



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**HİPERGLİSEMİK NÖROPATİ VE
MİTOKONDRIYAL FONKSİYONUN İLİNTİSİ:
MİTOKONDRI (DİS)FONKSİYONU VE
MİTOFAJİ/OTOFAJİ MODÜLASYONUNUN
POTANSİYEL NÖROPROTEKTİF ETKİSİ
ÜZERİNE *in vitro* ARAŞTIRMALAR**

Arif Kamil SALİHOĞLU

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet AYAR

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

29.12.2023

Arif Kamil SALİHOĞLU

İthaf

Bu doktora tezimi, elli yıldır diyabetten ve komplikasyonlarından muzdarip olan babam Saadettin SALİHOĞLU da dahil olmak üzere bütün diyabet hastalarına ve başta Danışmanım Prof. Dr. Ahmet AYAR olmak üzere, süregelen hastalıkların sağaltımı yolunda bilime katkı sunmakta olan bütün bilim insanlarına ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bilim yolculuğumda maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her şartta yanımda olan Saygıdeğer Danışmanım Prof. Dr. Ahmet AYAR Hocama minnettarım. Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim başta Doç. Dr. Mukadder OKUYAN ve Doç. Dr. Zafer ŞAHİN Hocalarım olmak üzere bütün Fizyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyelerine ve bütün çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan beni destekleyen ve bu günlere getiren sevgili ailem; annem Emine SALİHOĞLU, babam Saadettin SALİHOĞLU ve kardeşim Saliha SALİHOĞLU'na minnettarım.

Ayrıca, bu tez çalışmasının gerçekleşebilmesi için gerekli olan bazı malzemelerin pandeminin zor şartlarında tedariki noktasında katkılarından dolayı, Değerli Hocam Prof. Dr. Mete ÖZCAN'a, Değerli Dostlarım Doç. Dr. Şahin HANALİOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Tagi HANALİOĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Arif Kamil SALİHOĞLU

Bu doktora tezi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 220S863 protokol numarası ile 1002- Hızlı Destek Programı kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Glukoz ve Glukoz Homeostazı	4
2.1.1. Monosakkaritlerin Hücrelere Taşınması	6
2.1.2. Glukoz Metabolizması	6
2.1.2.1. Glikoliz ve Oksidatif Dekarboksilasyon	6
2.1.2.2. Trikarboksilik Asit Döngüsü	7
2.1.2.3. Elektron Taşıma Zinciri ve Oksidatif Fosforilasyon	7
2.1.2.4. Glikojenez	7
2.1.2.5. Glikojenoliz	8
2.1.2.6. Glukoneogenez	8
2.1.2.7. Pentoz Fosfat Yolu	8
2.1.3. Glukoz Homeostazında Pankreasın Rolü	10
2.1.3.1. İnsülin	10
2.1.3.2. Glukagon	11
2.1.3.3. Somatostatin	11
2.1.3.4. Amilin	12
2.1.3.5. Pankreatik Polipeptid	12

2.1.4. Glukoz Homeostazında Karaciğerin Rolü	13
2.1.5. Glukoz Homeostazında Böbreklerin Rolü	13
2.1.6. Glukoz Homeostazında Hipotalamus-Hipofiz Aksının Rolü	14
2.2. Hiperglisemi Tanımı	16
2.2.1. Kronik ve Akut Hiperglisemi	17
2.2.2. Kronik Hiperglisemi ile Seyreden Hastalıklar	17
2.2.3. Kronik Hipergliseminin Komplikasyonları	20
2.2.3.1. Makrovasküler Komplikasyonlar	20
2.2.3.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar	21
2.3. Diyabetik Nöropati	22
2.3.1. Diyabetik Nöropatinin Klinik Görünümleri, Sınıflaması ve Genel Terapötik Yaklaşım Modaliteleri	23
2.4. Nosisepsiyon Tanımı	26
2.4.1. Diyabetik Nöropatinin <i>in vitro</i> Bir Modeli Olarak “Dorsal Kök Gangliyonu” Dokusunun İncelenmesi	28
2.5. Diyabetik Nöropati Patofizyolojisi	30
2.6. Oksidatif Stres	33
2.6.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	34
2.6.2. Antioksidan Sistemler	35
2.6.3. Enzimatik Antioksidan Sistem	36
2.6.3.1. Süperoksit Dismutaz	36
2.6.3.2. Katalaz	36
2.6.3.3. Glutatyon Sistemleri	36
2.6.3.4. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz	37
2.6.4. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistem	37
2.6.4.1. C Vitamini	38
2.6.4.2. E Vitamini	38
2.6.4.3. Karotenoidler	38
2.6.4.4. Selenyum	38
2.6.4.5. Polifenoller	39
2.6.4.6. Melatonin	39
2.6.4.7. Flavonoidler	39

2.6.5. Diyabetik Nöropatide Oksidatif Değişiklikler ve Antioksidan Uygulamaları	39
2.6.5.1. Alfa-Lipoik Asit	40
2.6.5.2. Aldoz Redüktaz İnhibitörleri	40
2.6.5.3. Protein Kinaz C İnhibitörleri	40
2.7. Mitokondri Disfonksiyonu	41
2.7.1. Mitokondri ve Oksidatif Fosforilasyon	41
2.7.2. Mitokondriyal Solunum Zinciri Elemanlarını Etkileyen Ajanlar	43
2.7.2.1. Anetol Triton	44
2.7.3. Hiperglisemik Nörotoksisite ile Mitokondri Disfonksiyonu İlişkisi	44
2.8. Hücre Ölümü	45
2.8.1. Tip I Hücre Ölümü- Apoptoz	46
2.8.2. Tip II Hücre Ölümü- Otofaji	47
2.8.2.1. Mitofaji	48
2.8.3. Tip III Hücre Ölümü- Nekroz	49
2.8.4. Diğer Hücre Ölümü Türleri	50
2.8.5. Hiperglisemik Nörotoksisite ile Mitofaji/Otofaji İlişkisi	50
2.8.6. Mitofaji/Otofaji Modülatörleri	50
2.8.6.1. Metformin	51
2.8.6.2. Rapamisin	51
2.8.6.3. Ürolitin A	52
3. GEREÇ ve YÖNTEM	54
3.1. Çalışma Tasarımı	54
3.2. Deney Hayvanları	54
3.3. DKG Nöron Primer Hücre Kültürü Hazırlanması	55
3.3.1. DKG Nöronlara Uygulanan Kimyasallar ve Test Ajanları	57
3.3.1.1. Hiperglisemi ve Hiperozmolarite Tetiklenmesi	59
3.3.1.2. DKG Nöronlarında Yüksek Konsantrasyonda Glukozun Tetiklediği Nörotoksisite Üzerine Potansiyel Nöroprotektif Etkileri Test Edilen Ajanların Dozlarının Belirlenmesi	59
3.4. Nörotoksisite Deneyleri	60
3.5. İstatistiksel Analizler	62

3.6. Etik Kurul Onayı	62
3.7. Destekleyen Kuruluş	62
4. BULGULAR	63
4.1. Test Ajanlarının Fizyolojik Düzeyde Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri	63
4.2. Yüksek Konsantrasyonda Glukoz Uygulamasının DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri ve Anetol Triton Uygulamasının Yüksek Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri	65
4.3. Ürolitin A Uygulamasının Yüksek Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri	67
4.4. Rapamisin Uygulamasının Yüksek Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri	69
4.5. Test Ajanlarının Kombinasyonlar Halinde Uygulanmasının Yüksek Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri	71
4.6. Test Ajanlarının Hiperozmolar Koşullarda İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri	76
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	79
6. KAYNAKLAR	85
EKLER	121
EK 1. Etik Kurul Onayı	122
EK 2. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Programı Öğrencisinin Tezini Teslim Edebilme Koşulunu Sağladığına Dair Belge	123
ÖZGEÇMİŞ	124

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Kronik hiperglisemi ile seyreden hastalıkların listesi	19
Tablo 2.	Diyabetik nöropatilerin sınıflandırılması	25
Tablo 3.	Mitokondriyi hedef alan terapötik ilaçlar ve etki mekanizmaları	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Bir ATP molekülünün modeli	5
Şekil 2. Bir α -D-Glukoz molekülünün modeli	5
Şekil 3. Glukoz metabolizması özeti	9
Şekil 4. Diyabetik nöropatide sinir hasarı paternleri	24
Şekil 5. Diyabetik nöropati patogenezi özeti	30
Şekil 6. Tez çalışması tasarımının şematik planı	58
Şekil 7. Fizyolojik glukoz içeren konvansiyonel hücre kültürü çözeltisinde inkübe edilen DKG nöronlarında anetol trition, ürolitin A, rapamisin ve metformin'in hücre indeksine zamana bağlı etkileri	64
Şekil 8. Fizyolojik glukoz içeren konvansiyonel hücre kültürü çözeltisinde inkübe edilen DKG nöronlarında dimetil sülfoksit, anetol trition, ürolitin A, rapamisin ve metformin'in hücre indeksine etkileri	65
Şekil 9. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine anetol trition'un tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine zaman bağımlı etkileri	66
Şekil 10. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine anetol trition'un tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine etkileri	67
Şekil 11. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine ürolitin A'nın tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine zaman bağımlı etkileri	68
Şekil 12. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine ürolitin A'nın tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine etkileri	69
Şekil 13. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine rapamisin'in tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine zaman bağımlı etkileri	70
Şekil 14. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine rapamisin'in tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine etkileri	71

Şekil 15. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine metformin (1 mM) ve metformin (1 mM) ile diğer bir test ajanının birlikte uygulanmasının hücre indeksine zaman bağımlı etkileri	73
Şekil 16. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine metformin (1 mM) ve metformin (1 mM) ile diğer en az iki test ajanının birlikte uygulanmasının hücre indeksine zaman bağımlı etkileri	74
Şekil 17. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine DMSO, metformin ve test ajanlarının metformin ile kombinasyonlarının hücre indeksine zaman bağımlı etkilerinin birlikte gösterimi	75
Şekil 18. DKG nöronlarda hiperozmolar stres üzerine DMSO, metformin ve test ajanlarının hücre indeksine zaman bağımlı etkileri	77
Şekil 19. DKG nöronlarda hiperozmolar stres üzerine DMSO, metformin ve test ajanlarının hücre indeksine etkileri	78

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Sabit hava akımlı güvenlik kabini, gerçek zamanlı hücre canlılığı analizi sistemi ve karbondioksit inkübatörü	55
Resim 2a.	C57BL/6J farenin kolumna vertebralisinin orta hattan disseke edilmesi ve gömülü DKG'lerin tespiti	56
Resim 2b.	DKG'lerin izole edilmesi	56
Resim 3.	Enzimatik ve mekanik olarak ayrıştırılmış DKG nöron hücre gövdeleri	57
Resim 4.	RTCA DP analiz cihazı ve RTCA 1.2.1 yazılımına sahip veri kontrol ünitesi	60
Resim 5.	Altın mikroeletrotlar içeren 16 kuyucuklu E-pleyt	61
Resim 6.	RTCA yazılımında görülen DKG nöronları içeren kuyucuklara ait hücre indekslerinin görüldüğü trase örneği	61

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
ADP	Adenozin Difosfat
Akt	Protein Kinaz B veya “ <i>AK-strain Transforming</i> ”
ALA	Alfa-Lipoik Asit
AMPK	Adenozin Monofosfat Aktive Edici Protein Kinaz
Apaf-1	Apoptotik Proteazı Aktive Eden Faktör-1
Asetil CoA	Asetil Koenzim A
ATG	Otofaji-İlişkili (Gen/Protein) / “ <i>AuTophagy-related</i> ”
ATP	Adenozin Trifosfat
ATT	Anetol Trition
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
CRH	Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
DKG	Dorsal Kök Gangliyonu
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dL	Desilitre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FADH₂	Flavin Adenin Dinükleotid
Fas	Fs-7 İlişkili Yüzey Antijeni
Fe	Demir
G6PD	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GLUT	Glukoz Taşıyıcı Protein
kg	Kilogram
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
m	Metre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

μM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mN	Milnewton
MTF	Metformin
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa Beta
ng	Nanogram
PARP	Poliadenozin Difosfat-Riboz Polimeraz
PI3K	Fosfatidil İnozitol-3 Kinaz
PP	Pankreatik Polipeptid
RM	Rapamisin
RNA	Ribonükleik Asit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analizi / “ <i>Real-Time Cell Analysis</i> ”
s	Saniye
SGLT	Sodyum/Glukoz Kotransporter
SOD	Süperoksit Dismutaz
SSTR2	Somatostatin Reseptörü-2
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroidin
TURDEP-II	Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrin Hastalıklar Prevalans Çalışması-II
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UDP-GlcNAc	Üridin Difosfat N-Asetil Glukozamin
ULK-1	Unc-51 Benzeri Kinaz-1
URA	Ürolitin A
ve ark.	Ve Arkadaşları
vb.	Ve Benzeri
YG	Yüksek Konsantrasyonda Glukoz

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
$>$	Büyük
δ	Delta
$<$	Küçük
$\&$	Ve
$\sim$	Yaklaşık
$\%$	Yüzde

Formüller

$C_6H_{12}O_6$	Glukoz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
$OH^\cdot$	Hidroksil Radikali
CO_2	Karbondioksit
Cl^-	Klorür
NO_2	Nitrojen Dioksit
O_2	Oksijen
NO_2^+	Nitronyum İyonu
$ONOO^\cdot$	Peroksinitrit Radikali
K^+	Potasyum İyonu
H^+	Proton
Na^+	Sodyum İyonu
H_2O	Su
O_2^-	Süperoksit
$1O_2$	Tekli oksijen

ÖZET

Hiperglisemik Nöropati ve Mitokondriyal Fonksiyonun İltisi: Mitokondri (Dis)fonksiyonu ve Mitofaji/Otofaji Modülasyonunun Potansiyel Nöroprotektif Etkisi Üzerine *in vitro* Araştırmalar

Nöropati, kronik hiperglisemili hastaların yaklaşık yarısında gelişen en yaygın komplikasyondur. Mitokondri disfonksiyonunun ve mitofaji/otofaji modülasyonundaki bozuklukların, hiperglisemik nöropatinin patogeneğinde kritik rolleri olduğu gösterilmiştir; ancak bu modülasyonları düzenleyen ajanların nöroprotektif etkisi araştırılmamıştır. Bu bağlamda tez çalışmasının amacı, bu modülasyonları düzenlediği bilinen seçilmiş ajanların (anetol trition, ürolitin A, rapamisin ve metformin ile kombinasyonlarının), dorsal kök gangliyon (DKG) nöron hücre kültüründe hiperglisemi ile tetiklenen *in vitro* strese karşı nöroprotektif etkilerini test ederek, tedavi edici potansiyelleri için kanıt sunmaktır.

Hiperglisemik nöropatinin hücre model olarak (12 haftalık) C57BL/6J farelerden elde edilen DKG nöronları kültüre edildi. Test ajanlarının yüksek glukoz konsantrasyonunda (YG, 50 mM) inkübe edilen nöronlar üzerindeki nöroprotektif etkileri, 70 saat boyunca gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi (xCELLigence) ile “hücre indeksi” ana ölçüm parametresi kullanılarak incelendi. İstatistik analizler, tek yönlü ANOVA ve Fisher’in LSD post-hoc testi ile gerçekleştirildi ve 0.05’ten küçük *p* değerleri anlamlı kabul edildi.

YG maruziyeti, DKG nöronlarının hücre indeksinde anlamlı düzeyde düşüşe yol açtı ($p=0.006$). YG ile eşzamanlı anetol trition uygulamasının herhangi bir dozunda YG nörotoksisitesini anlamlı olarak önleyemedi ($p>0.05$). YG ile eşzamanlı ürolitin A (10 μ M veya 30 μ M) veya rapamisin (0.1 μ M veya 0.3 μ M) uygulamasının YG nörotoksisitesini önlediği saptandı (sırasıyla $p=0.01$, $p=0.04$, $p=0.036$ ve $p=0.008$). YG ile eş zamanlı metformin veya test ajanlarıyla kombinasyonlarının YG nörotoksisitesini anlamlı düzeyde önleyemediği tespit edildi ($p>0.05$).

Bu tez çalışması ile, mitofaji/otofaji modülatörü ajanlar olan ürolitin A ve rapamisin’in fare DKG nöronlarında doz bağımlı olarak YG nörotoksisitesine karşı nöroprotektif kapasiteye sahip olduğuna dair özgün kanıtlar elde edildi. Bu çalışmanın sonuçlarına ve aracılık eden moleküler mekanizmalar hakkında kanıta yönelik daha ileri *in vivo* prelinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Diyabetik Nöropati, Hiperglisemi, Mitofaji, Mitokondri, Otofaji

ABSTRACT

Hyperglycemic Neuropathy and Its Relevance to Mitochondrial Function: *in vitro* Investigations on the Potential Neuroprotective Effect of Mitochondrial (Dys)function and Mitophagy/Autophagy Modulation

Neuropathy is the most prominent complication (approximately in half of patients) of chronic hyperglycemia. Mitochondrial dysfunction and mitophagy/autophagy demodulation have been indicated to play crucial roles in pathogenesis of hyperglycemic neuropathy; however, whether agents that provide these modulatory effects have neuroprotective effects has not been investigated. In this context, the aim of this thesis study is to evaluate the neuroprotective effects of selected agents known to provide aforementioned modulations (anethole trithione, urolithin A, rapamycin and their combinations with metformin) against *in vitro* stress induced by high glucose (HG) in dorsal root ganglion (DRG) neuron cell culture and to provide evidence for their therapeutic potential.

DRG neurons from (12 weeks old) C57BL/6J mice were cultured as a cellular model of hyperglycemic neuropathy. The neuroprotective effects of test agents on HG-induced neurons were examined using "cell index" as main parameter with xCELLigence real-time cell analyzer for 70 hours. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA and Fisher's LSD post-hoc test, with significance set at $p < 0.05$.

HG (50 mM) exposure caused a significant decline in cell indices in DRG neurons with physiological glucose levels. Co-treatment of anethole trithione with HG-induction failed to significantly attenuate HG-induced neurotoxicity at any dose ($p > 0.05$). Co-treatment of urolithin A (10 μ M or 30 μ M) or rapamycin (0.1 μ M or 0.3 μ M) with HG-induction significantly prevented HG-induced decrease in cell index ($p = 0.01$, $p = 0.04$, $p = 0.036$ and $p = 0.008$ respectively). Co-treatment of metformin or its combinations with other test agents failed to significantly attenuate HG-induced neurotoxicity ($p > 0.05$).

This thesis study indicates unique evidence that urolithin A and rapamycin, which modulate mitophagy/autophagy, have dose-dependent neuroprotective capacity against HG-induced neurotoxicity in murine DRG neurons. Further *in vivo* preclinical and clinical studies are warranted to address the results of this study and providing evidence on the mediating molecular mechanisms.

Keywords: Diabetic Neuropathy, Hyperglycemia, Mitophagy, Mitochondria, Autophagy

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Glukoz homeostazında kronikleşen denge bozuklukları kan glukoz konsantrasyonunda sıklıkla süregelen olan bir artışa (hiperglisemi) neden olabilmektedir. Kronik hiperglisemi, diabetes mellitus (diyabet) hastalık grubunun karakteristik bir bulgusudur ve genellikle hastalığın başlangıcından yalnızca birkaç yıl sonra gelişen diyabetik komplikasyonların ana nedeni olarak kabul edilmektedir (1). Diyabet; insülin salınımında, etki gösterme sürecinde veya her ikisindeki defektlerden kaynaklanan, hiperglisemi ile karakterize, bir grup metabolik hastalıktır (2). Diyabetle gelişen kronik hiperglisemi; özellikle gözler, böbrekler, kalp; kan damarları ve sinirler olmak üzere farklı organ ve dokuların uzun vadede hasarına, fonksiyon kaybı ve/veya yetmezliğine yol açmaktadır (3).

Tez çalışmasının merkezindeki hastalık grubu olan diyabet (tip 1, tip 2 ve spesifik alt tipleri); uzun seyri ve yüksek küresel prevalansı nedeniyle çok ciddi ekonomik boyutları olan önemli bir toplum sağlığı sorunudur (4). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerince ülkemizde, 2008'den 2019 yılına dek, bir yılda sağlık kuruluşuna başvuran bireyler arasından diyabet tanısı alanların oranı %5.9'dan %10.2'ye yükselmiştir (5). Türk Diyabet, Obezite, Hipertansiyon ve Endokrin Hastalıklar Epidemiyolojisi Araştırma Grubunun (TURDEP-II) son verilerine göre, ülkemizde 20 yaş üstü nüfusun %45.7'sinin prediyabetli ve diyabetli olduğu tespit edilmiştir (6). Diyabete bağlı küresel sağlık harcamaları 2007 yılından 2019 yılına dek 232 milyar Amerikan dolarından 760 milyar Amerikan dolarına yükselmiştir ve 2019 yılı itibarıyla ülkemiz, toplam sağlık harcamalarının %24'ünü diyabet ve komplikasyonlarına yönelik tedavi ve girişimlere ayırarak Avrupa ülkeleri arasında ilk sırada yer almıştır (7). Küresel sağlık harcamalarının %34.7'sinin, diyabetin ve diyabetle gelişen durumların maliyetini oluşturduğu tespit edilmiştir (8). Bütün bu istatistiksel veriler, mevcut hastalığın ve komplikasyonlarının insan sağlığını ve küresel ekonomiyi ne denli etkilediğini açıkça ortaya koymaktadır.

Glukoz homeostazı; insülin salıverilmesi, hücrelere glukoz alımı ve hepatik glukoz üretimi şeklindeki fizyolojik süreçlerin yüksek düzeyde koordineli etkileşimi ile sağlanmaktadır. Glukoz homeostazı; glukoz alımı (gastrointestinal sistemden glukoz emilimi), dokuda kullanımı (glikoliz, pentoz fosfat yolu, trikarboksilik asit döngüsü, glikojen sentezi) ve endojen üretimi (glikojenoliz ve glukoneogenez) arasındaki dengeyi temsil etmektedir (9).

Hücrenin [yüksek enerjili fosfat bağları içeren adenozin trifosfat (ATP) sentezini sağlaması nedeniyle] enerji santrali olarak nitelendirilen mitokondrinin son yıllarda homeostazın devamlılığı için son derece kritik olduğu anlaşılmış ve pek çok hastalığın patogenezinde mitokondri disfonksiyonunun yer aldığı tespit edilmiştir (10). Mitokondri; hücrede oksidatif fosforilasyon, trikarboksilik asit döngüsü, yağ asitlerinin oksidasyonu, hem biyosentezi ve amino asit metabolizmasında rol oynamaktadır ve enerji öncülü moleküllerin kısıtlılığına, çevresel toksinlere ve oksidatif strese oldukça duyarlıdır (11). Bu nedenlerle, mitokondri disfonksiyonu pek çok hastalığın temel patogenezinin oluşturduğu için, ilgili hastalıkların tedavisine yönelik yaklaşımlarda mitokondri fonksiyonunu regüle eden ajanlar doğal olarak potansiyel aday olmuştur (12).

Nöropati, etkin glisemik kontrol sağlanamadığı kronik bir süreçte gelişen en yaygın diyabetik komplikasyonlardan biridir ve diyabetik nöropatinin patogenezi henüz tamamen anlaşılamamıştır (13). Hiperglisemi, hipertansiyon, hiperlipidemi, yüksek beden-kitle indeksi, sigara kullanımı ve diyabetli bireylerin hastalık yaşı; diyabetik nöropatinin gelişmesindeki en önemli risk faktörleri olarak değerlendirilmektedir (14). Diyabetli erişkin bireylerin yaklaşık yarısında bir dereceye kadar nöropati gelişmekte (13), nöropati bulguları olmaksızın sinir ileti anormallikleri de hesaba katıldığında bu oran %100'e ulaşmaktadır (15, 16). Diyabetik nöropati çeşitli klinik bulgularla ortaya çıkabilmektedir, bunlardan en yaygın olanı distal simetrik duyuşal polinöropatidir (17, 18). Diyabetik nöropatili hastalarda ciddi ağrılar, duyu kaybı, hipo-/hiper-estezi, ayak ülserleri, enfeksiyon, yara iyileşmesinde gecikmeler ve kangren meydana gelebilmekte; birçok vakada nihai komplikasyon alt ekstremitte amputasyonu olabilmektedir (19). Alt ekstremitte amputasyonu, diyabetli bireylerde diyabeti olmayan kişilere kıyasla on-yirmi kat daha fazladır (20) ve tahmini olarak küresel ölçekte her otuz saniyede bir, alt ekstremitenin bir parçası diyabetin komplikasyonu nedeniyle amputé edilmektedir (21).

Hiperglisemiden ve hiperlipidemiden kaynaklanan oksidatif stresle ilişkili mitokondriyal disfonksiyonun, diyabetik periferik nöropati gelişiminde kritik bir mekanizma olduğu ileri sürülmüştür (22–24). Mitokondri fonksiyonunu geliştiren farmakolojik ajanların kullanımı; diyabetik periferik nöropatinin gelişimini önlemeye veya nöropati prognozunun iyileşmesine yol açtığı belirlenmiştir (25). Mitokondriyal disfonksiyon, merkezi ve periferik sinir sistemlerinde nörodejenerasyonun ana mekanizması

olarak gösterilmiş (26, 27); nöronlarda ve damar endotel hücrelerinde diyabetin komplikasyonlarının önemli bir modölatörü olarak ileri sürülmüştür (17, 28).

Diyabet ve önemli bir komplikasyonu olarak nöropatinin patogeneğinde diyabette değişen kan glukoz konsantrasyonlarına bağlı hücre içi stres ile tetiklenen hücresel otofaji de yer almaktadır (29). Otofaji; lizozomlar ile hasarlı hücresel bileşenlerin geri dönüştürüldüğü ve hücrenin kendi kendini sindirdiği katabolik bir süreçtir (30). Mitofaji, otofagozomun yapısında disfonksiyone mitokondrinin bulunduğu hücresel otofajidir (31). Mitofaji tetikleyicileri, diyabetik komplikasyonların (kardiyak komplikasyonlar, diyabetik nefropati vb.) yönetiminde kullanılmak üzere test edilmeye başlanmıştır (32, 33).

Bu bağlamda araştırmanın amacı; mitokondri disfonksiyonunu önlediği ve mitofaji/otofaji modülasyonu sağlayıcı etkisi bilinen seçilmiş ajanların [anetol trition, ürolitin A, rapamisin ve bu test ajanlarının (tıpta yaygın kullanılan bir antidiyabetik ve aynı zamanda bir mitofaji/otofaji modölatörü olan) metformin ile kombinasyonları (34–36)] diyabetik periferik nöropatiyi *in vitro* düzeyde modelleyen duyuşal nöron hücre kültürü ile DKG hücrelerinde yüksek konsantrasyonda glukoz (YG) ile tetiklenen *in vitro* metabolik strese karşı nöroprotektif etkilerini (gerçek zamanlı hücre canlılığı analizi ile) test ederek, terapötik fayda sağlama potansiyelleri hakkında deneysel düzeyde kanıt sunmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

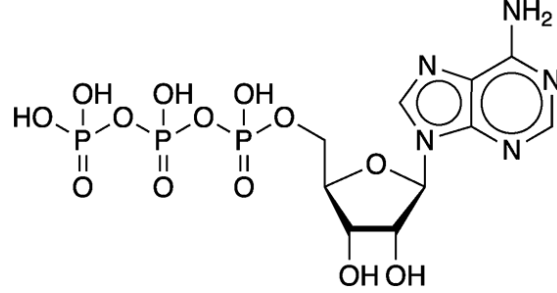
2.1. Glukoz ve Glukoz Homeostazi

Enerji elde etme ve kullanma döngüsü, canlılığın en önemli kriterlerden biridir ve canlı organizmanın hareketi, büyümesi, üremesi, stres, açlık, aşırı beslenme, egzersiz ve benzeri durumlar nedeniyle oluşan bütün eylemlere karşı yanıt verebilmesi için enerji sürekliliğini sağlamak zorundadır. Bu nedenle canlı organizmalar, molekül ve iyonların hücresel yapılar arasında aktif transportu, biyolojik makromoleküllerin basit başlangıç bileşiklerinden sentezlenmesi ve hücre veya organ düzeyinde hareketlerdeki mekanik fonksiyonların yerine getirilmesi için sürekli bir serbest enerji kaynağına ihtiyaç duyarlar. Bu enerjiyi yaşam boyunca sürekli elde edebilmek için termodinamiğin yasaları çerçevesinde canlı hücrelerin ve dokuların alevler içinde yanmadan veya patlama reaksiyonu göstermeden yaşamını tehlikesizce sürdürmeye olanak sağlayan bir dizi biyokimyasal süreçlere gereksinim vardır.

Organizmadaki hücrelerin canlılığını sürdürülebilmesi için hücre dışı sıvı ortamında bulunan besin kaynaklarını ve iyonları kullanıp enerji elde etmesi gereklidir. Bu bağlamda, 19. yüzyılda yaşamış Fransız fizyolog Claude Bernard tarafından, bütün hücrelerin aynı hücre dışı sıvı ortamında “*milieu intérieur*- iç çevre” biyolojik madde alış-verişinde denge halinde bulunduğu tanımlanmış ve 20. yüzyılın başlarında Amerikalı fizyolog Walter Cannon tarafından “bu iç çevrede ideal dengenin sürdürülmesi” anlamında homeostaz terimi ilk kez kullanılmıştır (37). Bu bağlamda homeostaz, canlı organizmaların dış ortamdaki faktörlerde meydana gelen değişikliklere rağmen çeşitli fizyolojik değişkenleri dar bir aralıkta düzenleyerek iç dengeyi koruduğu biyolojik süreçler bütünü olarak tanımlanmıştır (38). Canlı organizmaların enerji elde etme bağlamında homeostazı sağlamak için ana hedefleri; kısa vadede depo edebilen bir enerji kaynağı, indirgeyici (redüktan) moleküller ve biyosentez için yapı taşları üretebilmektir (39).

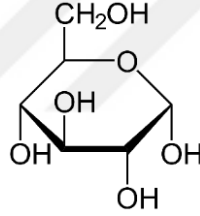
Canlı organizmaların hücresel düzeyde tek enerji kaynağı; bir adenin bazı, beş karbonlu bir riboz şekeri ve üç fosfat birimi içeren ATP molekülüdür (Şekil 1). Bir ATP molekülünün fosfat bağlarının hidrolizi ile açığa çıkan enerji, bir biyolojik reaksiyonun dengesini yaklaşık milyonlarca kez ürünler lehine dönüştürmektedir; böylelikle termodinamik açıdan mümkün olmayan birçok biyolojik reaksiyon, yeterli miktarda ATP molekülünün hidrolizi sayesinde milisaniyeler içinde gerçekleşebilmektedir (39). Canlı organizmaların ATP hidrolizini gerçekleştirmek için kullandığı ham maddeler,

karbohidratlar, yağlar ve proteinler olup; en sık kullanılan ham madde, en temel karbohidrat bileşiği olan glukozdur (40).



Şekil 1. Bir ATP molekülünün modeli

Glukoz, her bir molekülü altı karbon, on iki hidrojen ve altı oksijen atomundan oluşan bir monosakkarit olup, insanda aerobik veya anaerobik hücresel solunumun gerçekleşebilmesi adına birincil enerji ham maddesidir (Şekil 2) (41).



Şekil 2. Bir α -D-Glukoz molekülünün modeli

İnsanda kan glukozu konsantrasyonundaki uzun süreli değişimler, sonu ölüme gidebilen çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. Bu nedenle, kan glukozu konsantrasyonunun yaşam boyu ideal seviyeler içinde bulunma ve sorunsuz bir enerji elde etme süreci, hayati önem taşımaktadır ve bu sürece glukoz homeostazı denir (42).

Birincil enerji ham maddesi olan glukoz, insanda doğrudan diyetle alım veya karaciğer ve böbrekte sonradan sentez yoluyla elde edilir. Glukoz ile diğer monosakkaritler (glikozlar); yağ asitleri, amino asitler ve glikojenin öncüsü olarak rol oynamaktadır. Ayrıca hücrelerin çeşitli katabolik yolları tarafından oksitlenirler, DNA ve RNA için pentoz şekerlerinin sentezinde görev alırlar ve ayrıca lipidlerin sentezi için indirgeyici olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) üretirler (43).

2.1.1. Monosakkaritlerin Hücrelere Taşınması

Karbohidrat metabolizmasının ilk adımında polisakkaritlerin monosakkaritlere dönüşümü ve monosakkaritlerin plazma membranlarından taşınması yer almaktadır. Glukoz ve diğer monosakkaritlerin hidrofilik doğasından dolayı, plazma membranının lipit çift katmanı bu maddelere karşı geçirgen değildir. Bu nedenle, plazma membranı boyunca monosakkarit taşınmasına, glukoz taşıyıcıları (transporter) adı verilen membran proteinleri aracılık eder (44).

İnsanda; kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcıları (GLUT), sodyum-glukoz kotransporter'ları ve SWEET proteinleri olmak üzere üç tip glukoz taşıyıcı protein bulunmaktadır. Bu taşıyıcılara “glukoz taşıyıcıları” denilmekle birlikte yalnızca glukozu değil aynı zamanda fruktoz, fukoz, ksiloz, vitaminler, iyonlar vb. gibi diğer maddeleri de taşımaktadır (45).

GLUT proteinleri SLC2 genleri tarafından kodlanır. Bu proteinler, membran taşıyıcılarının majör kolaylaştırıcı süper ailesinin “*major facilitator superfamily*” üyeleridir ve substratların hücresel membranlar boyunca bir konsantrasyon gradyanı boyunca difüzyonunu kolaylaştıran uniporter tipi proteinlerdir (46). GLUT ailesi GLUT1-GLUT12, GLUT14 ve HMIT (GLUT13) olmak üzere 14 izoformdan oluşur. HMIT proteini, proton güdümlü miyoinositol taşıyıcısıdır (47). İnsan vücudundaki her hücre tipinde bir veya daha fazla çeşit GLUT proteini eksprese edilir. Birçok GLUT proteini için ana substratların henüz tanımlanmamış olduğu düşünülmektedir (48).

2.1.2. Glukoz Metabolizması

Canlılarda enerjiye ihtiyaç duyulduğunda glukoz, yüksek enerjili bağlar içeren ATP molekülü üretmek için metabolize edilir. Glukoz oksitlenerek, mümkün olan maksimum verimle büyük miktarda enerjinin elde edilmesini sağlayan uzun bir dizi reaksiyona girmektedir (49).

2.1.2.1. Glikoliz ve Oksidatif Dekarboksilasyon

Glukozun tamamen oksidasyonunu başlatan ilk metabolik yolağa glikoliz (Embden-Meyerhof- Parnas yolu) adı verilir ve bu yolak sırasında her glukoz molekülü bölünüp üç karbonlu iki birime dönüştürülür. Glikolizin bir sonraki sonucu iki piruvat molekülü, iki ATP ve iki nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve iki proton (H^+) üretilmesidir. Glikoliz sırasında hücre mevcut toplam enerjinin yaklaşık %5'ini kullanmaktadır. Oksijen varlığında, aerobik organizmalar piruvatı karbondioksit (CO_2) ve suya dönüştürür. Oksijen

yokluğunda piruvat, etanol (örneğin maya hücrelerinde) veya laktat (örneğin kas hücrelerinde, eritrositlerde) gibi çeşitli indirgenmiş molekül türlerine dönüştürülebilir, bu anaerobik işleme fermentasyon denir (50).

Glukozun aerobik metabolizması sırasında piruvat, mitokondri organeli içine taşınmaktadır. Piruvatın asetil koenzim A (asetil CoA)'ya oksidasyonu (oksidatif dekarboksilasyon), iki CO₂ ve NADH + H⁺ molekülü açığa çıkarmaktadır (51).

2.1.2.2. Trikarboksilik Asit Döngüsü

Mitokondrideki bir dizi reaksiyonla asetil CoA'nın, CO₂'ye indirgenmesini sağlayan bir dizi reaksiyona "trikarboksilik asit döngüsü", "sitrik asit döngüsü" veya "Krebs döngüsü" denir. Trikarboksilik asit döngüsünün yakıtı olan asetil CoA molekülü, glukozun yanı sıra yağ asitleri ve amino asitlerden de elde edilmektedir. Karbohidrat kökenli asetil CoA bu döngüye iki kez girmektedir, çünkü her glukoz iki piruvat molekülü üretmekte ve oksidatif dekarboksilasyon sürecinde iki asetil CoA molekülü oluşmaktadır (52).

2.1.2.3. Elektron Taşıma Zinciri ve Oksidatif Fosforilasyon

Oksidatif fosforilasyon, trikarboksilik asit döngüsünde meydana gelen NADH ve flavin adenin dinükleotidden (FADH₂) elde edilen elektronlarla mitokondride ATP sentezleyen bir dizi reaksiyondur. Elektronlar ardı ardına sitokrom zincirinden aktarılmakta ve her seferinde enerjilerinin bir kısmını serbest bırakmaktadır. Ardından protonlar aktif olarak membran boyunca kemiozmotik değişim ile mitokondriyal matrikse ATP sentaz yoluyla pompalanmak için kullanılmaktadır. Proton ve elektron vericisi NADH + H⁺ ve bir molekül H₂O olduğunda, elektron taşıma zincirinin sonucunda üç ATP molekülü; FADH₂ olduğunda, bu sürecin sonucunda bir H₂O ve iki ATP molekülü elde edilmektedir (53).

2.1.2.4. Glikojenez

Glikojenez, glukozun başta karaciğer ve kas hücrelerinde olmak üzere glikojen olarak depolanmasını sağlayan süreçtir. Glikojenez, yemek sonrası kan glukoz seviyeleri yüksek olduğunda meydana gelmektedir. Glikojenin çoğu, karaciğer hücrelerinde (70 kg'lık sağlıklı bir erkekte yaklaşık 90 g) ve kas hücrelerinde (70 kg'lık sağlıklı bir erkekte yaklaşık 350 g) depolanmaktadır. Her glikojenez olduğu durumda karaciğer ve kas hücrelerinde depolanmak üzere glikojen zincirlerine glukoz molekülleri eklenmektedir (54).

2.1.2.5. Glikojenoliz

Kan glukoz seviyeleri düştüğünde kaslarda ve karaciğerde depolanan glikojenin glukoz moleküllerine dönüştürülmesine glikojenoliz denir. Karaciğer, glikoliz sırasında glukoz-6-fosfatı tüketebilir, ayrıca glukoz-6-fosfataz enzimini kullanarak fosfat grubunu uzaklaştırabilir ve serbest glukozu kan dolaşımına bırakabilmektedir. Kas hücrelerinde glukoz-6-fosfataz enzimi bulunmadığından, glukoz-6-fosfat glukozla dönüştürülemez ve bu nedenle kas kasılması için enerji üretmek amacıyla glukoz-6-fosfat kullanılmaktadır (55).

