalize olan AgRP nöronlarında STZ ile oluşturulmuş diyabet modelinde ve apelin uygulanması sonrasında oluşabilecek elektrofizyolojik özelliklerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Enjeksiyonu tamamlanan fareler aynı şekilde tekli kafeslere aktarılmıştır. Yukarıdaki protokole uygun şekilde ilk olarak 5 ardışık gün STZ (50 mg/kg/gün) uygulanarak diyabet modeli oluşturulmuştur. STZ sonrası alınan kan örneklerinin diyabet lehine (>250 mg/dL) sonuçlanan farelere sonrasında kronik (10 gün) apelin (50 mg/kg/gün) IP olarak uygulanmıştır. Deney sonrası fareler dekapite edildikten sonra beyinleri çıkartılarak elektrofizyolojik kayıtlar için 250 μ m'lik kesitler alınmıştır. Alınan kesitler elektrofizyoloji banyosuna aktararak hipotalamus arkuat çekirdeğinde lokalize olan ve GFP ile işaretlenmiş nöronlardan yama kısıncı (patch clamp) tekniği ile elektrofizyoloji kayıtları alınmıştır (Şekil 10A). STZ uygulaması yapılmamış hayvanlara apelin uygulaması yapılmasının AgRP nöron aktivitesini değıştirmedeği gözlenmiştir (Şekil 10B ve C). STZ uygulaması ise kontrol hayvanlarına ve apelin uygulanan hayvanlara kıyasla AgRP nöron aktivitesini anlamlı şekilde arttırmıştır ($p<0,05$; Şekil 10B ve C). Apelin uygulamasının ise STZ kaynaklı AgRP nöronal aktivitesinde düşürme eğiliminde olmasına rağmen, bu düşüş anlamlı değildir (Şekil 10B ve C).



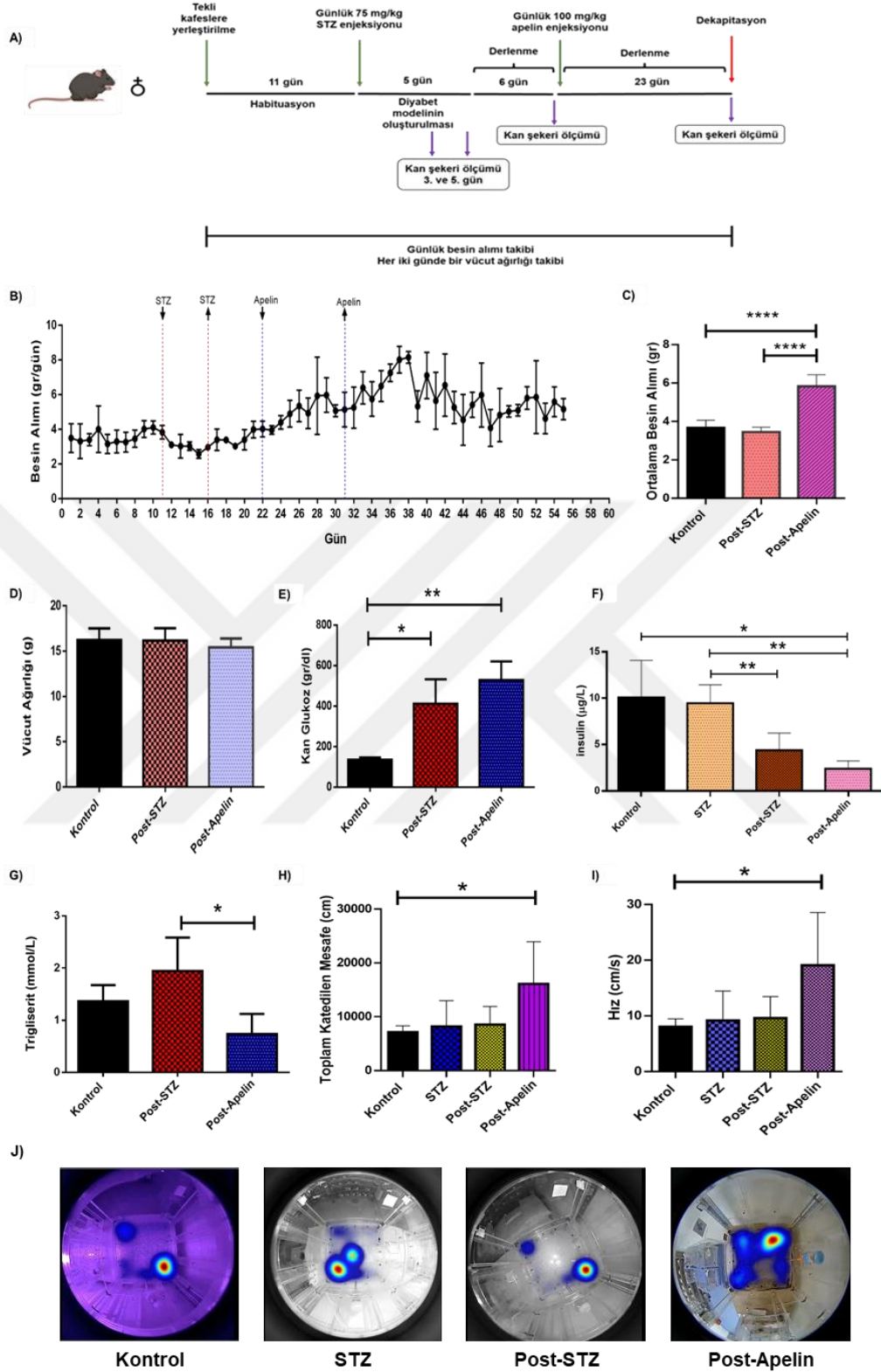
Şekil 10. (A) Hipotalamus arkuat çekirdek GFP ile işaretlenmiş AgRP nöron görüntüsü **(B)** AgRP nöronlarından alınan elektrofizyoloji kayıt örnekleri **(C)** gruplardan alınan aksiyon potansiyel akım grafiği (*p<0,05, ***p<0,001 ve ****p<0,0001).

4.6. STZ ile Diyabet Modeli Oluşturulmuş Farelere Farklı Doz Apelin Uygulanmasının Vücut Ağırlığı, Besin Alımı ve Kan Şekeri Seviyelerine Olan Etkileri

Apelinin farklı bir dozda olası etkisinin araştırılması üzerine yeni bir deney grubu oluşturulmuştur. Bu gruptaki farelere protokole göre STZ ile diyabet modeli oluşturulduktan sonra apelin uygulanmış ve vücut ağırlıkları, besin alımı ve kan şekerleri yönünden takip edilmiştir (Şekil 11A). Burada farklı olarak, apelin IP olarak 10 gün boyunca 50 mg/kg yerine doz iki katına çıkartılarak 100 mg/kg olarak uygulanmıştır. Ayrıca son apelin dozu uygulandıktan sonra diğer gruplardan farklı olarak fareler apelinin olası uzun dönem etkilerinin araştırılması amacı ile tedavi sonrasında 3 hafta tekli kafeslerde takip edilmeye devam edilmiştir (Şekil 11A).

STZ ile indüklenerek diyabet oluşturulmuş hayvanlarda besin alımı apelin uygulaması sonrasında hem kontrole hem de STZ uygulaması sonrası döneme göre anlamlı derecede artmıştır (p<0,0001; Şekil 11C). STZ ile indüklenerek diyabet oluşturulmuş hayvanların vücut ağırlıkları kontrole göre değişmemiştir (Şekil 11D). Kan glukoz seviyeleri ise STZ uygulaması sonrasında kontrole göre anlamlı derecede

yükselmiştir ($p<0,05$; Şekil 11E). Bu değişim apelin uygulandıktan sonra da diyabet varlığına bağlı olarak kontrole göre yükselmeye devam etmiştir (Şekil 11E). Serum insülin seviyeleri STZ sonrası kontrole göre anlamlı derecede düşmüştür ($p<0.01$; Şekil 11F) ve bu düşüşe STZ sonrası uygulanan apelinin bir etkisi olmadığı, düşüşün STZ uygulamasına bağlı olarak gelişen hücre harabiyetinden ötürü insülin salınamamasına bağlı olduğu bilinmektedir. Serum trigliserit seviyeleri STZ uygulaması sonrası yükselme eğiliminde olsa bile apelin uygulaması sonrası STZ uygulaması sonrasına kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$; Şekil 11G). Hayvanların lokomotor aktivitesi incelendiğinde STZ öncesi, STZ sonrası ve apelin uygulama döneminde değişmezken, apelin sonrası kronik takip döneminde hayvanların kat ettiği mesafe ve hızları (kafes içi aktivite) kontrole göre anlamlı şekilde yükselmiştir ($p<0.05$; Şekil 11H ve I).



Şekil 11. (A) Set 4 deney planlaması. Deneklerin (B) günlük ve (C) ortalama besin alımı, (D) ortalama vücut ağırlığı, (E) ortalama kan glukoz seviyeleri, serum (F) insülin ve (G) trigliserit seviyeleri, (H) toplam kat ettikleri mesafe, (I) ortalama hızları ve (J) ısı haritaları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diyabet, insülin direnci ve/veya insülin salgılama bozukluğu ile karakterize bir hiperglisemi durumudur. Yağ dokusu, glukoz ve lipid metabolizmasında, nöroendokrin süreçlerde, insülin duyarlılığında ve diğer bazı fizyolojik süreçlerde rol alan birçok adipokini salgılamaktadır. Bu çalışmamızda normal ve diyabetik hayvanlarda apelinin iştah düzenlenme mekanizması üzerine olası etkilerini araştırdık.