2.1.2.6. Glukoneogenez

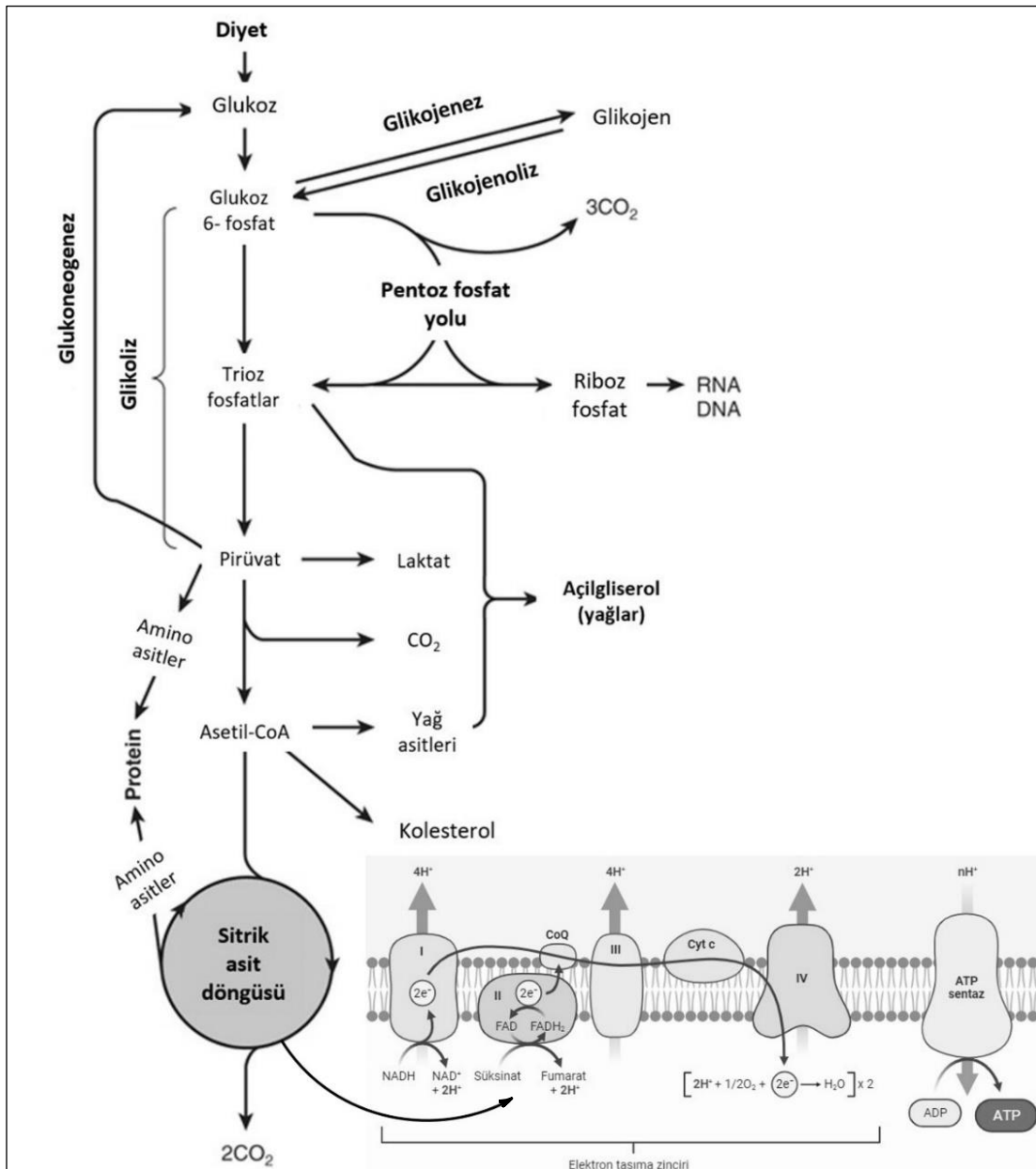
Gliserol, piruvat ve glikojenik amino asitler gibi karbohidrat olmayan öncüllerden glukoz üretilmesine glukoneogenez denir. Glukoneogenez temel olarak karaciğerde meydana gelmesine rağmen, metabolik asidoz veya açlık gibi metabolik stres koşulları altında böbrekte de glukoneogenez gerçekleşmektedir. Karaciğer glikojeni tükendiğinde, glukoneogenez yolu vücuda yeterli glukozu sağlamaya çalışmaktadır. Glukoneogenez için ana substratlar laktat (kas ve kırmızı kan hücrelerinde oluşur), amino asitler (kasta türetilir) ve gliseroldür (triasilgliserollerin degradasyonu ile üretilir). Anaerobik glikoliz sırasında piruvat laktata indirgenir, laktat kan dolaşımı ile karaciğere taşınır, karaciğerde laktat glukozla dönüştürülür ve daha sonra glukoz kaslar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere kana geri gönderilir (bu metabolik yolak Cori döngüsü olarak da adlandırılır, 56).

Glikolitik ara maddelere dönüştürülebilen tüm amino asitler arasında alaninin önemli bir rolü vardır. Kas, örneğin egzersiz sırasında büyük miktarlarda piruvat ürettiğinde, bu moleküllerin bazıları alanine dönüştürülür. Alanin karaciğere taşınır, yeniden piruvata ve ardından glukozla dönüştürülebilir (glukoz-alanin döngüsü). Glukoz-alanin döngüsü, kas ve karaciğer arasındaki α -keto asitlerin geri dönüşümünde rol oynayanın yanı sıra amino nitrojenin karaciğere taşınması için de önemli bir mekanizmadır (kas hücreleri, amino nitrojenden üre sentezleyememektedir, 57).

2.1.2.7. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolu temel olarak altı karbonlu glukozu beş karbonlu şekere ve indirgeyici güce dönüştüren sitoplazmik bir anabolik yoldur. Başlıca ürünleri, hücreler içindeki indirgeyici biyosentez reaksiyonları için $\text{NADPH} + \text{H}^+$, nükleotidlerin ve nükleik asitlerin sentezi için riboz-5-fosfattır. Pentoz fosfat yolu sitoplazmada meydana gelir ve

oksidatif ve oksidatif olmayan aşamalardan oluşan bir metabolik yoldur. Oksidatif aşamada, glukoz-6-fosfatın riboz-5-fosfata dönüştürülmesinden elde edilen enerji kullanılarak iki molekül NADP^+ ; $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a indirgenir. Bu metabolik yolağın oksidatif olmayan fazı, üretilen riboz-5-fosfatı, hem altı karbonlu (fruktoz-6-fosfat) hem de üç karbonlu (gliseraldehit-3-fosfat) şekerlere dönüştürür ve bunlar daha sonra glikoliz yolu tarafından kullanılabilir (58).



2.1.3. Glukoz Homeostazında Pankreasın Rolü

Glukoz metabolizması büyük ölçüde pankreasın Langerhans adacıkları tarafından salgılanan hormonlara bağlıdır. Organizma, açlık hipoglisemisi ve postprandiyal hiperglisemiyi önlemek için insülin ve glukagon denilen birbirine karşıt fonksiyon yerine getiren hormonları salgılayarak glukoz seviyelerini düzenlemektedir (60). Pankreasın Langerhans adacıklarında glukagon salgılayan alfa (α) hücreleri, insülin ve amilin salgılayan beta (β) hücreleri, somatostatin salgılayan delta (δ) hücreleri ve pankreatik polipeptid (PP) salgılayan PP hücreleri olmak üzere dört ana hücre tipi bulunmaktadır. Ayrıca, çok daha az miktarda, serotonin salgılayan enterokromafin hücreler, gastrin salgılayan G hücreleri ve grelin salgılayan grelin-pozitif hücreler de Langerhans adacıklarında yer almaktadır (61).

2.1.3.1. İnsülin

İnsülin, glukoz homeostazında son derece kritik rolü olan, pankreastaki β hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan ve organizmadaki birçok hücreyi etkileyen bir peptid hormondur. İnsülinin birincil işlevlerinden biri, glukozun hücelere alımını kolaylaştırmaktır. İnsülin, dolaşımdan glukoz alımını teşvik etmek için iskelet kası ve yağ dokusu dahil olmak üzere periferik dokulara etki etmektedir. İskelet kasında insülin, fosfatidil inozitol-3 kinaz (PI3K) / protein kinaz B ("*Ak-strain transforming*"- Akt) sinyal yolunu aktive ederek, hücre içi depolardan plazma membranına glukoz taşıyıcı 4 proteininin translokasyonuna yol açmakta ve glukoz alımının artmasını sağlamaktadır. Yağ dokusunda insülin, glukoz alımını ve depolanmak üzere trigliseritlere dönüşümünü uyarmaktadır. İnsülin ayrıca glukoz üretiminin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Karaciğerde insülin, glukoneogenezi inhibe etmekte ve glikojen sentezini teşvik ederek kan glukoz seviyelerinde düşüşe yol açar ve glikojenolizi baskılamaktadır. İnsülinin bu fonksiyonları, kan glukoz seviyelerini düşürmeye ve glukoz homeostazını korumaya yardımcı olmaktadır (62).

Adipositlerdeki mitokondriyal işlev bozukluğunun insülin duyarlılığını ve adiponektin salgılanmasını bozarak glukoz homeostazında bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir. Adipositlerin işlev bozukluğu, tip 2 diabetes mellitus gibi metabolik hastalıkların gelişimine sebep olabilmektedir (63).

Ayrıca insülin, insülin gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Glukoz uyarımı, insülin gen transkripsiyonunun artan regülasyonuna yol açarak insülin biyosentezinin artmasına neden olur. Glukoz uyarımına yanıt olarak salgılanan insülin,

insülin gen transkripsiyonunu ayrıca artırmaktadır. Bu pozitif geri besleme döngüsü, glukoz homeostazını korumak için yeterli insülin üretiminin sağlanmasına yardımcı olmaktadır (64).

2.1.3.2. Glukagon

Glukagon, insüline zıt düzenleyici bir hormon olarak hareket eder ve kan glukoz seviyelerini düşük olduğunda yükseltmek için pankreastaki α hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Glukagonun ana işlevlerinden biri, glikojenden glukoz-1-fosfat salınımını katalize eden glikojen fosforilaz enzimini aktive ederek glikojenolizi uyarmaktır. Bu glukoz-1-fosfat daha sonra glukoz-6-fosfata ve ardından kan dolaşımına salınan glukozla dönüştürülmektedir. Glukagon, glukoneogeneze yer alan kilit enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini artırmaktadır (65). Ayrıca, glukagon karaciğerdeki glukagon sinyal yollarının, düşük yoğunluklu lipoprotein ("*low-density lipoprotein*"-LDL) kolesterolün düzenlenmesinde rol oynayan bir protein olan proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9 seviyelerini etkilediği gösterilmiştir (66).

2.1.3.3. Somatostatin

Somatostatin pankreastaki δ hücreleri tarafından üretilmekte ve parakrin ve endokrin düzenleyici olarak görev yapmaktadır (67, 68). Somatostatinin glukoz homeostazındaki ana işlevlerinden biri, pankreatik beta hücrelerinden insülin salgılanmasını engellenmesidir (67, 69). Somatostatin, insülin salınımını baskılamak için somatostatin reseptörleri, özellikle somatostatin reseptörü-2 (SSTR2) aracılığıyla β hücrelerine etki etmektedir (70). Bu negatif geri besleme mekanizması, aşırı insülin salgılanmasını önlemeye ve kan glukoz seviyelerini normal bir aralıkta tutmaya yardımcı olmaktadır. Somatostatin, insülin üzerindeki inhibitör etkisine ek olarak, SSTR2 reseptörü aracılığıyla α hücrelerine etki ederek pankreatik α hücrelerinden glukagon salınımını da inhibe etmektedir (69).

Somatostatin, pankreas ekzokrin fonksiyonunu ve pankreas kan akışını düzenleyen bir hormon olan PP salgılanmasını (70), ayrıca gastrik asit salgılanmasında rol oynayan ve glukoz homeostazını etkileyen bir hormon olan gastrin salınımını da inhibe etmektedir (71). Somatostatinin izole hepatositlerde bazal glukoz üretimi (glukoneogenez veya glikojenez) üzerinde doğrudan bir etkisinin olmadığı ve *in vivo* olarak insülin ve glukagon seviyeleri korunduğunda bazal glukoz üretim hızını değiştirmedeği tespit edilmiştir (72).

2.1.3.4. Amilin

Adacık amiloid polipeptidi olarak da bilinen amilin; glukoz, arginin ve yağ asitleri de dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara yanıt olarak pankreas β hücrelerinden insülin ile birlikte salgılanmaktadır. Amilin, mide boşalmasını yavaşlatarak besin emilim oranını azaltmaya ve yemekten sonra kan glukoz seviyelerinde hızlı artışları önlemeye yardımcı olmaktadır (73). Ayrıca, amilinin pankreatik α hücrelerinden glukagon salgılanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (74).

Amilin, mide boşalması ve glukagon salgılanması üzerindeki etkilerine ek olarak, iştah ve enerji dengesini düzenlemede işlev görmektedir. Hipotalamusun arkuat çekirdeğinde, gıda alımı ve enerji harcamasının düzenlenmesinde rol oynayan bir başka hormon olan leptin ile sinerjistik etkileşime girmektedir. Amilin ve leptin arasındaki bu etkileşim, enerji homeostazını kontrol etmeye ve aşırı gıda alımının önlenmesini sağlamaktadır (75).

Amilinin fazla salgılanması, tip 2 diyabetin karakteristik bir özelliği olan adacık amiloidinin oluşmasına neden olabilmektedir. Bu amiloid birikimleri β hücre disfonksiyonuna ve bozulmuş insülin sekresyonuna sebep olarak glukoz homeostazını olumsuz etkilemektedir (76).

2.1.3.5. Pankreatik Polipeptid

Pankreatik polipeptidin pankreatik ekzokrin salgısını inhibe ettiği, gıda alımını azalttığı, mide boşalmasını geciktirdiği ve pankreatik hormon salgısını modüle ettiği gösterilmiştir. PP, sindirim enzimlerinin salgılanmasını azaltmak için pankreastaki asiner hücrelere etki etmekte ve böylece pankreatik enzimlerin gastrointestinal sisteme salınımını azaltmaktadır. Ekzokrin salgının bu şekilde engellenmesi, glukoz da dahil olmak üzere besinlerin sindiriminin ve emiliminin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Hipotalamus ve iştahın düzenlenmesinde rol oynayan beyin bölgelerine PP'nin etki ederek gıda alımını azalttığı; pankreatik adacık hücrelerinden insülin, glukagon ve somatostatin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. Açlık PP seviyelerinde azalma, akut pankreatit ve pankreas kanseri olan hastalarda bozulmuş glukoz regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Yağ, protein ve karbohidrat ile karışık bir öğüne PP yanıtının olmaması, bozulmuş glukoz homeostazının bir göstergesi olarak tanımlanmış ve PP'nin bozulmuş glukoz homeostazı için bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür (60).

2.1.4. Glukoz Homeostazında Karaciğerin Rolü

Karaciğer; glikojenez, glikojenoliz, glikoliz ve glikoneojenez yollarını kontrol ederek glukoz metabolizmasını düzenlemektedir. İnsülin ve glukagon başta olmak üzere hormonal sinyaller bu düzenlemede yaşamsal rol oynamaktadır. İnsülin, glikoneogenezi inhibe ederken karaciğerde glukoz alımını ve depolanmasını teşvik etmektedir. Glukagon ise karaciğerde glikojenoliz ve glikoneogenezi uyararak kan glukoz seviyelerini yükseltmektedir. Hepatositlerde Akt yolağının aktivasyonu glukoz alımını, glikojen sentezini ve protein sentezini teşvik ederken, glikoneogenez ve glikojenolizi inhibe etmektedir. Akt, glikojen sentezini düzenleyen glikojen sentaz kinaz-3 gibi glukoz metabolizmasında yer alan çeşitli hedef molekülleri fosforillemekte ve aktive etmektedir. Akt ayrıca hepatik glikoneogenezin düzenlenmesinde kilit rol oynayan transkripsiyon faktörünü inhibe ederek glikoneogenezin baskılanmasına yol açmaktadır (77).

Rapamisin'in memeli hedef proteini ("*mammalian target of rapamycin*"- mTOR) yolağı, Akt yolağının bir efektörüdür ve karaciğerdeki glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır: Hepatik lipogenez ve glikoneogenezi teşvik ederek glukoz üretiminin artmasına neden olmaktadır. Bu yolağın inhibisyonunun çeşitli deneysel modellerde glukoz homeostazı ve insülin duyarlılığını iyileştirdiği gösterilmiştir (78).

Metabolik enzimlerin post-translasyonel modifikasyonları ve allosterik kontrolü de karaciğerdeki glukoz metabolizmasının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (77). Örneğin, siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein H'nin asetilasyonu açlığa bağlı hepatik lipid metabolizmasını düzenlemekte ve bu da glukoz homeostazını etkilemektedir (79). Protein fosfataz-1 düzenleyici alt birimi hepatik glikojenezi düzenleyerek postprandiyal kan glukozu seviyelerinin regülasyonuna katkıda bulunmaktadır (80).

2.1.5. Glukoz Homeostazında Böbreklerin Rolü

Glukoz homeostazındaki en önemli süreçlerden biri böbreklerde glukoz geri emilimidir. Glukoz geri emilimi, proksimal kıvrımlı tübüllerde sodyum-glukoz kotransporterleri (SGLT'ler), özellikle de SGLT2 aracılığıyla gerçekleşmektedir. SGLT2, glukozun glomerüler filtrattan kan dolaşımına geri emilmesinden sorumludur. Bu süreç idrarda glukoz kaybını önlemeye yardımcı olur ve kan glukoz seviyelerinin korunmasına katkıda bulunmaktadır. Diyabette olduğu gibi renal glukoz geri emiliminin düzensizliği,

glukozüriye (idrarda glukoz) ve glukoz homeostazının bozulmasına neden olabilmektedir (81).

Diğer bir önemli mekanizma, böbreklerde glukoz üretimini ve bunun kan dolaşımına salınmasını içeren renal glukoneogenezdır. Böbreklerdeki glukoneogenez, uzun süreli açlık veya düşük karbohidrat alımı dönemlerinde kan glukoz seviyelerinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Renal glukoz alımının insülin tarafından uyarıldığı ve yemek sonrası glukoz homeostazına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (9).

Böbreklerde glukoz homeostazının düzenlenmesi adına önemli faktörlerden biri, peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör gama proteindir (PPAR γ). PPAR γ , böbreklerde lipid ve glukoz metabolizmasında rol oynayan bir nükleer hormon reseptörüdür, sistemik kan basıncının kontrolünde rol oynar ve renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde yer almaktadır. PPAR γ aktivasyonunun hiperglisemi kaynaklı epitelyal-mezenkimal geçişi tersine çevirdiği ve proksimal tübüler hücrelerde fonksiyonel glukoz taşınmasını geri kazandığı gösterilmiştir (82).

İnsülin sinyalleşme yolağının da renal glukoz homeostazının korunmasında çok önemli bir görev üstlenmektedir. GLUT2 ve Akt gibi glukoz metabolizmasında yer alan kilit proteinler bu süreç için önemlidir. GLUT2, glukozun glomerüler filtrattan kan dolaşımına geri emiliminden sorumludur. İnsülin sinyalleşmesinin bir hedefi olan Akt, glukoz alımının ve kullanımının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. (83).

Ayrıca, antibiyotik kaynaklı mikrobiyom tükenmesinin böbrek glukoz metabolizmasını değiştirdiği ve böbrek hasarını şiddetlendirdiği bulunmuştur. Bağırsaktaki bakteriyel kompozisyon, kan glukoz seviyelerini ve böbrek glukoz kullanımını etkileyebilmekte ve böbrek glukoneogenezinin bozulmasına neden olabilmektedir (84).

2.1.6. Glukoz Homeostazında Hipotalamus-Hipofiz Aksının Rolü

Hipotalamus-pankreas aksında, otonom sinirler doğrudan karaciğere giren ve karaciğer metabolizmasını etkileyen glukagon ve insülin salgılamaktadır. Hipotalamus-adrenal aksında, otonom sinirler adrenal medulladan katekolaminleri salgılamakta ve bunlar da karaciğer metabolizmasını etkilemektedir. Hipotalamustan gelen nöroendokrin yollardan oluşan hipotalamus-hipofiz aksı da farklı hormonlar salgılayan hipofiz bezine sinyaller göndermektedir. Bu aks mekanizmalarının karaciğer glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde yoğun olarak rol oynadığı düşünülmektedir (85).

Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı, hipotalamus, hipofiz bezi ve adrenal bez arasındaki karmaşık bir dizi homeostatik etkileşimi ifade etmektedir. Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksının çekirdeği hipotalamusun paraventriküler çekirdeğidir. Paraventriküler çekirdek, vazopressin ve kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) sentezleyen ve salgılayan nörokrin nöronları içermektedir. Bu iki peptid ön hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılanmasını uyarmaktadır. ACTH da periferik dolaşıma girerek adrenal kortekse ulaşır ve burada glikokortikoid hormon üretimini (kortizol) tetiklemektedir. Glikokortikoidler, sırasıyla CRH ve ACTH üretimini baskılamak için hipotalamus ve hipofizin paraventriküler çekirdeği üzerinde negatif bir geri bildirim uygulamaktadır. Glikokortikoidlerin *in vivo* aktivasyonu glikojen sentazın aktivasyonuna ve fosforilazın inaktivasyonuna neden olarak glikojen sentezine yol açmaktadır (86). Glikokortikoidler yağ dokusunda lipolize ve iskelet kasında proteolize yol açarak bu dokular tarafından glukoz alımını inhibe etmekte ve yağ dokusundan gliserol ve kastan amino asit salınımına neden olmaktadır. Buna karşılık, gliserol ve amino asitler karaciğerde glukoz üretmek için substrat olarak kullanılmaktadır. Glikokortikoidler hepatik glukoneogenezi uyarır ve insülinin karaciğer ve kastaki etkilerini antagonize eder, böylece glukoz seviyelerini artırma eğilimi göstermektedir. GLUT4 ekspresyonu iskelet kası ve yağ dokusunda glikokortikoidler tarafından artırılmaktadır. Artan lipoliz, glikokortikoid kaynaklı insülin direncinde önemli olabilmektedir. Glikokortikoidler pankreatik β -hücrelerinden insülin salgılanmasını inhibe etmektedir (87, 88).

Tiroid bezinin fonksiyonunun sürdürülmesi hipotalamus-hipofiz-tiroid aksın aktivitesi ile kontrol edilir. Hipotalamustan, biyosentezi uyaran tiotropin salgılatıcı hormonu (TRH, "*thyrotropin-releasing hormone*") salgılanmakta ve TRH de ön hipofizden tiotropin salınımını sağlamaktadır. Tiotropin; tiroksin (T4) ve triiyodotironini (T3) dolaşıma salan tiroid bezini uyarmaktadır. Tiroid hormonu glukoz homeostazının önemli bir belirleyicisidir (89, 90). T3 hormonu glukoz metabolizmasının (glukoz ve lipidlerin oksidasyonu, glukoz depolanması, glikoliz ve kolesterol sentezi) gen ifadesini düzenlemektedir (91). T3 hormonu, sıçan iskelet kasında bazal glukoz ve insülin aracılı glukoz alımını doğrudan uyarmaktadır. Bu indüksiyonun öncelikle GLUT4 protein ekspresyonundaki bir artıştan kaynaklandığı gösterilmiştir (92).

İnsan büyüme hormonu karbohidrat ve lipid metabolizmasının temel bir düzenleyicisidir. Karaciğerde dolaylı olarak glukoz üretimini artırır. Kana salınan gliserol,

karaciğerde glukoneogenez için bir substrat görevi görmektedir. Büyüme hormonu insülinin etkisini antagonize eder; hepatik glukoneogenezi ve glikojenolizi artırarak açlık hepatik glukoz çıkışını artırır ve glikojen sentezi ve glukoz oksidasyonunun inhibisyonu yoluyla periferik glukoz kullanımını azaltmaktadır (93).

Östrojen uygulaması sıçanlarda pankreastan proinsülin biyosentezini artırmaktadır. Hamilelik sırasında östrojen reseptörü, insülin gen ekspresyonunu düzenlemek için östrojen, glukoz ve kandaki diğer besinlerden gelen bilgileri entegre etmekte ve bu nedenle insülin ve glukoz homeostazının korunmasına katkıda bulunmaktadır (94). Östrojen, kan-beyin bariyeri endotelinde glukoz taşıyıcılarının ekspresyonunu ve glukoz taşınmasını artırmaktadır. Androjenler, insülin duyarlılığı ile ilişkili olan vücut kompozisyonunu etkileyebilmektedir. Testosteron, iskelet kasında glukoz metabolizmasıyla ilişkili sinyal yolunu aktive etmektedir. Kadınlarda testosteron, subkutan adipositlerde seçici insülin direncine neden olmaktadır (95).

2.2. Hiperglisemi Tanımı

Hiperglisemi, Yunanca “hyper” (yüksek), “glykys” (şeker) ve “haima” (kan) kelimelerinden oluşmaktadır ve omurgalı organizmaların dolaşım sistemlerinde bulunan kanın veya organizma(lar)dan elde edilen hücrelerin bulunduğu ortamın glukoz konsantrasyonunun normal değerlerinden yüksek olması şeklinde tanımlanmaktadır (96). Hiperglisemi tanımı geçtiğimiz yüzyılla gelişmeye devam etmektedir ve canlı türü, yaş ve diğer faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterdiği için kantitatif açıdan tek bir sınır değer ve tanım belirtilmesi olanaksızdır. Bununla birlikte, insanda sekiz saatlik açlık sonrası kan glukoz düzeyinin 100 mg/dL altında olması, normal; 100-125 mg/dL olması prediyabet, 126 mg/dL ve üzeri kan glukoz değerleri (hiperglisemi için referans değer) diyabet olarak kabul edilmektedir (4). İnsanlar için bu referans değerleri, hipergliseminin retinopati komplikasyonunu önleme adına belirlenmiştir (97). Kemirgenlerde ise 250 mg/dL üzerindeki kan glukozu değerleri, hiperglisemi için eşik değer olarak kabul edilmektedir (98).

Bir canlı organizmada kronik hiperglisemi gelişip tedavi edilmediğinde; göz, böbrekler, sinirler, kalp ve damar sisteminde hasar gibi yaşamı tehdit eden birçok ciddi komplikasyona yol açabilmektedir. Bu nedenle, olası komplikasyonlarını önlemek için hiperglisemiye etkili ve verimli bir şekilde yönetmek hayati önem taşımaktadır (4).

2.2.1. Kronik ve Akut Hiperglisemi

Kronik hiperglisemi, uzun bir süre boyunca sürekli olarak yüksek kan glukozu seviyeleri ile karakterize bir durumdur. İnsanda kronik hiperglisemi oluşması için belirtilen sürenin kan dolaşımında bulunan glikozile-hemoglobin miktarının yaklaşık yarılanma ömrü (ortalama 90 gün) kadar süre olduğuna dair yayınlar mevcuttur (99). Bu süre içinde kemirgenlerde açlık kan glukoz düzeylerinin ortalamasının 250 mg/dL'nin üzerinde seyir göstermesi, kemirgenler için kronik hiperglisemi olarak kabul edilmektedir; ancak bu sınır değerleri, canlının türü, yaş ve diğer faktörlerle değişiklik gösterebileceği dikkate alınmalıdır (100, 101).

Akut hiperglisemi, aniden ortaya çıkan ve dakikalar veya saatler içinde meydana gelen yüksek kan glukoz seviyeleri ile karakterize bir durumdur (99, 102). Akut hiperglisemi, serbest radikal aracılı oksidatif hasara ve endotel disfonksiyonuna yol açabilen oksidatif stresin artışı ile ilişkilendirilmiştir (103). Ayrıca, akut hipergliseminin sistemik enflamatuvar yolakları aktive ettiği tespit edilmiştir (104). İnme hastalarında akut hipergliseminin, beyin iskemisinin neden olduğu nöronal hasarı artırdığı saptanmıştır (105, 106). Akut hipergliseminin doku hasarına yol açmada, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişiminde kronik hipergliseminin etkisine katkıda bulunabileceği birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Akut hiperglisemi, kronik hiperglisemi ile aynı metabolik ve hemodinamik yolları aktive edebilmektedir. Özellikle, hiperglisemi ile doku hasarına aracılık eden yolakların aktivasyonu arasındaki bağlantı olarak, mitokondri kökenli reaktif oksijen türlerinin (ROT) artması öne sürülmüştür (99).

2.2.2. Kronik Hiperglisemi ile Seyreden Hastalıklar

Kronik hiperglisemi, diyabet hastalık grubu başta olmak üzere birçok hastalığın başlıca etyopatogenezinde rol almaktadır. Diyabet hastalık grubu, vücudun insülin hormonunu etkili bir şekilde kullanamaması veya üretememesi nedeniyle veya her iki durumun da birlikte yaşandığı, ortalama kan glukozu seviyelerinin yüksek olmasıyla karakterize kronik bir tıbbi durumdur. Üç ana diyabet türü bulunmaktadır: *Tip 1 diyabet*; bağışıklık sisteminin, insülin üreten β hücrelerini hasara uğrattığı otoimmün bir durumdur. Tip 1 diyabetli kişilerin kan glukozu seviyelerini düzenlemek için ömür boyu insülin tedavisine gereksinimleri bulunmaktadır. *Tip 2 diyabet*; diyabetin en yaygın şeklidir ve tipik olarak vücut hücrelerinde insülin reseptör sayısının azalmasından kaynaklı insülin direnci ile karakterizedir. Tip 2 diyabet durumunda, zamanla pankreas daha az insülin

üretebilmektedir. Tip 2 diyabet genellikle yaşam tarzı değişiklikleri, ağızdan alınan ilaçlar ve bazen de insülin veya diğer enjekte edilebilir ilaçlarla yönetilebilmektedir. *Gestasyonel diyabet*: Bu diyabet türü hamilelik sırasında meydana gelmektedir ve genellikle geçici bir tıbbi durumdur. Hamilelik sırasında hormonal değişiklikler insülin direncine yol açtığından gestasyonel diyabet ortaya çıkmaktadır. Gestasyonel diyabet, genellikle geçici bir durum olsa da hem annenin hem de bebeğin sağlığını korumak için, uzman bir hekim tarafından kanıta dayalı bilgi ile dikkatli bir izlem ve yönetim gerektirmektedir (4).

Bu diyabet türleri ile birlikte kronik hiperglisemi ile seyreden başka hastalıklar da bulunmaktadır, ancak kronik hiperglisemi durumunun zamanla insülin üretimini, salgılanmasını ve vücut hücrelerinde insülin reseptör modülasyonunu olumsuz etkilemesinden (ve böylelikle diyabete dönüşmesinden) dolayı; bu hastalıklar da Amerikan Diyabet Cemiyeti (*American Diabetes Association*) tarafından, diyabet hastalık grubu kapsamı altında “Diğer nedenlere bağlı spesifik tipler” başlığında incelenmiştir (4). Bu tez çalışmasının başlığında “diyabetik nöropati” yerine “hiperglisemik nöropati” belirtilmiş olmasının nedeni, kronik hipergliseminin *in vitro* olarak modellendiği bu çalışmanın, kronik hiperglisemi ile seyreden bütün hastalıklarda meydana gelebilecek olan nörotoksisiteye yönelik bulguların sunulmuş olmasıdır. Ayrıca, diyabet gelişmeden (insülin metabolizması bozulmadan) önce kronik hipergliseminin mikrovasküler komplikasyonlarının gelişmeye başlaması, “hiperglisemik nöropati” kelime öbeğinin tercih edilmesinin diğer nedenidir (107).

Kronik hiperglisemi ile seyreden hastalıkların kapsamlı bir listesi Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1. Kronik hiperglisemi ile seyreden hastalıkların listesi (4)

Tip 1 diabetes mellitus
Otoimmün
İdiyopatik
Tip 2 diabetes mellitus
Gestasyonel diabetes mellitus
Diğer nedenlere bağlı spesifik tipler
β -hücre fonksiyonunun genetik kusurları
Gençlerin yaşlı tipi diyabeti tip 1-6, 9, 10
Mitokondriyal DNA hasarı
İnsülin etkisinde genetik kusurlar
Tip A insülin direnci
Rabson-Mendenhall sendromu
Leprikonizm
Lipoatrofik diyabet
Ekzokrin pankreas bozuklukları
Pankreatit
Pankreas neoplazmı
Pankreatik cerrahi
Hemokromatozis
Kistik fibröz
Endokrinopatiler
Akromegali
Glukagonoma
Cushing sendromu
Somatostatinoma
Feokromositoma
Hipertiroidizm
İlaç kaynaklı
Glikokortikoidler
Kontrol noktası inhibitörü immünoterapisi
Nikotinik asit
Pentamidin
Kalsinörin inhibitörleri
α -interferon
Diazoksit
β -adrenerjik agonistler
Tiyazidler
Fenitoin
Organ nakli sonrası
Enfeksiyonlar
Sitomegalovirüs
Konjenital kızamıkçık
Bağımsızlık aracılı, diyabetin yaygın olmayan biçimleri
Anti-insülin reseptör antikör varlığı
"Stiff-man" sendromu
Kronik hiperglisemi (ve de diyabet) ile seyredabilen diğer genetik sendromlar
Down sendromu
Klinefelter sendromu
Porfiriya kutanea tarda
Friedreich ataksisi
Wolfram sendromu
Huntington koresi
Prader-Willi sendromu
Turner sendromu
Laurence-Moon-Biedl sendromu
Miyotonik distrofi

2.2.3. Kronik Hipergliseminin Komplikasyonları

Kronik hiperglisemi, ilerleyen süreçte morbidite ve mortalite riskini artıracak düzeyde, vasküler yapılarda olumsuz komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu komplikasyonlar, başlıca mikrovasküler ve makrovasküler olarak iki grupta değerlendirilmektedir. Makrovasküler komplikasyonlar, aterosklerozda görülen komplikasyonların aynısı olup, kronik hiperglisemi ile daha da hızlı gelişebilmektedir. Mikrovasküler komplikasyonlar ise, kronik hiperglisemiye (ve zamanla gelişen diyabete) özgü olup, sinir sistemi, retina ve böbrekler gibi doku ve organ hasarı ile karakterizedir (4).

2.2.3.1. Makrovasküler Komplikasyonlar

Kronik hipergliseminin makrovasküler komplikasyonları, temel olarak ateroskleroza ikincil olarak meydana gelir, çünkü kronik hiperglisemi başlı başına ateroskleroz için bir risk faktörüdür (108). Tip 2 diyabet hastalarında makrovasküler komplikasyonlar ölümlerin en sık nedenidir ve bu komplikasyonların yaklaşık %60'ı koroner kalp hastalığıdır (109). Kronik hiperglisemi ve diyabet; sıklıkla dislipidemi ve hipertansiyon ile birlikte seyir göstermesine rağmen, ateroskleroz için de başlıca bir risk faktörü oluşturmaktadır. Kronik hiperglisemik ortam; LDL artışı, okside veya glikozile LDL artışı, trombosit agregasyonu artışı, hiperviskozite, endotel hücre fonksiyon bozukluğu, fibrinoliz, fibrinojen ve pıhtılaşma faktörlerinin artışı gibi ateroskleroz etyopatogenezinin zemin hazırlamaktadır (108). Özellikle insülin direncinin bulunduğu tip 2 diyabet için, hiperinsülinemi, düz kas hücre çoğalmasını uyararak makrovasküler komplikasyon meydana gelmesine neden olmaktadır (109). Ateroskleroz, büyük vasküler yapıları (kalp, beyin ve alt ekstremitelerdeki arterlerini) tutarak; sıklıkla miyokard infarktüsü, bacak ve ayak kangrenleri ve serebrovasküler hastalığa neden olabilmektedir (108).

Kronik hipergliseminin meydana getirdiği makrovasküler komplikasyonlar diyabetik kalp hastalığı, periferik arter hastalığı ve serebrovasküler hastalık olmak üzere üç ana patoloji olarak meydana gelmektedir. Diyabetik kalp hastalığı; koroner arter hastalığı, diyabetik kardiyomiyopati ve kardiyak otonom nöropati olarak üç ayrı patolojiden oluşmaktadır (109).

Koroner arter hastalığı, kalbin özellikle distal arterlerinde (ancak bütün damarların tutulumu gözlenebildiği) arteriyoskleroz ile gelişen, zamanla miyokardda infarktüs ve kalp yetmezliği ile sonuçlanan bir hastalıktır. Bu durum, kan glukozunun hücrelere dağıtımını da

ayrıca bozarak, diyabetik komalara (ketoasidoz veya hiperglisemik non-ketotik) sebep olabilmektedir. Bir kısırdöngü oluşturarak, diyabetik ketoasidoz da miyokard enfarktüsünü tetikleyebilmektedir (108).

Diyabetik kardiyomiyopati, kalp kapak hastalığı, hipertansif veya konjenital kalp hastalığı olmaksızın kronik hiperglisemin meydana getirdiği ve genellikle ani olarak belirti veren kalp yetmezliğidir. Diyabetik kardiyomiyopatide zamanla kardiyomegali, miyokard fibrozu, miyokardda kapiller bazal membran kalınlaşması ve kapiller mikroanevrizmalar gelişebilmektedir. Diyabetik kardiyomiyopati geliştiğinde, ekokardiyografik olarak diyastol fonksiyon bozukluğu saptanabilmektedir (108).

Kardiyak otonom nöropati, ani kardiyak ölümlerin sıklıkla nedeni olup kardiyak fonksiyon bozukluklarına yol açan, diyabetin hem makrovasküler hem de mikrovasküler bir komplikasyonudur (109).

Periferik arter hastalığı; kronik hipergliseminin sonucu olarak gelişen türünde çok daha erken başlangıçlı ve agresif bir seyir göstermektedir, çoğunlukla kangren oluşumu ile karakterizedir ve el ve ayak gibi uç ekstremitelerden itibaren amputasyon(lar)ı gerektirebilmektedir (109).

Serebrovasküler hastalık; beyindeki büyük damarlarda ateroskleroz nedeniyle trombus (pıhtı) oluşarak ilgili beyin bölgesine yeterli kan akımının sağlanamamasıdır. Kronik hipergliseminin meydana getirdiği hiperkoagülabilité, trombus oluşumunu tetiklediğinden serebrovasküler hastalık gelişme riskini de artırmaktadır. Diyabetik hastaların yaklaşık %20-40'ı serebrovasküler hastalıklardan kaybedilmektedir (110).

2.2.3.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar

Kronik hiperglisemiye maruziyet sonucu böbrekte (renal glomerüler kılcal damarlar), retinada ve sinirlerde (vasa nervosum) bulunan ince damar yapılarının hasar görmesinden kaynaklanan (sırasıyla) nefropati, retinopati ve nöropati olarak tanımlanan komplikasyonlar, mikrovasküler komplikasyonlar olarak sınıflandırılmıştır (111).

Diyabetik nefropati; diabetes mellitusun yaygın bir komplikasyonudur ve glomerüler mezangial genişleme, podosit kaybı, tubulointerstisyel hasar ve fibrozis ile karakterizedir (112, 113). Janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) yoluyla, diyabetik nefropatinin patogenezinde kilit süreçler olan enflamasyon, fibrozis ve

oksidatif stresin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (112). Hiperglisemi kaynaklı oksidatif stresin diyabetik nefropati gelişiminde önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (114).

Diyabetik retinopati; kronik hipergliseminin neden olduğu, gözün retinasındaki kan damarlarında meydana gelen hasarı tanımlamaktadır. Retinal arteriyoler dilatasyon, diyabetik mikrovasküler disfonksiyonun spesifik bir işareti ve diyabetik retinopatinin prelinik bir belirteci olarak tanımlanmıştır. Retinal arteriyollerin genişlemesinin diyabetik retinopati insidansını artırdığı ve ilerlemesini öngördüğü gösterilmiştir (115). Diyabetik retinopatinin patogenezinde retinal mitokondri fonksiyonlarının hasarlandığı ve süperoksit radikallerinin üretiminin arttığı ortaya konulmuştur (116). Nükleer ve mitokondriyal transkripsiyon faktörleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilen mitokondriyal biyogenez de diyabetik retinopatide etkilenmektedir (117). Bir antioksidan enzim olan mangan süperoksit dismutazın (SOD) aşırı ekspresyonunun mitokondriyal disfonksiyonu ve diyabetik retinopati gelişimini önlediği gösterilmiştir (116). Mitokondriyal SOD'nin retinal hücre ölümündeki koruyucu rolü, gelecekteki müdahaleler için potansiyel bir moleküler hedef olduğunu göstermektedir (118). Retinal damarlanmanın fraktal analizi de diyabetik retinopati ile ilişkilendirilmiştir. Retinal damarlanmanın görüntülenmesi ve glisemi, lipidler, kan basıncı ve vücut ağırlığı ölçümleriyle ilgili biyobelirteçler, diyabetik retinopatinin taranması ve teşhisi için klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır (119).

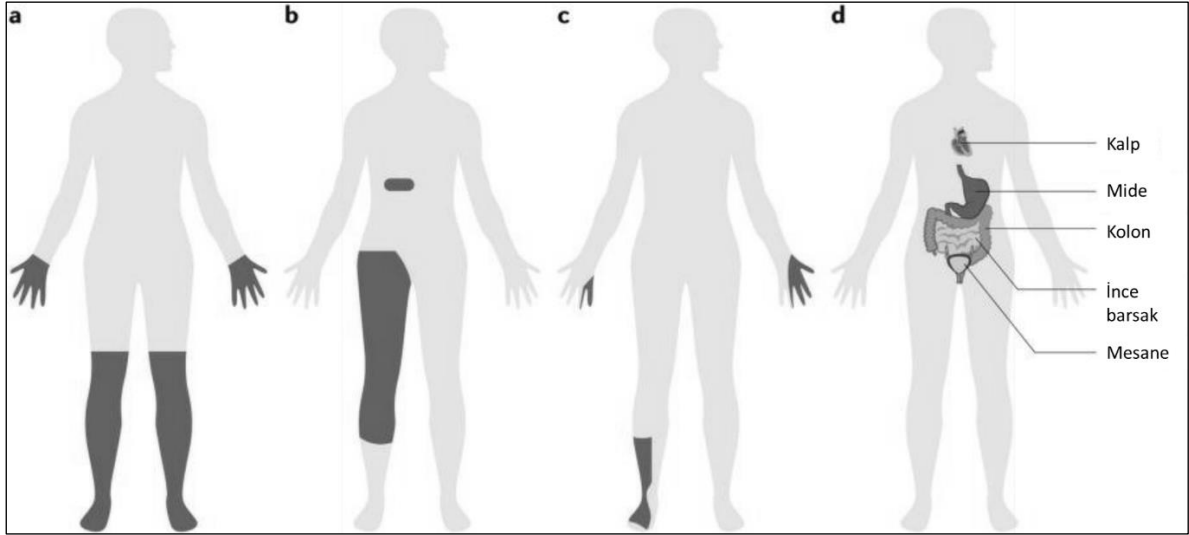
2.3. Diyabetik Nöropati

Nöropati, glisemik kontrol olmadığında kronik bir süreçte gelişen en yaygın diyabetik komplikasyonlardan biridir ve diyabetik nöropatinin patogenezi henüz tamamen anlaşılamamıştır (13). Hiperglisemi, hipertansiyon, hiperlipidemi, yüksek beden-kitle indeksi, sigara kullanımı ve diyabetli bireylerin hastalık yaşı; diyabetik nöropatinin gelişmesindeki en önemli risk faktörleri olarak değerlendirilmektedir (14). Diyabetli erişkin bireylerin yaklaşık yarısında bir dereceye kadar nöropati gelişmekte (120), nöropati bulguları olmaksızın sinir ileti anormallikleri de hesaba katıldığında bu oran %100'e ulaşmaktadır (15, 16). Diyabetik nöropati çeşitli klinik bulgularla ortaya çıkabilmektedir, bunlardan en yaygın ve hasar verici olanı distal simetrik duyuşal polinöropatidir (17, 18). Diyabetik nöropatili hastalarda ciddi ağrılar, duyu kaybı, hipo-/hiper-estezi, ayak ülserleri, enfeksiyon, yara iyileşmesinde gecikmeler, Charcot nöroatrofisi (kemik, eklem ve yumuşak dokuyu etkileyen progresif ve deforme edici bir hastalık) ve kangren meydana gelebilmekte; birçok vakada nihai komplikasyon alt ekstremitte amputasyonu olabilmektedir

(19). Alt ekstremite amputasyonu, diyabetli bireylerde diyabeti olmayan kişilere kıyasla on-yirmi kat fazladır (20) ve tahmini olarak küresel ölçekte her otuz saniyede bir, alt ekstremitenin bir parçası diyabetin komplikasyonu nedeniyle amputé edilmektedir (21).

2.3.1. Diyabetik Nöropatinin Klinik Görünümleri, Sınıflaması ve Genel Terapötik Yaklaşım Modaliteleri

Diyabetik nöropati, diyabetli kişilerde görülen en yaygın nöropatik sendromdur. Toronto Diyabetik Nöropati Konsensüs Paneli, diyabetik nöropatiyi 'kronik hiperglisemiye maruz kalma ve kardiyovasküler risk ortak değişkenlerinin bir sonucu olarak metabolik ve mikrovasküler değişikliklerine atfedilebilen simetrik, uzunluğa bağlı sensorimotor polinöropati' olarak tanımlamıştır. Sıklıkla subklinik olan sinir iletim testlerindeki bir anormallik, durumun ilk objektif nicel göstergesi olarak kabul edilmektedir (18). Daha az yaygın nöropatik sendromlar arasında kraniyal mononöropatiler ve proksimal motor nöropati gibi fokal nöropatiler yer almaktadır. Diyabetik nöropati ayak parmaklarında başlar ve yavaş yavaş proksimale doğru ilerlemektedir. Alt uzuvlarda iyice yerleştikten sonra, tipik 'eldiven ve çorap' dağılım modelini izleyen duyu kaybıyla birlikte üst uzuvları da etkilemektedir (121). Diyabette görülen diğer yaygın nöropatiler; kardiyak otonom nöropati, gastrointestinal dismotilite, diyabetik sistopati ve impotans gibi otonom nöropatileri içermektedir (Şekil 4). Fokal nöropatiler, daha az yaygın olmakla birlikte, izole mononöropatilere yol açan bireysel periferik sinirlerin işlev bozukluğunu veya daha az yaygın olarak radikülopati veya poliradikülopatileri ifade etmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Diyabetik nöropatide sinir hasarı paternleri. Nöropati paternlerine örnek olarak **(a)** diyabetik sensörimotor polinöropati, küçük lif baskın nöropati veya tedaviye bağlı nöropati; **(b)** radikülopleksopati; **(c)** mononöropati ve **(d)** otonom nöropati (şekilde en sık etkilenen organlar gösterilmiştir) veya tedaviye bağlı nöropati verilebilir. (Peltier ve ark.nın makalesinden esinlenerek hazırlanmıştır, 122).

Diyabetik nöropatiler heterojen bir klinik sendrom grubunu kapsamaktadır. Tipik olarak, bu sendromlar nörolojik tutulum şekillerine göre kategorize edilmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Diyabetik nöropatilerin sınıflandırılması (123)

A.Generalize simetrik polinöropatiler	
1.	Diyabetik sensörimotor polinöropati
a.	Miks sensörimotor nöropati
b.	Küçük-lif ağırlıklı nöropatiler
c.	Büyük-lif ağırlıklı nöropatiler
d.	Saf küçük-lif nöropatileri
2.	Akut ağrılı-distal sensörimotor polinöropatiler
a.	Tedaviye bağlı nöropati
b.	Hiperglisemiye bağlı nöropati
3.	Otonomik nöropati
a.	Gastrointestinal otonom nöropati
b.	Kardiyovasküler otonom nöropati
c.	Südomotor disfonksiyon
d.	Ürogenital nöropatiler
4.	Pupiller disfonksiyon
5.	Metabolik (hipoglisemik) nöropati
B.Fokal veya multifokal nöropatiler	
1.	Mononöropati
a.	Kraniyal siniri etkileyen mononöropatiler (ör. fasiyal sinir felci)
b.	Periferik sinirleri etkileyen mononöropatiler (ör. peroneal sinir felci)
2.	Mononöritis mülipleks
3.	Radikülo-pleksus nöropatisi
a.	Radikülopati
i.	Toraksik radikülopati
ii.	Torako-abdominal radikülopati
iii.	Abdominal radikülopati
b.	Radikülo-pleksopati
i.	Servikal radikülo-pleksopati
ii.	Lumbosakral radikülo-pleksopati
4.	Tuzak nöropatileri (ör. karpal tünel sendromu, ulnar nöropati)

Diyabetik nöropatinin erken evrelerinde önemli motor yetersizliklere yaygın olarak rastlanmamaktadır. Diyabetik nöropatili birey, tipik olarak ilk evrelerde kas güçsüzlüğünden şikâyet etmez; semptomlar mevcut olduğunda, bunlar nöropatinin doğası gereği duysal olma eğilimindedir. Semptomatik kas güçsüzlüğü hastalığın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkabilmektedir. Yanma, karıncalanma ('iğnelenme' veya parestezi), ateş basması (elektrik çarpması gibi) veya batma (bıçak saplanması) gibi ağrılı semptomlar diyabetik nöropatili bireylerin yaklaşık üçte birinde ve tüm diyabetik bireylerin yaklaşık %20'sinde mevcuttur (121). Bu semptomlara genellikle uyku kalitesini düşürecek derecede geceleri daha sıklıkla karşılaşılmaktadır. Gün içindeki ağrılı semptomlarla birlikte, bu durum genellikle bireyin günlük aktivitelerini gerçekleştirme becerisinde azalmaya yol açmaktadır (124). Kronik

olarak devam eden ağırlı diyabetik nöropatiler yaşam kalitesini son derece zorlayabilmekte ve anksiyete ile birlikte derin depresyonla ilişkili olabilmektedir (125). Daha da önemlisi, semptomlar sinir hasarının ciddiyetinin güvenilir bir göstergesi olmayabilir: Şiddetli ağırlı semptomları olan bazı nöropatili bireylerde çok az duyuşsal eksiklik bulunurken, ağırlı semptomları olmayan diğler hastaların ayakları tamamen uyuşmuş olabilmektedir (ve bu bireyler ayak ülseri açısından son derece yüksek risk altındadır). Duyarsızlık veya ağırlı kaybı, ayak ülserine ve bir dizi ciddi yaralanmaya yol açabilmektedir. Elllerinde his kaybı olan bireyler ısıyı algılayamazlar ve örneğın yemek pişirirken ya da ütü yaparken sık sık kendilerini yakabilirler ve ayrıca küçük nesneleri tutmakta zorluk çekebilirler. Ayaklarında his kaybı olanlar; sıklıkla enfekte olabilen ve/veya ülserleşebilen ve amputasyona yol açabilen delinme yaraları, sürtünme yaraları ve yanıklara maruz kalabilirler. Bununla birlikte, uygun ayak bakımı ile ülserasyonların önemli bir kısmı önlenabilmektedir (126).

Diyabetik nöropatinin yönetimine yönelik mevcut yaklaşımlar; yaşam tarzı değışikliklerini, özellikle diyet ve egzersiz ile birlikte optimal lipid kontrolünü, kan basıncı kontrolünü ve iyi glisemik kontrolü içermektedir. Alfa lipoik asit, benfotiyamin, mühür yağı omega-3 çoklu-doymamış yağ asidi takviyesi, aldoz redüktaz inhibitörleri gibi diyabetik nöropatinin patogenezeine yönelik çeşitli tedaviler geliştirilmiştir (127). Ağırlı diyabetik nöropatide ise antikonvülsanlar, serotonin ve nöradrenalin geri-alım inhibitörleri ve trisiklik antidepresanlar etkisi kanıtlanmış tedavi modaliteleridir (123). Ağırlı tedavisinde opioid analjeziklerin oldukça yüksek bir etkinliğı olmasına rağmen güncel tedavi rehberlerinde opioid kullanımı, diyabetik nöropatide çok gerekmedikçe terapötik modalite olarak önerilmemektedir (127).

2.4. Nosisepsiyon Tanımı

Nosisepsiyon, kaçınma davranışını tetikleyen aşırı sıcaklık, mekanik stimülasyon gibi zararlı veya potansiyel olarak hasar verebilen uyanların merkezi ve periferik sinir sistemi tarafından kodlanması ve işlenmesi ile ilgili sinirsel süreç olarak tanımlanmaktadır. Ağırlı, bu yolların aktivasyonu sonucunda hissedilen öznel bir deneyimdir. Ancak bu algı, aksiyon potansiyeli frekansına, her bir aksiyon potansiyeli arasındaki zaman aralığına ve üst düzey beyin merkezlerinden gelen girdilere bağılıdır. Ağırlı genellikle vücut tarafından bir şeylerin ters gittiğini gösteren bir sinyal olarak kullanılır, ancak sinirlerin yanlış ateşlenmesi veya hasar görmesinden de kaynaklanabilmektedir (128).

Nosiseptif bilginin iletilmesinden sorumlu reseptörler nosiseptör olarak adlandırılır. Bunlar deride, eklemlerde, iç organlarda ve kaslarda bulunabilmektedir. Reseptörler çeşitli nöropeptidlerin yanı sıra aşırı sıcaklık, yüksek basınç ve enflamasyona neden olan doku hasarı ile de aktive olmaktadır (129–131).

Ağrı algısı, sinir uçlarında kılıfsız olan ancak bunun dışında Schwann hücreleri ile çevrili olan birincil nöronun dalları olan serbest sinir uçları ile başlamaktadır. Çok sayıda farklı reseptör, DKG’de (ekstremitelerden ve vücut gövdesinden gelen uyarı) ve trigeminal gangliyonda (yüzden gelen uyarı) bulunan nöronal hücre gövdelerinde birleşen bilgileri iletmektedir (132–134). Nosiseptif lifler, fiziksel özelliklerine ve ilettikleri potansiyel duyuşal uyarılara göre dört farklı alt tipe ayrılır:

A α lifleri: Proprioepsiyonda işlev görmektedir, termal duyarlılık yoktur, miyelinlidir, 13 ila 20 μ m çapındadır, iletim hızları 80 ila 120 m/s’dir, uzuvların, kasların ve eklem kapsüllerinin konumuna ilişkin bilgi taşımaktadır (135).

A β lifleri: Mekanoresepsiyonda işlev görmektedir (1 ila 1,5 mN kuvvet eşiğı), termal duyarlılığı yoktur, miyelinlidir, 6 ila 12 μ m çapındadır, iletim hızları 35 ila 90 m/s’dir, deriden dokunma ve basınç bilgisini taşımaktadır (136).

A δ lifleri: Nosisepsiyonda işlev görmektedir (5 mN kuvvet eşiğı), termal olarak duyarlıdır, miyelinlidir, 1 ila 5 μ m çapındadır, iletim hızları 5 ila 40 m/s’dir, alternatif olarak deriden sıcak, soğuk ve mekanotermal bilgiyi; termal duyarlılığı olmayan bazı sinir lifleri bunun yerine deriden dokunma ile ilgili bilgiyi taşımaktadır (136).

C lifleri: nosisepsiyonda işlev görmektedir, termal olarak duyarlıdır, miyelinsizdir, 0,02 ila 1,5 μ m çapındadır, iletim hızları 0,5 ila 2 m/s’dir, mekanik, termal ve/veya kimyasal nosisepsiyona ilişkin polimodal bilgileri taşımaktadır (137).

Kısaca, tüm A lifleri miyelinlidir ve tüm C lifleri miyelinsizdir; A lifleri C liflerine kıyasla daha hızlı iletim hızlarına ve daha büyük çaplı aksonlara sahiptir, ancak A liflerinden sadece A δ lifleri nosisepsiyonda rol oynamaktadır. Daha büyük ve daha hızlı mekanotermal A δ lifleri, zararlı bir uyarı ile karşılaşıldığında ilk olarak aktive olur, "ilk" veya hızlı ağrı olarak bilinen duyuyu sağlarlar (138, 139).

2.4.1. Diyabetik Nöropatinin *in vitro* Bir Modeli Olarak “Dorsal Kök Gangliyonu” Dokusunun İncelenmesi

Duyusal nöronlar sıcaklık, dokunma, kas uzunluğu, organ hacmi veya vücuda gerçek veya potansiyel zarar gibi çeşitli içsel ve çevresel ipuçları hakkında bilgi aktarmaktadır. Duyusal nöronların hücre gövdeleri öncelikle DKG’lerde veya trigeminal gangliyonlarda bulunur (140). Son otuz yılda, DKG nöronların elektrokimyasal, hücresel ve moleküler özelliklerinin anlaşılmasında, öncelikle hayvan çalışmalarından kaynaklanan önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu çalışmalar büyük ölçüde kronik ve/veya nöropatik ağrının gelişimi ve patofizyolojisinin altında yatan mekanizmaları anlamaya odaklanmıştır (141-144).

DKG’leri sadece primer duyusal nöronların hücre gövdelerini değil, aynı zamanda nöronal hücre gövdeleri etrafında bir tabaka oluşturan uydu hücreler olarak adlandırılan, belirli bir glia formuna benzer çeşitli diğer hücre tiplerini de içermektedir (145). Nöronlar ve uydu hücreleri işlevsel olarak yakın bir ilişki içindedir (146). Nöronlar ve uydu hücrelerine ek olarak DKG; küçük kan damarları, dolayısıyla endotel ve düz kas hücreleri içermektedir ve duyusal nöronların yoğun enerji ve dolayısıyla oksijen ihtiyacını karşılamak için kan sağlamaktadır. Bir metre kadar uzun aksonal yapılarda, proteinlerin onlarca milimetre boyunca devam eden sentezi ve taşınması, normal nöronal fonksiyon için kritik öneme sahiptir. Kan damarları DKG içinde geniş bir arteriyol ve kılcal damar ağı oluşturmaktadır (147). DKG'deki duyusal nöron birikimleri ve kan damarları arasındaki arayüz benzersizdir. DKG'deki kılcal damarlar fenestralıdır, kan-beyin bariyerinin yokluğunda, kanla taşınan birçok molekül doğrudan DKG'ye girebilir ve nöronal ve nöronal olmayan hücrelerle etkileşime girebilmektedir (148). Nöronal olmayan hedef hücreler, DKG içinde bulunan ve esas olarak makrofajlar ve T hücrelerinden ve daha az sayıda B hücrelerinden oluşan bir grup bağışıklık hücrelerini içermektedir (149).

İnsan DKG'si kolajen bağ dokusundan oluşan kalın bir dura mater tabakası içeren meninkslerle kaplıdır. Floresan ve ışık mikroskobu, insan DKG nöronlarının genellikle yüksek oranda otofloresan madde birikimleri veya kahverengimsi madde birikimleri içerdiğini göstermektedir. Bu, lipidler, yanlış katlanmış proteinler ve şeker moleküllerinin bir karışımından oluşan lipofusin pigmentidir (150). İnsan DKG nöronları, melanin birikimlerinin eşlik ettiği yaşa bağlı lipofusin inklüzyonları göstermektedir. İnsan DKG nöronlarının çekirdekleri normalde hücre gövdesine göre göreceli büyüklükte bir nükleolus

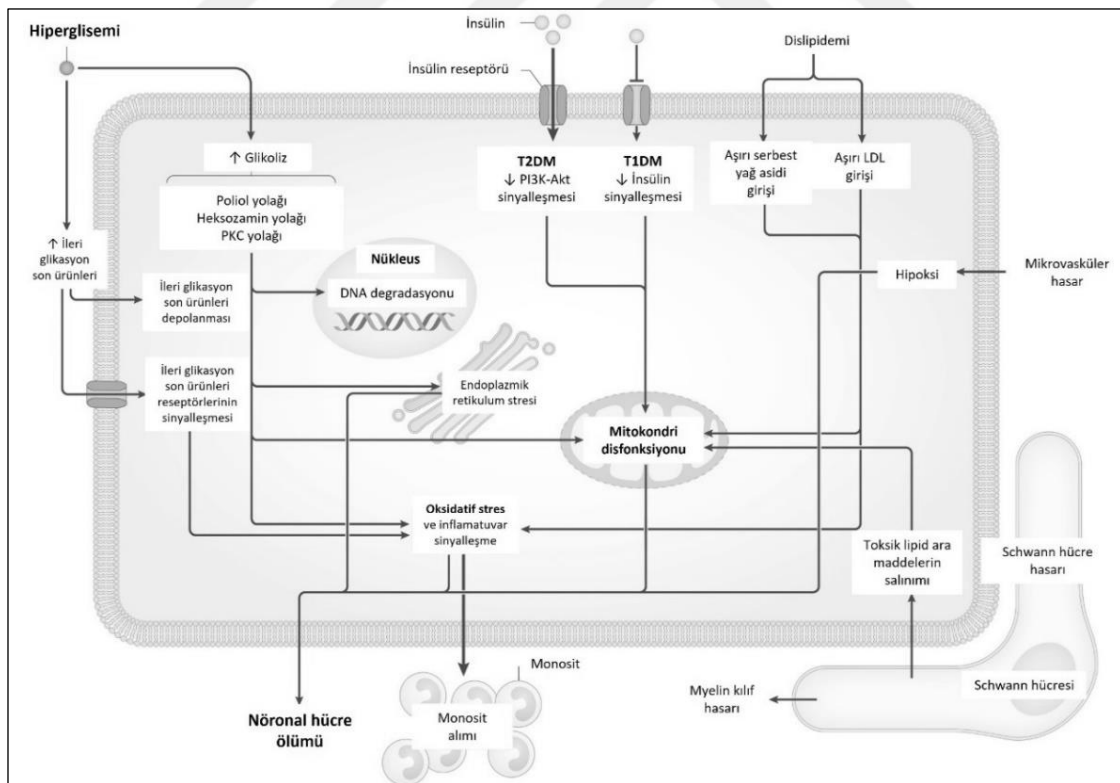
içerir ve Cajal cisimciklerine sahiptir (151). West ve ark.nın bir çalışmasında C5 seviyesindeki DKG'de yaklaşık 60 000, C7 seviyesinde DKG'de ise yaklaşık 100 000 nöron bulunduğu tespit edilmiştir (152).

Kültürlenmiş, ayrıştırılmış insan DKG nöronlarının çapı 28 ila 56 µm arasında değişmektedir (153). DKG'deki nöronlar, hücre gövdesinden bir başlangıç segmenti aracılığıyla çıkan T şeklinde psödoünipolar bir yapıya sahiptir. İnsan DKG'si karakteristik olarak voltajla aktive olan sodyum kanallarını, voltaj-kapılı kalsiyum kanallarını, kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarını, pürinerjik reseptörleri, geçici reseptör potansiyel-katyon kanallarını "*transient receptor potential cation channel*" içeren iyon kanallarına sahiptir (154, 155). Ayrıca DKG nöronlarından salınan nöromediatörler nosisepsiyon sürecinin gerçekleştirilmesini sağlar: kalsitonin gen ilişkili peptid, P maddesi, galanin, somatostatin, endotelin-1, anjiotensin gibi nöropeptidler; sinir büyüme faktörü, glial kökenli nörotrofik faktör, beyin kökenli nörotrofik faktör gibi nörotrofinler; izolektin-B4; nitrik oksit sentaz; gama amino bütirik asit ve fosfolipaz B3, DKG nöronların merkezi ve periferik sonlanmalarında transmitterlerle birlikte salınan nöromodülatörlerdir (155).

Dorsal kök gangliyon nöronları, periferik nöropati araştırmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır (156). Nörotoksisite ile nöropati arasında mekanizma olarak ilinti vardır ve nörotoksisite analizi nöropati için model olarak kabul edilmektedir: Diyabete bağlı periferik nöropatinin tam mekanizması bilinmemekle birlikte, DKG duyusal nöronlarda gelişen nörotoksisitenin klinik nöropati mekanizmasına çok benzediği (periferden gövdeye doğru doz bağımlı bir nörotoksisite geliştiği) gösterilmiştir (157, 158). DKG duyusal nöronlar, kan-beyin veya kan-sinir bariyeri tarafından korunmaması (159), metabolik aktivitesi ve kan perfüzyonunun da yüksek olması (160), buna rağmen mikro-çevrelerinde oksijen perfüzyon basıncının düşük olması (161) gibi nedenlerle; diyabete bağlı mikro-anjiopati ve sonuçta nöropati gelişimine duyarlıdır. Bu nedenle, DKG nöronlarında diyabete bağlı nörotoksisite analizleri (periferik sinir uzantılarının değerlendirilmesi ile birlikte) nöropati için bir model olarak kabul edilmektedir. Bütün yönleriyle ideal bir model olamasa da DKG nöron hücre kültürlerinde nörotoksisite analizleri diyabete bağlı periferik nörotoksisite/nöropati araştırmaları için uygun bir *in vitro* deneysel model olarak kabul edilmekte ve bu konudaki temel bilim araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (156, 157, 162).

2.5. Diyabetik Nöropati Patofizyolojisi

Diyabetik nöropati, duysal ve otonomik aksonları hedef alan, daha sonra motor aksonları etkileyen ve giderek duyu kaybına yol açan periferik sinir sisteminin nörodejeneratif bir hastalığıdır (25). Hiperglisemi, duysal nöronun perikaryonundan akson terminaline kadar tüm nöronu etkilemektedir (163). Hiperglisemi, çeşitli metabolik yolların bozulmasına veya hiperaktivasyonuna yol açmaktadır: Son 30 yılda, diyabetik duysal nöropati alanındaki araştırmalar, DKG nöronların ve Schwann hücrelerinin metabolik ve/veya redoks durumuyla ilgili yollara odaklanmıştır. Diyabetik duysal nöropati patogenezinde rol oynayan metabolik sinyal kaskadları; poliol, heksozamin ve protein kinaz C (PKC) yollarının aktivasyonu, sinirde ileri glükasyon son ürünlerinin birikmesi ve aşırı glukoz ve/veya yağ asidi akışının gerçekleşmesidir. Her bir yolak tek başına sinir yapılarına zarar verebilirken, toplu olarak mitokondriyal redoks durumunda bir dengesizliğe (ve mitokondri disfonksiyonuna) neden olmakta ve (mitokondriyal ve sitozolik) ROT'nin aşırı oluşumuna yol açmaktadır (Şekil 5) (164).



Şekil 5. Diyabetik nöropati patogenezi özetidir (LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein, PKC: Protein kinaz C, PI3K-Akt: Fosfatidil inozitol 3 kinaz / Protein kinaz B yolağı, T1DM: Tip 1 diabetes mellitus, T2DM: Tip 2 diabetes mellitus, (Sloan ve ark.nın makalesinden esinlenilerek hazırlanmıştır, 123).

Poliol yolağı: Diyabetik nöropatinin altında yattığı düşünölen ve üzerinde en çok çalışılan yolaktır (164). Aldoz redöktaz ve sorbitol dehidrogenaz olmak üzere iki enzim, poliol yolağı aracılığıyla glukoz metabolizmasında kilit rol oynamaktadır. Aldoz redöktaz, NADPH yardımıyla glukozu sorbitole dönöştürmekte ve sorbitol dehidrogenaz, NAD⁺ kullanarak sorbitölü fruktoza okside etmektedir. Sonuç olarak, glukozun düşük bir yüzdesi bu yolla metabolize edilmektedir (165). Bununla birlikte, hiperglisemik bir durumda hücre içi glukoz konsantrasyonu arttığında, azalmış NADPH ile birlikte enzimatik indirgeme işlemi yoluyla daha fazla glukoz sorbitole dönöştürölmektedir (166). Hücre içi sorbitol konsantrasyonundaki bir artış ozmotik strese neden olur, diğör elektrolitlerin hücre dışına akışını kolaylaştırır ve sonuç olarak periferik nöronların Schwann hücreleri etkilenir, çünkü Schwann hücrelerinde bol miktarda sorbitol bulunmaktadır. Poliöl yolağının diyabetik nöropatinin Schwannopati (Schwann hücre hasarı) ile ilişkili fenotipine katkıda bulunabileceğı gösterilmiştir (167). Ayrıca, sorbitol ve fruktoz birikimi miyoinositol ve taurin konsantrasyonunun azalmasına, Na⁺/K⁺-ATPaz pompasının inhibisyonuna, hücre içi Na⁺ birikimine, akson-glia disfonksiyonuna ve sinir iletim hızının azalmasına neden olur (168). NADPH, indirgenmiş glutatyon (GSH) üretimi için önemli bir bileşendir, çünkü NADPH sorbitölün fruktoza indirgenmesi için bir faktördür, bu nedenle GSH konsantrasyonu önemli ölçüde azalmaktadır. GSH'nin bu azalan regölasyonu endotelyal sinir hasarına ve ardından nitrik oksit aracılı vazodilatasyon kaybına neden olmaktadır. Poliöl yolağı ve GSH arasında bir korelasyon, transgenik farelerin lenslerinden elde edilmiştir; burada aldoz redöktaz seviyelerinin artmasıyla GSH içeriğinde azalma gözlenmiştir. Hiperglisemiden bağımsız bir transgenik fare modelinde, dokuda poliöl birikimine bağılı olarak motor sinir ileti hızı ve sinir lifi atrofisinde gecikme tespit edilmiştir (169). Yagihashi ve ark. diyabet oluşturulan transgenik farelerin periferik sinirlerindeki fruktoz ve sorbitol seviyelerinde diyabetik olmayan transgenik farelere kıyasla bir artış olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, diyabetik transgenik farelerde, diyabetik olmayan transgenik farelere kıyasla tibiyl motor sinir ileti hızında ciddi bir düşüş gözlenmiştir (170). Schwann hücrelerinde aldoz redöktazı aşırı ifade eden diyabetli transgenik fareler periferik sinir ileti hızında daha çok azalma göstermiştir (171).

Heksozamin yolağı: Hiperglisemi, birçok metabolik yolun anormal aktivasyonuna yol açan çeşitli diyabetik komplikasyonlardan sorumludur. Bunlardan biri olan heksozamin yolağı, diyabetik nöropatinin patogeneğinde yer almaktadır (172). Glukoz, poliöl yolunda sorbitol

ve fruktoza dönüştürüldükten sonra, kalan glukoz glukoz-6-fosfata ve daha sonra fruktoz-6-fosfata dönüştürülür, böylece heksozamin yoluna girer (173). Heksozamin yolunda, glutamin-fruktoz-6-fosfat transaminaz-1 enzimi fruktoz-6-fosfatı glukozamin-6-fosfata dönüştürür ve nihai son ürün üridin difosfat N-asetil glukozamin (UDP-GlcNAc) olmaktadır (174). Ayrıca, glukozamin-fruktoz aminotransferaz ve UDP-GlcNAc aktivitelerinin ob/ob farelerin kaslarında önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, kronik kalori kısıtlamasına tabi tutulan sıçanların kaslarında insüline karşı duyarlılıkta bir iyileşme ile çakışan daha düşük bir UDPGlcNAc konsantrasyonu bulunmuştur (175). Klinik çalışmalarda, insülin direnci olan bireylerden alınan kas biyopsileri yüksek glukozamin-fruktoz aminotransferaz aktivitesi göstermiştir. İnsülin direnci ve kontrolsüz hiperglisemisi olan obez hastalar, insülin tedavisi ile önemli ölçüde iyileşme gösterirken, kaslarındaki UDPGlcNAc seviyelerinde %40'lık bir artış göstermiştir (176).

Protein Kinaz C (PKC) volağı: PKC, lipidle aktive olan serin-treonin kinaz enzim ailesidir (177). PKC'lerin diyabetik nöropatinin başlaması ve ilerlemesinde çok önemli rolleri bulunmaktadır. Kronik hiperglisemi, glikolizin bir ara ürünü olan ve fosfatidik aside dönüştürülen gliseraldehit 3-fosfat üretimini artırarak diaçilgliserol (DAG) birikimine neden olmaktadır. Hiperglisemi sadece PKC ve DAG seviyelerini artırmakla kalmaz, aynı zamanda aldoz redüktaz aktivitesini ve *de novo* DAG sentezini de artırır (178). Sürekli aktive olan PKC, insülin direncine aracılık ederek, sodyum/potasyum adenozin trifosfataz (Na^+/K^+ -ATPaz) kanalı işlevini bozarak, vasküler endotelial büyüme faktörü ve transforme edici büyüme faktörü- β “*transforming growth factor- β* ” ekspresyonunu dalgalandırarak birçok metabolik hasara neden olmakta ve bu da vazokonstriksiyon, hipoksi ve nöronal hasara sebep olmaktadır (179).

İleri glikasyon son ürünlerinin artışı: İleri glikasyon son ürünleri hem diyabetik patofizyolojide hem de diyabetik komplikasyonlarda önemli bir rol oynamaktadır. Bu geri dönüşümsüz glikasyon ürünleri, glukozun proteinler üzerindeki amino gruplarıyla reaksiyona girerek Amadori ürünlerini oluşturduğu ve sonuçta ileri glikasyon son ürünleri üretildiği Maillard reaksiyonu ile oluşmaktadır. Bu ürünler, ileri glikasyon son ürün reseptörleri olarak bilinen hücre yüzeyi reseptörleri ile bağlanabilir ve bu da zararlı bir nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) aracılı aşağı akış sinyal kaskadını başlatır. İleri glikasyon son ürün reseptörlerinin aktivasyonu kemirgen modellerinde vazokonstriksiyon, enflamasyon ve nörotrofik destek kaybıyla sonuçlanırken (180), diyabetik nöropati ve tip 2

diyabet hastalarının periferik sinirlerinde daha yüksek seviyelerde ileri glikasyon son ürünleri varlığı bildirilmiştir (181). Periferik sinirlerin endotelyal ve Schwann hücrelerinde ileri glikasyon son ürün reseptörleri varlığı ve diyabetik durumda yükseldiği gösterilmiştir (182). İleri glikasyon son ürünleri ve reseptörlerinin etkileşimi NF- κ B'nin regülasyonunu artırır ve böylece enflamasyon ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücrel süreçler düzenlenmektedir (183, 184). Diyabetik nöropatisi olan bireylerde yapılan çalışmalar, ileri glikasyon son ürün reseptörlerinin NF- κ B'nin ekspresyonunu artırdığını göstermiştir (185). Nöronal ileri glikasyon son ürün reseptörlerinin aktivasyonu NADPH oksidaz aktivitesi yoluyla oksidatif stresi indüklemektedir (186). Sekido ve ark., ileri glikasyon son ürünlerinin sıçanlarda Schwann hücrelerinde apoptoz indüksiyonundan sorumlu olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada, indüklenen ileri glikasyon son ürünlerinin diyabetik sıçanlarda hücre canlılığı ve replikasyonunun azalmasından, mitokondriyal membran potansiyelinin düşmesinden, NF- κ B'nin yukarı regülasyonundan ve enflamatuvar sitokinlerin yükselmesinden de sorumlu olduğu gösterilmiştir (187).

Poliadenozin difosfat-riboz polimeraz (PARP) yolağı: PARP, normal koşullarda DNA onarımı ve apoptoz ile ilişkilidir. Bununla birlikte, PARP'ın aşırı ekspresyonu diyabet ile ilişkili çeşitli patolojik durumlarda doku hasarına yol açmaktadır (165). PARP, streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik sıçanların, ob/ob ve yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerin periferik sinirlerinde ve spinal gangliyonlarında bulunmaktadır (188, 189). Diyabet kaynaklı hiperglisemi, tek sarmallı DNA kırılmalarını başlatan ve PARP'ın hızlı aktivasyonunu düzenleyen reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Yüksek glukoz ve esterleşmemiş yağ asitleri PARP'ı aktive ederek diyabetik farelerde nöroilemma, retinal perisitler ve renal podositlerde oksidatif stresi tetiklemektedir (190).

2.6. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücrel metabolizma sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretilmesiyle oluşan reaktif ürünlerin detoksifiye edilememesinden kaynaklanan yükseltgen/oksidatif bir dengesizlik olarak tanımlanabilir (191). Biyolojik oksidasyon sonucu oluşan serbest radikallerin artması; hücre içi proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya, lipidlerle çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonuna bağlı membran hasarına, nükleik asit/baz modifikasyonlarına, kromozom değişikliklerine (DNA tek iplik ve çift iplik kırılmaları, DNA ve protein çapraz bağları), hücre ölümüne ve polisakkarit

depolimerizasyonu ve karbonhidrat dejenerasyonu gibi hücresel yapı ve bileşenlerde oksidatif strese neden olmaktadır (192–194).

Antioksidanlar, serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmayı koruyan, hasarı azaltan veya onaran sistemdir. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan ROT artışının neden olduğu mekanizmaların diyabet, kanser, metabolik sendrom, ateroskleroz, sıtma, Alzheimer hastalığı, romatoid artrit, nörodejeneratif hastalıklar ve pre-eklampsi gibi birçok hastalığa neden olduğu bilinmektedir (195–198).