Diyabet araştırmalarında kullanılan çok çeşitli deneysel hayvan modelleri bulunmaktadır ²⁴². STZ diyabet araştırmalarında en yaygın kullanılan kimyasal indüklemeye ajanıdır ²⁴³⁻²⁴⁵. STZ, kullanılan doza bağlı olarak hafif ila şiddetli DM türleri üretebilir. Yaygın olarak T1DM'yi indüklemeye kullanılan tek bir doz STZ, T2DM'yi indüklemek için de kullanılmaktadır ²⁴⁶⁻²⁴⁸. DM'yi indüklemek için önerilen doz, kemirgen türleri arasında değişiklik göstermektedir. Bu modeli oluşturmada tek yüksek doz ya da ardışık düşük doz STZ kullanımı yaygındır. Örneğin, genellikle Wistar veya Sprague-Dawley sıçanlarında kullanılan tek doz 50 ila 85 mg/kg arasındayken ^{117,137,249}, farelerde ise bu doz 130 ile 225 mg/kg arasında değişebilmektedir ^{132,250}. STZ'nin çoklu dozlarda uygulanımı, özellikle T2DM modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bu yaklaşım aynı zamanda T1DM oluşturmak için de kullanılabilir ²⁵¹. Çoklu STZ uygulamasının tek doz STZ uygulamasına göre en önemli avantajı, hayvan morbidite ve mortalitesinin azalmasıdır ¹³². Biz de çalışmamızda erkeklerde 50 mg/kg, dişilerde ise 75 mg/kg doz STZ'yi beş gün boyunca uyguladık. Son STZ uygulamasından iki gün sonra diyabet oluşumunu doğrulamak adına farelerden kan örnekleri alındı ve glukometre yardımı ile kan şekerleri tayin edilerek 250 mg/dL ve üzeri olanlar diyabet pozitif olarak kabul edildi ²⁵². Çalışmamızda uyguladığımız STZ dozlarının başarılı bir şekilde diyabeti indüklediğini tespit ettik.

Uzun süren hiperglisemi ve insülin hiposensitivitesi durumunda, çeşitli doku ve organlarda işlev bozukluğu oluşabilir. Obezite, çeşitli metabolik ve yağ dokusu kaynaklı faktörlerin normal fizyolojik dengesinin bozularak diyabete sebep olan önemli bir risk faktörüdür. Bu sebeple, metabolik hastalıkların neden olduğu insidans, morbidite ve mortaliteyi azaltmak için etkili ve yeni bir terapötik öneriye ihtiyaç vardır.

Glukoz homeostazının sağlanmasında yağ dokusunun da salgıladığı bazı adipokinler yoluyla önemli bir rolü vardır ²⁵³. Apelin hormonu, adipositler tarafından üretilir ve salgılanır; bu nedenle adipokin olarak adlandırılır. Homeostaz, vücut sıvı dengesi, hücre proliferasyonu ve enerji metabolizması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerdeki potansiyel rolü nedeniyle Apelin-APJ sistemine son yıllarda artan bir ilgi vardır ^{166,254,255}. Birçok çalışma plazmada artan apelinin metabolik patolojilerle ilişkili olduğunu bildirmiştir ²⁵⁶⁻²⁵⁸. Kanıtlar, apelin-APJ sisteminin glukoz ve lipid metabolizmasındaki düzenleyici rolü lehinedir ¹⁹². İnsülin, apelinin sentezini ve salınımını uyaran ana düzenleyicilerinden biri olarak kabul edilir ²⁵⁹. Apelin glukoz alımını uyarır, insülin duyarlılığını artırır, lipolizi ve yağ asidi oksidasyonunu düzenler ²⁶⁰. Apelin uygulamasının diyabet varlığında gelişen komplikasyonları iyileştirmede faydalı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir ^{261,262}. Apelin ayrıca hipoksi ve yağlanmadan da etkilenmektedir ^{263,264}. Normal ve insüline dirençli farelerde apelinin periferik glukoz alımını arttırdığı gösterilmiştir ¹⁹². Eksojen apelin uygulamasının glukoz metabolizmasını iyileştirdiği tespit edilmiştir ²⁵⁹. Ayrıca izole doku ve biyopsi örnekleri üzerinde yapılan ve normal ve tip 2 diyabetiklerden alınan adipositlerde apeline bağlı glukoz alımı çalışmalarda tespit edilmiştir ^{259,260}. Bu sonuçlar, apelinin yüksek insülinemi altında eksojen bir insülin sensitizörü olarak hareket edebileceğini göstermektedir. Tüm bu çalışmalar apelin-APJ sisteminin diyabet ve komplikasyonlarında potansiyel bir terapötik hedef olma ihtimalini güçlendirmektedir.

Apelinin farklı formlarının vücut ağırlığı, besin alımı, kan glukozu ve insülin homeostazına olan etkileri farklı modellerde çalışılmıştır ²⁶⁵⁻²⁶⁷. Sıçanlarda, on gün boyunca 30, 100 ve 300 µg/kg apelin-13 uygulanması sonucunda vücut ağırlığı artış oranlarında apelinin pozitif yönde anlamlı etkisi bulunmuştur ²⁶⁸. Buna karşın fareler üzerinde yapılan bir çalışmada 14 gün boyunca günde 0,1 µmol/kg apelin-13 uygulanması farelerin vücut ağırlığı değişiminde negatif yönde anlamlı değişikliğe sebep olmuştur ²⁶⁷. Çalışmamızda 50 mg/kg apelin uyguladığımız farelerin vücut ağırlıklarında anlamlı şekilde bir azalma gözlemledik. Apelin-13'ün besin alımı üzerine etkileri farklı çalışmalarda karışık sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada on gün boyunca intraperitoneal 30, 100 ve 300 µg/kg apelin-13 uygulaması besin alımını anlamlı derecede arttırmıştır ²⁶⁸. Bunun yanında, bazı çalışmalarda santral apelin-13 uygulamasının besin alımını anlamlı derecede arttırdığı gözlemlenirken ²⁴⁰, apelin-13 ve

analoglarının farklı dozlarda uygulanmasının besin alımını farklı şekilde regüle ettiği bulunmuştur²⁶⁹. Biz çalışmamızda intraperitoneal olarak on gün boyunca 50 mg/kg dozda uyguladığımız apelin-13'ün besin alımında anlamlı azalmaya sebep olduğunu gözlemledik. Bunun yanında çalışmamızda, uyguladığımız apelin-13'ün farelerin kan glukoz seviyelerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını gözlemledik. Yapılan bir çalışmada ise apelin-13 ile apelin-36'nın farklı mutant formlarının kan glukoz seviyesine etkileri incelenmiş, apelin-13'ün kan glukoz seviyesini değiştirmedeği ancak apelin-36'nın farklı formlarının kan glukoz seviyesini anlamlı şekilde azalttığı raporlanmıştır²⁶⁶. Farelerde lokomotor aktivitenin on gün boyunca apelin-13 uygulanması sonucunda anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiş olup²⁴⁰, sıçanlarda stres kaynaklı oluşan immobilitede geri dönüş sağlamıştır²⁷⁰. Bir diğer çalışmada ise kronik sosyal yenilgi stresli sıçanlarda apelin-13 uygulaması sonucunda lokomotor aktivitede değişiklik görülmemiştir²⁷¹. Daha önceki birkaç çalışma, intraserebroventriküler veya intrahipokampal apelin-13 infüzyonun sıçanlarda spontan lokomotor aktiviteyi değiştirmedeğini göstermiştir^{270,272,273}. Bizim çalışmamızda da apelin-13 uygulamasının lokomotor aktivitede herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı gözlenmiştir.