2.6.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Birçok kimyasal ve biyolojik sürecin ayrılmaz bir parçası olan serbest radikaller, atomik yörüngelerinde kararsız ve reaktif eşleşmemiş değerlik elektronları bulunan atomlar, atom grupları veya moleküllerdir (199). Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olmaları, onlara elektron alıp verme özgürlüğü vermektedir. Böylece reaksiyona girme kabiliyetleri radikal olmayan bileşiklere göre çok daha yüksektir (200). Tüm bunların yanı sıra serbest radikal konsantrasyonu düşük veya orta seviyelerde tutulduğunda konak savunma sistemi tarafından patojenlerle savaşıma, düz kas hücre çoğalmasını önleme, sistemik dolaşımı düzenleme, sinyal iletim süreçlerinde düzenleyici araçlar olarak görev yapma gibi roller üstlenerek organizma için fayda sağlamaktadır. Bu durumda oksijen paradoksu ile karşı karşıya kalan aerobik hücreler, metabolizmadaki serbest radikal seviyesini fizyolojik konsantrasyonlarda tutabilmek için homeostatik düzenlemeye ihtiyaç duymaktadır (201, 202).

Serbest radikaller; ROT ve reaktif nitrojen türlerinden (RNT) oluşur. Biyolojik sistemlerdeki en önemli radikaller oksijenden türetilenlerdir (193). ROT, moleküler oksijenden oluşan eşleşmemiş elektronlara sahip molekülleri tanımlamaktadır. Temel durumdaki oksijen, enerji veya elektron transferi ile daha reaktif formlara dönüştürülebilir. Aerobik metabolizmada oksijenin suya indirgenmesi sırasında elektron transferi ile gerçekleşen bir dizi reaksiyon sonucunda reaktif moleküller veya partiküller oluşur. Oksijenden türeyen ROT olarak süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-) ve prooksidan olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) örnek gösterilebilir. O_2^- ve OH^- "radikal", H_2O_2 ise "radikal olmayan" türler olarak tanımlanmaktadır (192).

Tekli oksijen ($1O_2$), dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulundurmadığı için radikal olmayan reaktif bir oksijen molekülüdür. Oksijenin enerjik uyarılmasıyla oluştuğu

için spin kısıtlaması yoktur ve çok yüksek reaktiviteye sahiptir. Tekli oksijen mevcut enerjisini diğer moleküllere aktarabilir ve DNA, RNA, proteinler, lipidler ve sterollerle reaksiyona girebilir. Ayrıca peroksi radikalini ($\text{ROO}^\cdot$) oluşturabilir ve lipid peroksidasyonunu başlatabilir (203). Üçlü oksijenin bir elektronla indirgenmesiyle oluşan süperoksit radikali hücrede güçlü bir indirgeyici olduğundan, moleküler düzeyde ikincil olarak ürettiği radikaller önemlidir. Süperoksit radikali, mitokondriyal solunum sırasında kompleks I'den III'e geçerken bir elektronun O_2 atomuna aktarılmasıyla oluşur. Mitokondride kullanılan oksijenin %2'si süperoksitde dönüşürken, mitokondride oksijenin indirgenmesiyle oluşan birincil ürün sudur (204).

Süperoksit radikali ($\text{O}_2^\cdot$), oksijene bir elektron aktarılmasıyla oluşmaktadır. Süperoksit radikali nitrik oksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit molekülünü ($\text{ONOO}^\cdot$) oluşturur ve bu da $\text{OH}^\cdot$ radikali, nitrojen dioksit (NO_2), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilmektedir (205).

Oksijenin iki elektronla indirgenmesi hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin ana üretimi, süperoksit dismutasyonu ve iki süperoksit molekülünün iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşmesi ile gerçekleşmektedir (192).

Reaktif oksijen türleri iki ana kaynaktan ortaya çıkmaktadır: mitokondriyal oksidatif metabolizma ve ROT'nin sinyal iletim yollarının veya hücrel savunma mekanizmasının bir parçası olarak oluştuğu ksenobiyotiklere, bakterilere ve sitokinlere karşı hücrel yanıt süreçleri (206). Süperoksit radikali, mitokondriyal solunum zincirinin kompleks I ve III tarafından oluşturulan ilk ROT olarak kabul edilir. Süperoksit radikali SOD tarafından hidrojen peroksit ve ardından katalaz veya glutatyon peroksidaz (GPX) tarafından su ve oksijene ayrıştırılmaktadır. Ayrıca NADPH oksidazlar, başka bir hücrel ROT kaynağıdır (207).

2.6.2. Antioksidan Sistemler

İnsan vücudundaki oksijenin yaklaşık %4-5'i biyolojik indirgeyiciler tarafından ROT'ye dönüştürülür. Daha yüksek kısmi oksijen basıncı altındaki hücreler sürekli olarak ROT'nin saldırısına maruz kalır ve bu durum sofistike bir antioksidan savunma sisteminin uyumlu eylemiyle dengelenir. Antioksidan sistemler, enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. En önemli antioksidan enzimler; SOD, GPX, katalazdır.

En önemli düşük moleköl ağırlıklı enzimatik olmayan antioksidanlar ise C vitamini, E vitamini, karotenoidler, GSH ve flavonoidlerdir (207).

2.6.3. Enzimatik Antioksidan Sistem

Antioksidan enzimler, ROT ve/veya yan ürünlerinin daha kararlı, genellikle daha az zararlı türlere dönüşümünü katalize eden bir protein/metaloprotein sınıfıdır. Antioksidan enzimler, tüm hücrel bileşenlere zarar veren ROT kaynaklı oksidatif strese karşı önemli bir savunma mekanizmasını temsil etmektedir (208). SOD, GPX ve katalaz gibi bazı enzimler ROT'ye karşı karşılıklı olarak destekleyici bir savunma eyleminde bulunmaktadır (207).

2.6.3.1. Süperoksit Dismutaz

Canlı organizmalar, serbest radikallerin ve reaktif türlerin temizlenmesi için bir sistem geliştirmiştir. SOD, süperoksit radikalının uzaklaştırılmasını gerçekleştirir. Diğer bir adımda, üretilen hidrojen peroksit, GPX ve katalaz sistemi tarafından ortadan kaldırılmaktadır. SOD'nin çeşitli izoenzimleri serbest radikalleri temizleme aktivitesine katılmaktadır. İlk izoenzim mitokondride bulunur ve manganez bağımlı iken, diğer izoenzim sitoplazmada bulunur ve bakıra ve çinkoya bağımlıdır (207).

2.6.3.2. Katalaz

Katalaz sadece peroksizomlarda bulunmaktadır. Katalazın saflaştırılmış formu, her biri aktif bölgesine bağlı bir hem (Fe III-protoporfirin) grubuna sahip olan dört protein alt birimi içermektedir (209).

Mitomisin C ile DNA bölünmesi ve X-ışını, katalaz enzimi tarafından baskılandığı tespit edilen malign dönüşümü indüklemiştir. Bazı çalışmalara göre, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve stres gibi faktörler çeşitli endojen antioksidanların aktivitesinden sorumludur (210). Stres koşulları altında BDNF eksikliği olan fareler, stres altındaki vahşi tipe kıyasla katalaz enziminin aktivitesinde artış göstermiştir. Bu, serbest radikalleri temizleme kapasitesinin azaldığını göstermektedir ve normal/vahşi tipin BDNF heterojen farelerden daha iyi tolerans kabiliyetine sahip olduğunu belirtmektedir (211).

2.6.3.3. Glutasyon Sistemleri

Glutasyon sistemi; glutasyon redüktaz, GSH, GPX ve glutasyon-S-transferazı içermektedir. GPX, organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksitlerin parçalanmasını

katalize eden, kofaktör olarak dört birim selenyum içeren bir enzimdir. Glutatyon S-transferaz lipid peroksitlerle daha fazla aktivite gösterir. Bu enzimler karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmakta ve detoksifikasyon metabolizmasına da katkıda bulunmaktadır (210).

GSH, vücuttaki antioksidan savunma süreçlerini koordine eden protein olmayan bir tiyoldür. GSH durumundaki değişikliklerin çeşitli komplikasyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Metiyonin, sistein ve glutatyon gibi tiyol bileşiklerinin uygulanmasının hayvanlarda ve insanlarda oksidatif strese karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Tiyollerin indirgenmiş formu, C vitamini ve E vitamini gibi diğer antioksidanların geri dönüşümü için kullanılmaktadır (212).

2.6.3.4. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz

Oksidatif strese karşı koruma büyük ölçüde NADPH'nin indirgeyici gücüne bağlıdır ve bunun seviyesi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) yardımıyla değerlendirilir. Hayvan hücreleri NADPH üretebilen birkaç enzim içerir ve bunlar arasında G6PD en önemlisidir (213). G6PD katalizi, pentoz fosfat yolunun hız sınırlayıcı basamağıdır ve DNA replikasyonu için nükleotid öncüllerinin yanı sıra ROT'nin detoksifikasyonu ve lipidin *de novo* sentezi için NADPH'ye indirgeyici güç sağlamaktadır (214). Pentoz fosfat yolu ve G6PD'nin ROT detoksifikasyonundaki ilişkisi, G6PD eksikliği olan farelerin beyinde daha yüksek oksidatif hasar seviyelerine sahip olmasıyla belirlenir. Hücreler de pentoz fosfat yoluna yönelik NADPH üretimini artırarak oksidatif strese karşı tepki vermektedir (215).

2.6.4. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistem

Enzimatik antioksidanlar, oksitlenmiş metabolik ürünleri çok aşamalı bir mekanizma ile etkili bir şekilde hidrojen peroksit ve suya dönüştürmekte iken, enzimatik olmayan antioksidanlar radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanların bazıları suda çözünür ve sitozol veya sitoplazmik matrikste çalışır. Lipidlerde çözünebilen bir diğer antioksidan grubu ise membranlarda faaliyet gösterir. Non-enzimatik antioksidanların en temsili örnekleri C, E ve A vitaminleri, yaklaşık yarısı flavonoid olan polifenoller, karotenoidler, glutatyon, kurkumin, melatonin ve diğerlerini içermektedir (216).

2.6.4.1. C Vitamini

Ürik asit, sistein, glutatyon ve C vitamini oksijen radikallerinin hidrofilik temizleyicisi olarak çalışır (210). C vitamini (askorbik asit), biyolojik sistemdeki reaktif türlerin güçlü bir temizleyicisi ve indirgeyicisidir. Antioksidanların ilk savunma hattında yer alıp, proteinleri ve lipid membranı oksidan hasardan korumaktadır (217).

2.6.4.2. E Vitamini

E Vitamini (alfa-tokoferol), insanlarda zincir kırma sürecine dahil olan önemli bir antioksidan olarak kabul edilir. E vitamini, lipid peroksidasyonunu önlemek için hücre zarında bulunur ve reaktif oksijen ara ürünlerine bağlı olan hücre sinyal yollarının modülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca $\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$ ve 1O_2 dahil olmak üzere ROT'yi doğrudan temizleyebilirler (218). Ayrıca E vitamini anti-tümörojenik olarak güçlü bir rol oynamaktadır. Yağ peroksil radikallerine hidrojen atomu bağışlayarak ve lipid peroksidasyon sürecini bozarak işlev görmektedir. Alfa-tokoferol yeni serbest radikal oluşumunu kısıtlarken, gama-tokoferol mevcut reaktif türleri nötralize etmektedir. Böylelikle E vitamini, serbest reaktif moleküllerle ilişkili kronik rahatsızlıkları geciktirmeye veya önlemeye yardımcı olmaktadır (219).

2.6.4.3. Karotenoidler

Likopen ve β -karoten gibi karotenoidler, tekli oksijeni temizleyerek ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek, β -karoten peroksit radikallerinin oluşumunu önleyerek, hücreyi oksidatif stresten koruyarak antioksidan görevi görmektedir (220).

2.6.4.4. Selenyum

Selenyum, karsinogenez sürecini azaltma potansiyeli nedeniyle odak noktası haline gelmiş doğal bir elementtir. Selenyumun C vitamini ile ilgili antioksidan aktivitesi geniş çapta incelenmiştir (221). Selenyum eksikliği, lipidlerin peroksidasyonunu artıran ve serbest radikallerin oluşumuna yol açan hücrel ve doku hasarı ile sonuçlanır. Peroksidasyon reaksiyonu ile subselüler membrandaki doymamış yağ asitlerinde meydana gelen hasar Se ve E vitamini ile azaltılabilir (222). Selenyum ve E vitamini metabolizmaları birbirleriyle ilişkilidir ve selenyum, E vitamini depolanmasında önemli bir rol oynamaktadır (221).

2.6.4.5. Polifenoller

Polifenoller, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarında yer alan serbest demir ve bakırı şelatlayarak ROT oluşumunu önler. Polifenollerin hücreleri oksidatif strese karşı koruduğuna ve oksidatif stresle ilişkili çeşitli dejeneratif hastalık riskini sınırladığına dair kanıtlar giderek artmaktadır (223). Örneğin, *Nigella sativa*'nın uçucu yağının ana bileşeni olan timokinonun antioksidan, anti-enflamatuvar, antineoplastik ve antiviral gibi birçok özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (224).

2.6.4.6. Melatonin

Melatonin, karanlığa tepki olarak epifiz bezi tarafından üretilen bir hormondur. Melatonin "karanlığın hormonu" olarak adlandırılır. Melatonin, D vitamini ile birlikte ışık ve karanlık gereksinimlerini karşılamak için "ışık sensörleri" olarak görev yapar (225). Epifiz bezi, yaşa, yaşam tarzına, fiziksel egzersize ve ilaç kullanımına bağlı olarak günde yaklaşık 0,5 mg melatonin üretir ve üretimi yaşla birlikte azalmaktadır. Melatonin, pineal bez dışında pankreas, karaciğer, beyin, lens, tiroid ve diğerlerini içeren çeşitli dokularda bulunur. Anne sütü de dahil olmak üzere neredeyse tüm vücut sıvıları melatonin içermektedir (226).

2.6.4.7. Flavonoidler

Flavonoidler, kronik hastalıkların önlenmesindeki sağlığa yararlı etkileri, ağırlıklı olarak serbest radikalleri sonlandırma ve redoks metal iyonlarını etkili bir şekilde şelatlama yeteneği ile ortaya çıkan antioksidanlardır. Buna ek olarak, flavonoidler antioksidan enzimlerin sentezini aktive edebilir ve E vitamini gibi karşılık gelen çiftlerin daha yüksek elektron indirgeme potansiyeline sahip vitaminleri yeniden üretebilir (227).

2.6.5. Diyabetik Nöropatide Oksidatif Değişiklikler ve Antioksidan Uygulamaları

Diyabetik nöropatiye aracılık etmede oksidatif stres merkezi bir rol oynar ve bu nedenle antioksidanların son on yıl içinde diyabetik nöropatinin etkili ve verimli bir şekilde tedavi edilmesi arayışında ana akımı oluşturmaktadır. Genel olarak antioksidanlar; serbest radikallerin zararlı etkilerini ya oluşumlarını önleyerek ya da onları temizleyip etkisiz hale getirerek azaltmak veya antioksidan enzimlerin aktivitelerini indükleyerek ve antioksidan yollarında yer alan diğer proteinleri yenileyerek doğal savunma sistemlerini güçlendirmek üzere iki ana hedefe ulaşmak için çalışır (228). Diyabetik nöropatide oksidatif stresin rolünün ana kanıtı, diyabetik nöropati deneysel hayvan modellerinde aşırı serbest

radikallerin üretildiğinin ve bu etkilerin antioksidan ile tedavi edildiğinde düzeldiğinin keşfedilmesidir (229, 230). Bu nedenle ilaç araştırmalarında, antioksidanların veya serbest radikalleri doğrudan temizleyen ajanların ROT reaksiyonlarının oluşumunu veya ilerlemesini azaltılması ve bunun da oksidatif stresi azaltarak diyabetik nöropati koşullarının iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla keşfedilen en önemli antioksidanlardan bazıları alfa-lipoik asit, A, C ve E vitaminleri, asetil L-karnitin, taurin, ruboksistaurin, aldoz redüktaz inhibitörleri ve melatonindir (228).

2.6.5.1. Alfa-Lipoik Asit

Alfa-lipoik asidin klinik çalışmalarda en başarılı antioksidan olduğu düşünülmektedir (231). Alfa-lipoik asit bir dizi mitokondriyal enzim için bir kofaktördür (232). Deneysel modellerde, Alfa-lipoik asidin lipid peroksidasyonunu azalttığı, oksidatif stresi azalttığı ve diyabetik hayvanlarda distal, duysal ve motor sinir iletimini iyileştirdiği bildirilmiştir (233). Alfa-lipoik asidin diyabetik nöropati semptomlarını iyileştirmedeki rolü çeşitli klinik çalışmalarda gösterilmiştir (231, 234–236). Alfa-lipoik asidin heksozamin yolağını ve ileri glikasyon son ürünlerini inhibe ederek oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (237).

2.6.5.2. Aldoz Redüktaz İnhibitörleri

Aldoz redüktaz inhibitörleri, poliol yoluna glukoz akışını azaltan ve böylece nöronlarda aşırı sorbitol ve fruktozun zararlı etkilerini önleyen ajanlardır. *İn vivo* ve *in vitro* hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlar, aldoz redüktaz inhibisyonunun diyabetik nöropati üzerindeki olumlu etkisini vurgulamıştır (170, 238). Aldoz redüktaz inhibitörleri diyabetik nöropatinin ilerlemesini önler (239), sural motor ve duysal sinir iletim hızlarını artırır (240) ve nöropatik ağrıyı hafifletmekle birlikte el bileği ve ayak bileği F dalgası latansını iyileştirmektedir (241).

2.6.5.3. Protein Kinaz C İnhibitörleri

Protein kinaz C, sinir fonksiyonundan ve nörotransmitterlerin sentezinden sorumlu kilit düzenleyici proteinlerin aktivasyonunda rol oynamaktadır. PKC'nin inhibe edilmesinin nöropatik ağrıyı baskıladığı bildirilmiştir (242). Antioksidan etkilere sahip spesifik bir PKC inhibitörü olan ruboksistaurin, diyabetik sıçanlarda sinir iletim hızını ve endonöriyal kan akışını iyileştirmektedir (243).

2.7. Mitokondri Disfonksiyonu

Mitokondri disfonksiyonu, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP formunda enerji üretmekten sorumlu organel olan mitokondrinin işlev kaybına veya hasara uğramış olmasına işaret etmektedir. Mitokondri disfonksiyonu, nörodejeneratif bozukluklar, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve psikiyatrik bozukluklar dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (244). Mitokondri disfonksiyonunun değerlendirilmesi; mitokondriyal solunum, ATP üretimi, membran potansiyeli, ROT üretimi ve mitokondriyal DNA mutasyonları dahil olmak üzere çeşitli parametreleri içermektedir (245). Mitokondriyal proteomik, metabolomik ve genetik analiz gibi teknikler mitokondriyal disfonksiyonu incelemek için kullanılabilir (245, 246).

Nörodejeneratif hastalıklarda mitokondri disfonksiyonu ortak bir özelliktir ve bu bozuklukların merkezi patogenezinde rol oynadığına inanılmaktadır (247); Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve amiotrofik lateral skleroz gibi hastalıklarda görülebilmektedir. Mitokondri disfonksiyonun nörodejenerasyondaki kesin rolü halen araştırılmaktadır, ancak anormal proteinlerin birikmesine, oksidatif strese, bozulmuş enerji metabolizmasına ve nöronal hücre ölümüne katkıda bulunduğu düşünülmektedir (248).

Diyabette mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun insülin direncinin gelişiminde ve diyabetik komplikasyonların patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (17). İskelet kası ve yağ dokusu gibi insüline duyarlı dokularda mitokondriyal fonksiyonun bozulması, ATP üretiminin azalmasına, ROT üretiminin artmasına ve insülin sinyalleşmesinin bozulmasına sebep olabilir. Bu anormallikler insülin direncine ve diabetes mellitus gelişmesine neden olabilmektedir (249).

2.7.1. Mitokondri ve Oksidatif Fosforilasyon

Mitokondri; hücrede oksidatif fosforilasyon, trikarboksilik asit döngüsü, yağ asitlerinin oksidasyonu, hem biyosentezi ve amino asit metabolizmasında rol oynamaktadır ve bunlardan en önemlisi oksidatif fosforilasyon sırasında ATP üretimidir (11). Mitokondrinin krista adı verilen oldukça katlanmış iç membranı, solunum zinciri bileşenlerinin veya oksidatif fosforilasyon komplekslerini (I-IV) barındırmakta ve ATP sentaz (kompleks V) ile birlikte ATP'nin üretim mekanizmasını oluşturmaktadır. Kompleks I-IV ve F₁F₀-ATP sentaz (kompleks V); oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretmek için kullanılan mitokondri iç membranı boyunca elektrokimyasal bir proton gradyanı oluşturmak

için uyum içinde çalışan çok alt birimli enzimlerdir. Glikoliz, yağ asidi oksidasyonu ve sitrik asit döngüsü sırasında üretilen NADH veya $FADH_2$, solunum zinciri için yakıt oluşturmaktadır (53).

Kompleks I veya NADH dehidrogenaz, elektron taşıma zincirinin en büyük enzimidir ve geniş bir kısmı lipid çift tabakasına gömülü ve daha küçük bir omuzu mitokondriyal matrise doğru çıkıntı yapan karakteristik bir L şekline sahiptir. Kompleks I, NADH substratını hidrofilik kolun distal ucuna bağlar ve her seferinde bir tane olmak üzere iki elektronu flavin mononükleotid ve yedi demir-sülfür kümesi aracılığıyla ubikinona aktarır (250). Ubikinonun indirgenmesi membran kolunda konformasyonel değişikliklere neden olarak dört protonun dört kanal aracılığıyla membran boyunca translokasyonuna yol açar (251).

Kompleks II veya süksinat dehidrogenaz, elektronların solunum zincirine ikinci bağımsız giriş noktasıdır. Süksinatı okside eder ve elektronları üç demir-sülfür kümesi aracılığıyla ubikinona aktarır. Kompleks II bir proton pompası değildir ve proton gradyanı oluşumuna doğrudan katkıda bulunmamaktadır (53).

Membranda bir dimer olarak bulunduğu bilinen Kompleks III veya sitokrom c oksidoredüktaz, ubikinonu ubikinole okside eder ve sonuç olarak membranlar arası boşluğa iki proton pompalayabilir. Ubikinolden gelen elektronlar kompleks III'ün sitokrom b ve c1 aracılığıyla taşıyıcı sitokrom c'ye aktarılır (53).

Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin son enzimi kompleks IV veya sitokrom c oksidazdır. Sitokrom c'den elektronları kabul eder ve iki su molekülüne dönüştürmek üzere bir oksijen molekülüne iletir. Bu işlem sırasında kompleks I'den dört, kompleks III'ten dört ve kompleks IV'ten iki adet proton pompalanır (53).

ATP sentaz veya kompleks V, ADP'yi ATP'ye dönüştürmek için bir proton gradyanında depolanan enerjiyi kullanmaktadır. Kompleks V, toplam kütlesi 600 kilodalton olan ve 15-18 alt birimden oluşan bir komplekstir (252). F_0 ve F_1 diye adlandırılan iki ana alt birimden oluşmaktadır: F_0 alt birimi, iç mitokondri matriksine gömülü bir şekilde bulunur ve bir proton kanalı içerir; F_1 alt birimi, ADP ve inorganik fosfattan ATP sentezlemektedir (253).

2.7.2. Mitokondriyal Solunum Zinciri Elemanlarını Etkileyen Ajanlar

Mitokondrinin farklı yönleri hakkındaki bilgiler yıllar geçtikçe mitokondriyal (özellikle mitokondriyi hedef alan) tıp kavramı tercih edilir hale gelmiştir (254). Mitokondrinin bir hücrenin hayatta kalmasını ve ölümünü düzenlemedeki önemli rolü, onları kanser de dahil olmak üzere birincil patolojik durumların tedavisi için potansiyel bir hedef haline getirmiştir. Mitokondriyi hedefleme stratejileri arasında elektron taşıma zinciri komplekslerinin inhibisyonu, oksidatif fosforilasyon, ROT ve oksidatif stres seviyelerinin kontrol edilmesi, Krebs döngüsü enzimlerinin veya anti-apoptotik proteinler gibi mitokondriyal membranların spesifik proteinlerinin hedeflenmesi yer almaktadır (255). Mitokondriyi hedef alan başlıca terapötik bileşikler ve bunların metabolik ve nörodejeneratif hastalıklardaki etki şekilleri Tablo 3'te belirtilmiştir.

Tablo 3. Mitokondriyi hedef alan terapötik bileşikler ve etki mekanizmaları (255)

Bileşik	Etki mekanizması
MitoQ	ROT ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar.
MitoVit E	ROT oluşumunu engeller. Lipid peroksidasyonunu azaltır.
Koenzim Q10	Aβ peptid birikimini azaltır. Mitokondriyal elektron taşıma sistemini destekler.
MitoApo	Süperoksit oluşumunun azaltılmasına yardımcı olur. H ₂ O ₂ üretimini azaltır. Oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünü önler.
Melatonin	Mitokondriyal kalsiyum seviyelerinin azaltılmasına yardımcı olur. Mitokondri hacminin korunmasına yardımcı olur.
Nikotinamid adenin dinükleotid	Mitokondri fisyonunu ve füzyonunu düzenler. ATP ve NAD ⁺ seviyelerini geri yükler ROT oluşumunu engeller.
MitoTEMPO	Mitokondriyal süperoksiti ortadan kaldırır. ROT oluşumunu engeller. Lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi azaltır.
Szeto-Schiller tetrapeptidleri	Antioksidanların iç mitokondriyal membrana hedefli iletimini sağlar. Hidrojen peroksit ve peroksinitrit oksidanlarını temizler. Lipid peroksidasyonunu engeller. Mitokondriyal ROT'yi azaltır.

2.7.2.1. Anetol Trition

Anetol trition [5-(4-metoksifenil)-3H-1,2-ditiyol-3-tion], ağız kuruluğu yaşayan hastalarda (Sjögren sendromu vb.) tükürük salgısının artması veya hazımsızlık, kolesistit, safra taşı ve akut/kronik hepatit gibi gastrointestinal hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılagelen, ayrıca etken maddesi lahana, Brüksel lahanası ve turpgiller gibi gıda maddelerinde bulunabilen bir ilaştır (34, 256). Yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerinde tümörigenezi (tümör gelişmesini) inhibe ettiği gösterilmiş (257) ve Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından “kanser tedavisinde çalışılan bir madde” olarak tanımlanmıştır (258). Anetol trition’un hücresel düzeyde antioksidan özelliği (259), hücre içi ROT sentezini regüle etme özelliği (260), mitokondri membran potansiyelini düzenleyerek hücre canlılığına olumlu katkıda bulunduğu (261), hatta astroglial hücre kültürlerinde nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir (262). Varsayılan bir nöroprotektan olan anetol trition, kültüre edilmiş astroglial hücrelerin glukoz açlığı sırasında hücre içi GSH düzeylerini artırmaktadır (263). Anetol trition, normal mitokondriyal fonksiyonu değiştirmeden mitokondriyal kompleks I düzeyinde ROT oluşumunu engelleyerek ve GSH düzeylerini artırarak antioksidan özellik göstermektedir (34, 264)

2.7.3. Hiperglisemik Nörotoksisite ile Mitokondri Disfonksiyonu İlişkisi

Dorsal kök gangliyon nöronlarında, aksonlarda ve Schwann hücrelerinde hiperglisemiden ve hiperlipidemiden kaynaklanan oksidatif stresle ilişkili mitokondri disfonksiyonunun, diyabetik nöropati için merkezi bir patofizyolojik mekanizma olduğu öne sürülmüştür (265–269). Diyabetin uzun vadeli patolojilerinin çoğu kalıcı hiperglisemi nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Aşırı glukozu sahip doğum öncesi sıçan nöron kültürlerinde, ortalama mitokondri boyutunda %50’lik bir artış ve ROT’de hızlı bir zirve artışı tespit edilmiştir (268). Kronik hipergliseminin, DKG nöronlarında iç mitokondri membran potansiyelinin depolarizasyonuna, solunum zinciri aktivitesinin azalmasına ve mitokondri DNA seviyelerinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (265, 270, 271).

Diyabetik duyuşal nöropatide mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun, antiapoptotik protein Bcl-2’nin azalmış seviyeleri, sitokrom C’nin mitokondriden sitoplazmaya translokasyonu ve apoptozun indüksiyonu, mitokondriyal biyogenez ve fisyon dismodülasyonu ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (272, 273). Kas, kalp ve karaciğer de dahil olmak üzere insüline duyarlı dokulardaki mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, zamanla diyabetik durumun bozulmasına katkıda bulunduğu saptanmıştır (274). DKG nöronlarında

AMPK sinyalleşmesinin bozulması, diyabette mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve periferik nöropati ile ilişkilendirilmiştir (275).

Uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin, mitokondriyal sinyal sistemlerini ve duysal nöronlardaki işlevi düzenlediği bulunmuştur; bu da lipid metabolizması, mitokondriyal işlev ve diyabetik nöropati arasındaki ilintiyi ortaya koymaktadır (276). Duyusal nöronlardaki mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun, diyabetik nöropatinin hayvan modellerinde distal aksonopatiye katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (277). Ayrıca mitokondriyal disfonksiyonun, metabolik, kemotoksik veya enfeksiyöz hakaretlerle tetiklenen periferik nöropatlere katkıda bulunan bir faktör olarak tanımlanmış olması, çeşitli nöropatik durumlarda geniş çapta rol oynadığının altını çizmektedir (278). Mitokondri fonksiyonunu geliştiren farmakolojik ajanların kullanımı; diyabetik periferik nöropatinin gelişimini önlemeye veya nöropati prognozunu iyileşmesine yol açtığı belirlenmiştir (25).

2.8. Hücre Ölümü

Fizyolojik olarak hücre ölümü, dokuları, organ boyutunu ve fonksiyonunu korumak için gerekli olan, oldukça düzenlenmiş ve önemli bir homeostatik mekanizmadır. Bu bağlamda, hücre ölümü; “yaşamsal hücre fonksiyonların (ATP üretimi, redoks homeostazının korunması vb.) geri dönüşümsüz dejenerasyonu ve bunun sonucunda kalıcı plazma membranı geçirgenliği veya hücre parçalanma yoluyla hücre bütünlüğün kaybı” şeklinde tanımlanabilir (279). Günlük hücre doğumu ve ölümü akışından çoğunlukla muaf olan bir hücre tipi nöronal hücredir; gelişim periyodunu takiben postmitotik nöronların uygun devreleri sürdürmek için uzun ömürlü olmaları gerekir (280). Hücre ölümü makroskopik morfolojik değişikliklerle kendini gösterir. Ölü hücrelerin ve bunların parçalarının imha edildiği mekanizmalarla birlikte, bu tür morfotipler tarihsel olarak hücre ölümünü üç farklı biçimde sınıflandırmak için kullanılmıştır: (I) sitoplazmada büzülme, kromatin yoğunlaşması (piknoz), nükleer parçalanma (karyoreksis) ve plazma zarının taşması, fagositik aktiviteye sahip komşu hücrelerin lizozomlarında parçalanan, göreceli olarak ufak keseciklerin (genellikle apoptotik cisimcikler olarak bilinir) oluşumuyla sonuçlanan tip I hücre ölümü veya apoptoz; (II) yoğun sitoplazmik vakuolizasyonla ortaya çıkan ve hücre içinde fagositik süreç ve lizozomal sindirim ile sonuçlanan tip II hücre ölümü veya otofaji; ve (III) tip I veya tip II hücre ölümünden farklı olarak fagositik ve lizozomal tutulumun yokluğunda hücre parçalarının atılmasıyla sonlanan tip III hücre ölümü veya nekroz (281).

2.8.1. Tip I Hücre Ölümü – Apoptoz

Apoptoz, bir organizmanın gelişimi, homeostaz ve hastalık sırasında istenmeyen hücreleri öldürülmesini ve ortadan kaldırmasını sağlayan karmaşık ve kalıtsal olarak sıkı kontrol altına alınmış bir biyolojik süreçtir (282). Bu süreç homeostaz durumunda kalıtsal kontrol altına alınmış olması nedeniyle “programlı hücre ölümü” olarak da tanımlanmaktadır (283). Apoptoz, intrinsek yolak (‘mitokondriyal apoptotik yolak’ olarak da bilinir) ve ekstrinsek yolak (‘ölüm reseptörü yolağı’ olarak da bilinir) olmak üzere iki ana yolak üzerinden gerçekleşmektedir (284).

İntrinsek yolak; DNA hasarı, oksidatif stres veya büyüme faktörünün çekilmesi gibi hücre içi sinyallerle başlatılmaktadır. Bu sinyaller, mitokondri dışı membranının geçirgenliğini destekleyen Bax ve Bak gibi Bcl-2 protein familyasının pro-apoptotik proteinlerinin aktivasyonuna yol açmaktadır (285). Mitokondri dışı membranının bu geçirgenliği, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasına izin vermektedir. Sitokrom c, daha sonra kaspaz-9'u aktive edecek olan, apoptozom adı verilen apoptotik proteazı aktive eden faktör-1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile bir kompleks oluşturmaktadır. Aktive edilmiş kaspaz-9 daha sonra kaspaz-3 gibi aşağı akış “downstream” efektör kaspazlarını aktive ederek apoptozu gerçekleştirmektedir (284).

Ekstrinsek yolak; FS-7 ilişkili yüzey antijeni ligandı “FS-7-associated surface antigen (Fas) ligand” veya tümör nekroz faktörü-alfa gibi hücre dışı ölüm ligandlarının Fas veya tümör nekroz faktörü reseptörü gibi ilgili ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlamaktadır. Bu bağlanma, ölüme neden olan sinyal kompleksinde, kaspaz-8'in aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktive edilmiş kaspaz-8, kaspaz-3 gibi aşağı akış efektör kaspazlarını doğrudan parçalayabilir ve aktive edebilir ve intrinsek yolağın aktivasyonuna neden olabilir. Sonuç olarak apoptoz, intrinsek veya ekstrinsek yolakla başlatılabilen, oldukça düzenlenmiş bir süreçtir. İntrinsek yolak, hücre içi sinyaller tarafından tetiklenir ve mitokondriden sitokrom c'nin salınmasını içerir; ekstrinsek yolak ise, ölüm ligandlarının hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılır. Her iki yol da kaspazların aktivasyonu üzerinde birleşerek hücre ölümüne yol açmaktadır (284).

Apoptotik proteinler ve yolaklar arasındaki denge, hücrelerin apoptotik uyarılara duyarlılığını belirler ve gelişim, doku homeostazı, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve diyabet gibi hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde oldukça kritik rol oynamaktadır (286). Apoptozun düzensizliği, diyabetik nöropati ve glukoz

nörotoksitesitesi dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda önemli etkilere sahip olabilmektedir (272, 287).

2.8.2. Tip II Hücre Ölümü – Otofaji

Otofaji terimi, Yunanca “kendini yeme” anlamına gelip, 1963 yılında Christian de Duve tarafından lizozom/vakuoldeki sitoplazmik bileşenlerin bozunma süreci için ilk kez kullanılmıştır (288) ve otofajik yolların moleküler düzeyde açıklanması, 2016 yılında Yoshinori Ohsumi’ye Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülünü kazandırmıştır (289).

Otofaji, hasarlı proteinleri ve işlevsiz organelleri ortadan kaldırmak için oksidatif stresin neden olduğu katabolik bir süreçtir. Otofajik hücre ölümü, genellikle besin yoksunluğu, hipoksi, oksidatif stres, genotoksik stres veya yüksek glukoz nedeniyle tetiklenmektedir (290). Otofaji, sitoplazmik materyalleri yutan çift membranlı bir kesecik olan otofagozom oluşumuyla başlamakta, bu sürecin yolları otofajiyle ilişkili (ATG) proteinler tarafından düzenlenmektedir (291). Adenozin 5'-monofosfat (AMP) ile aktive edilen protein kinaz (AMPK), mTOR, unc-51 benzeri kinaz-1 (ULK1), PI3K/Akt, GTPazlar, kalsiyum ve protein sentezi dahil olmak üzere birçok sinyal yolu otofajide rol oynamaktadır (292, 293). Otofaji regülasyonunun bozulması; kanser, miyopatiler, nörodejeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları, gastrointestinal rahatsızlıklar ve diabetes mellitus komplikasyonları gibi patolojilerle ilişkilidir (294).

Memeli hücrelerinde; mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç otofaji türü gerçekleşmektedir. Her biri morfolojik olarak farklı olmakla birlikte, üçü de parçalanma ve geri dönüşüm için yükün lizozoma iletilmesiyle sonuçlanır (295).

Makrootofaji, otofajinin en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılan şeklidir ve otofajiden bahsedildiğinde aksi belirtilmedikçe makrootofaji kastedilir. Hasar görmüş organeller ve protein agregatları da dahil olmak üzere sitoplazmik bileşenleri içine alan, otofagozom adı verilen çift membranlı yapıların oluşumunu içerir. Bu otofagozomlar daha sonra lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluşturur ve burada tutulan kargo lizozomal enzimler tarafından parçalanır (296).

Mikrootofaji ise sitoplazmik bileşenlerin lizozomal membranın içeri girmesi veya çıkması yoluyla doğrudan yutulmasını içerir. Bu süreç, kargonun parçalanmak üzere lizozoma doğrudan alınmasına olanak tanır (297).

Şaperon aracılı otofaji, bozunma için spesifik olarak bireysel sitozolik proteinleri hedef alan seçici bir otofaji şeklidir. Şaperon aracılı otofajide spesifik bir hedefleme motifi içeren sitozolik proteinler, şaperon proteini HSC70 tarafından tanınır ve lizozomal membrana iletilir. Hedeflenen proteinler daha sonra lizozomal membran boyunca yer değiştirir ve lizozomal enzimler tarafından parçalanır (298).

Otofaji yolağı, otofagozom adı verilen çift membranlı bir yapının oluşumuyla sonuçlanır. Bu, hücre içi materyali sarar ve sonuçta lizozomlarla birleşerek, zarflı materyalin bozunmasına izin verir. Otofagozom oluşumu ve olgunlaşması, ATG proteinlerinin sıralı fonksiyonu tarafından düzenlenir. Süreç, ULK1, ATG13 ve fokal adezyon kinaz ailesiyle etkileşen proteinden (FIP200) oluşan bir ön başlatma kompleksinin aktivasyonu ile hareket etmektedir. Bu kinaz kompleksinin aktivitesi; mTOR ve AMPK olmak üzere iki metabolik yolak tarafından düzenlenmektedir (299). Sağlıklı hücrelerde ULK1, ATG13 ve mTOR'un fosforilasyonu, ön başlatma kompleksini inhibe etmektedir. Amino asit yoksunluğu gibi metabolik stres altında ULK1 ve ATG13'ün mTOR aracılı inhibisyonu ortadan kalkmaktadır (300). Buna karşılık AMPK, başlangıç öncesi kompleksi aktive etmektedir. ATP sentezi bir hücredeki ATP tüketiminin taleplerini karşılayamadığı zaman, AMP ve ADP birikir ve AMPK'yi aktive eder. Aktif AMPK, mTOR aktivitesinin baskılanması yoluyla dolaylı olarak ve ULK1'in fosforile (aktive) edilmesi yoluyla doğrudan otofajiyi tetiklemektedir. Bundan dolayı, mTOR'un inhibe edildiği ve/veya AMPK'nin aktive edildiği durumlar, ön başlatma kompleksini aktifleştirmektedir (301).

Otofaji, makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofajinin bu üç yolu, hücrel homeostazı korumak ve hücrel bileşenlerin uygun şekilde dönüşümünü sağlamak için birlikte çalışır. Bu yolların düzensizliği, nörodejeneratif bozukluklar, kanser ve metabolik bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (302, 303).

2.8.2.1. Mitofaji

Mitofaji, otofagozomların yükünün işlevsiz mitokondri olduğu bir hücrel otofaji şeklidir. Mitofaji hasarlı mitokondriyi, fosfataz & tensin homolog-indüklediği kinaz-1 (PINK1)/Parkin birleşimi yoluyla içine alır ve daha sonra onları lizozomal sindirim için yönlendirir (304). Hücrelerdeki mitofajik dönüşüm, oksidatif strese kurtulmaya yardımcı olur ve sağlıklı mitokondriyal biyogenez için gerekli temel alt birimleri sağlar. Ayrıca mitokondriyal toksinlerin doğrudan sitozole salınmasını önler ve böylece hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur (305). Mitofajinin, çeşitli nörodejeneratif bozukluklarda yararlı etki

sağlamak için terapötik olarak hedeflenmektedir (306). Terapötik hedef sağlamak için diyabetik nöropati durumunda mitofajiye yönelik stratejiler arasında AMPK aktivasyonu, SIRT1 aktivasyonu, mTOR inhibisyonu yer almaktadır (307, 308). Mitofaji tetikleyicileri diyabetik komplikasyonların (kardiyak komplikasyonlar, diyabetik nefropati vb.) yönetiminde kullanılmak üzere test edilmeye başlanmıştır (32, 33).

2.8.3. Tip III Hücre Ölümü – Nekroz

Nekrotik hücre ölümü, yüksek sıcaklık ve mekanik stres gibi fiziksel hasar durumunda meydana gelebilir ve hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olabilir. Bu durumda nekroz pasiftir ve herhangi bir spesifik sinyal yolağına ihtiyaç duymamaktadır (293, 309). İkincil nekroz adı verilen başka bir nekroz türü, apoptozun veya otofajinin geç evresinde, ölü hücrelerin fagositozla uzaklaştırılmadığı durumlarda ortaya çıkmaktadır. İkincil nekroz, apoptoz veya otofaji gibi başlangıç sinyal olaylarından bağımsız olarak kabul edilmektedir, ancak nekroz aynı zamanda sinyalleşme kademesinin bir sonucu da olabilir (310). Nekroz; kromatin yoğunlaşması olmaksızın organel yapı kaybı, hücre şişmesi ve plazma zarı yırtılması ile karakterizedir. Bazen nekroptoz olarak da adlandırılan bu hücre ölümü biçimi, hepsi reseptörle etkileşime giren protein kinaz 3'ün aktivasyonu üzerinde birleşen hücre içi sinyalleşme ile aktive olmaktadır (311).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan oksidatif stresin, diyabetik nöropati gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (312). Artan ROT üretimi, hücresel hasara ve enflamatuvar yolların aktivasyonuna yol açarak nekrotik hücre ölümüne katkıda bulunabilmektedir (312, 313). Enflamatuvar süreçler, diyabetik nöropati patogenezinde bir diğer önemli oyuncudur. Diyabetik hastaların periferik sinirlerinde ve diyabetik nöropatinin hayvan modellerinde kronik düşük dereceli enflamasyon gözlemlenmiştir. Sitokinler ve kemokinler gibi enflamatuvar araçlar hücresel hasarı indükleyebilir ve nekrotik hücre ölümünü teşvik edebilir. Enflamatuvar yollar aynı zamanda oksidatif stres yollarıyla da etkileşime girebilir ve bu da hücresel hasar ve enflamasyondan oluşan kısır bir döngüye yol açabilmektedir (314).

Diyabetik nöropatinin altında yatan hücre ölümü mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır ancak oksidatif stres, enflamasyon, mitokondri disfonksiyonu, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere birçok faktörün etkili olduğu tespit edilmiştir (312, 313).

2.8.4. Diğer Hücre Ölümü Türleri

Otofaji, apoptoz ve nekroz dışında; entoz, kannibalistik hücre ölümü, kazara hücre ölümü, aponekroz, netoz, nekroptoz, mitotik katastrof, partanatoz, kornifikasyon, metüoz, onkoz, paraptoz, anoikis, piroptoz, ferroptoz, fagoptoz, kaspazdan bağımsız apoptoz, eksitotoksisite ve burada bahsedilen hücre ölümü modalitelerinin hiçbirine ait olmayan ve kapsamlı bir şekilde incelenmemiş birçok başka hücre ölümü türü de bulunmaktadır (315).

2.8.5. Hiperglisemik Nörotoksisite ile Mitofaji/Otofaji İlişkisi

Aşırı ROT ve RNT üretimi, dislipidemi ve tabiatıyla hiperglisemi durumu da dahil olmak üzere, diyabet nedeniyle nöral dokuda çok sayıda metabolik ve hücrel değişiklik tanımlanmıştır (316). Bu değişiklikler, anormal glikozillenmiş proteinlerin ve işlevsiz mitokondriyal proteinlerin üretilmesiyle mitokondriyal ve sitozolik oksidatif strese neden olmaktadır (317). Bu bağlamda mitofaji/otofaji mekanizması sitoprotektif bir yanıt olarak giderek büyüyen bir araştırma alanıdır (318). Nöral dokudaki mitofaji/otofaji süreci, hücrel stres faktörlerinin neden olduğu hasarı ve hasarlı mitokondrileri ortadan kaldıran bir temizleme mekanizması olarak tanımlanmıştır (319). Süregelen çalışmalar, mitofaji/otofajinin diyabetik nöropatinin patofizyolojisinde potansiyel olarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir; diyabetik nöropatinin doğal seyri sırasında nöronal hasarla olan ilişkiyi tamamen anlamak için ileri araştırmalar gereklidir (269).

Hücrel stresin neden olduğu mitofaji/otofaji, birçok dokuyu, glukoz veya lipid metabolizmasını ve insülin salgılanmasını etkilemektedir. Otofaji indüksiyonu, mTOR, LKB1, ULK ve LC3, AMPK, SIRT1 gibi farklı protein sinyalleriyle gerçekleşmektedir. Mitofaji/otofaji mekanizması ile hücre sinyal sistemi için oldukça önemli protein kinaz AMPK arasındaki ilişki önemli bir terapötik hedef olabileceği öne sürülmüştür. Artan ve azalan regülasyonları da dahil olmak üzere otofaji benzeri mTOR'un diğer düzenleyici yollarının engellenmesi umutvar bir terapötik yaklaşımdır (29).

2.8.6. Mitofaji/Otofaji Modülatörleri

Bozulmuş mitokondriyal homeostaz ve işlevsiz organellerin kontrolsüz birikmesi, yaşla ilişkili çeşitli patolojilerin ortak paydalarıdır. Son zamanlarda, hasarlı mitokondrinin etkili bir şekilde uzaklaştırılmasını teşvik etmek ve hücrenin enerji homeostazını düzenlemek için kullanılabilecek yeni kimyasal modülatörleri belirlemek için farmakolojik taramalar yapılmaktadır. Bu nedenle, mitofaji/otofaji sürecini seçici olarak hedeflemek,

kusurlu enerji metabolizması ile karakterize hücre yaşlanmasına veya dejenerasyonuna bağlı bozukluklara karşı koymak için potansiyel bir terapötik stratejidir. Bu doğrultuda, mitofaji/otofaji gibi mitokondriyal eliminasyonu düzenleyen çeşitli sentetik kimyasal maddeler ve doğal bileşikler tanımlanmıştır (320). En yaygın kullanılan mitofaji/otofaji modülatörü ajanlara melatonin, resveratrol, ürolitin A, metformin, berberin, kuersetin ve rapamisin örnek olarak verilebilir (321).

2.8.6.1. Metformin

Metformin, hepatik glukoz üretimini azaltan ve periferik insülin duyarlılığını artıran, AMPK/mTOR yolağını aktive ederek otofaji modülasyonu sağlayan ve yaygın olarak reçete edilen bir antidiyabetik ajandır (322, 323). Metforminin antihiperglisemik etki mekanizmaları arasında ince bağırsakta glukoz emiliminin azalması, hücreler tarafından glukoz alımının artması, plazmada serbest olan yağ asitlerinin konsantrasyonunda azalma ve AMP tarafından aktive edilen protein kinazın aktivasyonu yoluyla glukoneogenezin inhibisyonu yer almaktadır (269). Metforminin diğer etki mekanizmaları, antiaterosklerotik etkisi, hipotansif ve antikarsinojenik etkisi ve damarlardaki endotel fonksiyonu üzerindeki etkisi ile ilgilidir. Metforminin pleiotropik etkileri arasında plazma lipit profilleri üzerindeki etki, oksidatif stresin azalması ve plazmadaki fibrinolitik aktivitenin artması yer alır. Metforminin tip 2 DM'li hastalarda otofajik vezikül birikimini ve pankreas β hücrelerinin ölümünü azalttığı görülmektedir (324). Metformin, AMPK'den bağımsız olarak mTOR yolunu inhibe etme kapasitesine sahiptir ve otofajik veziküllerin oluşumunu ve ortadan kaldırılmasını teşvik etmektedir (325).

2.8.6.2. Rapamisin

Rapamisin, diğer bir adıyla sirolimus; koroner stentleri kaplamak (326), bazı nadir akciğer hastalıklarını tedavi etmek (327) ve organ nakli reddini önlemede güçlü bir bağışıklık baskılayıcı ajan olarak (328) kullanılan, antineoplastik ve antifungal özellikte (329) bir makrolid bileşiğidir. Önemli bir mitofaji/otofaji modülatörü olan rapamisin'in (330); DKG hücre kültürü düzeyinde nöroprotektif etkisi (331), DKG'de nöronal gelişime olan etkisi (332), streptozosinle tetiklenmiş diyabet modelinde hiperglisemik DKG hücre kültüründe nöroprotektif etkisi ve nörit gelişimi incelenmiştir (333, 334). Mitofaji/otofaji mekanizmasını indükleyen immünsüpresif bir ilaç olan rapamisin, hücre sinyal sisteminin diğer yollarını da etkileme yeteneğine sahiptir; diyabet ve komplikasyonlarına yönelik terapötik hedef olabileceği öngörülmüştür (335). Rapamisinin, dallı zincirli amino asitlerle

desteklenmiş yağlar açısından zengin bir diyetle beslenen, ancak yüksek yağlı diyetlerle beslenmeyen deney hayvanlarında glukoz toleransını arttırdığı rapor edilmiştir (336); bu durum rapamisin veya rapamisin ile ilişkili bileşiklerin özellikle tip 2 diyabetteki olası rolünü düşündürmektedir (337). Bu nedenle, DM komplikasyonlarında mitofaji/otofaji mekanizmasının sitoprotektif etkisini destekleyen tedavilerin geliştirilmesi potansiyel olarak umut verici bir araştırma yolu olduğu öne sürülmüştür (269).

2.8.6.3. Ürolitin A

Bir mitofaji/otofaji aktivatörü olan ürolitin A, özellikle kas sağlığı üzerine ve yaşlanmaya yönelik preklinik modellerde olumlu sonuçlar alınan bir (nar, maviyemiş, çilek başta olmak üzere birçok meyvede bulunan) ellajik asit metabolitidir (35, 338). Yapılan çalışmalarda ürolitin A'nın; önemli bir antioksidan ve mitofaji/otofaji modülatörü olduğu (339, 340), nöroproteksiyonda rolü olduğu (341, 342), hiperglisemi ile tetiklenmiş nöronal amiloidogenezi baskılayabildiği (343), streptozotosinle tetiklenmiş diyabetik farelerde pankreas hücrelerinde sitoprotektif ve otofajik regülatör rolü oynadığı (344), streptozosinle tetiklenmiş diyabetik sıçanlarda miyokardiyal disfonksiyonu önlediği (345), insülin direnci geliştirilen farelerde mitokondriyal fonksiyonu modüle ederek insülin direncini azalttığı (346) gösterilmiştir. Ürolitin A uygulamasının, hiperglisemik ortam tarafından üretilen kalsiyumun mitokondriyal akışını azaltarak YG'nin neden olduğu mitokondriyal ROT birikimini ve amiloid öncü proteini gibi tipik olarak hipergliseminin neden olduğu nörodejeneratif değişikliklerde görülen amiloid-beta üreten enzimlerin ekspresyonunu azaltabildiği ortaya konulmuştur (343).

Ürolitin A'nın, PINK1/Parkin bağımlı mitofaji yolunun güçlü bir aktivatörü olduğu tespit edilmiştir; bu durum fagolizozomal temizlenme için mitokondriyal proteinlerin seçici olarak çoğalmasına yol açmaktadır. Ürolitin A ayrıca çeşitli PINK1/Parkinden bağımsız yolların aktivasyonunu da sağlamaktadır ve böylelikle disfonksiyone mitokondrinin degradasyonuna yol açmaktadır (347). Tip II diyabet komplikasyonlarının patogenezinde, insülinin hücre içi etkilerine aracılık etmede rol oynayan Akt kinaz yolağının aşırı aktivasyonunun rol aldığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Ürolitin A, Akt'nin fosforilasyonunun önemli bir inhibitörüdür ve bu nedenle diyabetin neden olduğu kardiyovasküler komplikasyonlar üzerinde faydalı etkileri olabileceği öngörülmüştür (348). Ayrıca ürolitin A uygulamasının nukleus pulposus hücrelerinde AMPK yolağını aktive ederek mitofajiyi belirgin şekilde indüklediği saptanmıştır; böylelikle ürolitin A'nın

özellikle yaşlı yetişkinlerde sırt ağrısının yaygın bir nedeni olan intervertebral disk dejenerasyonunun ilerlemesini yavaşlatabileceği öngörülmektedir (349). Ürolitin A'nın yaşlanan insan derisi fibroblastlarında tip I kolajen ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı, matris metaloproteinaz-1 ekspresyonunu ve hücre içi ROT'yi azalttığı gösterilmiştir (350, 351).

Genel olarak, çeşitli insan nöron hücre hatlarının *in vitro* ortamda 1-10 μ M arasında değişen konsantrasyonlarda ürolitin A uygulaması, nöroenflamasyonun ve lokal ROT seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır (342, 343, 352, 353). 2.5-10 μ M arasındaki dozlarda ürolitin A uygulaması ile tümör nekroz faktörü-alfa düzeylerinde anlamlı ve doza bağlı bir azalma olduğu; 2.5 μ M dozda ürolitin A'nın, nükleer SIRT-1 protein ekspresyonunun artmasına neden olduğu ve kontrollerle karşılaştırıldığında NF-kB yolu aktivasyonunun ve enflamatuvar sitokinlerin üretiminin genel olarak azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Ürolitin A'nın ayrıca mitokondriyal ilişkili apoptoz yolunun inhibisyonu yoluyla amiloid-beta kaynaklı nörotoksisite modellerinde doza bağımlı bir nöroprotektif etki gösterdiği saptanmıştır (352).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Tasarımı

Bu çalışmanın tasarımı, *in vitro* deneysel araştırma (primer duyuşal nöron hücre kültüründe kimyasal maddelerin hücre dışı sıvıya uygulanması, bu çalışma özelinde, hücre kültüründe birlikte inkübasyon şeklinde uygulanan yüksek glukoz ve test ajanlarının nöron canlılığına olan etkilerinin -nörotoksitesinin- irdelenmesi) niteliğindedir.

Uzun süre hiperglisemiye maruz kalmanın (YG uygulaması ile diyabet taklidi yapma) DKG duyuşal nöronlarda tetikleyeceği nöropati/nörotoksite, *in vitro* koşullarda normal ve yüksek düzey hücre dışı glukoz kullanılan inkübasyon protokolleri ile taklit edilmiştir. Test ajanlarının etkilerinin YG uygulamasından mı, yoksa hiperozmolariteden mi kaynaklandığının irdelenmesi için hiperozmolar (mannitol içeren) hücre dışı koşullarda inkübasyon deneysel tasarıma eklenmiştir (Bk. “3.3.1.1. Hiperglisemi ve Hiperozmolarite Tetiklenmesi” bölümü).

3.2. Deney Hayvanları

Araştırma *in vitro* deneysel modelde gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarından primer nöron hücre kültürü hazırlanmıştır.

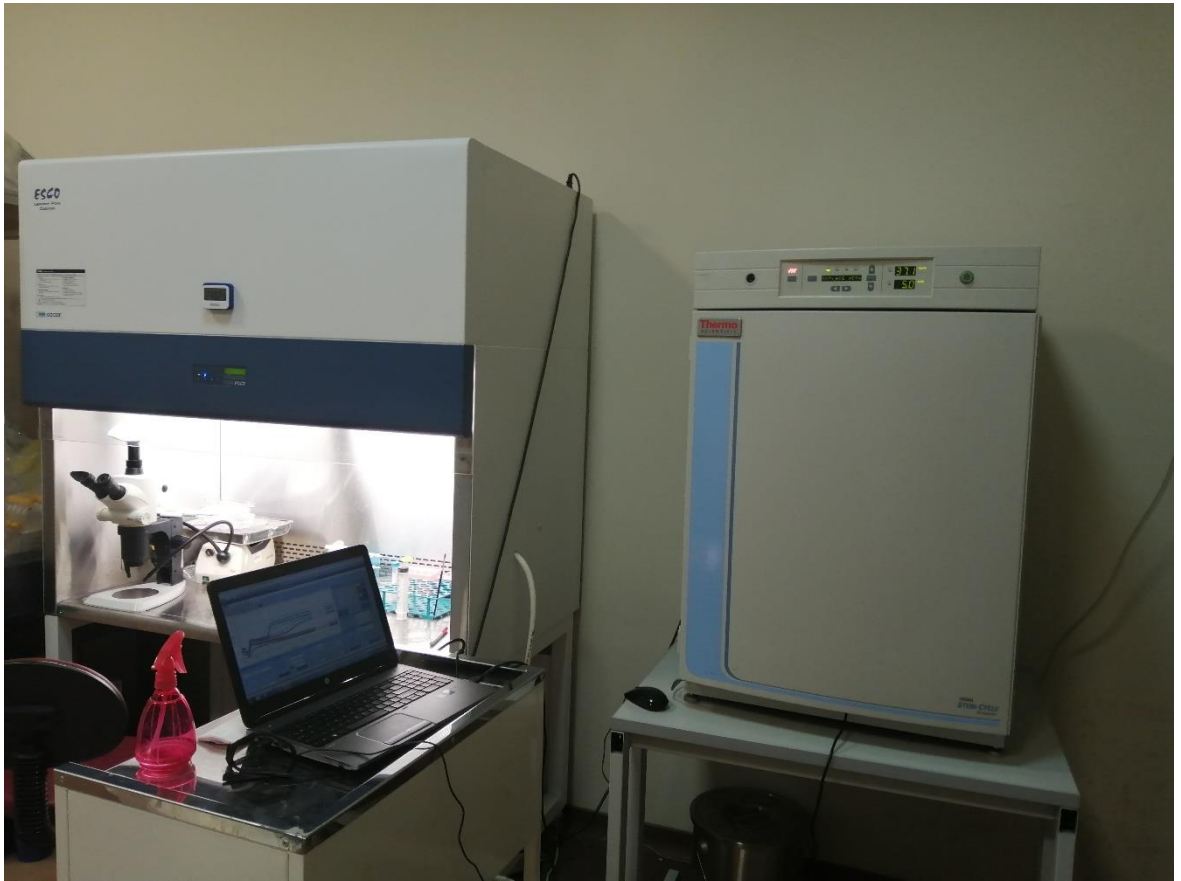
Diyabeti azami ölçüde modelleme adına, diyabete yatkın olarak geliştirilmiş ve bu amaçla araştırmalarda yaygın olarak kullanılan genetik modifiye C57BL/6J cinsi (354) erişkin (12 haftalık) fareler (9 adet), DKG nöron kültürü için donör olarak kullanıldı. C57BL/6J türü fareler, genetik olarak obezite ve diyabete yatkın fare türü olup, insandaki diyabet gelişim süreciyle oldukça benzerlik gösterdiği için bu fare kökenli hücre kültürü modeli seçildi (355). C57BL/6J türü 9 adet fare, Jackson Laboratuvarından (Bar Harbor, Maine, ABD) lisanslı olarak Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi.

C57BL/6J normal fare türü olup; yüksek yağlı diyetle beslenmesi durumunda diyabet/obeziteye yatkındır. C57BL/6J türü fareler genetik faktörleri ve beslenme şartları birleşimiyle obeziteye yatkınlık göstermesi bakımından insan modeline uygundur. Bu hayvan modelinde obezite gelişme süreci ile diyabet gelişmesi, insandakine benzer bir paralellik göstermektedir. İnsandaki gibi C57BL/6J farelerinde de diyetle indüklenen diyabet ve obezite abdomende yağ doku birikmesiyle karakterizedir (355). İlave olarak, diyabetik nöropati ve ağrı patofizyolojisi çalışmalarında bu fare türü sıklıkla

kullanılmaktadır (356–360). Bu bağlamda, bu tez çalışmasında C57BL/6J fare türü seçilmiştir.

3.3. DKG Nöron Primer Hücre Kültürü Hazırlanması

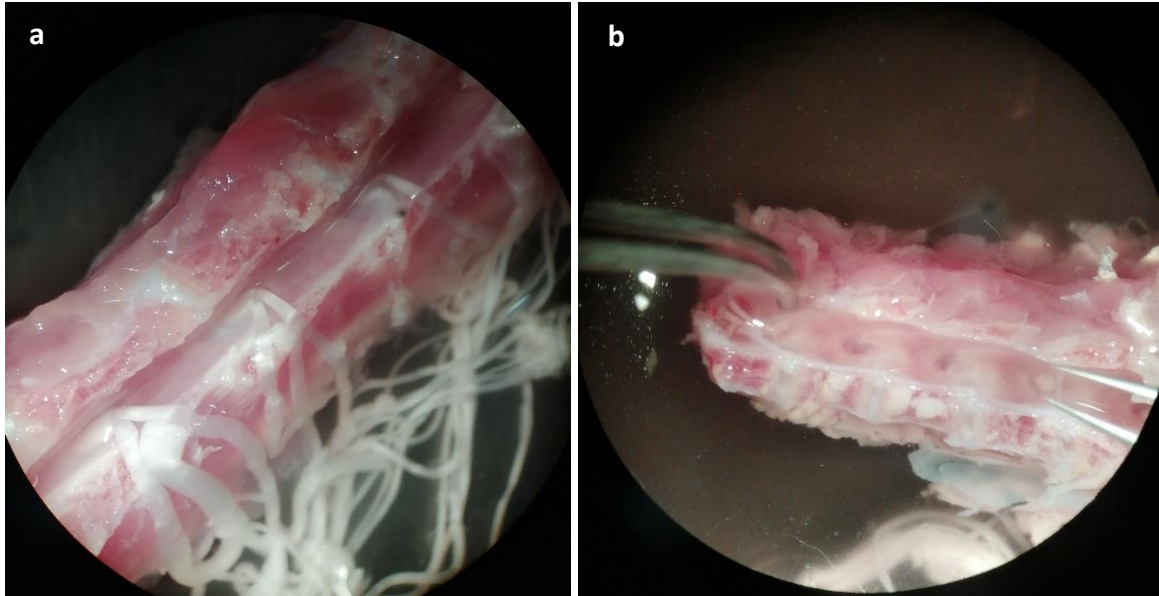
DKG nöron kültürü hazırlanması ile alakalı bütün işlemler asepsi ve antisepsiye dikkat edilerek sabit hava akımlı bir biyogüvenlik kabininde (Esco Technologies Inc., USA) gerçekleştirildi (Resim 1). Bu işlem daha önce sıçan ve fareler için tarif edilen protokole göre uygulandı (142, 361).



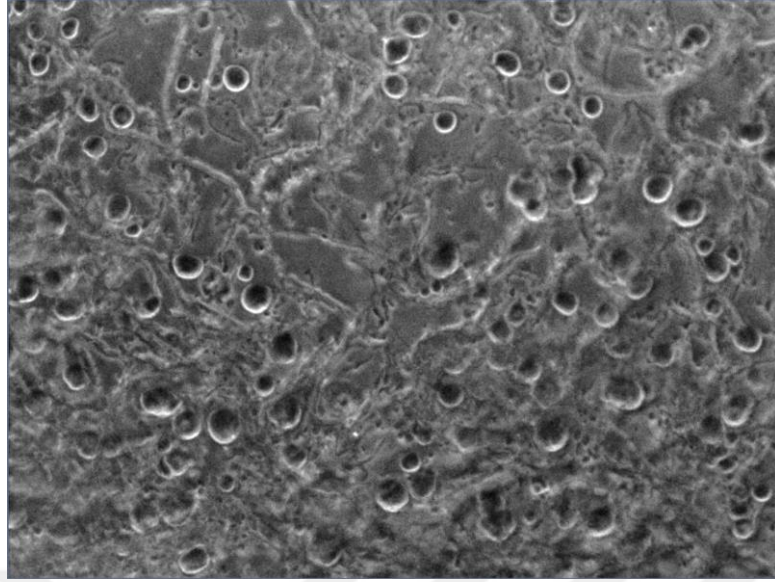
Resim 1. Sabit hava akımlı güvenlik kabini, gerçek zamanlı hücre canlılığı analizi sistemi ve karbondioksit inkübatörü

Dekapite edilmiş erişkin farelerin (C57BL/6J cinsi, 12 haftalık -erişkin-) kolumna vertebralisi diseke edildi, ardından diseksiyon mikroskobu altında her bir spinal sinir ile alakalı bütün DKG'ler diseke edildi (Resim 2a ve 2b). Nörobazal-A (500 mL, Gibco Corp., Catalog No:10888-022), B27 supplement (50X, 10 mL, Gibco Corp., Catalog No: 17504-044), glutamaks (100X, 5 mL, Invitrogen, Catalog No: 35050-038) ve penisilin/streptomisin

(10 µg/mL, Sigma-Aldrich Corp., Catalog No: P4333) içeren hücre kültürünün besiyeri çözeltisi hazırlandı. Hücre kültürü besiyeri çözeltisi içerisine toplanan bu DKG'ler, mekanik ve enzimatik yöntemlerle ayrıştırılmak suretiyle duyuşal nöronlar izole edildi: Toplanan DKG'ler fosfat tamponlu salin (PBS, Gibco, 14190-094) içerisinde üç kez yıkandı, ardından 20 dakika boyunca papain solüsyonu (15 U/mL, Worthington Biochemical Corp., CAS No: 9001-73-4) ve 13 dakika boyunca kollagenaz (1.25 mg/mL, Sigma-Aldrich Corp., CAS No: 9001-12-1) ile enzimatik işleme tabi tutuldu. Ardından Pastör pipeti ile mekanik ayrıştırma gerçekleştirildi ve duyuşal nöronlar izole edildi; izole edilen nöronların sayısı ve sağlıklı bir görünüme sahip olmama durumu ilk aşamada da mikroskop altında incelenerek teyit edildi (Resim 3). İzole edilen hücrelerin bulunduğu solüsyon, bazal impedans ölçümü alınmış xCELLigence e-pleyt kuyucuklarına, kuyucuk başına yaklaşık 500 hücre içerecek şekilde (~ 5000 hücre / 2 mL), 200'er µL hacimde ekildi. Pleytler, poli-D-lizin (250 µg/mL, Sigma-Aldrich Corp., CAS No: 27964-99-4) ve laminin (10 µg/mL, Sigma-Aldrich Corp., CAS No: 114956-81-9) ile bir gün önceden kaplandı. Kuyucuklara ekilen hücre süspansiyonu üzerine 100 ng/mL sinir büyüme faktörü (NGF, 2.5 S, Sigma-Aldrich Corp., CAS No: 93928-24-6) eklenerek 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 O₂ içeren nemli bir inkübatörde (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) inkübasyona bırakıldı.



Resim 2. a. C57BL/6J farenin kolumna vertebralisinin orta hattı dissekte edilmesi ve gömülü DKG'lerin tespiti, **b.** DKG'lerin izole edilmesi.



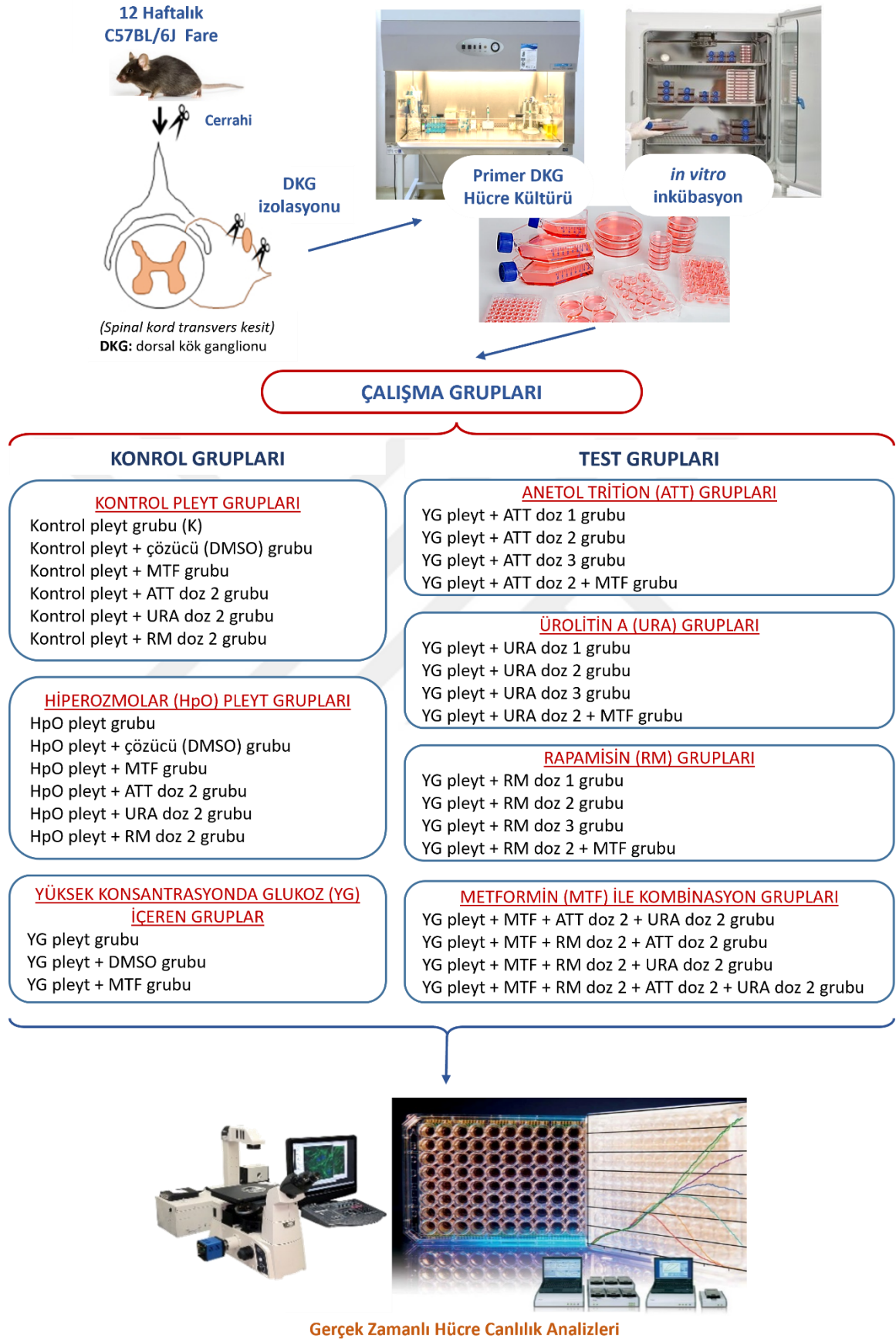
Resim 3. Enzimatik ve mekanik olarak ayrıştırılmış DKG nöron hücre gövdeleri (0. saatte, 40x büyütme, Zeiss AxioObserver mikroskop).

İzole edilen hücreler kuyucuklara iyice yapışması sağlandığı ve akut ayrıştırma travması geçtikten sonra (yaklaşık 22. saatte) deney protokolünce belirlenen kimyasallar, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi “*real time cell analyzer-RTCA*” sistemi duraklatılıp ilgili pleytler steril laminar kabine alınarak, ilgili kuyucuklara belirlenen dozlarda ilave edildi.

Ardından, pleytler inkübatördeki RTCA cihazına yerleştirilerek 48 saat boyunca gerçek zamanlı olarak hücre canlılık indeksleri, RTCA 1.2.1 yazılımı vasıtasıyla elde edildi ve kayıt altına alındı.

3.3.1. DKG Nöronlara Uygulanan Kimyasallar ve Test Ajanları

Bu tez çalışmasının deney protokolü, her çalışma grubu için 70 saat sürdürülen DKG duyusal nöron primer hücre kültüründe, yaklaşık 22. saatte test ajanlarının ve belirli kimyasalların uygulanıp test ajanlarının etkilerinin tespit edilmesini içermektedir. Bu *in vitro* çalışma grupları, toplam 31 alt-grup olacak şekilde tasarlandı (Şekil 6). Bahsedilen çalışma grupları, test ajanlarının etkilerinin incelendiği pleyt kuyucukları ile ayrılmış DKG içeren solüsyonlarından oluşmaktadır (deney hayvanı grubu değildir).



Şekil 6. Tez çalışması tasarımının şematik planı

3.3.1.1. Hiperglisemi ve Hiperozmolarite Tetiklenmesi

Yetişkin fare DKG nöronlarının kültüre edildiği sıvı olan nörobazal A medyumunu (Sigma) 25 mM D-glukoz (nöronlar için optimal bazal glukoz konsantrasyonu) içermektedir (268, 362). Dolayısıyla *in vitro* hiperglisemik stresi tetiklemek için standart hücre kültürü medyumuna (nörobazal A medyumunu) + 25 mM 2-deoksi-D-glukoz eklendi. Bu protokol ile insanda hipergliseminin yol açtığı tablonun modellendiği kabul edildi (363, 364).

Hiperozmolar pleytlerde YG ile inkübe edilen pleytlerle birlikte yüksek glukoz inkübasyonunun neden olacağı hiperozmolariteye eş değer ozmolarite artışı sağlamak için 25 mM D-mannitol eklendi (364).

Her kuyucuk için deney protokolünün yaklaşık 22. saatinde; ilgili doz(lar)da test ajan(lar)ı (anetol trition, ürolitin A, rapamisin, metformin ve ilgili kombinasyonları), DKG hücre dışı ortamının glukoz konsantrasyonuna yönelik kimyasal (YG için seçilmiş pleytlere 25 mM 2-deoksi-D-glukoz, hiperozmolar durum için 25 mM D-mannitol ilave edildi, fizyolojik konsantrasyonda glukoz için seçilmiş pleytlere glukozu yönelik ilave kimyasal verilmedi) ve 10 µL sinir büyüme faktörü (100 ng/mL) ilave edildi.

3.3.1.2. DKG Nöronlarında Yüksek Konsantrasyonda Glukozun Tetiklediği Nörotoksisite Üzerine Potansiyel Nöroprotektif Etkileri Test Edilen Ajanların Dozlarının Belirlenmesi

Kullanılan test ajanlarının *in vitro* konsantrasyonları, literatürden esinlenerek [öncelikli olarak fare DKG hücre kültürü yapılan çalışmalardan, öyle bir çalışma olmadığında farelerde diğer nöron hücre kültürü çalışmalarından veya sıçan nöron hücre kültürü çalışmalarından allometrik ölçüm (365) yöntemiyle] aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

Anetol trition için sırasıyla doz konsantrasyonları: 10 - 30 - 100 µM (34, 262, 263, 366),

Ürolitin A için sırasıyla doz konsantrasyonları: 3 - 10 - 30 µM (352),

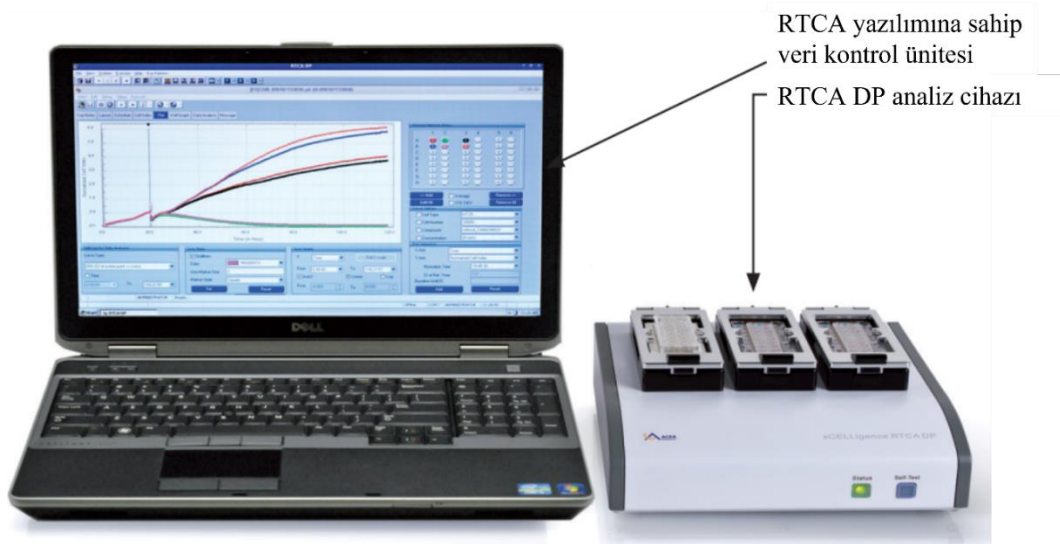
Rapamisin için sırasıyla doz konsantrasyonları: 0.03 – 0.1 – 0.3 µM (332, 367),

Bu üç test ajanıyla kombine edilecek veya tek başına uygulanan metformin konsantrasyonu: 1 mM (368–371).