Ayrıca STZ ile indüklenen diyabet modelinde farklı iki dozda uygulanan apelin-13'ün hem kısa hem de uzun dönem etkilerini inceledik. Deneylerimizde, ilk STZ enjeksiyonundan sonra hayvanlarımızın besin tüketimi azalmaya başlamıştır. Önceki çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda STZ uygulaması sonrası tüm grup hayvanlarında vücut ağırlıkları düşüş göstermiştir²⁷⁴⁻²⁷⁷. Bunun yanında, yapılan çalışmalarda bulgularımıza paralel olarak, kemirgenlerde STZ uygulaması sırasında besin alımında azalma gözlenmiştir^{278,279}. STZ uygulamasının kesilmesinden sonra ise besin alımının arttığı farklı çalışmalarda raporlanmıştır²⁸⁰⁻²⁸³. Biz de çalışmamızda aynı şekilde son STZ uygulamasından sonra farelerin besin tüketiminin arttığını gözlemledik. Diyabetik hayvanlara 50 mg/kg apelin-13 uygulanmasının vücut ağırlığındaki azalmayı değiştirmemiş olduğu, besin alımında ise artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. Apelin-13 verilmeyen diyabetik hayvanlarda da STZ uygulaması kesildiğinde besin alımında görülen artış, apelinin diyabetik hayvanlarda besin alımını etkilemediğini düşündürmektedir. Bunun yanında intraserebroventriküler apelin-13 uygulamasının besin alımını arttırması²⁴⁰, ancak çalışmamızda gördüğümüz intraperitoneal 50 mg/kg apelin-13 uygulamasının kısa dönemde sağlıklı hayvanlarda besin alımını azaltması ve diyabetik

hayvanlarda anlamlı bir etkisinin olmaması, sağlıklı fizyolojik koşullarda ve diyabet patolojisinde santral ve periferik etkilerinin farklı yollar üzerinden ilerleyebileceğini düşündürmektedir ^{166,284}. Buna karşın artan doz (100 mg/kg) ve apelin-13 uygulamasının kesilmesinden sonra uzun dönem takibinde besin alımında, STZ uygulamasının kesilmesine kıyasla daha fazla artış gözlemlendi. Apelin-13'ün KBB'yi rahat bir şekilde geçişi ve geçişinin doyuma ulaşmadan gerçekleşebilmesi periferik uygulanan apelinin santral etkilerinin görülmesine sebep olabilir ²⁸⁵. Çalışmamızda gözlemlediğimiz 100 mg/kg apelin-13 uygulanmasının kesilmesinden sonraki dönemde artmakta görülen besin alımının sebebi, yüksek doz kronik apelin uygulanmasının etkilerinin apelin kesildikten sonra da devam etmesi olabilir ²⁸⁶. Bunun yanında kronik yüksek doz apelin uygulamasının diyabet patolojisine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir ^{189,286,287}. Çalışmamızda gözlemlenen diyabet modeli oluşturulması sonrası artan kan glukozu seviyelerinin, apelin-13 uygulamasının kesilmesi sonrası da devam eden kan glukozundaki artış trendi, kronik apelin uygulamasının hepatik glukoz salınımını tetiklemesi sebebi ile olabilir ^{188,286}.

Yakın zamanlardaki çalışmalar apelinin insülin üretimini, insülin duyarlılığını iyileştirme ve diyabete bağlı gelişen böbrek hipertrofisi gibi komplikasyonları pozitif olarak düzenlemesinden dolayı diyabette potansiyel bir terapötik ajan olduğu düşünülmektedir ^{14,255}. Ek olarak apelinin tokluğu indüklediği ve vücut ağırlığını azalttığını ortaya koyan çalışmalar, onun gelecekte diyabet tedavisi için umut vadeden bir hedef olmasını sağlamaktadır ^{191,288}. Kemirgenlerde yapılan çalışmalar, apelinin insüline duyarlılığı artırıcı etkilere sahip olduğunu ve glukoz homeostazı üzerinde faydalı rol oynadığını göstermiştir ²⁵⁵. Diyabetik hastalarda apelin konsantrasyonları artmaktadır ²⁸⁹. Ayrıca diyabetiklerde nefropati, bozulmuş glukoz toleransı ve dislipidemi durumunda apelin seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir ²⁹⁰. Çalışmamızda, serum insülin seviyelerinin post-STZ ve post-apelin dönemlerinde giderek azaldığı ve apelinin insülin seviyesinde herhangi bir koruyucu etkisi gözlenmemiştir. Çalışmamızda kronik apelin-13 uygulamasının trigliserit değerlerinde düşüş sağladığı görülmüş olup, bu etki bize diyabet kaynaklı hiperlipidemi azaltmada apelin-13'ün pozitif rolü olabileceğini düşündürmektedir.

AgRP nöronları enerji homeostazında merkezi bir rol oynamaktadır ^{291,292}. Bunu, vücudun anlık enerji durumunu algılayan bir devrenin bir parçası olarak

gerçekleştirmektedir ^{291,292}. Açlık durumunda, ARC'de bulunan oreksijenik NPY ve AgRP peptitlerini koeksprese eden nöronlar aktif hale gelir, bunun yanında anoreksijenik POMC nöronları inaktiftir ²⁹³. Kolesistokinin, peptit YY, glukagon benzeri peptit 1 gibi bağırsak hormonları NPY/AgRP nöronlarını inhibe ederken, ghrelin NPY/AgRP nöronlarını uyarır ²⁹⁴. Pankreas insülin salgımlarken, leptin yağ kütlesi hücreleri tarafından salgılanır ²⁹⁴. Her iki hormon da NPY/AgRP nöronlarının inhibisyonunu ancak POMC/CART nöronlarının uyarılmasını tetikler ²⁹⁴.

Diyet ve obezitenin enerji dengesini düzenleyen MSS mekanizmalarında işlev bozukluğuna neden olur. Bu durum göz önüne alındığında AgRP nöronlarının hormonal veya besin alımına karşı hassasiyetindeki değişiklikler besin ihtiyacı algısını bozabilir ^{291,292}.

AgRP nöronlarının aktivitesinin leptin eksikliği olan *ob/ob* farelerde, STZ indüklü DM farelerde ve Zucker diyabetik yağlı sıçanlarda arttığı gösterilmiştir ²⁹⁵⁻²⁹⁷. AgRP nöronları diyabetik hiperglisemiye de katkıda bulunabilir. STZ indüklü DM modelinde, AgRP nöronlarının inhibisyonu, diyabetik hiperglisemiyi azaltırken ²⁹⁷, santral leptin veya fibroblast büyüme faktörü 1 uygulamasının diyabetik hiperglisemiyi iyileştirmedeki etkilerinin hipotalamik *Agrp* mRNA ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili bulunmuştur ^{298,299}. Biz de çalışmamızda STZ ile oluşturulan diyabet modelinde AgRP nöronlarının elektrofizyolojik aktivitesinde anlamlı artış gözlemledik. Bunun yanında diyabet olmamış hayvanlara apelin uygulaması sonrası AgRP nöron aktivitesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenemedi. STZ uygulanan hayvanlara apelin uygulaması sonrasında ise STZ kaynaklı elektrofizyolojik aktivitedeki artış bir miktar azalsa da bu azalma anlamlı değildi. APJ'nin POMC nöronlarındaki ekspresyonu daha önce gösterilmiştir ¹⁸⁹. Yine aynı çalışmada apelinin POMC nöronlarından α -MSH salgısını arttırdığı ve bu yolak üzerinden besin alımı ve vücut ağırlığını regüle ettiği gösterilmiştir ¹⁸⁹. Bir başka çalışmada ise apelin-13'ün POMC nöron aktivitesini arttırdığı raporlanmıştır ³⁰⁰. Çalışmamızda gözlemlediğimiz diyabetik hayvanlarda apelin-13 uygulaması sonrası AgRP nöron aktivitesindeki kısmi azalma apelin-13'ün POMC nöron aktivitesindeki artışın AgRP nöron aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisinden kaynaklanıyor olabilir ³⁰¹.

Sonuç olarak apelin-13 uygulamasının diyabette vücut ağırlığı, yeme davranışı ve AgRP nöronal aktivitesi üzerine olan etkilerini incelediğimiz çalışmamızda, yeme davranışının düşük ve yüksek doz (sırasıyla 50 mg/kg ve 100 mg/kg) apelin-13

uygulamasý sonrası anlamlý derecede yükseldiğini gözlemledik. Bunun yanında AgRP nöron aktivitesi STZ uygulamasý sonrası kontrole kıyasla anlamlý olarak yükselirken, STZ uygulanmış hayvanlara apelin-13 uygulamasý sonrasında AgRP nöron aktivitesinde kısmi olarak azalma gözlemledik. STZ uygulamasý süresinde ise hayvanların vücut ağırlığı kontrole kıyasla azalırken, STZ uygulamasının kesilmesinden sonra hayvanların vücut ağırlığındaki azalma genel olarak devam etmiştir. Çalışmamızın sonuçları, apelin-13 uygulamasının diyabet hayvanlarda uygulama yolunun değişmesi (ICV veya intravenöz), apelin-13'ün farklı dozlarda uygulanması, cinsiyet bazlı etkilerinin araştırılması veya daha uzun süre uygulanacak apelin-13'ün diyabet üzerindeki olası etkilerinin netleştirilmesinde yol gösterici olacaktır.



6. KAYNAKLAR

1. Hippisley-Cox J, Coupland C. Diabetes treatments and risk of amputation, blindness, severe kidney failure, hyperglycaemia, and hypoglycaemia: open cohort study in primary care. *Bmj*. Mar 30 2016;352:i1450.
2. Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:37.
3. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab*. Sep 2017;6(9):943-957.
4. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*. Jan 1 2013;9(1):25-53.
5. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiol Rev*. Jan 1 2018;98(1):117-214.
6. Pulgaron ER, Delamater AM. Obesity and type 2 diabetes in children: epidemiology and treatment. *Curr Diab Rep*. Aug 2014;14(8):508.
7. Fang X, Zuo J, Zhou J, et al. Childhood obesity leads to adult type 2 diabetes and coronary artery diseases: A 2-sample mendelian randomization study. *Medicine (Baltimore)*. Aug 2019;98(32):e16825.
8. Poudel A, Savari O, Striegel DA, et al. Beta-cell destruction and preservation in childhood and adult onset type 1 diabetes. *Endocrine*. Aug 2015;49(3):693-702.
9. Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014;7:587-91.
10. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. Oct 26 2018;19(11)
11. Dall TM, Zhang Y, Chen YJ, Quick WW, Yang WG, Fogli J. The economic burden of diabetes. *Health Aff (Millwood)*. Feb 2010;29(2):297-303.
12. Gallwitz B. Novel Therapeutic Approaches in Diabetes. *Endocr Dev*. 2016;31:43-56.