3.4. Nörotoksisite Deneyleri

In vitro hücre kültürü esaslı nörotoksisite analizleri olarak xCELLigence gerçek zamanlı hücre takip sistemi (ACEA Biosciences, San Diego, ABD); çevresel toksisite testleri, mikrobiyoloji ve hücre fonksiyonu araştırmalarında kullanılmakta olan, hücre davranışı kinetiğinin zaman bağımlı değerlendirilmesine imkân veren yeni nesil bir tekniktir (372). Bu sistemin teknolojik prensipleri literatürde ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (373-375).

Gerçek zamanlı hücre canlılığı analizi; xCELLigence RTCA DP cihazı (ACEA Biosciences, San Diego, ABD) ile gerçekleştirildi (Resim 1 ve 4). RTCA DP cihazı, hücre kültürü protokollerinin gereği olarak (asepsi ve antisepsiye dikkat edilerek) inkübatörde muhafaza edildi. xCELLigence gerçek zamanlı hücre takip sistemi, altın mikro-elektrotları içeren mikro titrasyon plakalarını kullanarak elektrik impedansını ölçen ve bu yolla kültüre edilmiş hücrelerin canlılığını gerçek zamanlı olarak ve süreğen bir usulde takip etmeye olanak veren, yeni nesil bir sitotoksisite analiz sistemidir. xCELLigence RTCA DP cihazı, aynı anda üç adet pleytte bulunan hücrelerin canlılığını, birimsiz olarak hücre indeksi (“*cell index*”-CI) şeklinde sunmaktadır ve her pleytte 16 adet kuyucuk bulunmaktadır (Resim 5). xCELLigence hücre analiz sisteminden elde edilen birimsiz bir veri olarak “hücre indeksi”, yalnızca hücre sayısını değil, hücresel adezyon, hücre canlılığı, hücre morfolojisi, hücre büyümesi, zaman içinde nörit gelişimi ve hücre çoğalmasının da değerlendirilmesini kapsayan bütüncül bir belirteçtir (376).

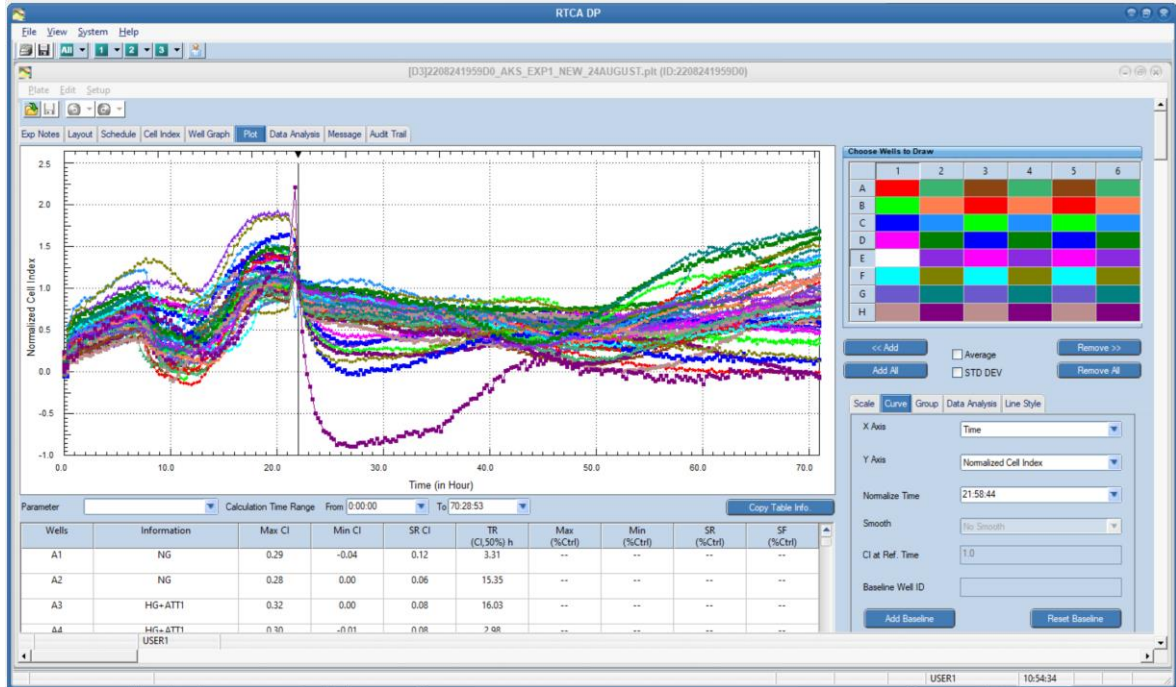


Resim 4. RTCA DP analiz cihazı ve RTCA 1.2.1 yazılımına sahip veri kontrol ünitesi



Resim 5. Altın mikroelektrotlar içeren 16 kuyucuklu E-pleyt

Bu sistem için özel pleytlere (e-pleyt PET, ACEA Biosciences, San Diego, ABD) standart kültür protokolüne göre ekilen DKG nöronlarına protokolde yer alan çalışma gruplarında ilgili miktarda glukoz ve test ajanları eklenerek 70 saat boyunca monitorizasyon sağlandı, her bir çalışma alt-grubunda on beş dakikada bir hücre indeksleri analiz edildi (Resim 6).



Resim 6. RTCA yazılımında görülen DKG nöronları içeren kuyucuklara ait hücre indekslerinin görüldüğü trase örneği.

Not: Her bir trasede; bir kuyucuktan zamanla elde edilen hücre indeksleri tespit edilmektedir. Yatay eksen zamanı ve dikey eksen hücre indeksini ("cell index") göstermektedir. Sağ üstteki renkli kutular, ayrı ayrı değerlendirilmesine imkan veren sırasıyla üç pleyttaki 16'şar adet kuyucuğu temsil etmektedir.

Veri kayıt ve analizinde xCELLigence özel yazılımı (versiyon 1.2.1) kullanıldı. Yaşayan hücre olmadığında (sadece hücre kültür çözeltisi) veya ölü hücreler süspansiyon haline geldiğinde, hücre indeksi sıfıra yaklaşmaktadır. Hücreler elektrodla kaplı yüzeye yapıştığında, ölçülen sinyallerin hücre sayısını lineer olarak yansıtan kayıtlar şeklinde aldığı ve bunun zaman bağımlı olarak bu sistemce ölçüldüğü gösterilmiştir (372).

Hücre indeksleri, sistemin yazılımı aracılığı ile elektriksel impedans değişiklikleri üzerinden hesaplandı. xCELLigence üzerinden kayıt edilen hücre indeks verileri, test ajanlarının uygulandığı yaklaşık 22. saatteki hücre indeksi 1.0 kabul edilerek, ilerleyen 48 saat boyunca 15'er dakikada bir elde edilen bütün hücre indeksi-zaman eğrisi altında kalan alanlar hesaplandı. Şekil 6'da belirtilen her bir deneysel protokol grubu için en az üç farklı kültürden elde edilen nöronlar üzerinde tekrarlandı.

3.5. İstatistiksel Analizler

Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. Shapiro-Wilk normallik testine göre verilerin normal dağıldığı ve bu veriler varjansların homojenlik testinde homojen olarak dağıldığı için; verilerin istatistik analizleri, tek yönlü varyans analizi testi (ANOVA) ve sonrasında her bir alt gruptaki verilerin sayısı ve benzer diğer nörotoksisite çalışmaları da dikkate alınarak (377–381), Fisher'in LSD (*'least significant difference'*- en küçük anlamlı farklılık) post-hoc testi ile gerçekleştirildi. İstatistikler için SPSS v.21 programı ve grafikler için Origin 5.0 programı kullanıldı. *p* değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6. Etik Kurul Onayı

Bu tez çalışmasının deneysel aşaması, KTÜ Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalında gerçekleştirildi. Çalışma, KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 21.02.2021 tarih ve 2020/39 protokol numaralı onayıyla kabul edildi (Ek 1).

3.7. Destekleyen Kuruluş

Tez çalışmasında kullanılan deney hayvanları, kimyasal ve sarf malzemeler; TÜBİTAK tarafından 220S863 protokol numaralı 1002- Hızlı Destek Programı kapsamında desteklendi (Ek 2).

4. BULGULAR

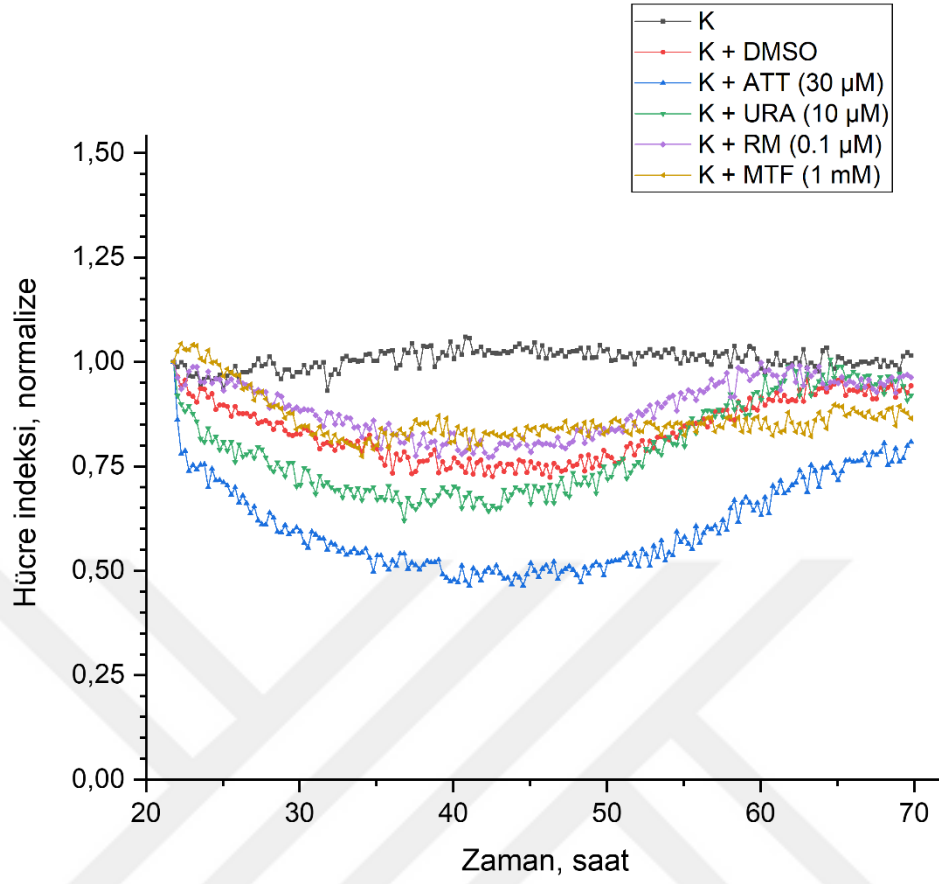
Bu tez çalışması kapsamında sunulan bulguların bir kısmı, uluslararası bir kongrede sunulmuş ve özet bildiri olarak yayımlanmıştır (382).

Bu çalışmada C57BL/6J cinsi farelerden elde edilerek primer kültürü hazırlanmış DKG nöronları kullanıldı. Her bir deneysel protokol en az üç farklı kültürden elde edilen nöronlar üzerinde tekrar edildi.

İzole edilen DKG nöronları E-pleytlere ekilerek (bkz. Yöntem bölümü) 70 saat boyunca 15 dakika zaman aralıklarıyla kuyucukların hücre indeksi ölçümleri xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sistemi ile kaydedildi. DKG nöronları pleyt zeminine tutunmayı sağladığı zaman (~ 22. saatte), Gereç ve Yöntem bölümünde deney grupları listesinde belirtildiği şekliyle, 2-deoksi-D-glukoz veya D-mannitol uygulaması ve test ajanlarının (anetol trition, ürolitin A, rapamisin) ilgili dozlarının ve bu ajanlarının metforminle (1 mM) kombinasyonları halinde, eş zamanlı olarak kuyucuklara eklendi. Test ajanlarının uygulandığı yaklaşık 22. saatteki hücre indeksi 1.0 kabul edilerek, ilerleyen 48 saat boyunca bütün hücre indeksi-zaman eğrisi altında kalan alanlar hesaplandı. Her çalışma grubu için elde edilen eğri altındaki alan değerleri ANOVA- Fisher'in LSD post-hoc testi ile kıyaslandı.

4.1. Test Ajanlarının Fizyolojik Düzeyde Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri

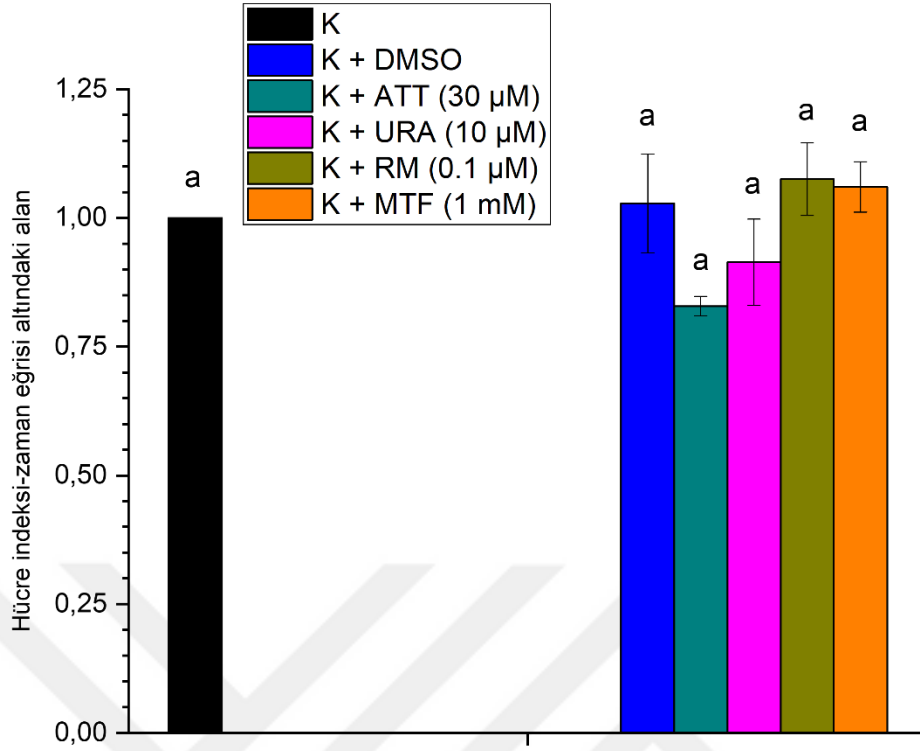
Fizyolojik konsantrasyonda glukoz içeren konvansiyonel hücre kültürü çözeltisinde inkübe edilen DRG nöronlarına; çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO), test ajanları olarak anetol trition (ATT, 30 μ M), ürolitin A (URA, 10 μ M), rapamisin (RM, 0,1 μ M) veya metformin (MTF, 1 mM) uygulaması, fizyolojik seviyelerde glukoz içeren hücre dışı çözeltisi içinde inkübe edilen DKG nöronlarına (kontrol, K) kıyasla hücre indeksi-zaman verilerinden elde edilen grafikte, ortalama eğri altındaki alan (EAA, zaman bağımlı hücre indeksleri eğrisi altındaki alan) değerleri üzerinde anlamlı bir etki meydana getirmedi ($p>0.05$; sırasıyla ortalama EAA değerleri: K: 1, K + DMSO: 1.03 ± 0.1 , K + 30 μ M ATT: 0.83 ± 0.02 , K + 10 μ M URA: 0.92 ± 0.08 , K + 0.1 μ M RM: 1.08 ± 0.07 , K + MTF: 1.06 ± 0.05 ; Şekil 7 ve 8).



Şekil 7. Fizyolojik glukoz içeren konvansiyonel hücre kültürü çözeltisinde inkübe edilen DKG nöronlarında dimetil sülfoksit, anetol trition, ürolitin A, rapamisin ve metformin'in hücre indeksine zamana bağlı etkileri.

K: kontrol, DMSO: dimetil sülfoksit, ATT: anetol trition, URA: ürolitin A, RM: rapamisin, MTF: metformin.

Not: Her bir trase, bir deney grubunu temsilen bir deneyin hücre indekslerini göstermektedir. Trasedeki her bir nokta, 70 saat boyunca 15 dakika aralıklarla elde edilen hücre indeksleridir.



Şekil 8. Fizyolojik glukoz içeren konvansiyonel hücre kültürü çözeltisinde inkübe edilen DKG nöronlarında dimetil sülfoksit, anetol trition, ürolitin A, rapamisin ve metformin'in hücre indeksine etkileri.

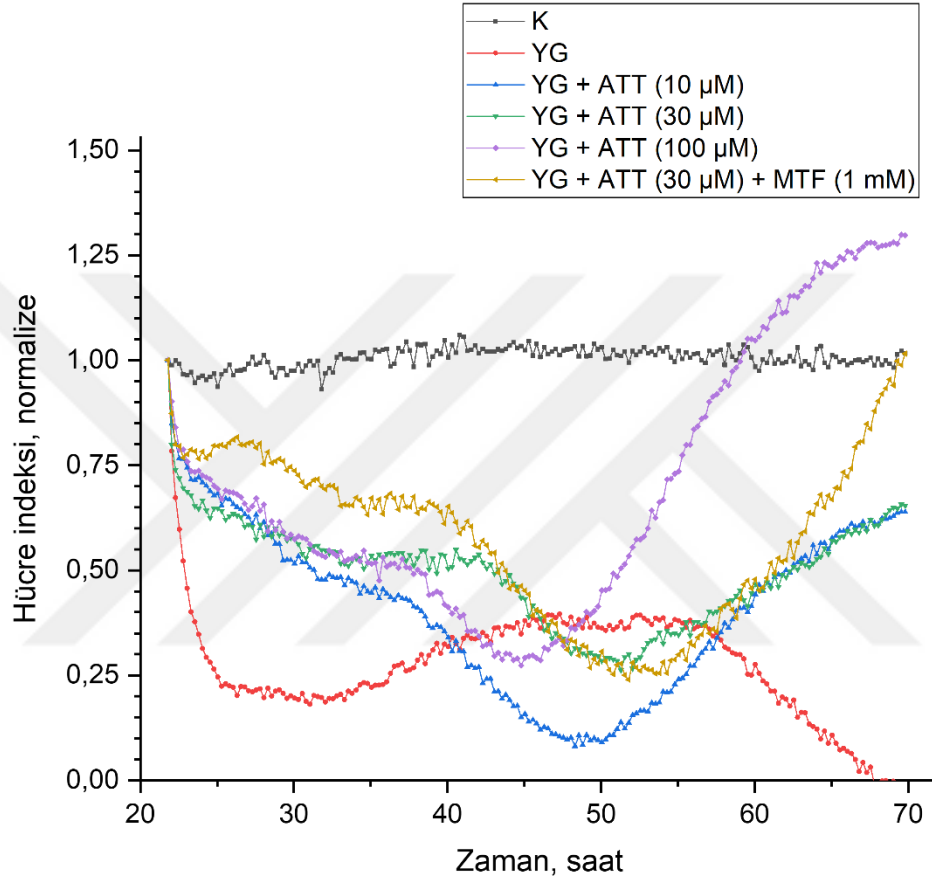
K: kontrol, DMSO: dimetil sülfoksit, ATT: anetol trition, URA: ürolitin A, RM: rapamisin, MTF: metformin.

Not: Aynı harf ile etiketlenen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p > 0.05$) yoktur. Test ajanı uygulanmayan kontrol (K) grubunun hücre indeksi-zaman eğrisi altındaki alan ortalaması 1.0 olarak kabul edilip diğer gruplar bu değere kıyaslanarak normalize edilerek sunulmuştur.

4.2. Yüksek Konsantrasyonda Glukoz Uygulamasının DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri ve Anetol Triton Uygulamasının Yüksek Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri

Yüksek konsantrasyonda glukoz (YG) uygulaması sonrası DKG nöronlarının hücre indeksi-zaman verilerinden elde edilen grafikte ortalama EAA değerleri, kontrol DKG nöronların hücre indekslerine göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p=0.006$; sırasıyla ortalama EAA değerleri: K: 1, YG: 0.58 ± 0.11). YG ile eş zamanlı anetol trition ($30 \mu\text{M}$ veya $100 \mu\text{M}$ dozlarında) veya anetol trition ($30 \mu\text{M}$) + metformin (1 mM) kombinasyonu uygulanan DKG nöronların hücre indeksi-zaman verilerinden elde edilen grafikte ortalama

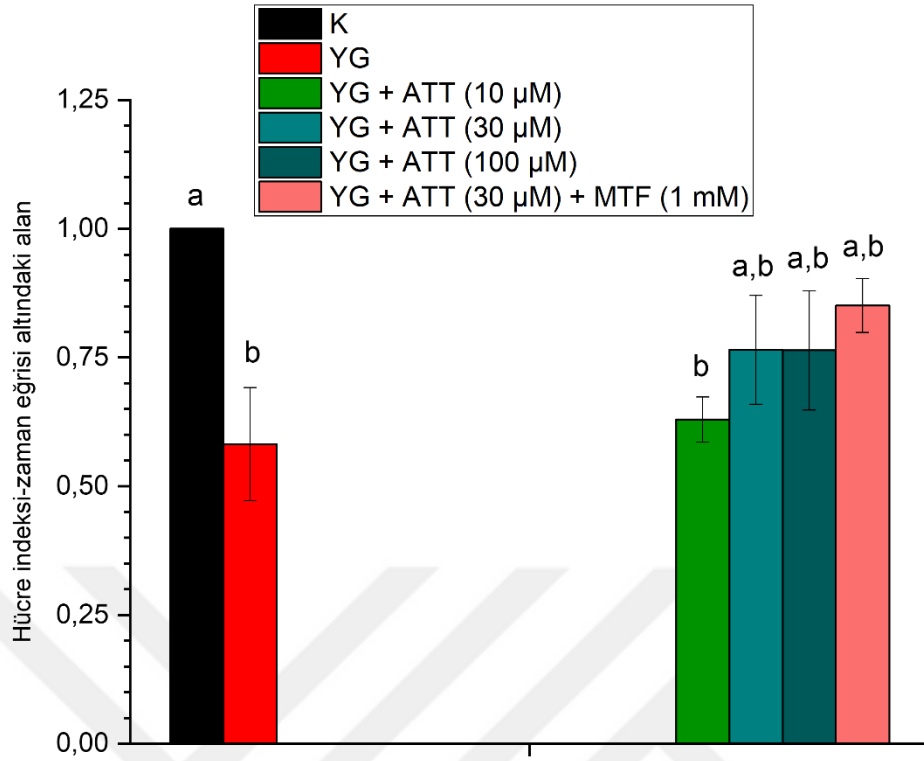
EAA değerleri, sadece YG'ye maruz bırakılan hücrelere göre daha yüksek bulundu (sırasıyla ortalama EAA değerleri: K: 1, YG + 10 μ M ATT: 0.63 ± 0.04 , YG + 30 μ M ATT: 0.76 ± 0.1 , YG + 100 μ M ATT: 0.76 ± 0.12 , YG + 30 μ M ATT + MTF: 0.85 ± 0.05). Ancak bu etki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$, Şekil 9 ve 10).



Şekil 9. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine anetol trition'un tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine zaman bağımlı etkileri.

K: kontrol, YG: yüksek konsantrasyonda glukoz, ATT: anetol trition, MTF: metformin.

Not: Her bir trase, bir deney grubunu temsilen bir deneyin hücre indekslerini göstermektedir. Trasedeki her bir nokta, 70 saat boyunca 15 dakika aralıklarla elde edilen hücre indeksleridir.



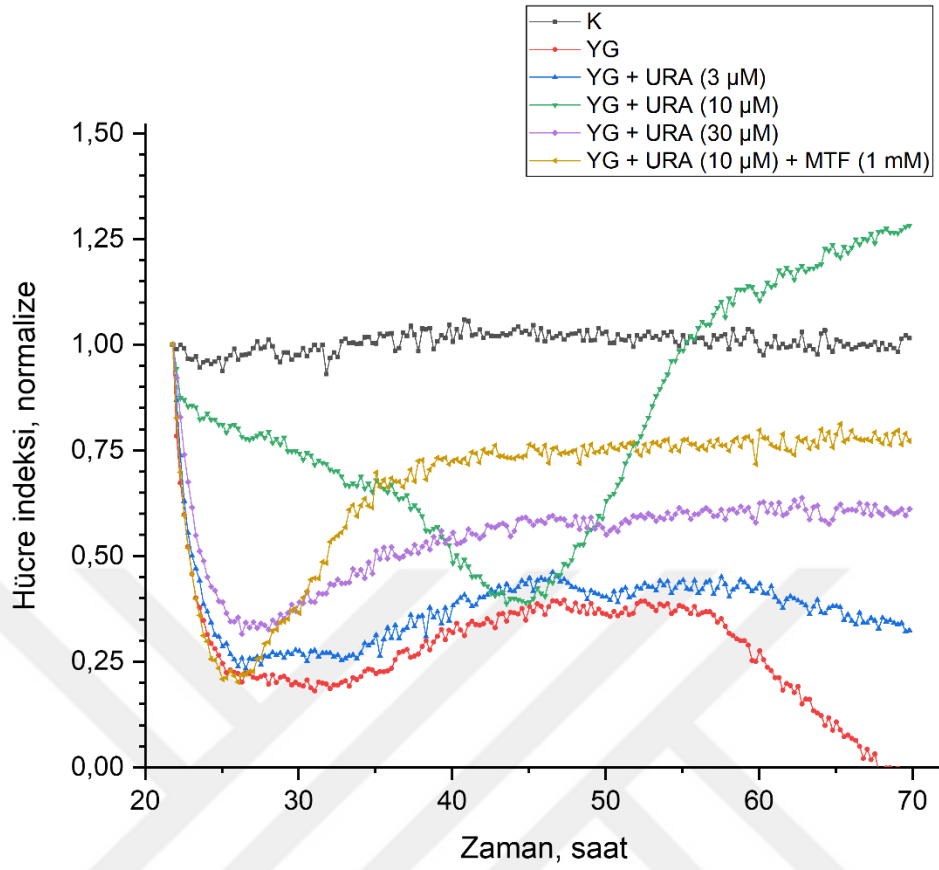
Şekil 10. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine anetol trition'un tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine etkileri.

K: kontrol, YG: yüksek konsantrasyonda glukoz, ATT: anetol trition, MTF: metformin.

Not: Aynı harf ile etiketlenen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p > 0.05$) yoktur. Test ajanı uygulanmayan kontrol (K) grubunun hücre indeksi-zaman eğrisi altındaki alan ortalaması 1.0 olarak kabul edilip diğer gruplar bu değere kıyaslanarak normalize edilerek sunulmuştur.

4.3. Ürolitin A Uygulamasının Yüksek Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri

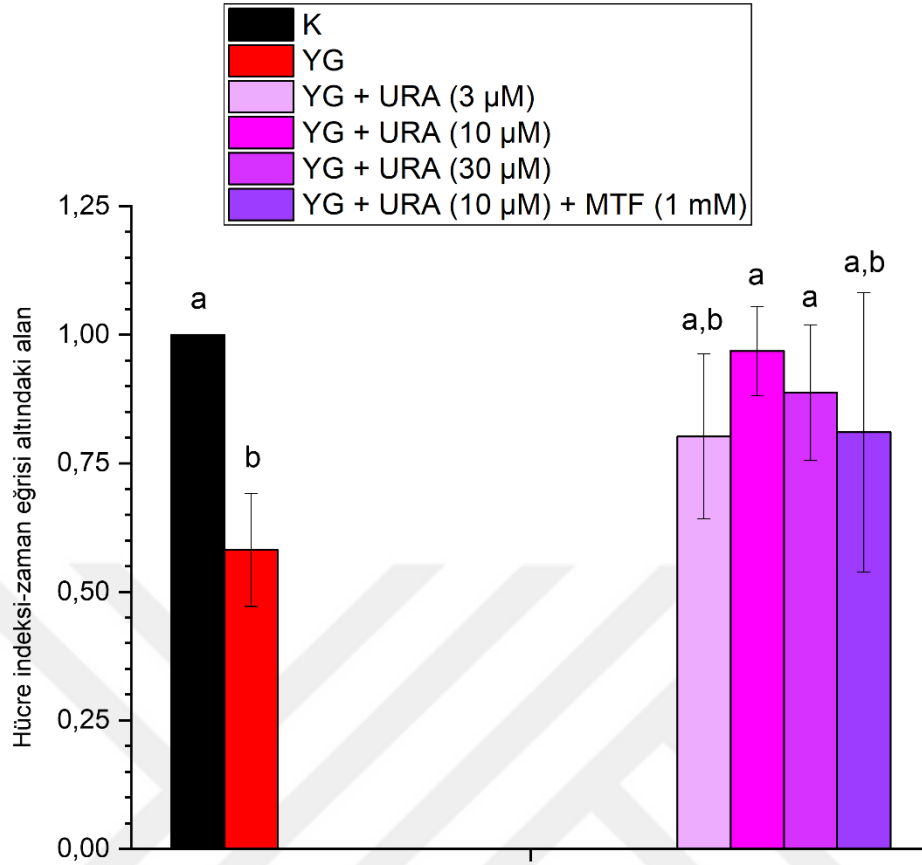
Yüksek konsantrasyonda glukoz ile eşzamanlı ürolitin A (10 µM veya 30 µM) uygulamasının, YG uygulamasının meydana getirdiği hücre indekslerindeki düşüşü anlamlı düzeyde önlediği tespit edildi (sırasıyla, $p=0.01$ ve $p=0.04$). YG ile eşzamanlı ürolitin A (3 µM) veya metformin (1 mM) + ürolitin A (10 µM) uygulamasının, YG uygulamasının meydana getirdiği hücre indekslerindeki düşüş üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığı saptandı ($p > 0.05$; sırasıyla ortalama EAA değerleri: K: 1, YG: 0.58 ± 0.11 , YG + 3 µM URA: 0.80 ± 0.16 , YG + 10 µM URA: 0.15 ± 0.09 , YG + 30 µM URA: 0.89 ± 0.13 , YG + 10 µM URA + MTF: 0.81 ± 0.27 ; Şekil 11 ve 12).



Şekil 11. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine ürolitin A'nın tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine zaman bağımlı etkileri.

K: kontrol, YG: yüksek konsantrasyonda glukoz, URA: ürolitin A, MTF: metformin.

Not: Her bir trase, bir deney grubunu temsilen bir deneyin hücre indekslerini göstermektedir. Trasedeki her bir nokta, 70 saat boyunca 15 dakika aralıklarla elde edilen hücre indeksleridir.



Şekil 12. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine ürolitin A'nın tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine etkileri.

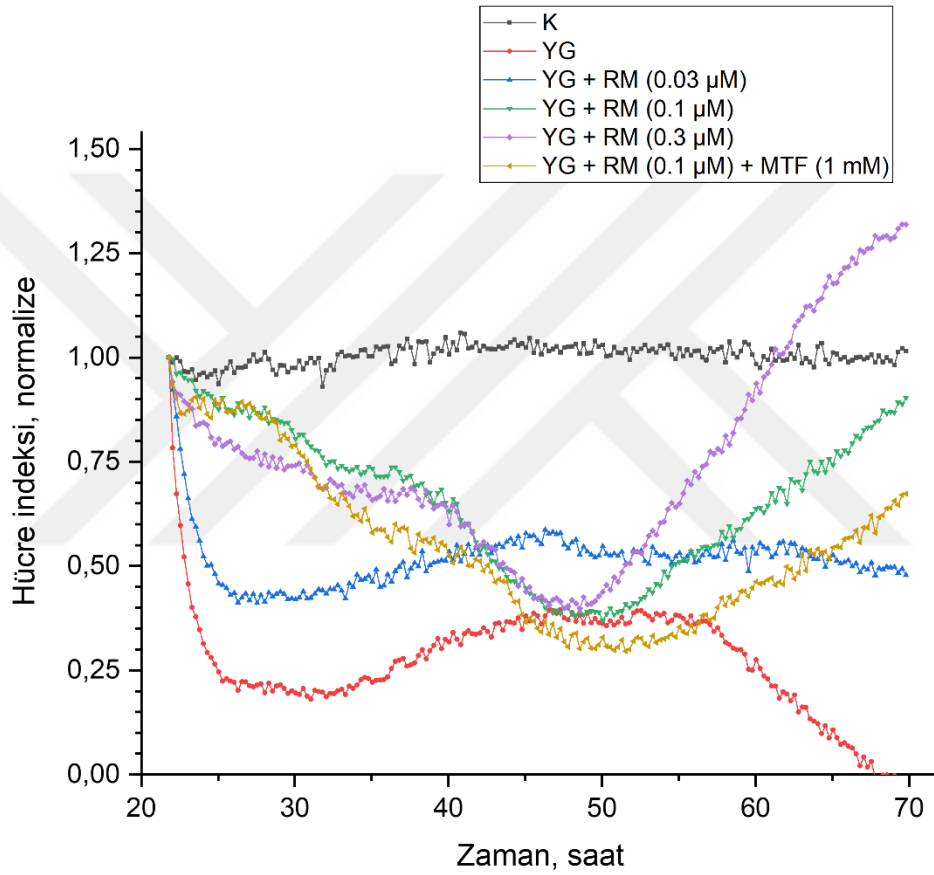
K: kontrol, YG: yüksek konsantrasyonda glukoz, URA: ürolitin A, MTF: metformin.

Not: Aynı harf ile etiketlenen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p > 0.05$) yoktur. Test ajanı uygulanmayan kontrol (K) grubunun hücre indeksi-zaman eğrisi altındaki alan ortalaması 1.0 olarak kabul edilip diğer gruplar bu değere kıyaslanarak normalize edilerek sunulmuştur.

4.4. Rapamisin Uygulamasının Yüksek Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri

Yüksek konsantrasyonda glukoz ile eşzamanlı rapamisin (0.1 µM veya 0.3 µM) uygulamasının, YG uygulamasının meydana getirdiği hücre indekslerindeki düşüşü anlamlı düzeyde önlediği tespit edildi (sırasıyla, $p=0.036$ ve $p=0.008$). YG ile eşzamanlı rapamisin (0.1 µM) + metformin (1 mM) uygulaması sonrası DKG nöronların hücre indeksi-zaman verilerinden elde edilen grafikte ortalama EAA değerlerinin; kontrol DKG nöronların değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı ($p=0.018$), ancak YG'nin meydana getirdiği hücre indekslerindeki düşüş üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığı saptandı ($p > 0.05$). YG ile

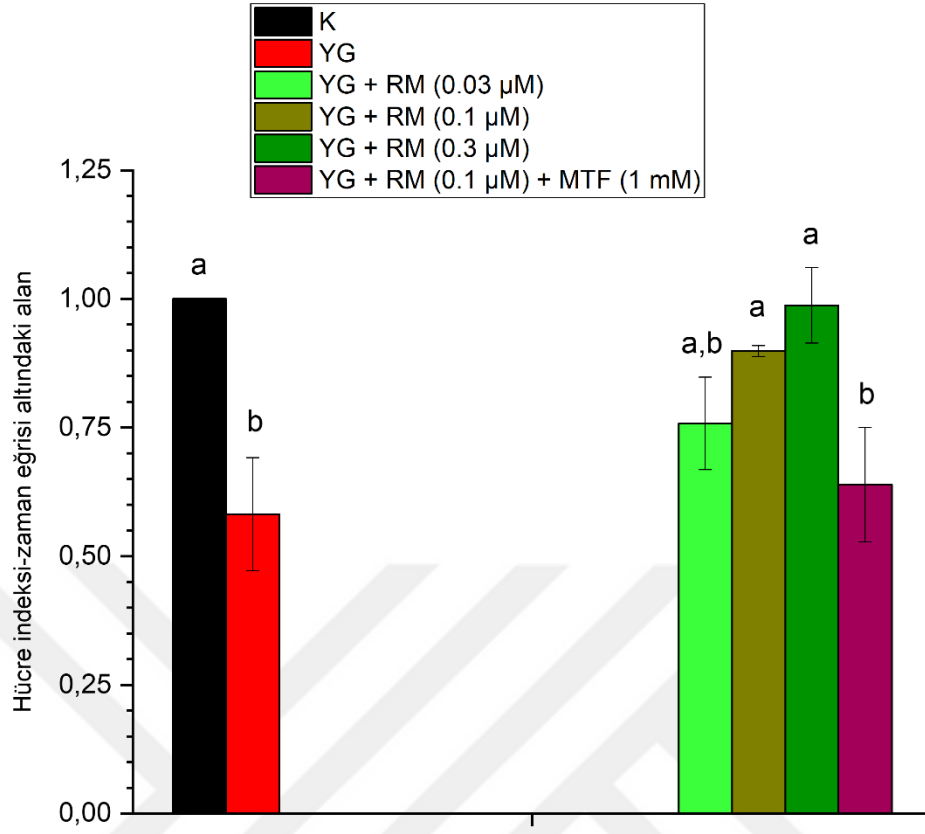
eşzamanlı rapamisin (0.03 μ M) uygulamasının; hem kontrol DKG nöronlarına, hem de YG maruz kalan DKG nöronlarına kıyasla hücre indeksi-zaman verilerinden elde edilen grafikte ortalama EAA değerleri açısından anlamlı bir etki oluşturmadığı tespit edildi ($p>0.05$ ve $p>0.05$; sırasıyla ortalama EAA değerleri: K: 1, YG: 0.58 ± 0.11 , YG + 0.03 μ M RM: 0.76 ± 0.09 , YG + 0.1 μ M RM: 0.90 ± 0.01 , YG + 0.3 μ M RM: 0.99 ± 0.07 , YG + 0.1 μ M RM + MTF: 0.64 ± 0.11 ; Şekil 13 ve 14).



Şekil 13. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine rapamisin'in tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine zaman bağımlı etkileri.

K: kontrol, YG: yüksek konsantrasyonda glukoz, RM: rapamisin, MTF: metformin.

Not: Her bir trase, bir deney grubunu temsilen bir deneyin hücre indekslerini göstermektedir. Trasedeki her bir nokta, 70 saat boyunca 15 dakika aralıklarla elde edilen hücre indeksleridir.



Şekil 14. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine rapamisin'in tek başına ve metformin ile kombinasyonunun hücre indeksine etkileri.