13. Perreault L, Skyler JS, Rosenstock J. Novel therapies with precision mechanisms for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. Jun 2021;17(6):364-377.
 14. Hu H, He L, Li L, Chen L. Apelin/APJ system as a therapeutic target in diabetes and its complications. *Mol Genet Metab*. Sep 2016;119(1-2):20-7.
 15. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia*. Oct 1995;38(10):1213-7.
 16. Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*. Apr 2005;146(4):1764-71.
 17. Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, et al. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg*. Nov 2009;19(11):1574-80.
 18. Hegazi R, El-Gamal M, Abdel-Hady N, Hamdy O. Epidemiology of and Risk Factors for Type 2 Diabetes in Egypt. *Ann Glob Health*. Nov-Dec 2015;81(6):814-20.
 19. Wild SH, Byrne CD. Commentary: sub-types of diabetes--what's new and what's not. *Int J Epidemiol*. Dec 2013;42(6):1600-2.
 20. Nguyen DM, El-Serag HB. The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am*. Mar 2010;39(1):1-7.
 21. Paz-Filho G, Mastronardi C, Delibasi T, Wong ML, Licinio J. Congenital leptin deficiency: diagnosis and effects of leptin replacement therapy. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. Nov 2010;54(8):690-7.
 22. Kyrou I, Randeva HS, Tsigos C, Kaltsas G, Weickert MO. Clinical Problems Caused by Obesity. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al, eds. *Endotext*. MDText.com, Inc.
- Copyright © 2000-2022, MDText.com, Inc.; 2000.
23. Organization WH. Obesity and overweight: World Health Organization. 2020.
 24. Malnick SD, Knobler H. The medical complications of obesity. *Qjm*. Sep 2006;99(9):565-79.

25. Bagdade JD, Bierman EL, Porte D, Jr. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest.* Oct 1967;46(10):1549-57.
26. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *Jama.* Oct 27 1999;282(16):1523-9.
27. Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *J Clin Invest.* Sep 1 1997;100(5):1166-73.
28. Reaven G. All obese individuals are not created equal: insulin resistance is the major determinant of cardiovascular disease in overweight/obese individuals. *Diab Vasc Dis Res.* Oct 2005;2(3):105-12.
29. Templeman NM, Skovsø S, Page MM, Lim GE, Johnson JD. A causal role for hyperinsulinemia in obesity. *J Endocrinol.* Mar 2017;232(3):R173-r183.
30. Weng J, Ji L, Jia W, et al. Standards of care for type 2 diabetes in China. *Diabetes Metab Res Rev.* Jul 2016;32(5):442-58.
31. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* Jan 2017;40(Suppl 1):S11-s24.
32. Mayer-Davis EJ, Kahkoska AR, Jefferies C, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* Oct 2018;19 Suppl 27(Suppl 27):7-19.
33. Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, et al. Care of children and adolescents with type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* Jan 2005;28(1):186-212.
34. Patterson CC, Karuranga S, Salpea P, et al. Worldwide estimates of incidence, prevalence and mortality of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* Nov 2019;157:107842.
35. Petrie JR, Sattar N. Excess Cardiovascular Risk in Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation.* Feb 5 2019;139(6):744-747.

36. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. Mar 30 2017;3:17016.
37. Roep BO, Thomaidou S, van Tienhoven R, Zaldumbide A. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the β -cell (do not blame the immune system?). *Nat Rev Endocrinol*. Mar 2021;17(3):150-161.
38. Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, et al. How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or β -cell suicide revisited. *Diabetes*. May 2011;60(5):1370-9.
39. Harjutsalo V, Sund R, Knip M, Groop PH. Incidence of type 1 diabetes in Finland. *Jama*. Jul 24 2013;310(4):427-8.
40. Divers J, Mayer-Davis EJ, Lawrence JM, et al. Trends in Incidence of Type 1 and Type 2 Diabetes Among Youths - Selected Counties and Indian Reservations, United States, 2002-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. Feb 14 2020;69(6):161-165.
41. Elamin A, Omer MI, Zein K, Tuvemo T. Epidemiology of childhood type I diabetes in Sudan, 1987-1990. *Diabetes Care*. Nov 1992;15(11):1556-9.
42. Felner EI, Klitz W, Ham M, et al. Genetic interaction among three genomic regions creates distinct contributions to early- and late-onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. Dec 2005;6(4):213-20.
43. Durruty P, Ruiz F, García de los Ríos M. Age at diagnosis and seasonal variation in the onset of insulin-dependent diabetes in Chile (Southern hemisphere). *Diabetologia*. Dec 1979;17(6):357-60.
44. Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB, Jr., et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. *Jama*. Jun 27 2007;297(24):2716-24.
45. Mayer-Davis EJ, Lawrence JM, Dabelea D, et al. Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012. *N Engl J Med*. Apr 13 2017;376(15):1419-1429.
46. Lawrence JM, Divers J, Isom S, et al. Trends in Prevalence of Type 1 and Type 2 Diabetes in Children and Adolescents in the US, 2001-2017. *Jama*. Aug 24 2021;326(8):717-727.

47. Diaz-Valencia PA, Bougnères P, Valleron AJ. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health*. Mar 17 2015;15:255.
48. Wolfsdorf J, Glaser N, Sperling MA. Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents: A consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. May 2006;29(5):1150-9.
49. Tillil H, Köbberling J. Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes*. Jan 1987;36(1):93-9.
50. Hyöty H, Hiltunen M, Knip M, et al. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes*. Jun 1995;44(6):652-7.
51. Lönnrot M, Lynch KF, Elding Larsson H, et al. Respiratory infections are temporally associated with initiation of type 1 diabetes autoimmunity: the TEDDY study. *Diabetologia*. Oct 2017;60(10):1931-1940.
52. Goldacre RR. Associations between birthweight, gestational age at birth and subsequent type 1 diabetes in children under 12: a retrospective cohort study in England, 1998-2012. *Diabetologia*. Mar 2018;61(3):616-625.
53. Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet*. Jun 2006;38(6):617-9.
54. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. Jul 2007;39(7):857-64.
55. Hakonarson H, Grant SF, Bradfield JP, et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature*. Aug 2 2007;448(7153):591-4.
56. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. Sep 2007;39(9):1074-82.
57. Concannon P, Onengut-Gumuscu S, Todd JA, et al. A human type 1 diabetes susceptibility locus maps to chromosome 21q22.3. *Diabetes*. Oct 2008;57(10):2858-61.

58. Consortium WTCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. Jun 7 2007;447(7145):661-78.
59. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, et al. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet*. Dec 2008;40(12):1399-401.
60. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*. Sep 8 1994;371(6493):130-6.
61. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*. May 3 1996;85(3):291-7.
62. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nature reviews endocrinology*. 2012;8(4):228-236.
63. Ozougwu J, Obimba K, Belonwu C, Unakalamba C. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol*. 2013;4(4):46-57.
64. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice*. 2014;103(2):137-149.
65. Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes care*. 2011;34(6):1249-1257.
66. D'alessio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2011;13:126-132.
67. Lin Y, Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *The Journal of endocrinology*. 2010;204(1):1.
68. Okon EB, Chung AW, Zhang H, Laher I, van Breemen C. Hyperglycemia and hyperlipidemia are associated with endothelial dysfunction during the development of type 2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*. May 2007;85(5):562-7.
69. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. John Wiley & Sons; 2010.

70. Whitmore C. Type 2 diabetes and obesity in adults. *Br J Nurs*. Jul 22-Aug 11 2010;19(14):880, 882-6.
71. Zhou X, Ji L, Ran X, et al. Prevalence of Obesity and Its Influence on Achievement of Cardiometabolic Therapeutic Goals in Chinese Type 2 Diabetes Patients: An Analysis of the Nationwide, Cross-Sectional 3B Study. *PLoS One*. 2016;11(1):e0144179.
72. Mathews AE, Mathews CE. Inherited β -cell dysfunction in lean individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*. Jul 2012;61(7):1659-60.
73. Prasad RB, Groop L. Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes (Basel)*. Mar 12 2015;6(1):87-123.
74. Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes*. Aug 15 2013;4(4):114-23.
75. Faerch K, Hulmán A, Solomon TP. Heterogeneity of Pre-diabetes and Type 2 Diabetes: Implications for Prediction, Prevention and Treatment Responsiveness. *Curr Diabetes Rev*. 2016;12(1):30-41.
76. Karalliedde J, Gnudi L. Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. Feb 2016;31(2):206-13.
77. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. Dec 13 2001;414(6865):813-20.
78. Holman N, Young RJ, Jeffcoate WJ. Variation in the recorded incidence of amputation of the lower limb in England. *Diabetologia*. Jul 2012;55(7):1919-25.
79. Hu G, Jousilahti P, Bidel S, Antikainen R, Tuomilehto J. Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care*. Apr 2007;30(4):842-7.
80. Akter K, Lanza EA, Martin SA, Myronyuk N, Rua M, Raffa RB. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? *Br J Clin Pharmacol*. Mar 2011;71(3):365-76.
81. Ali MK, Narayan KM, Tandon N. Diabetes & coronary heart disease: current perspectives. *Indian J Med Res*. Nov 2010;132(5):584-97.