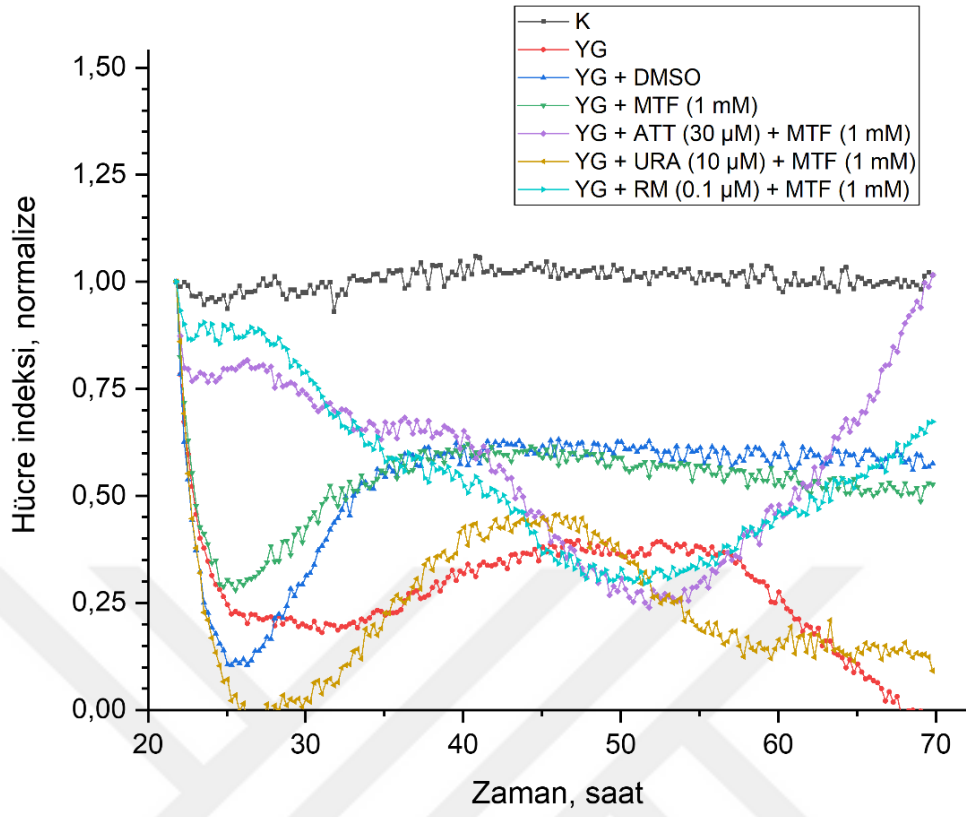
K: kontrol, YG: yüksek konsantrasyonda glukoz, RM: rapamisin, MTF: metformin.

Not: Aynı harf ile etiketlenen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p > 0.05$) yoktur. Test ajanı uygulanmayan kontrol (K) grubunun hücre indeksi-zaman eğrisi altındaki alan ortalaması 1.0 olarak kabul edilip diğer gruplar bu değere kıyaslanarak normalize edilerek sunulmuştur.

4.5. Test Ajanlarının Kombinasyonlar Halinde Uygulanmasının Yüksek Glukoz Konsantrasyonlarında İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri

Yüksek konsantrasyonda glukoz ile eşzamanlı dimetil sülfoksit uygulamasının, YG uygulamasının meydana getirdiği hücre indekslerindeki düşüş üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığı tespit edildi ($p > 0.05$). YG ile eşzamanlı metformin (1 mM) uygulamasının; hem kontrol DKG nöronlarına, hem de YG stresine maruz kalan DKG nöronlarına kıyasla hücre indeksi-zaman verilerinden elde edilen grafikte ortalama EAA değerleri açısından anlamlı bir etki oluşturmadığı saptandı ($p > 0.05$). YG ile eşzamanlı anetol trition (30 µM) +

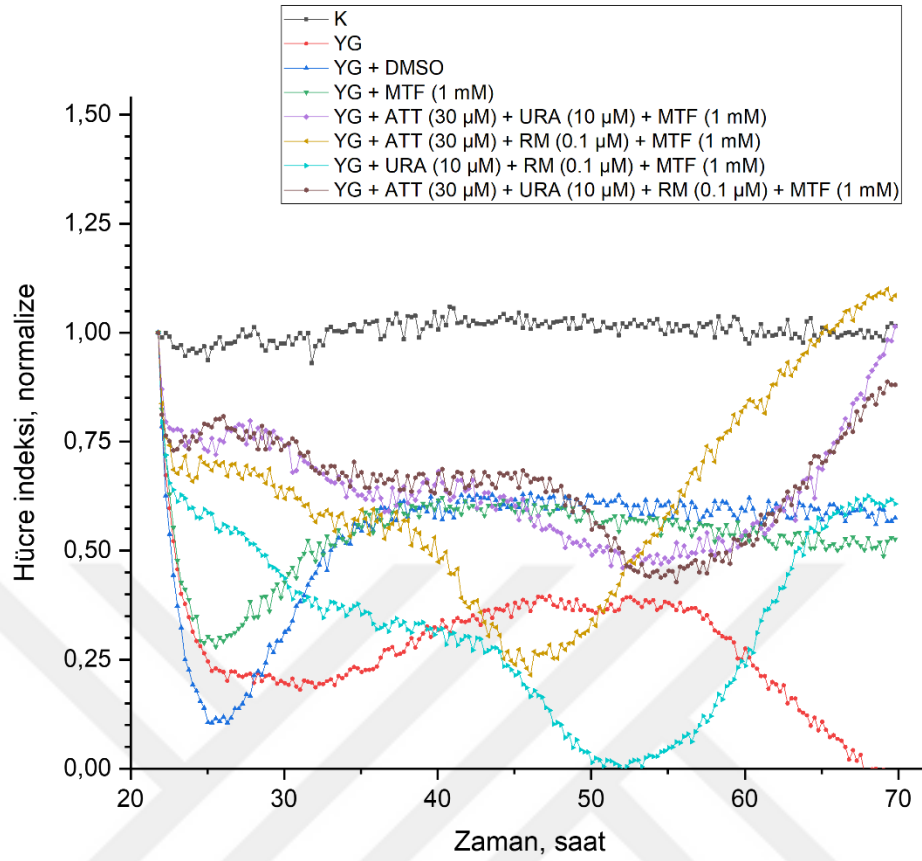
ürolitin A (10 μ M) + metformin veya anetol trition (30 μ M) + rapamisin (0.1 μ M) + metformin (1 mM) uygulamasının; YG uygulamasının meydana getirdiği hücre indekslerindeki düşüşü anlamlı düzeyde önlediği tespit edildi (sırasıyla $p=0.027$ ve $p=0.02$). YG ile eşzamanlı rapamisin (0.1 μ M) + metformin (1 mM) veya ürolitin A (10 μ M) + rapamisin (0.1 μ M) + metformin (1 mM) uygulamasının; YG uygulamasının meydana getirdiği hücre indekslerindeki düşüş üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığı saptandı ($p>0.05$; sırasıyla ortalama EAA değerleri: K: 1, YG: 0.58 ± 0.11 , YG + DMSO: 0.65 ± 0.05 , YG + MTF: 0.74 ± 0.03 , YG + 30 μ M ATT + MTF: 0.85 ± 0.05 , YG + 10 μ M URA + MTF: 0.81 ± 0.27 , YG + 0.1 μ M RM + MTF: 0.64 ± 0.11 , YG + 30 μ M ATT + 10 μ M URA + MTF: 0.92 ± 0.19 , YG + 30 μ M ATT + 0.1 μ M RM + MTF: 0.93 ± 0.05 , YG + 10 μ M URA + 0.1 μ M RM + MTF: 0.59 ± 0.09 , YG + 30 μ M ATT + 10 μ M URA + 0.1 μ M RM + MTF: 0.72 ± 0.18 ; Şekil 15-17).



Şekil 15. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine metformin (1 mM) ve metformin (1 mM) ile diğer bir test ajanının birlikte uygulanmasının hücre indeksine zaman bağımlı etkileri.

K: kontrol, YG: yüksek konsantrasyonda glukoz, DMSO: dimetil sülfoksit, ATT: anetol trition, URA: ürolitin A, RM: rapamisin, MTF: metformin.

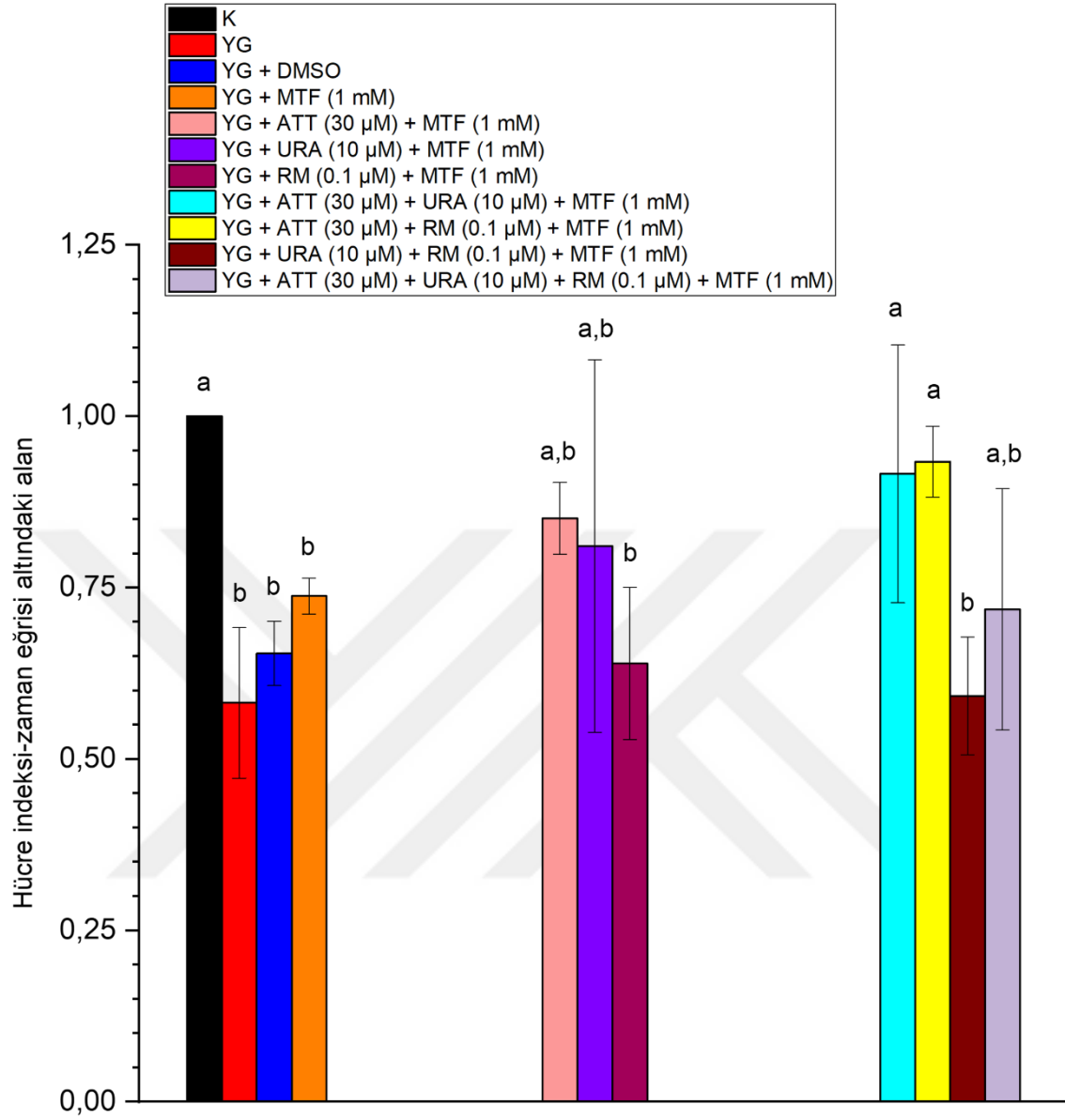
Not: Her bir trase, bir deney grubunu temsilen bir deneyin hücre indekslerini göstermektedir. Trasedeki her bir nokta, 70 saat boyunca 15 dakika aralıklarla elde edilen hücre indeksleridir.



Şekil 16. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine metformin (1 mM) ve metformin (1 mM) ile diğer en az iki test ajanının birlikte uygulanmasının hücre indeksine zaman bağımlı etkileri.

K: kontrol, YG: yüksek konsantrasyonda glukoz, DMSO: dimetil sülfoksit, ATT: anetol trition, URA: ürolitin A, RM: rapamisin, MTF: metformin.

Not: Her bir trase, bir deney grubunu temsilen bir deneyin hücre indekslerini göstermektedir. Trasedeki her bir nokta, 70 saat boyunca 15 dakika aralıklarla elde edilen hücre indeksleridir.



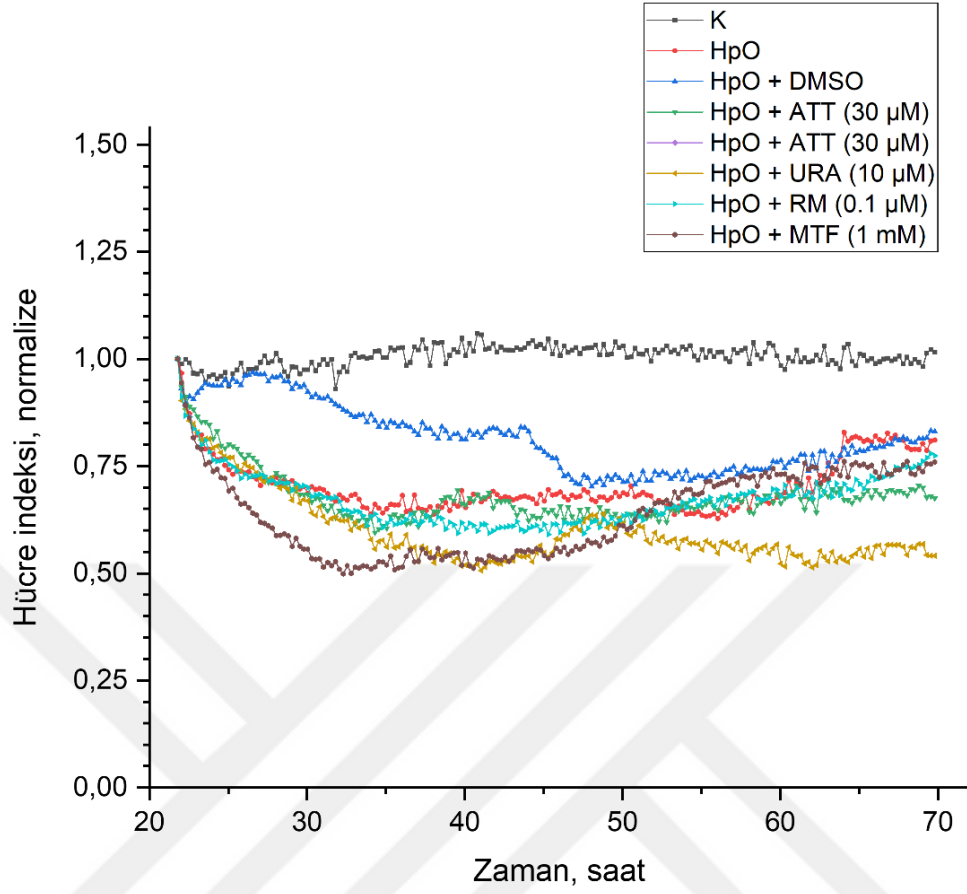
Şekil 17. DKG nöronlarda yüksek konsantrasyonda glukoz stresi üzerine DMSO, metformin ve test ajanlarının metformin ile kombinasyonlarının hücre indeksine zaman bağımlı etkilerinin birlikte gösterimi.

K: kontrol, YG: yüksek konsantrasyonda glukoz, DMSO: dimetil sülfoksit, ATT: anetol trition, URA: ürolitin A, RM: rapamisin, MTF: metformin.

Not: Aynı harf ile etiketlenen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p > 0.05$) yoktur. Test ajanı uygulanmayan kontrol (K) grubunun hücre indeksi-zaman eğrisi altındaki alan ortalaması 1.0 olarak kabul edilip diğer gruplar bu değere kıyaslanarak normalize edilerek sunulmuştur.

4.6. Test Ajanlarının Hiperozmolar Koşullarda İnkübe Edilen DKG Nöronlarında Hücre İndeksleri Üzerine Etkileri

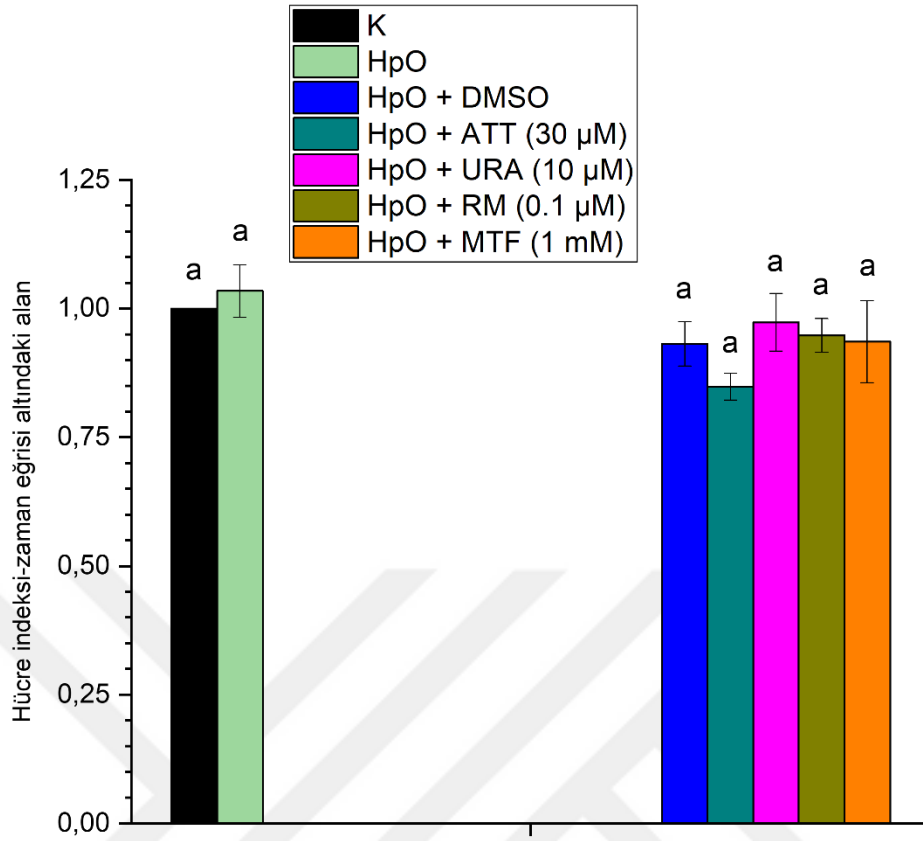
Hiperozmolar (HpO) strese maruz bırakılan DKG nöronlarına; hiperozmolarite tetiklenmesi ile eşzamanlı dimetil sülfoksit, anetol trition (30 μ M), ürolitin A (10 μ M), rapamisin (0.1 μ M) ve metformin (1 mM) uygulaması, kontrol DKG nöronlarına kıyasla hücre indeksi-zaman verilerinden elde edilen grafikte ortalama EAA değerleri açısından anlamlı bir etki meydana getirmedi ($p>0.05$; sırasıyla ortalama EAA değerleri: K:1, HpO: 1.03 ± 0.05 , HpO + DMSO: 0.93 ± 0.04 , HpO +30 μ M ATT: 0.85 ± 0.03 , HpO + 10 μ M URA: 0.97 ± 0.06 , HpO + 0.1 μ M RM: 0.95 ± 0.03 , HpO + 1 m MTF: 0.94 ± 0.08 ; Şekil 18 ve 19).



Şekil 18. DKG nöronlarda hiperozmolar stres üzerine DMSO, metformin ve test ajanlarının hücre indeksine zaman bağımlı etkileri.

K: kontrol, HpO: hiperozmolar, DMSO: dimetil sülfoksit, ATT: anetol trition, URA: ürolitin A, RM: rapamisin, MTF: metformin.

Not: Her bir trase, bir deney grubunu temsilen bir deneyin hücre indekslerini göstermektedir. Trasedeki her bir nokta, 70 saat boyunca 15 dakika aralıklarla elde edilen hücre indeksleridir.



Şekil 19. DKG nöronlarda hiperozmolar stres üzerine DMSO, metformin ve test ajanlarının hücre indeksine etkileri.

K: kontrol, HpO: hiperozmolar, DMSO: dimetil sülfoksit, ATT: anetol trition, URA: ürolitin A, RM: rapamisin, MTF: metformin.

Not: Aynı harfile etiketlenen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p>0.05$) yoktur. Test ajanı uygulanmayan kontrol (K) grubunun hücre indeksi-zaman eğrisi altındaki alan ortalaması 1.0 olarak kabul edilip diğer gruplar bu değere kıyaslanarak normalize edilerek sunulmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada en yaygın kronik hastalıklardan biri olan diyabet hastalık grubunun yaklaşık yarısında görülebilen bir komplikasyon olarak diyabetik nöropati için, toplum sağlığına mortalite ve morbidite maliyeti açısından düşünüldüğünde, patofizyolojinin kapsamlı biçimde belirlenebilme ve etkin bir tedavi yaklaşım geliştirilebilme gayreti son derece önemlidir. Mitokondri disfonksiyonu ve mitofaji/otofaji dismodülasyonu, diyabetik nöropati için kritik birer mekanizma olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu yaklaşımla, mevcut tez çalışması, mitokondri disfonksiyonunu önlediği (anetol trition) ve mitofaji/otofaji modülasyonu yaptığı bilinen (rapamisin, ürolitin A ve metformin ile kombinasyonları) seçilmiş ajanların diyabetik periferik nöropatiyi iyileştirebileceği veya tedavi edebileceği hipotezini *in vitro* düzeyde test etmek üzere tasarlanmıştır ve bu çalışmanın sonuçları özellikle mitofaji/otofaji modülasyonu sağlayan seçilmiş ajanların (ürolitin A ve rapamisin) potansiyel nöroprotektif etkileri olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan ajanların *in vitro* DKG nöron kültüründe nöroprotektif etkilerinin tespiti için, ilk kez xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz yöntemi kullanılmıştır, çalışmanın bu yönüyle de metodolojik özgünlüğü bulunmaktadır.

Fizyolojik konsantrasyonda glukoz içeren konvansiyonel hücre kültürü çözeltilinde inkübe edilen DKG nöronlarına dimetil sülfoksit, test ajanları olarak anetol trition (30 μ M), ürolitin A (10 μ M), rapamisin (0.1 μ M) veya metformin (1 mM) uygulaması, kontrol DKG nöronlarına kıyasla hücre indeksi açısından anlamlı bir etki meydana getirmedi. Normoglisemik koşullarda oksidatif stres, mitokondri disfonksiyonu ve otofajik mekanizmaların homeostatik düzeylerde bulunması durumu, hücresel mekanizmaları modüle eden test ajanlarının DKG nöronların hücre indekslerinde (düşüş veya artış olarak) anlamlı bir değişime neden olmaması durumu ile uyumluluk göstermektedir.

Dorsal kök gangliyon nöronları çok yüksek metabolik aktiviteye sahip olduğundan, kültür vasatının (bu durum için standart Nörobazal-A ortamı) nöronların hayatta kalması ve nörit uzaması için optimum olan 25 mM bazal glukoz içermesi gerekmektedir (383). Bu nedenle, bu çalışmada normoglisemik duruma uygun olarak kültür ortamı 25 mM glukoz içeriyordu ve yüksek glukoz içeren kültür ortamı 25 mM glukoz eklenerek hazırlandı (toplam 50 mM glukoz). Dolayısıyla, bu çalışmada ilave glukoz yaklaşık 450 mg/dL kan glukozunu yansıtmaktadır. Bu protokol kronik hiperglisemiyi kısa sürede taklit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (384) ve diyabetik nöropatiye yol açan anahtar mekanizmalar

olan oksidatif hasar, apoptoz, hücre sağkalımında azalma ve bozulmuş nörit uzamasına neden olduğu gösterilmiştir (271, 385). DKG nöronların yüksek glukoz maruziyeti sonucu elde edilen hücre indekslerinde keskin ve önemli bir azalma kaydedilmiştir. Bu bulgu, kronik hiperglisemi *in vitro* modelinin istenilen düzeyde çalıştığını göstermekle birlikte, bu konuda yapılan çalışmalarla da tutarlılık göstermektedir (385, 386). Böylelikle, anetol trition, ürolitin A, rapamisin ve bu ajanların ilgili dozlarının metformin ile kombinasyonlarının bu çalışmanın hücresel modelinde etkilerini test edilmesini uygun kılmıştır (ve mevcut literatür bilgisine göre, anetol trition ve ürolitin A ajanları ilk kez DKG nöronları üzerinde bu tez çalışması ile test edilmiştir). Bu bulgu ayrıca; diyabetik fare modellerinde DKG nöronları üzerine yüksek glukoz uygulamasının DKG nöron perikaryonlarında azalmaya neden olmadığını, yalnızca aksonal rejenerasyon ve nörit uzantısı gelişiminde azalma veya yavaşlama saptandığını belirten çalışmaların bulgularıyla uyumsuz değildir (17, 387, 388). Çünkü xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminden elde edilen birimsiz bir veri olarak “hücre indeksi”, yalnızca hücre sayısını değil, hücresel adezyon, hücre canlılığı, hücre morfolojisi, hücre büyümesi, zaman içinde nörit gelişimi ve hücre çoğalması da değerlendirilmesini kapsayan bütüncül bir belirteçtir (376). Bu nedenle, diyabete bağlı periferik nöropatinin (demiyelinizasyon, dejenerasyon, hücre bütünlüğünde bozulma, nörit gelişiminde azalma ve nöronal hücre gövdelerinde hasar dahil), xCELLigence analizi ile gerçekleştirilen “hücre indeksi” tarafından yansıtılması uygun bir yaklaşımdır (389). Ayrıca yüksek glukoz düzeyini 2-deoksi-D-glukoz (bir D-glukoz analogu) kullanarak, DKG nöronlarında glikolitik yolağın inhibisyonuna ve hücre için ROT’nin artışına yol açacağından aylar içinde kronik hiperglisemik süreci dakikalar içinde *in vitro* düzeyde taklit edebilmek mümkün olmaktadır (389, 390). 2-Deoksi-D-glukoz kullanılması sonucu glikolitik yolağın inhibisyonu ile hipoglisemideki yetersiz glukoz alımı durumu ile benzeştiği düşünülebilir; ancak 2-deoksi-D-glukoz kullanımının *in vitro* çalışmalarla kronik hiperglisemi sonucu ROT artışını taklit ettiği ve *in vivo* çalışmalarla da sempatik sinir sistemini uyarmakla insüline karşıt-düzenleyici hormonların artışını sağlayarak hiperglisemiye neden olduğu gösterilmiştir (391–393).

Yüksek konsantrasyonda glukoz ile eş zamanlı anetol trition (10 μ M) uygulaması, YG’nin tetiklediği nörotoksiteyi önleyemediği; anetol trition (30 μ M veya 100 μ M dozlarında) veya anetol trition (30 μ M) + metformin (1 mM) kombinasyonu uygulanan DKG hücrelerin ortalama hücre indeksi değerleri, sadece YG’ye maruz bırakılan hücrelere göre

istatistiksel açıdan anlamlı olmayacak düzeyde daha yüksek olduğu saptandı. Bu bulgu, anetol trition'un mitokondriyal kompleks I aracılı ROT'yi önlemesi ve sitozolik ROT üretimine müdahil olmaması (34) ile DKG nöronlarında hipergliseminin etki mekanizmasının mitokondri kökenli oksidatif strese çok sitozolik ROT artışına bağlı olduğuna dair mevcut literatürle tutarlılık göstermektedir (384, 394). Bu çalışmanın anetol trition ile ilgili bulguları özellikle, yüksek glukoz konsantrasyonlarının DKG nöronlarında mitokondri fonksiyonuna etkisi olmadığı, insülin sinyalleşmesindeki düzensizliklerin mitokondri disfonksiyonuna neden olduğu saptanan Huang ve ark.nın çalışmasının bulguları ile uyumludur (387).

Metformin, AMPK/mTOR yolağını aktive ederek otofaji modülasyonu sağlayan antidiyabetik ajandır (322, 323). Bu çalışmanın metformin veya anetol trition ile metformin kombinasyonunun hiperglisemik nörotoksisiteyi anlamlı düzeyde önleyememesine yönelik bulgusu, AMPK/mTOR yolağı işlevini birincil olarak mitokondri üzerinden sağladığına yönelik çalışmaların bulgularıyla uyumludur (395–398).

Ürolitin A, hücre içinde birçok metabolik yolağı aktive ettiği tespit edilmiştir: Wnt/ β -catenin yolağı ile hücre proliferasyonunda, beclin-1 yolağı ile otofaji tetiklemesinde, PI3K/Akt/mTOR yolağı ile hücre büyümesi ve canlılığının sürdürülmesinde ve sitozolik ROT'nin azalmasında, AMPK/mTOR yolağı ile ROT'nin azalmasında rol oynamaktadır (35, 399–401). Bu çalışmada, YG ile eşzamanlı ürolitin A uygulamasının, YG'nin tetiklediği nörotoksisiteyi doz bağımlı olarak anlamlı biçimde önlediği; ancak YG ile metformin (1 mM) + ürolitin A (10 μ M) uygulamasının, YG'nin tetiklediği nörotoksisiteyi anlamlı olarak önleyemediği saptandı. Ürolitin A'nın hücre içi birçok metabolik yolağı aktive ettiği göz önüne alındığında hem sitozolik hem de mitokondriyal ROT'nin azalmasına yol açarak nöroprotektif etki göstermesi, mevcut literatür bulguları ile uyumludur (399-401). Metformin ile kombinasyonunda bu nöroprotektif etkinin gözlenemeyişine, her iki test ajanının AMPK/mTOR yolağı ile mitokondriyal fonksiyonlarda daha baskın sinyalleşmesi neden olabilir; bu olasılığın kanıtlanması için mitokondriyal enzim işaretleyicileri veya mitokondriyal ROT'ye yönelik belirteçler kullanılarak ilave deneysel protokollere gereksinim vardır.

Rapamisin, mTOR inhibitörü olup, hücre içi ROT'yi azaltarak etki göstermektedir. mTOR; protein sentezini, hücre çoğalmasını, hücre hareketliliğini, hücre canlılığını, otofajiyi ve transkripsiyonu düzenleyen bir serin/treonin protein kinazdır. Önemli bir

mitofaji/otofaji modülatörü olan rapamisin'in (330); DKG hücre kültürü düzeyinde nöroprotektif etkisi (331, 402), DKG'de nöronal gelişime olan etkisi (332, 403, 404), streptozotosinle tetiklenmiş diyabet modelinde hiperglisemik DKG hücre kültüründe nöroprotektif etkisi (333) bilinen rapamisin, DKG hücre kültüründe hipergliseminin tetiklediği nörotoksisiteye olan etkileri diyabete yatkın genetik modifiye hayvan modelinde ilk kez bu çalışmada gerçekleştirildi ve anetol trition ve ürolitin A test ajanlarının yanında pozitif kontrol olarak belirlendi. Bu çalışmada, YG ile eşzamanlı rapamisin uygulamasının, YG'nin tetiklediği nörotoksisiteyi doz bağımlı olarak anlamlı biçimde önlediği tespit edildi ve bu bulgu yukarıda belirtilmiş olan benzeri çalışmalarla uyumlu idi; ancak YG ile metformin (1 mM) + rapamisin (0.1 µM) uygulamasının, YG'nin tetiklediği nörotoksisiteyi anlamlı olarak önleyemediği saptandı. mTOR yolağı, hem sitozol, hem de mitokondride de işlev görmekle birlikte, daha yüksek mTOR seviyelerine sahip hücrelerin ATP üretimi için mitokondrinin iç zarındaki oksidatif fosforilasyondan ziyade sitozolde gerçekleşen glikolize daha fazla gereksinim olduğunu saptayan çalışmalar bulunmaktadır (405, 406). Bu nedenle, metformin ile rapamisin kombinasyonunda nöroprotektif etkinin gözlenemeyişine, her iki test ajanının mTOR yolağı ile mitokondriyal fonksiyonlarda daha baskın sinyalleşmesi neden olabilir; bu olasılığın kanıtlanması için mitokondriyal enzim işaretleyicileri veya mitokondriyal ROT'ye yönelik belirteçler kullanılarak ilave deneysel protokollere gereksinim vardır.

Metformin ve diğer test ajanları YG ile birlikte uygulandığında, anetol trition (30 µM) + ürolitin A (10 µM) + metformin (1 mM) veya anetol trition (30 µM) + rapamisin (0.1 µM) + metformin (1 mM) kombinasyonu, YG'nin tetiklediği nörotoksisiteye karşı koruyucu etki sağladığı tespit edildi. Her bir test ajanı, ayrı ayrı düşünüldüğünde bile, karmaşık moleküler yollara sahip olduğundan; bu kombinasyonların nöroproteksiyon sağlayabilmesini mevcut verilerle moleküler düzeyde açıklamaya çalışmak oldukça zordur. Hücre içi kümülatif ROT'ye, mitokondri membran potansiyeline ve mitokondriyal ROT'ye yönelik belirteçler kullanılarak ilave deneysel protokoller, bu kombinasyonların etkinliğinin moleküler mekanizmalarını açıklığa kavuşturabilecektir.

Diabetes mellituslu bireylerde karşılaşılan bir diğer komplikasyon olan hiperozmolar durum da hücrenin ilave edilen glukozla eş ozmolaritede mannitole maruz bırakılmasıyla taklit edildi ve eş zamanlı olarak anetol trition, ürolitin A, rapamisin ve metforminin etkileri test edildi. Mannitol uygulaması, fizyolojik konsantrasyonda glukoz içeren hücre dışı

çözültide inkübe edilen DKG nöronlarına kıyasla herhangi bir toksik etki meydana getirmediği tespit edildi ve hiperozmolar strese eş zamanlı test ajanlarının uygulanması, herhangi bir nörotoksisiteye veya hücre indekslerinde anlamlı bir artışa neden olmadığı saptandı. Böylelikle, YG'nin meydana getirdiği nörotoksisitenin, hiperozmolariteden kaynaklanmadığı sonucuna varıldı.

Mevcut çalışmanın en belirgin kısıtlılığı, *in vitro* bir çalışma olmasıdır ve bulguların klinik ortama başarılı bir şekilde aktarılması için hücresel modelin başlı başına kendi sınırlamaları vardır. Yine de klinik öncesi çalışmalar, klinik kullanıma ilerlemek için aday ajanların potansiyel yararlı etkilerini kanıtlamak için gerekli ilk adımlardır. İkinci olarak, test ajanlarının DKG nöronlarında moleküler düzeyde hangi mekanizmanın işlediğinin (mitokondri fonksiyonlarını modüle etme, mitokondriyal veya sitozolik ROT'nin oluşumunu önleme, otofaji veya mitofaji modülasyonu) teyit edilememiş olduğudur, mekanizma için öngörülerin test ajanları ve DKG nöronlarının glukoz metabolizması hakkında daha önce yapılmış çalışmalardan edinilen veriler üzerinden değerlendirilmek durumunda kalmıştır. Örneğin, ürolitin A hem otofaji hem de mitofaji modülatörü olmasına rağmen, Ahsan ve ark. bir çalışmasında iskemik sinir hasarı modelinde ürolitin A'nın nöroprotektif etkilerinin mitofaji üzerinden değil, otofajik yollar üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir (407). Bu durum, önceden etki mekanizması bilinen kimyasal ajanların yeni keşfedilen etkilerinin bilinen yollar üzerinden gerçekleşemeyebileceğine bir örnek teşkil etmektedir. Yine de; belirli moleküler yolları aktive ettiği bilinen ajanların gerçekleştirilen kontrollü deneylerdeki olası etki mekanizmalarının, elde edilen verilere dayalı olarak imkanlar dahilinde tartışılabilmesine; 1928 yılında Frederick Griffith'in bakterilerin kalıtsal bilgiye sahip olabileceğini ve transformasyon yoluyla bu kalıtsal bilgiyi birbirine aktardıklarını (408) DNA molekülünün keşfinden yıllar önce kanıta dayalı olarak öngördüğü tarihi değeri olan çalışması örnek olarak gösterilebilir.

Bu tez çalışması ile deneysel hiperglisemik nöropati için *in vitro* bir modelde birimsiz ancak (hücre sayısı, hücresel adezyon, hücre canlılığı, hücre morfolojisi, hücre büyümesi, zaman içinde nörit gelişimi parametrelerinin bileşkesi tarafından etkilenen/belirlenen) bir dinamik hücre izleme tekniği (hücre indeksi) kullanılarak, anetol trition, ürolitin A, rapamisin ve bu test ajanlarının yerleşik bir antidiyabetik ajan olan metformin ile kombinasyonlarının etkileri araştırıldı ve özellikle mitofaji/otofaji modülasyonu sağlayan ürolitin A ve rapamisinin DKG nöronlarında konsantrasyon bağımlı olarak nöroprotektif

kapasiteye sahip olduğuna dair özgün kanıtlar elde edildi. Bu çalışmanın sonuçları, daha ileri *in vivo* prelinik ve klinik çalışma yapılmasını gerektirmektedir ve bu nöroprotektif etkilere aracılık eden moleküler mekanizmalar hakkında kanıt sağlamak için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.



6. KAYNAKLAR

1. Reusch JEB (2003). Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: What is it about glucose? *J Clin Invest* 112: 986–988.
2. Petersmann A, Nauck M, Müller-Wieland D, Kerner W, Müller U, Landgraf R, Freckmann G, Heinemann L (2018). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 126: 406–410.
3. Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P (2018). Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Can J Diabetes* 42: S10–S15.
4. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Hilliard ME, Isaacs D, Johnson EL, Kahan S, Khunti K, Leon J, Lyons SK, Perry ML, Prahalad P, Pratley RE, Seley JJ, Stanton RC, Gabbay RA (2023). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of care in diabetes. *Diabetes Care* 46: S19–S40.
5. Türkiye İstatistik Kurumu (2020). "Türkiye Sağlık Araştırması" [online]. Available from: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Turkiye-Saglik-Arastirmasi-2019-33661>. [Accessed 20 November 2023].
6. Satman I, Bayirlioglu S, Okumus F, Erturk N, Yemenici M, Cinemre S, Gulfidan G, Arga KY, D. Merih Y, Issever H (2023). Estimates and forecasts on the burden of prediabetes and diabetes in adult and elderly population in Türkiye. *Eur J Epidemiol* 38: 313–323.
7. International Diabetes Federation (2019). *IDF Diabetes Atlas*, 9th edition, Brussels, Belgium; Sayfa: 33-7.
8. Bommer C, Heesemann E, Sagalova V, Manne-Goehler J, Atun R, Bärnighausen T, Vollmer S (2017). The global economic burden of diabetes in adults aged 20–79 years: A cost-of-illness study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5: 423–430.
9. Meyer C, Dostou JM, Welle SL, Gerich JE (2002). Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E419–E427.
10. Nicolson GL (2014). Mitochondrial dysfunction and chronic disease: Treatment with natural supplements. *Integr Med (Encinitas)* 13: 35–43.
11. Pizzorno J (2014). Mitochondria- Fundamental to life and health. *Integr Med (Encinitas)* 13: 8–15.