82. Leal J, Gray AM, Clarke PM. Development of life-expectancy tables for people with type 2 diabetes. *Eur Heart J*. Apr 2009;30(7):834-9.
83. Mazzola N. Review of current and emerging therapies in type 2 diabetes mellitus. *Am J Manag Care*. Jan 2012;18(1 Suppl):S17-26.
84. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J*. Jul 2012;27(4):269-73.
85. Thompson KA, Kanamarlapudi V. Type 2 diabetes mellitus and glucagon like peptide-1 receptor signalling. *Clinical & Experimental Pharmacology*. 2013;3(04)
86. Amiel SA, Dixon T, Mann R, Jameson K. Hypoglycaemia in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. Mar 2008;25(3):245-54.
87. Fonseca VA. Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. Nov 2009;32 Suppl 2(Suppl 2):S151-6.
88. Leibowitz G, Kaiser N, Cerasi E. β -Cell failure in type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*. Apr 7 2011;2(2):82-91.
89. Liu LL, Lawrence JM, Davis C, et al. Prevalence of overweight and obesity in youth with diabetes in USA: the SEARCH for Diabetes in Youth study. *Pediatr Diabetes*. Feb 2010;11(1):4-11.
90. Dabelea D, Pihoker C, Talton JW, et al. Etiological approach to characterization of diabetes type: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*. Jul 2011;34(7):1628-33.
91. Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, et al. Type 2 diabetes among North American children and adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective. *J Pediatr*. May 2000;136(5):664-72.
92. Copeland KC, Zeitler P, Geffner M, et al. Characteristics of adolescents and youth with recent-onset type 2 diabetes: the TODAY cohort at baseline. *J Clin Endocrinol Metab*. Jan 2011;96(1):159-67.
93. Levitsky LL, Misra M. Epidemiology, presentation, and diagnosis of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. *UpToDate Waltham, MA: UpToDate*. 2007;

94. WHO. *Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy*. 2013.
95. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. Jan 2018;41(Suppl 1):S13-s27.
96. Farrar D, Simmonds M, Bryant M, et al. Treatments for gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. Jun 24 2017;7(6):e015557.
97. Sacks DA, Hadden DR, Maresh M, et al. Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel–recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Diabetes care*. 2012;35(3):526-528.
98. 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, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*. Nov 2019;157:107843.
99. Lavery JA, Friedman AM, Keyes KM, Wright JD, Ananth CV. Gestational diabetes in the United States: temporal changes in prevalence rates between 1979 and 2010. *Bjog*. Apr 2017;124(5):804-813.
100. Hillier TA, Pedula KL, Schmidt MM, Mullen JA, Charles MA, Pettitt DJ. Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care*. Sep 2007;30(9):2287-92.
101. Venkatesh KK, Lynch CD, Powe CE, et al. Risk of Adverse Pregnancy Outcomes Among Pregnant Individuals With Gestational Diabetes by Race and Ethnicity in the United States, 2014-2020. *Jama*. Apr 12 2022;327(14):1356-1367.
102. Dodd JM, Crowther CA, Antoniou G, Baghurst P, Robinson JS. Screening for gestational diabetes: the effect of varying blood glucose definitions in the prediction of adverse maternal and infant health outcomes. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. Aug 2007;47(4):307-12.
103. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med*. May 8 2008;358(19):1991-2002.

104. Pettitt DJ, Knowler WC, Baird HR, Bennett PH. Gestational diabetes: infant and maternal complications of pregnancy in relation to third-trimester glucose tolerance in the Pima Indians. *Diabetes Care*. May-Jun 1980;3(3):458-64.
105. Farrar D, Simmonds M, Bryant M, et al. Hyperglycaemia and risk of adverse perinatal outcomes: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. Sep 13 2016;354:i4694.
106. Landon MB, Mele L, Spong CY, et al. The relationship between maternal glycemia and perinatal outcome. *Obstet Gynecol*. Feb 2011;117(2 Pt 1):218-224.
107. Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Miller RK. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Res C Embryo Today*. Mar 2015;105(1):53-72.
108. Scholtens DM, Kuang A, Lowe LP, et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Follow-up Study (HAPO FUS): Maternal Glycemia and Childhood Glucose Metabolism. *Diabetes Care*. Mar 2019;42(3):381-392.
109. Lowe WL, Jr., Scholtens DM, Kuang A, et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Follow-up Study (HAPO FUS): Maternal Gestational Diabetes Mellitus and Childhood Glucose Metabolism. *Diabetes Care*. Mar 2019;42(3):372-380.
110. Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, Hanka LJ, Sokolski WT. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu*. 1959;7:230-5.
111. Herr RR, Jahnke JK, Argoudelis AD. The structure of streptozotocin. *J Am Chem Soc*. Aug 30 1967;89(18):4808-9.
112. Hardegger E, Meier A, Stoos A. [A preparative synthesis of streptozotocin]. *Helv Chim Acta*. 1969;52(8):2555-60. Eine präparative Synthese von Streptozotocin.
113. Hessler EJ, Jahnke HK. Improved synthesis of streptozotocin. *J Org Chem*. Jan 1970;35(1):245-6.
114. Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill GF, Jr. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 1977;74(6):2485-9.
115. Bennett RA, Pegg AE. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res*. Jul 1981;41(7):2786-90.

116. Gandy SE, Buse MG, Crouch RK. Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J Clin Invest.* Sep 1982;70(3):650-8.
117. Islam MS, Wilson RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol.* 2012;933:161-74.
118. Mansor LS, Gonzalez ER, Cole MA, et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovasc Diabetol.* Sep 24 2013;12:136.
119. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism.* Nov 2000;49(11):1390-4.
120. Salama RM, Schaalan MF, Elkoussi AA, Khalifa AE. Potential utility of sodium selenate as an adjunct to metformin in treating type II diabetes mellitus in rats: a perspective on protein tyrosine phosphatase. *Biomed Res Int.* 2013;2013:231378.
121. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* May 2004;27(5):1047-53.
122. Le May C, Chu K, Hu M, et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 13 2006;103(24):9232-7.
123. Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton).* Jun 2007;12(3):261-6.
124. Chia JS, McRae JL, Thomas HE, et al. The protective effects of CD39 overexpression in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Diabetes.* Jun 2013;62(6):2026-35.
125. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.* Oct 2017;39:46-58.
126. Morrow TJ. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. *Curr Protoc Neurosci.* Nov 2004;Chapter 9:Unit 9.18.
127. Marks J, Carvou NJ, Debnam ES, Srail SK, Unwin RJ. Diabetes increases facilitative glucose uptake and GLUT2 expression at the rat proximal tubule brush border membrane. *J Physiol.* Nov 15 2003;553(Pt 1):137-45.

128. de la Garza-Rodea AS, Knaän-Shanzer S, den Hartigh JD, Verhaegen AP, van Bakkum DW. Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. Jan 2010;49(1):40-4.
129. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, et al. Expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and pain-related behavior in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Anesth Analg*. Mar 2013;116(3):712-21.
130. Gutierrez JC, Bahamonde J, Prater MR, Yefi CP, Holladay SD. Production of a type 2 maternal diabetes rodent model using the combination of high-fat diet and moderate dose of streptozotocin. *Endocr Res*. May 2010;35(2):59-70.
131. Kataoka M, Kawamuro Y, Shiraki N, et al. Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 18 2013;430(3):1103-8.
132. Hayashi K, Kojima R, Ito M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol Pharm Bull*. Jun 2006;29(6):1110-9.
133. 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.
134. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Egawa S, Unno M. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:256707.
135. Blaes N, Pécher C, Mehrenberger M, et al. Bradykinin inhibits high glucose- and growth factor-induced collagen synthesis in mesangial cells through the B2-kinin receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jul 15 2012;303(2):F293-303.
136. Talbot S, De Brito Gariépy H, Saint-Denis J, Couture R. Activation of kinin B1 receptor evokes hyperthermia through a vagal sensory mechanism in the rat. *J Neuroinflammation*. Sep 13 2012;9:214.
137. Tirgan N, Kulp GA, Gupta P, et al. Nicotine exposure exacerbates development of cataracts in a type 1 diabetic rat model. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:349320.
138. Castillo GM, Nishimoto-Ashfield A, Banerjee AA, Landolfi JA, Lyubimov AV, Bolotin EM. Omeprazole and PGC-formulated heparin binding epidermal growth factor

normalizes fasting blood glucose and suppresses insulinitis in multiple low dose streptozotocin diabetes model. *Pharm Res.* Nov 2013;30(11):2843-54.

139. 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.* Aug 2011;61(4):356-60.

140. Wiersma MM, Bakker IM, Radder JK. Effect of high fat feeding on glucose tolerance in neonatally streptozotocin-treated rats at 3 and 6 months of age. *Ann N Y Acad Sci.* Jun 14 1993;683:228-36.

141. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun 2004;89(6):2548-56.

142. Weschenfelder C, Schaan de Quadros A, Lorenzon Dos Santos J, Bueno Garofallo S, Marcadenti A. Adipokines and Adipose Tissue-Related Metabolites, Nuts and Cardiovascular Disease. *Metabolites.* Jan 11 2020;10(1)

143. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med.* Nov-Dec 2008;14(11-12):741-51.

144. Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol.* Apr 2016;8(2):93-100.

145. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev.* Dec 2006;27(7):762-78.

146. Hida K, Wada J, Eguchi J, et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 26 2005;102(30):10610-5.

147. Villarroya F, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Giralt M. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *J Intern Med.* Nov 2018;284(5):492-504.

148. Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol.* Apr 2014;63(4):250-9.

149. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* Feb 2008;34(1):2-11.

150. Carrión M, Frommer KW, Pérez-García S, Müller-Ladner U, Gomariz RP, Neumann E. The Adipokine Network in Rheumatic Joint Diseases. *Int J Mol Sci.* Aug 22 2019;20(17)
151. Xie C, Chen Q. Adipokines: New Therapeutic Target for Osteoarthritis? *Curr Rheumatol Rep.* Dec 7 2019;21(12):71.
152. Recinella L, Orlando G, Ferrante C, Chiavaroli A, Brunetti L, Leone S. Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases. *Front Physiol.* 2020;11:578966.
153. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene.* Dec 22 1993;136(1-2):355-60.
154. De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortès C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology.* Dec 2000;72(6):400-7.
155. Devic E, Paquereau L, Vernier P, Knibiehler B, Audigier Y. Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*. *Mech Dev.* Oct 1996;59(2):129-40.
156. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 20 1998;251(2):471-6.
157. O'Carroll AM, Lolait SJ, Harris LE, Pope GR. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *J Endocrinol.* Oct 2013;219(1):R13-35.
158. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem.* Jan 2000;74(1):34-41.
159. Liu J, Liu M, Chen L. Novel pathogenesis: regulation of apoptosis by Apelin/APJ system. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* Jun 1 2017;49(6):471-478.
160. Chen Z, Wu D, Li L, Chen L. Apelin/APJ System: A Novel Therapeutic Target for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *DNA Cell Biol.* Dec 2016;35(12):766-775.

161. Wan T, Fu M, Jiang Y, Jiang W, Li P, Zhou S. Research Progress on Mechanism of Neuroprotective Roles of Apelin-13 in Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurochem Res*. Feb 2022;47(2):205-217.
162. Zhou JX, Shuai NN, Wang B, Jin X, Kuang X, Tian SW. Neuroprotective gain of Apelin/APJ system. *Neuropeptides*. Jun 2021;87:102131.
163. Kong X, Lin D, Lu L, Lin L, Zhang H, Zhang H. Apelin-13-Mediated AMPK ameliorates endothelial barrier dysfunction in acute lung injury mice via improvement of mitochondrial function and autophagy. *Int Immunopharmacol*. Dec 2021;101(Pt B):108230.
164. Liu W, Yan J, Pan W, Tang M. Apelin/Elabela-APJ: a novel therapeutic target in the cardiovascular system. *Ann Transl Med*. Mar 2020;8(5):243.
165. Zhou Q, Chen L, Tang M, Guo Y, Li L. Apelin/APJ system: A novel promising target for anti-aging intervention. *Clin Chim Acta*. Dec 2018;487:233-240.
166. Hu G, Wang Z, Zhang R, Sun W, Chen X. The Role of Apelin/Apelin Receptor in Energy Metabolism and Water Homeostasis: A Comprehensive Narrative Review. *Front Physiol*. 2021;12:632886.
167. De Hert E, Bracke A, Pintelon I, et al. Prolyl Carboxypeptidase Mediates the C-Terminal Cleavage of (Pyr)-Apelin-13 in Human Umbilical Vein and Aortic Endothelial Cells. *Int J Mol Sci*. Jun 22 2021;22(13)
168. El Messari S, Iturrioz X, Fassot C, De Mota N, Roesch D, Llorens-Cortes C. Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J Neurochem*. Sep 2004;90(6):1290-301.
169. Angelopoulou E, Paudel YN, Bougea A, Piperi C. Impact of the apelin/APJ axis in the pathogenesis of Parkinson's disease with therapeutic potential. *J Neurosci Res*. Sep 2021;99(9):2117-2133.
170. Folino A, Montarolo PG, Samaja M, Rastaldo R. Effects of apelin on the cardiovascular system. *Heart Fail Rev*. Jul 2015;20(4):505-18.
171. Antushevich H, Wójcik M. Review: Apelin in disease. *Clin Chim Acta*. Aug 2018;483:241-248.

172. Kang Y, Kim J, Anderson JP, et al. Apelin-APJ signaling is a critical regulator of endothelial MEF2 activation in cardiovascular development. *Circ Res*. Jun 21 2013;113(1):22-31.
173. Charo DN, Ho M, Fajardo G, et al. Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Nov 2009;297(5):H1904-13.
174. Chng SC, Ho L, Tian J, Reversade B. ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Dev Cell*. Dec 23 2013;27(6):672-80.
175. Pauli A, Norris ML, Valen E, et al. Toddler: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science*. Feb 14 2014;343(6172):1248636.
176. Wang Z, Yu D, Wang M, et al. Elabela-apelin receptor signaling pathway is functional in mammalian systems. *Sci Rep*. Feb 2 2015;5:8170.
177. Zhou S, Wang J, Wang Q, et al. Essential Role of the ELABELA-APJ Signaling Pathway in Cardiovascular System Development and Diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. Apr 2020;75(4):284-291.
178. Zhang H, Gong D, Ni L, et al. Serum Elabela/Toddler Levels Are Associated with Albuminuria in Patients with Type 2 Diabetes. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(3):1347-1354.
179. Dönmez Y, Acele A. Increased Elabela levels in the acute ST segment elevation myocardial infarction patients. *Medicine (Baltimore)*. Oct 2019;98(43):e17645.
180. Song J, Tang J, Zhang Z, Liu Y, Zhong J. Targeting the elabela/apelin-apelin receptor axis as a novel therapeutic approach for hypertension. *Chin Med J (Engl)*. May 5 2022;135(9):1019-1026.
181. Chapman FA, Nyimanu D, Maguire JJ, Davenport AP, Newby DE, Dhaun N. The therapeutic potential of apelin in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. Dec 2021;17(12):840-853.
182. Fu J, Chen X, Liu X, et al. ELABELA ameliorates hypoxic/ischemic-induced bone mesenchymal stem cell apoptosis via alleviation of mitochondrial dysfunction and activation of PI3K/AKT and ERK1/2 pathways. *Stem Cell Res Ther*. Dec 14 2020;11(1):541.

183. Chen H, Wang L, Wang W, et al. ELABELA and an ELABELA Fragment Protect against AKI. *J Am Soc Nephrol*. Sep 2017;28(9):2694-2707.
184. Onalan E, Doğan Y, Onalan E, Gozel N, Buran I, Donder E. Elabela levels in patients with type 2 diabetes: can it be a marker for diabetic nephropathy? *Afr Health Sci*. Jun 2020;20(2):833-840.
185. Choe W, Albright A, Sulcove J, et al. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol*. May 2000;6 Suppl 1:S61-9.
186. Newson MJ, Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM. Stress-dependent and gender-specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute stress. *J Endocrinol*. Jan 2013;216(1):99-109.
187. Duparc T, Colom A, Cani PD, et al. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal*. Sep 15 2011;15(6):1477-96.
188. Drougard A, Duparc T, Brenachot X, et al. Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxid Redox Signal*. Feb 1 2014;20(4):557-73.
189. Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, et al. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic α -MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Nov 2011;301(5):E955-66.
190. Yue P, Jin H, Xu S, et al. Apelin decreases lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology*. Jan 2011;152(1):59-68.
191. O'Harte FPM, Parthasarathy V, Hogg C, Flatt PR. Acylated apelin-13 amide analogues exhibit enzyme resistance and prolonged insulin releasing, glucose lowering and anorexic properties. *Biochem Pharmacol*. Dec 15 2017;146:165-173.
192. Dray C, Knauf C, Daviaud D, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab*. Nov 2008;8(5):437-45.
193. Attané C, Foussal C, Le Gonidec S, et al. Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes*. Feb 2012;61(2):310-20.

194. Wang W, Zhang D, Yang R, et al. Hepatic and cardiac beneficial effects of a long-acting Fc-apelin fusion protein in diet-induced obese mice. *Diabetes Metab Res Rev*. Jul 2018;34(5):e2997.
195. Narayanan S, Wang S, Vasukuttan V, et al. Pyrazole Agonist of the Apelin Receptor Improves Symptoms of Metabolic Syndrome in Mice. *J Med Chem*. Mar 25 2021;64(6):3006-3025.
196. O'Harte FPM, Parthsarathy V, Flatt PR. Chronic apelin analogue administration is more effective than established incretin therapies for alleviating metabolic dysfunction in diabetic db/db mice. *Mol Cell Endocrinol*. Mar 15 2020;504:110695.
197. Gourdy P, Cazals L, Thalamas C, et al. Apelin administration improves insulin sensitivity in overweight men during hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp. *Diabetes Obes Metab*. Jan 2018;20(1):157-164.
198. Sentinelli F, Bertocchini L, Incani M, et al. Association of Apelin Levels in Overweight-obese Children with Pubertal Development, but Not with Insulin Sensitivity: 6.5 Years Follow up Evaluation. *Endocr Res*. Nov 2020;45(4):233-240.
199. Cavallo MG, Sentinelli F, Barchetta I, et al. Altered glucose homeostasis is associated with increased serum apelin levels in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2012;7(12):e51236.
200. Dayem S, Battah AA, Bohy A, Yousef RN, Ahmed AM, Talaat AA. Apelin, Nitric Oxide and Vascular Affection in Adolescent Type 1 Diabetic Patients. *Open Access Maced J Med Sci*. Dec 15 2017;5(7):934-939.
201. Myers MG, Jr., Olson DP. Central nervous system control of metabolism. *Nature*. Nov 15 2012;491(7424):357-63.
202. Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*. Apr 2010;31(4):757-76.
203. Gropp E, Shanabrough M, Borok E, et al. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci*. Oct 2005;8(10):1289-91.

204. Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*. Nov 4 2005;123(3):493-505.
205. Kleinridders A, Könner AC, Brüning JC. CNS-targets in control of energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol*. Dec 2009;9(6):794-804.
206. Waterson MJ, Horvath TL. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab*. Dec 1 2015;22(6):962-70.
207. Roh E, Song DK, Kim MS. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp Mol Med*. Mar 11 2016;48(3):e216.
208. Kannan H, Hayashida Y, Yamashita H. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol*. Jun 1989;256(6 Pt 2):R1325-30.
209. Leibowitz SF, Hammer NJ, Chang K. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav*. Dec 1981;27(6):1031-40.
210. Shimizu N, Oomura Y, Plata-Salamán CR, Morimoto M. Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res*. Jul 21 1987;416(1):153-6.
211. Bellinger LL, Bernardis LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav*. Jul 2002;76(3):431-42.
212. Milam KM, Stern JS, Storlien LH, Keesey RE. Effect of lateral hypothalamic lesions on regulation of body weight and adiposity in rats. *Am J Physiol*. Sep 1980;239(3):R337-43.
213. Könner AC, Klöckener T, Brüning JC. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav*. Jul 14 2009;97(5):632-8.
214. Gantz I, Konda Y, Tashiro T, et al. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem*. Apr 15 1993;268(11):8246-50.

215. Liu H, Kishi T, Roseberry AG, et al. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci*. Aug 6 2003;23(18):7143-54.
216. Krashes MJ, Lowell BB, Garfield AS. Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. *Nat Neurosci*. Feb 2016;19(2):206-19.
217. Tao YX. The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocr Rev*. Aug 2010;31(4):506-43.
218. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. Jan 10 1997;88(1):131-41.
219. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*. Jan 9 1997;385(6612):165-8.
220. Voss-Andreae A, Murphy JG, Ellacott KL, et al. Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology*. Apr 2007;148(4):1550-60.
221. Ste Marie L, Miura GI, Marsh DJ, Yagaloff K, Palmiter RD. A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 24 2000;97(22):12339-44.
222. Betley JN, Cao ZF, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*. Dec 5 2013;155(6):1337-50.
223. Yokosuka M, Kalra PS, Kalra SP. Inhibition of neuropeptide Y (NPY)-induced feeding and c-Fos response in magnocellular paraventricular nucleus by a NPY receptor antagonist: a site of NPY action. *Endocrinology*. Oct 1999;140(10):4494-500.
224. Cabrele C, Langer M, Bader R, et al. The first selective agonist for the neuropeptide YY5 receptor increases food intake in rats. *J Biol Chem*. Nov 17 2000;275(46):36043-8.
225. Parker EM, Balasubramaniam A, Guzzi M, et al. [D-Trp(34)] neuropeptide Y is a potent and selective neuropeptide Y Y(5) receptor agonist with dramatic effects on food intake. *Peptides*. Mar 2000;21(3):393-9.

226. McCrea K, Wisialowski T, Cabrele C, et al. 2-36[K4,RYYSA(19-23)]PP a novel Y5-receptor preferring ligand with strong stimulatory effect on food intake. *Regul Pept.* Feb 8 2000;87(1-3):47-58.
227. Stanley BG, Leibowitz SF. Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci.* Dec 24 1984;35(26):2635-42.
228. Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology.* Jul 1984;115(1):427-9.
229. Shi YC, Lau J, Lin Z, et al. Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab.* Feb 5 2013;17(2):236-48.
230. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science.* Oct 3 1997;278(5335):135-8.
231. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* May 24 2001;411(6836):480-4.
232. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature.* Aug 9 2012;488(7410):172-7.
233. Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell.* Jun 26 2009;137(7):1225-34.
234. Wu Q, Clark MS, Palmiter RD. Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite. *Nature.* Mar 14 2012;483(7391):594-7.
235. Chen Y, Lin YC, Kuo TW, Knight ZA. Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits. *Cell.* Feb 26 2015;160(5):829-841.
236. Enriori PJ, Sinnayah P, Simonds SE, Garcia Rudaz C, Cowley MA. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J Neurosci.* Aug 24 2011;31(34):12189-97.
237. Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab.* May 6 2014;19(5):741-756.

238. Sunter D, Hewson AK, Dickson SL. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett*. Dec 15 2003;353(1):1-4.
239. Lin F, Wu H, Chen H, et al. Molecular and physiological evidences for the role in appetite regulation of apelin and its receptor APJ in Ya-fish (*Schizothorax prenanti*). *Mol Cell Endocrinol*. Oct 2014;396(1-2):46-57.
240. Valle A, Hoggard N, Adams AC, Roca P, Speakman JR. Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *J Neuroendocrinol*. Jan 2008;20(1):79-84.
241. Chaves-Almagro C, Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Valet P, Masri B. Apelin receptors: From signaling to antidiabetic strategy. *Eur J Pharmacol*. Sep 15 2015;763(Pt B):149-59.
242. Kottaisamy CPD, Raj DS, Prasanth Kumar V, Sankaran U. Experimental animal models for diabetes and its related complications-a review. *Lab Anim Res*. Aug 24 2021;37(1):23.
243. Islam M, Rupeshkumar M, Reddy KB. Streptozotocin is more convenient than Alloxan for the induction of Type 2 diabetes. *International Journal of Pharmacological Research*. 02/01 2017;7(1):06-11.
244. Damasceno DC, Netto AO, Iessi IL, et al. Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *Biomed Res Int*. 2014;2014:819065.
245. King A, Bowe J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem Pharmacol*. Jan 1 2016;99:1-10.
246. 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;8:181-8.
247. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*. Jul 2011;45(3):131-40.

248. Akinlade OM, Owoyele BV, Soladoye AO. Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes in rodents: a model for studying diabetic cardiac autonomic neuropathy. *Afr Health Sci.* Jun 2021;21(2):719-727.
249. Yang J, Cherian MG. Protective effects of metallothionein on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sci.* 1994;55(1):43-51.
250. Yang B, Li M, Shi ZG, Feng QZ. Bosentan ameliorates the expression of fibrotic related growth factors and collagen-1 in diabetic mice. *Anadolu Kardiyol Derg.* Dec 2012;12(8):621-7.
251. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. <https://doi.org/10.1002/cpz1.78>. *Current Protocols.* 2021/04/01 2021;1(4):e78.
252. Damián JP, Acosta V, Da Cuña M, et al. Effect of resveratrol on behavioral performance of streptozotocin-induced diabetic mice in anxiety tests. *Exp Anim.* 2014;63(3):277-87.
253. Bano G. Glucose homeostasis, obesity and diabetes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* Oct 2013;27(5):715-26.
254. Mughal A, O'Rourke ST. Vascular effects of apelin: Mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* Oct 2018;190:139-147.
255. Castan-Laurell I, Masri B, Valet P. The apelin/APJ system as a therapeutic target in metabolic diseases. *Expert Opin Ther Targets.* Mar 2019;23(3):215-225.
256. Gao LR, Zhang NK, Zhang Y, et al. Overexpression of apelin in Wharton' jelly mesenchymal stem cell reverses insulin resistance and promotes pancreatic β cell proliferation in type 2 diabetic rats. *Stem Cell Res Ther.* Dec 7 2018;9(1):339.
257. Liu Y, Zhang J, Wang Y, Zeng X. Apelin involved in progression of diabetic nephropathy by inhibiting autophagy in podocytes. *Cell Death Dis.* Aug 24 2017;8(8):e3006.
258. Cebeci AN, Guven A, Kuru LI. Perinephric adipose tissue thickness in relation to blood pressure, plasma apelin and C-reactive protein levels in obese adolescents. *Minerva Endocrinol.* Jun 2016;41(2):166-74.

259. Dray C, Debard C, Jager J, et al. Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Jun 2010;298(6):E1161-9.
260. Attané C, Daviaud D, Dray C, et al. Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo. *J Mol Endocrinol*. Feb 2011;46(1):21-8.
261. Palmer ES, Irwin N, O'Harte FP. Potential Therapeutic Role for Apelin and Related Peptides in Diabetes: An Update. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2022;15:11795514221074679.
262. Hwangbo C, Wu J, Papangeli I, et al. Endothelial APLNR regulates tissue fatty acid uptake and is essential for apelin's glucose-lowering effects. *Sci Transl Med*. Sep 13 2017;9(407)
263. He L, Xu J, Chen L, Li L. Apelin/APJ signaling in hypoxia-related diseases. *Clin Chim Acta*. Dec 7 2015;451(Pt B):191-8.
264. Yuzbashian E, Zarkesh M, Asghari G, et al. Is apelin gene expression and concentration affected by dietary intakes? A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. Mar 4 2018;58(4):680-688.
265. O'Harte FPM, Parthasarathy V, Hogg C, Flatt PR. Long-term treatment with acylated analogues of apelin-13 amide ameliorates diabetes and improves lipid profile of high-fat fed mice. *PLoS One*. 2018;13(8):e0202350.
266. Galon-Tilleman H, Yang H, Bednarek MA, et al. Apelin-36 Modulates Blood Glucose and Body Weight Independently of Canonical APJ Receptor Signaling. *J Biol Chem*. Feb 3 2017;292(5):1925-1933.
267. Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, et al. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology*. Jun 2007;148(6):2690-7.
268. Saral S, Alkanat M, Sumer A, Canpolat S. Apelin-13 increased food intake with serum ghrelin and leptin levels in male rats. *Bratisl Lek Listy*. 2018;119(1):47-53.
269. O'Harte FPM, Parthasarathy V, Hogg C, Flatt PR. Apelin-13 analogues show potent in vitro and in vivo insulinotropic and glucose lowering actions. *Peptides*. Feb 2018;100:219-228.

270. Li E, Deng H, Wang B, Fu W, You Y, Tian S. Apelin-13 exerts antidepressant-like and recognition memory improving activities in stressed rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* Mar 2016;26(3):420-30.
271. Tian SW, Xu F, Gui SJ. Apelin-13 reverses memory impairment and depression-like behavior in chronic social defeat stressed rats. *Peptides.* Oct 2018;108:1-6.
272. Jászberényi M, Bujdosó E, Telegdy G. Behavioral, neuroendocrine and thermoregulatory actions of apelin-13. *Neuroscience.* 2004;129(3):811-6.
273. Xiao ZY, Wang B, Fu W, et al. The Hippocampus is a Critical Site Mediating Antidepressant-like Activity of Apelin-13 in Rats. *Neuroscience.* Apr 1 2018;375:1-9.
274. Zafar M, Naeem-ul-Hassan Naqvi S. Effects of STZ-induced diabetes on the relative weights of kidney, liver and pancreas in albino rats: a comparative study. *International Journal of Morphology.* 2010;28(1):135-142.
275. Magalhães DA, Kume WT, Correia FS, et al. High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *An Acad Bras Cienc.* Mar 21 2019;91(1):e20180314.
276. Taher M, Tg Zakaria TM, Susanti D, Zakaria ZA. Hypoglycaemic activity of ethanolic extract of *Garcinia mangostana* Linn. in normoglycaemic and streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med.* May 21 2016;16:135.
277. Howarth F, Jacobson M, Shafiullah M, Adeghate E. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Experimental physiology.* 2005;90(6):827-835.
278. Motyl K, McCabe LR. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. *Biol Proced Online.* Mar 6 2009;11:296-315.
279. Yin R, Xue Y, Hu J, Hu X, Shen Q. The effects of diet and streptozotocin on metabolism and gut microbiota in a type 2 diabetes mellitus mouse model. *Food and Agricultural Immunology.* 2020;31(1):723-739.
280. Florence NT, Théophile D, Désiré DDP, et al. Antidiabetic activities of methanol-derived extract of *Dorstenia picta* twigs in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Journal of Traditional Medicines.* 2007;2(4):140-148.

281. Lee Y, Wang M-Y, Du XQ, Charron MJ, Unger RH. Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice. *Diabetes*. 2011;60(2):391-397.
282. Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2009;1(1):1-7.
283. Vitzel KF, Bikopoulos G, Hung S, Curi R, Ceddia RB. Loss of the anorexic response to systemic 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside administration despite reducing hypothalamic AMP-activated protein kinase phosphorylation in insulin-deficient rats. *PLoS One*. 2013;8(8):e71944.
284. Li C, Cheng H, Adhikari BK, et al. The Role of Apelin-APJ System in Diabetes and Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:820002.
285. Lee TH, Cheng KK, Hoo RL, Siu PM, Yau SY. The Novel Perspectives of Adipokines on Brain Health. *Int J Mol Sci*. Nov 11 2019;20(22)
286. Drougard A, Fournel A, Marlin A, et al. Central chronic apelin infusion decreases energy expenditure and thermogenesis in mice. *Sci Rep*. Aug 23 2016;6:31849.
287. Knauf C, Drougard A, Fournel A, Duparc T, Valet P. Hypothalamic actions of apelin on energy metabolism: new insight on glucose homeostasis and metabolic disorders. *Horm Metab Res*. Dec 2013;45(13):928-34.
288. Sawane M, Kajiya K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F, Takakura N. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes*. Jun 2013;62(6):1970-80.
289. Habchi M, Duvillard L, Cottet V, et al. Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Nov 2014;81(5):696-701.
290. Helmy MY, Hamdy N, Ghaffar NAE. Connection between the Plasma Level of Apelin and Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetic Patients. A Case Control Study. *Indian J Endocrinol Metab*. Sep-Oct 2021;25(5):418-426.
291. Vohra MS, Benchoula K, Serpell CJ, Hwa WE. AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *Eur J Pharmacol*. Jan 15 2022;915:174611.

292. Si R, Pan D, Wang Z, Chen Y, Cao J. Regulation of the central melanocortin system on energy balance in mammals and birds. *Neuropeptides*. Oct 2022;95:102267.
293. Andermann ML, Lowell BB. Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control. *Neuron*. Aug 16 2017;95(4):757-778.
294. Roger C, Lasbleiz A, Guye M, Dutour A, Gaborit B, Ranjeva JP. The Role of the Human Hypothalamus in Food Intake Networks: An MRI Perspective. *Front Nutr*. 2021;8:760914.
295. Havel PJ, Hahn TM, Sindelar DK, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the hypothalamic melanocortin system and muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *Diabetes*. Feb 2000;49(2):244-52.
296. Park ES, Seong JK, Yi SJ, et al. Changes in orexin-A and neuropeptide y expression in the hypothalamus of obese and lean Zucker Diabetic Fatty rats. *J Vet Med Sci*. Jul 2005;67(7):639-46.
297. Xu J, Bartolome CL, Low CS, et al. Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases. *Nature*. Apr 2018;556(7702):505-509.
298. Bentsen MA, Rausch DM, Mirzadeh Z, et al. Transcriptomic analysis links diverse hypothalamic cell types to fibroblast growth factor 1-induced sustained diabetes remission. *Nat Commun*. Sep 7 2020;11(1):4458.
299. Meek TH, Matsen ME, Damian V, Cubelo A, Chua SC, Jr., Morton GJ. Role of melanocortin signaling in neuroendocrine and metabolic actions of leptin in male rats with uncontrolled diabetes. *Endocrinology*. Nov 2014;155(11):4157-67.
300. Lee DK, Jeong JH, Oh S, Jo YH. Apelin-13 enhances arcuate POMC neuron activity via inhibiting M-current. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119457.
301. Anderson EJ, Çakir I, Carrington SJ, et al. 60 YEARS OF POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by α -MSH. *J Mol Endocrinol*. May 2016;56(4):T157-74.

7. EKLER

7.1. Etik Kurul Onayı



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)

ETİK KURUL KARARI

Protokol No	Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar No	Proje Yürütücüsü
2021-003	20.01.2021	2021/01	2021/01-3	Prof. Dr. Bayram Yılmaz
'AgRP Transgenik Farelerde Apelin Hormonunun İntraserebral Enjeksiyonu Sonrasında İştah Düzenlenmesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması' isimli proje oy birliğiyle etik açıdan uygun görülmüştür.				
Hayvan Türü /ırkı		Toplam Hayvan Sayısı		Hayvanın Cinsiyeti
Fare / AgRP		60		Erkek ve Dişi

Görevi	Adı Soyadı	Katılım Durumu
Başkan	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	
Başkan Vekili	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Üye	Dr. Veteriner Hekim Engin SÜMER	
Üye	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Üye	Prof. Dr. Rukset ATTAR	
Üye	Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE	
Üye	Doç. Dr. Ediz DENİZ	
Üye	Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR	
Üye	Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL	
Üye	Hakan GÖKSEL	
Üye	Ahmet ŞENKARDEŞLER	

7.2. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı	Volkan Adem	Soyadı	Bilgin
-----	-------------	--------	--------

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora			
Yüksek Lisans	Biyomedikal Mühendisliği	Boğaziçi Üniversitesi	2007
Lisans	Tıp	Yeditepe Üniversitesi	2003
Lise	Fen Bilimleri	Özel Tercüman Lisesi	1996
Bildiği Yabancı Dilleri		Yabancı Dil Sınav Notu (#)	
İngilizce (Yökdl)			
Almanca			

Başarılmış birden fazla sınav varsa (KPDS, ÜDS, TOEFL; EELTS vs), tüm sonuçlar yazılmalıdır

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırma Görevlisi	University of Houston	İki yıl (2010-2012)
Araştırma Görevlisi	Arizona State University	Üç yıl (2007-2010)

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilimsel Çalışmaları

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Yildiz, C., Bilgin, V. A., Yılmaz, B., & Özilgen, M. (2020). Organisms live at far-from-equilibrium with their surroundings while maintaining homeostasis, importing exergy and exporting entropy. International Journal of Exergy, 31(3), 287-301. doi:10.1504/IJEX.2020.106457

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifika/Ödülleri)

--