12. Smith RAJ, Hartley RC, Murphy MP (2011). Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. *Antioxid Redox Signal* 15: 3021–3038.
13. Yang H, Sloan G, Ye Y, Wang S, Duan B, Tesfaye S, Gao L (2020). New perspective in diabetic neuropathy: From the periphery to the brain, a call for early detection, and precision medicine. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 929.
14. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SEM, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, Witte DR, Fuller JH (2005). Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 352: 341–350.
15. Jin HY, Park TS (2015). Can nerve conduction studies detect earlier and predict clinical diabetic neuropathy? *J Diabetes Investig* 6(1): 18-20.
16. Younger D, Bronfin L (1996). Overview of diabetic neuropathy. *Semin Neurol* 16(2): 107-13.
17. Fernyhough P, Huang TJ, Verkhatsky A (2003). Mechanism of mitochondrial dysfunction in diabetic sensory neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 8(4): 227-35.
18. Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group (2010). Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 33(10): 2285-93.
19. Patel K, Horak H, Tiriyaki E (2021). Diabetic neuropathies. *Muscle Nerve* 63(1): 22-30.
20. Moxey PW, Gogalniceanu P, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Jones KJ, Thompson MM, Holt PJ (2011). Lower extremity amputations- A review of global variability in incidence. *Diabet Med* 28(10): 1144-53.
21. Amoah VMK, Anokye R, Acheampong E, Dadson HR, Osei M, Nadutey A (2018). The experiences of people with diabetes-related lower limb amputation at the Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana. *BMC Res Notes* 11(1): 66.
22. Fernyhough P, Roy Chowdhury SK, Schmidt RE (2010). Mitochondrial stress and the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Expert Rev Endocrinol Metab* 5(1): 39-49.
23. Picard M, Turnbull DM (2013). Linking the metabolic state and mitochondrial DNA in chronic disease, health, and aging. *Diabetes* 62(3): 672-8.
24. Sleigh A, Raymond-Barker P, Thackray K, Porter D, Hatunic M, Vottero A, Burren C, Mitchell C, McIntyre M, Brage S, Carpenter TA, Murgatroyd PR, Brindle KM, Kemp GJ, O'Rahilly S, Semple RK, Savage DB (2011). Mitochondrial dysfunction in patients with primary congenital insulin resistance. *J Clin Invest* 121(6): 2457-61.

25. Kobayashi M, Zochodne DW (2020). Diabetic polyneuropathy: Bridging the translational gap. *J Peripher Nerv Syst* 25(2): 66-75.
26. Brownlee M (1994). Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 43: 836–841.
27. Nicholls DG, Budd SL (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80(1): 315-60.
28. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779): 787-90.
29. Bhattacharya D, Mukhopadhyay M, Bhattacharyya M, Karmakar P (2018). Is autophagy associated with diabetes mellitus and its complications? A review. *EXCLI J* 17: 709-720.
30. Mizushima N (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21(22): 2861-73.
31. Youle RJ, Narendra DP (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1): 9-14.
32. Cheng W, Zhao F, Tang C-Y, Li XW, Luo M, Duan S-B (2018). Comparison of iohexol and iodixanol induced nephrotoxicity, mitochondrial damage and mitophagy in a new contrast-induced acute kidney injury rat model. *Arch Toxicol* 92(7): 2245-2257.
33. Chu C, Li D, Zhang S, Ikejima T, Jia Y, Wang D, Xu F (2018). Role of silibinin in the management of diabetes mellitus and its complications. *Arch Pharm Res* 41: 785–796.
34. Demaille D, Pasdois P, Sémont A, Dos Santos P, Diolez P (2019). An old medicine as a new drug to prevent mitochondrial complex I from producing oxygen radicals. *PLoS One* 14(5): e0216385.
35. Andreux PA, Blanco-Bose W, Ryu D, Burdet F, Ibberson M, Aebischer P, Auwerx J, Singh A, Rinsch C (2019). The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat Metab* 1(6): 595-603.
36. Wang H, Fu J, Xu X, Yang Z, Zhang T (2021). Rapamycin activates mitophagy and alleviates cognitive and synaptic plasticity deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 76: 1707–1713.
37. Cooper SJ (2008). From Claude Bernard to Walter Cannon. Emergence of the concept of homeostasis. *Appetite* 51(3): 419-27.

38. De Luca LA Jr. (2022) A critique on the theory of homeostasis. *Physiol Behav* 247: 113712.
39. Keha EE, Küfrevioğlu Öİ (2020). *Biyokimya*, 13. Baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum; Sayfa: 497-518.
40. Lee HJ, Moon J, Chung I, Chung JH, Park C, Lee JO, Han JA, Kang MJ, Yoo EH, Kwak SY, Jo G, Park W, Park J, Kim KM, Lim S, Ngoei KRW, Ling NXY, Oakhill JS, Galic S, Murray-Segal L, Kemp BE, Mantzoros CS, Krauss RM, Shin MJ, Kim HS (2019). ATP synthase inhibitory factor 1 (IF1), a novel myokine, regulates glucose metabolism by AMPK and Akt dual pathways. *FASEB J* 33(12): 14825-14840.
41. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013). Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 36(10): 587-97.
42. Bano G (2013). Glucose homeostasis, obesity and diabetes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 27(5): 715-26.
43. Gerich JE (2010). Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: Therapeutic implications. *Diabet Med* 27(2): 136-42.
44. Ismail A, Tanasova M (2022). Importance of GLUT transporters in disease diagnosis and treatment. *Int J Mol Sci* 23(15): 8698.
45. Deng D, Yan N (2016). GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters. *Protein Sci* 25(3): 546-58.
46. Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, Michalek RD, Rudolph MC, Deoliveira D, Anderson SM, Abel ED, Chen BJ, Hale LP, Rathmell JC (2014). The glucose transporter GLUT1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab* 20(1): 61-72.
47. Augustin R (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62(5): 315-33.
48. Mueckler M, Thorens B (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* 34(2-3): 121-38.
49. Vazquez A, Liu J, Zhou Y, Oltvai ZN (2010). Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited. *BMC Syst Biol* 4: 58.

50. Flamholz A, Noor E, Bar-Even A, Liebermeister W, Milo R (2013). Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(24): 10039-44.
51. Trisrivirat D, Sutthaphirom C, Pimviriyakul P, Chaiyen P (2022). Dual activities of oxidation and oxidative decarboxylation by flavoenzymes. *Chembiochem* 23(11): e202100666.
52. Franco R, Serrano-Marín J (2023). The unbroken Krebs cycle. Hormonal-like regulation and mitochondrial signaling to control mitophagy and prevent cell death. *Bioessays* 45(3): e2200194.
53. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol* 37: 101674.
54. Zhang Y, Xu D, Huang H, Chen S, Wang L, Zhu L, Jiang X, Ruan X, Luo X, Cao P, Liu W, Pan Y, Wang Z, Chen Y (2014). Regulation of glucose homeostasis and lipid metabolism by PPP1R3G-mediated hepatic glycogenesis. *Mol Endocrinol* 28(1): 116-26.
55. Kim H, Zheng Z, Walker PD, Kapatos G, Zhang K (2017). CREBH maintains circadian glucose homeostasis by regulating hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. *Mol Cell Biol* 37(14): e00048-17.
56. Giménez-Cassina A, Garcia-Haro L, Choi CS, Osundiji MA, Lane EA, Huang H, Yildirim MA, Szlyk B, Fisher JK, Polak K, Patton E, Wiwczar J, Godes M, Lee DH, Robertson K, Kim S, Kulkarni A, Distefano A, Samuel V, Cline G, Kim YB, Shulman GI, Danial NN (2014). Regulation of hepatic energy metabolism and gluconeogenesis by BAD. *Cell Metab* 19(2): 272-84.
57. Soto-Mota A, Norwitz NG, Evans RD, Clarke K (2022). Exogenous d-β-hydroxybutyrate lowers blood glucose in part by decreasing the availability of L-alanine for gluconeogenesis. *Endocrinol Diabetes Metab* 5(1): e00300.
58. Chen L, Zhang Z, Hoshino A, Zheng HD, Morley M, Arany Z, Rabinowitz JD (2019). NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. *Nat Metab* 1: 404-15.
59. Janson LW, Tischler ME (2012). *Medical Biochemistry: The Big Picture*, 1st ed., The McGraw-Hill Companies, New York, Sayfa: 66.

60. Pendharkar SA, Asrani VM, Xiao AY, Yoon HD, Murphy R, Windsor JA, Petrov MS (2016). Relationship between pancreatic hormones and glucose metabolism: A cross-sectional study in patients after acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311(1): G50-8.
61. DiGruccio MR, Mawla AM, Donaldson CJ, Noguchi GM, Vaughan J, Cowing-Zitron C, van der Meulen T, Huising MO (2016). Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Mol Metab* 5(7): 449-458.
62. Beddows CA, Dodd GT (2021). Insulin on the brain: The role of central insulin signalling in energy and glucose homeostasis. *J Neuroendocrinol* 33(4): e12947.
63. Wang CH, Wang CC, Huang HC, Wei YH (2013). Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes. *FEBS J* 280(4): 1039-50.
64. Leibiger B, Wahlander K, Berggren PO, Leibiger IB (2000). Glucose-stimulated insulin biosynthesis depends on insulin-stimulated insulin gene transcription. *J Biol Chem* 275(39): 30153-6.
65. D'Alessio D (2011). The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 13 (Suppl 1): 126-32.
66. Spolitu S, Okamoto H, Dai W, Zadroga JA, Wittchen ES, Gromada J, Ozcan L (2019). Hepatic glucagon signaling regulates PCSK9 and low-density lipoprotein cholesterol. *Circ Res* 124(1): 38-51.
67. Hauge-Evans AC, Anderson RL, Persaud SJ, Jones PM (2012). Delta cell secretory responses to insulin secretagogues are not mediated indirectly by insulin. *Diabetologia* 55(7): 1995-2004.
68. Svendsen B, Holst JJ (2021). Paracrine regulation of somatostatin secretion by insulin and glucagon in mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 64(1): 142-151.
69. Klaff LJ, Taborsky GJ Jr (1987). Pancreatic somatostatin is a mediator of glucagon inhibition by hyperglycemia. *Diabetes* 36(5): 592-6.
70. Liao Z, Li ZS, Lu Y, Wang WZ (2007). Microinjection of exogenous somatostatin in the dorsal vagal complex inhibits pancreatic secretion via somatostatin receptor-2 in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(3): G746-52.
71. Müller MK, Kessel B, Hütt T, Kath R, Layer P, Goebell H (1988). Effects of somatostatin-14 on gastric and pancreatic responses to hormonal and neural

- stimulation using an isolated perfused rat stomach and pancreas preparation. *Pancreas* 3(3): 303-10.
72. Cherrington AD, Caldwell MD, Dietz MR, Exton JH, Crofford OB (1977). The effect of somatostatin on glucose uptake and production by rat tissues *in vitro*. *Diabetes* 26(8): 740-8.
 73. Suire CN, Brizuela MK, Leissring MA (2020). Quantitative, high-throughput assays for proteolytic degradation of amylin. *Methods Protoc* 3(4): 81.
 74. Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY (2004). Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 279(8): 7264-74.
 75. Coester B, Lutz TA, Le Foll C (2022). Mouse microglial calcitonin receptor knockout impairs hypothalamic amylin neuronal pSTAT3 signaling but lacks major metabolic consequences. *Metabolites* 12(1): 51.
 76. Liu M, Hoskins A, Verma N, Bers DM, Despa S, Despa F (2018). Amylin and diabetic cardiomyopathy- amylin-induced sarcolemmal calcium leak is independent of diabetic remodeling of myocardium. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(5 Pt B): 1923-1930.
 77. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med* 48(3): e218.
 78. Prawitt J, Abdelkarim M, Stroeve JH, Popescu I, Duez H, Velagapudi VR, Dumont J, Bouchaert E, van Dijk TH, Lucas A, Dorchies E, Daoudi M, Lestavel S, Gonzalez FJ, Oresic M, Cariou B, Kuipers F, Caron S, Staels B (2011). Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes* 60(7): 1861-71.
 79. Kim H, Mendez R, Chen X, Fang D, Zhang K (2015). Lysine acetylation of CREBH regulates fasting-induced hepatic lipid metabolism. *Mol Cell Biol* 35(24): 4121-34.
 80. Luo X, Zhang Y, Ruan X, Jiang X, Zhu L, Wang X, Ding Q, Liu W, Pan Y, Wang Z, Chen Y (2011). Fasting-induced protein phosphatase 1 regulatory subunit contributes to postprandial blood glucose homeostasis via regulation of hepatic glycogenesis. *Diabetes* 60(5): 1435-45.
 81. Szablewski L (2017). Distribution of glucose transporters in renal diseases. *J Biomed Sci* 24(1): 64.

82. Corrales P, Izquierdo-Lahuerta A, Medina-Gómez G (2018). Maintenance of kidney metabolic homeostasis by PPAR gamma. *Int J Mol Sci* 19(7): 2063.
83. Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, Hartge M, Sprang C, Frost N, Krikov M, Bhanot S, Barros R, Morani A, Gustafsson JA, Unger T, Kintscher U (2008). Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet* 4(6): e1000108.
84. Osada Y, Nakagawa S, Ishibe K, Takao S, Shimazaki A, Itohara K, Imai S, Yonezawa A, Nakagawa T, Matsubara K (2021). Antibiotic-induced microbiome depletion alters renal glucose metabolism and exacerbates renal injury after ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 321(4): F455-F465.
85. Uyama N, Geerts A, Reynaert H (2004). Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 280(1): 808-20.
86. Laloux M, Stalmans W, Hers HG (1983). On the mechanism by which glucocorticoids cause the activation of glycogen synthase in mouse and rat livers. *Eur J Biochem* 136(1): 175-81.
87. Livingston JN, Lockwood DH (1975). Effect of glucocorticoids on the glucose transport system of isolated fat cells. *J Biol Chem* 250(21): 8353-60.
88. Smith OLK, Wong CY, Gelfand RA (1990). Influence of glucocorticoids on skeletal muscle proteolysis in normal and diabetic-adrenalectomized eviscerated rats. *Metabolism* 39(6): 641-6.
89. Müller MJ, Seitz HJ (1983). Interaction of thyroid hormones and cyclic AMP in the stimulation of hepatic gluconeogenesis. *Biochim Biophys Acta* 756(3): 360-8.
90. Nebioglu S, Wathanaronchai P, Nebioglu D, Pruden EL, Gibson DM (1990). Mechanisms underlying enhanced glycogenolysis in livers of 3,5,3'-triiodothyronine-treated rats. *Am J Physiol* 258(1 Pt 1): E109-16.
91. Kim SR, Talbott EA, Tull E, Vogt M, Andersen SJ, Kuller LH (2000). Contribution of abnormalities of thyroid hormones to type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23(2): 260-1.
92. Casla A, Rovira A, Wells JA, Dohm GL (1990). Increased glucose transporter (GLUT4) protein expression in hyperthyroidism. *Biochem Biophys Res Commun* 171(1): 182-8.
93. Fowelin J, Attvall S, von Schenck H, Smith U, Lager I (1991). Characterization of the insulin-antagonistic effect of growth hormone in man. *Diabetologia* 34(7): 500-6.

94. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Quesada I, Ropero AB (2009). The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 304(1-2): 63-8.
95. Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, Jones TH (2006). Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 154(6): 899-906.
96. Mouri M, Badireddy M (2023). Hyperglycemia. National Library of Medicine [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430900>. [Accessed 20 November 2023].
97. Takao T, Inoue K, Suka M, Yanagisawa H, Iwamoto Y (2018). Optimal cutoff values of fasting plasma glucose (FPG) variability for detecting retinopathy and the threshold of FPG levels for predicting the risk of retinopathy in type 2 diabetes: A longitudinal study over 27 years. *Diabetes Res Clin Pract* 140: 228-235.
98. Lai AKW, Lo ACY (2013). Animal models of diabetic retinopathy: Summary and comparison. *J Diabetes Res* 2013: 106594.
99. Marcovecchio ML, Lucantoni M, Chiarelli F (2011). Role of chronic and acute hyperglycemia in the development of diabetes complications. *Diabetes Technol Ther* (3): 389-94.
100. Rehman HU, Ullah K, Rasool A, Manzoor R, Yuan Y, Tareen AM, Kaleem I, Riaz N, Hameed S, Bashir S (2023). Comparative impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis in diabetic rats compared to normoglycemic rats. *Sci Rep* 13(1): 7921.
101. Svenson KL, Von Smith R, Magnani PA, Suetin HR, Paigen B, Naggert JK, Li R, Churchill GA, Peters LL (2007). Multiple trait measurements in 43 inbred mouse strains capture the phenotypic diversity characteristic of human populations. *J Appl Physiol* 102(6): 2369-78.
102. Schirra J, Katschinski M, Weidmann C, Schäfer T, Wank U, Arnold R, Göke B (1996). Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *J Clin Invest* 97(1): 92-103.
103. Loader J, Montero D, Lorenzen C, Watts R, Méziat C, Reboul C, Stewart S, Walther G (2015). Acute hyperglycemia impairs vascular function in healthy and

cardiometabolic diseased subjects: Systematic review and meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(9): 2060-72.

104. Cherney DZ, Scholey JW, Sochett E, Bradley TJ, Reich HN (2011). The acute effect of clamped hyperglycemia on the urinary excretion of inflammatory cytokines/chemokines in uncomplicated type 1 diabetes: A pilot study. *Diabetes Care* 34(1): 177-80.
105. van Kooten F, Hoogerbrugge N, Naarding P, Koudstaal PJ (1993). Hyperglycemia in the acute phase of stroke is not caused by stress. *Stroke* 24(8): 1129-32.
106. Nowaczewska M, Kamińska A, Kukulska-Pawluczuk B, Junik R, Pawlak-Osińska K (2019). Effect of hyperglycemia on cerebral blood flow in patients with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 153: 1-5.
107. Smith AG, Singleton JR (2013). Obesity and hyperlipidemia are risk factors for early diabetic neuropathy. *J Diabetes Complications* 27(5): 436-42.
108. Chawla A, Chawla R, Jaggi S (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab* 20(4): 546-51.
109. Cade WT (2008). Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther* 88(11): 1322-35.
110. Zhou H, Zhang X, Lu J (2014). Progress on diabetic cerebrovascular diseases. *Bosn J Basic Med Sci* 14(4): 185-90.
111. Ziegler D, Porta M, Papanas N, Mota M, Jermendy G, Beltramo E, Mazzeo A, Caccioppo A, Striglia E, Serhiyenko V, Serhiyenko A, Rosta L, Stirban OA, Putz Z, Istenes I, Horváth V, Kempler P (2022). The role of biofactors in diabetic microvascular complications. *Curr Diabetes Rev* 18(4): e250821195830.
112. Berthier CC, Zhang H, Schin M, Henger A, Nelson RG, Yee B, Boucherot A, Neusser MA, Cohen CD, Carter-Su C, Argetsinger LS, Rastaldi MP, Brosius FC, Kretzler M (2009). Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 58(2): 469-77.
113. Fang Y, Tian X, Bai S, Fan J, Hou W, Tong H, Li D (2012). Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats by inhibiting oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and the p38 MAPK signaling pathway. *Int J Mol Med* 30(1): 85-92.

114. Kobayashi T, Uehara S, Ikeda T, Itadani H, Kotani H (2003). Vitamin D3 up-regulated protein-1 regulates collagen expression in mesangial cells. *Kidney Int* 64(5): 1632-42.
115. Rogers SL, Tikellis G, Cheung N, Tapp R, Shaw J, Zimmet PZ, Mitchell P, Wang JJ, Wong TY (2008). Retinal arteriolar caliber predicts incident retinopathy: Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle (AusDiab) study. *Diabetes Care* 31(4): 761-3.
116. Madsen-Bouterse SA, Zhong Q, Mohammad G, Ho YS, Kowluru R (2010). Oxidative damage of mitochondrial DNA in diabetes and its protection by manganese superoxide dismutase. *Free Radic Res* 44(3): 313-21.
117. Santos JM, Tewari S, Goldberg AF, Kowluru RA (2011). Mitochondrial biogenesis and the development of diabetic retinopathy. *Free Radic Biol Med* 51(10): 1849-60.
118. Kowluru RA, Atasi L, Ho YS (2006). Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(4): 1594-9.
119. Jenkins AJ, Joglekar MV, Hardikar AA, Keech AC, O'Neal DN, Januszewski AS (2015). Biomarkers in diabetic retinopathy. *Rev Diabet Stud* 12(1-2): 159-95.
120. Hicks CW, Selvin E (2019). Epidemiology of peripheral neuropathy and lower extremity disease in diabetes. *Curr Diab Rep* 19(10): 86.
121. Tesfaye S (2011). Recent advances in the management of diabetic distal symmetrical polyneuropathy. *J Diabetes Investig* 2(1): 33-42.
122. Peltier A, Goutman SA, Callaghan BC (2014). Painful diabetic neuropathy. *BMJ* 348: g1799.
123. Sloan G, Selvarajah D, Tesfaye S (2021). Pathogenesis, diagnosis and clinical management of diabetic sensorimotor peripheral neuropathy. *Nat Rev Endocrinol* 17(7): 400-420.
124. Quattrini C, Tesfaye S (2003). Understanding the impact of painful diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 19 (Suppl 1): S2-8.
125. Gore M, Brandenburg NA, Dukes E, Hoffman DL, Tai KS, Stacey B (2005). Pain severity in diabetic peripheral neuropathy is associated with patient functioning, symptom levels of anxiety and depression, and sleep. *J Pain Symptom Manage* 30(4): 374-85.
126. Boulton AJ, Kirsner RS, Vileikyte L (2004). Clinical practice. Neuropathic diabetic foot ulcers. *N Engl J Med* 351(1): 48-55.
127. Feldman EL, Callaghan B, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright D, Bennett D, Bril V, Russell J, Viswanathan V (2019). Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers* 5(1): 41.

128. Dubin AE, Patapoutian A (2010). Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 120(11): 3760-72.
129. Pereira V, Goudet C (2019). Emerging trends in pain modulation by metabotropic glutamate receptors. *Front Mol Neurosci* 11: 464.
130. Bahari Z, Meftahi GH (2019). Spinal α 2-adrenoceptors and neuropathic pain modulation; therapeutic target. *Br J Pharmacol* 176(14): 2366-2381.
131. Szabadi E (2018). Functional organization of the sympathetic pathways controlling the pupil: Light-inhibited and light-stimulated pathways. *Front Neurol* 9: 1069.
132. Zieglgänsberger W (2019). Substance P and pain chronicity. *Cell Tissue Res* 375(1): 227-241.
133. Koivisto A, Jalava N, Bratty R, Pertovaara A (2018). TRPA1 antagonists for pain relief. *Pharmaceuticals (Basel)* 11(4): 117.
134. Pérez de Vega MJ, Ferrer-Montiel A, González-Muñiz R (2018). Recent progress in non-opioid analgesic peptides. *Arch Biochem Biophys* 660: 36-52.
135. Sneddon LU (2018). Comparative physiology of nociception and pain. *Physiology (Bethesda)* 33(1): 63-73.
136. Woller SA, Eddinger KA, Corr M, Yaksh TL (2017). An overview of pathways encoding nociception. *Clin Exp Rheumatol* 35(Suppl 107): 40–46.
137. St John Smith E (2018). Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *J Neurol* 265(2): 231-238.
138. Frias B, Merighi A (2016). Capsaicin, nociception and pain. *Molecules* 21(6): 797.
139. Tracey WD Jr (2017). Nociception. *Curr Biol* 27(4): R129-R133.
140. Krames ES (2015). The dorsal root ganglion in chronic pain and as a target for neuromodulation: A review. *Neuromodulation* 18(1): 24-32.
141. Ayar A, Kelestimur H (2002). The inhibitory effects of dantrolene on action potential-induced calcium transients in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Physiol Res* 51(4): 341-6.
142. Ayar A, Scott RH (1999). The actions of ryanodine on calcium-activated conductances in rat cultured DRG neurones; evidence for calcium-induced calcium release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359(2): 81-91.
143. Ayar A, Martin DJ, Ozcan M, Kelestimur H (2001). Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett* 313(1-2): 73-7.

144. Kelestimur H, Bulut F, Canpolat S, Ozcan M, Ayar A (2021). Kisspeptin leads to calcium signaling in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Gen Physiol Biophys* 40(2): 155-160.
145. Hanani M (2010). Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: In search of function. *Brain Res Rev* 64(2): 304-27.
146. Pannese E (1981). The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 65: 1-111.
147. Kubíček L, Kopáček R, Klusáková I, Dubový P (2010). Alterations in the vascular architecture of the dorsal root ganglia in a rat neuropathic pain model. *Ann Anat* 192(2): 101-6.
148. Kiernan JA (1996). Vascular permeability in the peripheral autonomic and somatic nervous systems: controversial aspects and comparisons with the blood-brain barrier. *Microsc Res Tech* 35(2): 122-36.
149. Makker PG, Duffy SS, Lees JG, Perera CJ, Tonkin RS, Butovsky O, Park SB, Goldstein D, Moalem-Taylor G (2017). Characterisation of immune and neuroinflammatory changes associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *PLoS One* 12(1): e0170814.
150. Moreno-García A, Kun A, Calero O, Medina M, Calero M (2018). An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration. *Front Neurosci* 12: 464.
151. Berciano MT, Novell M, Villagra NT, Casafont I, Bengoechea R, Val-Bernal JF, Lafarga M (2007). Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. *J Struct Biol* 158(3): 410-20.
152. West CA, McKay Hart A, Terenghi G, Wiberg M (2012). Sensory neurons of the human brachial plexus: A quantitative study employing optical fractionation and *in vivo* volumetric magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* 70(5): 1183-94.
153. Davidson S, Copits BA, Zhang J, Page G, Ghetti A, Gereau RW (2014). Human sensory neurons: Membrane properties and sensitization by inflammatory mediators. *Pain* 155(9): 1861-1870.
154. Waxman SG, Zamponi GW (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: Emerging ion channel targets. *Nat Neurosci* 17: 153–163.
155. Haberberger RV, Barry C, Dominguez N, Matusica D (2019). Human dorsal root ganglia. *Front Cell Neurosci* 13: 271.

156. Kobayashi M, Zochodne DW (2018). Diabetic neuropathy and the sensory neuron: New aspects of pathogenesis and their treatment implications. *J Diabetes Investig* 9(6): 1239-54.
157. Melli G, Höke A (2009). Dorsal root ganglia sensory neuronal cultures: A tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opin Drug Discov* 4(10): 1035-45.
158. Zochodne DW (2014). Mechanisms of diabetic neuron damage: Molecular pathways. *Handb Clin Neurol* 126: 379-99.
159. Arvidson B (1979). Distribution of intravenously injected protein tracers in peripheral ganglia of adult mice. *Exp Neurol* 63(2): 388-410.
160. Kadekaro M, Crane AM, Sokoloff L (1985). Differential effects of electrical stimulation of sciatic nerve on metabolic activity in spinal cord and dorsal root ganglion in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(17): 6010-3.
161. Zochodne DW, Ho LT (1991). Unique microvascular characteristics of the dorsal root ganglion in the rat. *Brain Res* 559(1): 89-93.
162. Zochodne DW, Verge VM, Cheng C, Sun H, Johnston J (2001). Does diabetes target ganglion neurones? Progressive sensory neurone involvement in long-term experimental diabetes. *Brain* 124(Pt 11): 2319-34.
163. Little AA, Albers JW (2015). Clinical description of toxic neuropathies. *Handb Clin Neurol* 131: 253-96.
164. Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DLH (2017). New horizons in diabetic neuropathy: Mechanisms, bioenergetics, and pain. *Neuron* 93(6): 1296-1313.
165. Bhattacharjee N, Barma S, Konwar N, Dewanjee S, Manna P (2016). Mechanistic insight of diabetic nephropathy and its pharmacotherapeutic targets: An update. *Eur J Pharmacol* 791: 8-24.
166. Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865): 813-20.
167. Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008). Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 9(1): 36-45.
168. Zenker J, Ziegler D, Chrast R (2013). Novel pathogenic pathways in diabetic neuropathy. *Trends Neurosci* 36(8): 439-49.
169. Lee AY, Chung SS (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 13(1): 23-30.

170. Yagihashi S, Yamagishi SI, Wada Ri R, Baba M, Hohman TC, Yabe-Nishimura C, Kokai Y (2001). Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. *Brain* 124(Pt 12): 2448-58.
171. Song Z, Fu DT, Chan YS, Leung S, Chung SS, Chung SK (2003). Transgenic mice overexpressing aldose reductase in Schwann cells show more severe nerve conduction velocity deficit and oxidative stress under hyperglycemic stress. *Mol Cell Neurosci* 23(4): 638-47.
172. Kang Q, Yang C (2020). Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol* 37: 101799.
173. Krause N, Wegner A (2020). Fructose metabolism in cancer. *Cells* 9(12): 2635.
174. Coussement P, Bauwens D, Peters G, Maertens J, De Mey M (2020). Mapping and refactoring pathway control through metabolic and protein engineering: The hexosamine biosynthesis pathway. *Biotechnol Adv* 40: 107512.
175. Buse MG, Robinson KA, Gettys TW, McMahon EG, Gulve EA (1997). Increased activity of the hexosamine synthesis pathway in muscles of insulin-resistant ob/ob mice. *Am J Physiol- Endocrinol Metab* 272(6 Pt 1): E1080-8.
176. Yki-Järvinen H, Daniels MC, Virkamäki A, Mäkimattila S, DeFronzo RA, McClain D (1996). Increased glutamine: Fructose-6-phosphate amidotransferase activity in skeletal muscle of patients with NIDDM. *Diabetes* 45(3): 302-7.
177. Steinberg SF (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 88(4): 1341–78.
178. Mizukami H, Osonoi S (2020). Pathogenesis and molecular treatment strategies of diabetic neuropathy collateral glucose-utilizing pathways in diabetic polyneuropathy. *Int J Mol Sci* 22(1): 94.
179. Geraldles P, King GL (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 106(8): 1319–31.
180. Lukic IK, Humpert PM, Nawroth PP, Bierhaus A (2008). The RAGE pathway: Activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1126: 76-80.
181. Mišur, I, Žarković K, Barada A, Batelja L, Miličević Z, Turk Z (2004). Advanced glycation end products in peripheral nerve in type 2 diabetes with neuropathy. *Acta Diabetol* 41(4): 158–166.

182. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM, D'Agati VD (2000). Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 11(9): 1656-1666.
183. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2007). Arguing for the motion: Yes, RAGE is a receptor for advanced glycation endproducts. *Mol Nutr Food Res* 51(9): 1111-5.
184. Wada R, Yagihashi S (2005). Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1043: 598-604.
185. Hwang JS, Shin CH, Yang SW (2005). Clinical implications of N epsilon-(carboxymethyl)lysine, advanced glycation end product, in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 7(3): 263-7.
186. Vincent AM, Perrone L, Sullivan KA, Backus C, Sastry AM, Lastoskie C, Feldman EL (2007). Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. *Endocrinology* 148(2): 548-58.
187. Sekido H, Suzuki T, Jomori T, Takeuchi M, Yabe-Nishimura C, Yagihashi S (2004). Reduced cell replication and induction of apoptosis by advanced glycation end products in rat Schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun* 320(1): 241-8.
188. Li F, Szabó C, Pacher P, Southan GJ, Abatan OI, Charniauskaya T, Stevens MJ, Obrosova IG (2004). Evaluation of orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in streptozotocin-diabetic rat model of early peripheral neuropathy. *Diabetologia* 47(4): 710-7.
189. Obrosova IG, Xu W, Lyzogubov VV, Ilnytska O, Mashtalir N, Vareniuk I, Pavlov IA, Zhang J, Slusher B, Drel VR (2008). PARP inhibition or gene deficiency counteracts intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain in advanced diabetic neuropathy. *Free Radic Biol Med* 44(6): 972-81.
190. Drel VR, Xu W, Zhang J, Kador PF, Ali TK, Shin J, Julius U, Slusher B, El-Remessy AB, Obrosova IG (2009). Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition counteracts cataract formation and early retinal changes in streptozotocin-diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(4): 1778-90.
191. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 8416763.

192. Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *Int J Mol Sci* 22(9): 4642.
193. Kıran TR, Otlı O, Karabulut AB (2023). Oxidative stress and antioxidants in health and disease. *J Lab Med* 47(1): 1–11.
194. Halliwell B, Adhikary A, Dingfelder M, Dizdaroglu M (2021). Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage *in vivo*. *Chem Soc Rev* 50(15): 8355-60.
195. Arfin S, Jha NK, Jha SK, Kesari KK, Ruokolainen J, Roychoudhury S, Rathı B, Kumar D (2021). Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants (Basel)* 10(5): 642.
196. Hao Y, Zhu YJ, Zou S, Zhou P, Hu YW, Zhao QX, Gu LN, Zhang HZ, Wang Z, Li J (2021). Metabolic syndrome and psoriasis: Mechanisms and future directions. *Front Immunol* 12: 711060.
197. Allegra M (2021). Redox systems, oxidative stress, and antioxidant defences in health and disease. *Antioxidants (Basel)* 10(12): 1955.
198. Taysi S, Tascan AS, Ugur MG, Demir M (2019). Radicals, oxidative/nitrosative stress and preeclampsia. *Mini Rev Med Chem* 19(3): 178-193.
199. Halliwell B, Gutteridge JMC (2015). *Free radicals in biology and medicine*, 5th ed. Oxford University Press, Oxford, Birleşik Krallık; Sayfa: 20–2.
200. Gulcin İ (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch Toxicol* 94(3): 651-715.
201. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87(1): 315-424.
202. Halliwell B (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 5): 1147-50.
203. Davies MJ (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* 305(3): 761-70.
204. Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 93(8): 3199-207.
205. Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM (2002). Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 39(6): 1088-94.

206. Finkel T (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194(1): 7-15.
207. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Arch Toxicol* 97(10): 2499-2574.
208. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32(8): 595-603.
209. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N (2019). Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 9613090.
210. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4(8): 118-26.
211. Hacıoglu G, Senturk A, Ince I, Alver A (2016). Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice in acute stress model. *Iran J Basic Med Sci* 19(4): 388-93.
212. Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH (2011). Glutathione. *Arabidopsis Book* 9: 1–32.
213. Peters AL, Van Noorden CJ (2009). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: Cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *J Histochem Cytochem* 57(11): 1003-11.
214. Stanton RC (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life* 64(5): 362-9.
215. Nóbrega-Pereira S, Fernandez-Marcos PJ, Brioché T, Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A, Flores JM, Viña J, Serrano M (2016). G6PD protects from oxidative damage and improves healthspan in mice. *Nat Commun* 7: 10894.
216. Niki E (2016). Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch Biochem Biophys* 595: 19-24.
217. Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskaliyeva B, Abdull Razis AF, Modu B, Calina D, Sharifi-Rad J (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem* 11: 1158198.
218. Traber MG, Atkinson J (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 43(1): 4-15.

219. Traber MG, Stevens JF (2011). Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med* 51(5): 1000-13.
220. Kawata A, Murakami Y, Suzuki S, Fujisawa S (2018). Anti-inflammatory activity of β -carotene, lycopene and tri-n-butylborane, a scavenger of reactive oxygen species. *In Vivo* 32(2): 255-264.
221. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, Sulaiman Rahman H (2018). Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. *Front Pharmacol* 9: 1162.
222. Mourente G, Bell JG, Tocher DR (2007). Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? *Fish Physiol Biochem* 33(3): 269–280.
223. Lakey-Beitia J, Burillo AM, La Penna G, Hegde ML, Rao KS (2021). Polyphenols as potential metal chelation compounds against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 82(s1): S335-S357.
224. Taysi S, Algburi FS, Mohammed ZR, Ali OA, Taysi ME (2022). Thymoquinone: A review on its pharmacological importance, and its association with oxidative stress, COVID-19, and radiotherapy. *Mini Rev Med Chem* 22(14): 1847-1875.
225. Minich DM, Henning M, Darley C, Fahoum M, Schuler CB, Frame J (2022). Is melatonin the “next vitamin D”? A review of emerging science, clinical uses, safety, and dietary supplements. *Nutrients* 14(19): 3934.
226. Mahmood D (2019). Pleiotropic effects of melatonin. *Drug Res (Stuttg)* 69(2): 65-74.
227. Simunkova M, Barbierikova Z, Jomova K, Hudecova L, Lauro P, Alwasel SH, Alhazza I, Rhodes CJ, Valko M (2021). Antioxidant vs. prooxidant properties of the flavonoid, kaempferol, in the presence of Cu(II) ions: A ROS-scavenging activity, Fenton reaction and DNA damage study. *Int J Mol Sci* 22(4): 1619.
228. Oyenih AB, Ayeleso AO, Mukwevho E, Masola B (2015). Antioxidant strategies in the management of diabetic neuropathy. *Biomed Res Int* 2015: 515042.
229. Cameron NE, Cotter MA, Archibald V, Dines KC, Maxfield EK (1994). Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 37(5): 449-59.
230. Ozkan Y, Yilmaz O, Oztürk AI, Erşan Y (2005). Effects of triple antioxidant combination (vitamin E, vitamin C and alpha-lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. *Cell Biol Int* 29(9): 754-60.

231. Vallianou N, Evangelopoulos A, Koutalas P (2009). Alpha-lipoic acid and diabetic neuropathy. *Rev Diabet Stud* 6(4): 230-6.
232. Packer L, Kraemer K, Rimbach G (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17(10): 888-95.
233. Baydas G, Donder E, Kiliboz M, Sonkaya E, Tuzcu M, Yasar A, Nedzvetskii VS (2004). Neuroprotection by alpha-lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochemistry (Mosc)* 69(9): 1001-5.
234. Ziegler D, Sohr CG, Nourooz-Zadeh J (2004). Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 27(9): 2178-83.
235. SYDNEY Trial Study Group (2003). The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: The SYDNEY trial. *Diabetes Care* 26(3): 770-6.
236. Ziegler D, Low PA, Litchy WJ, Boulton AJ, Vinik AI, Freeman R, Samigullin R, Tritschler H, Munzel U, Maus J, Schütte K, Dyck PJ (2011). Efficacy and safety of antioxidant treatment with α -lipoic acid over 4 years in diabetic polyneuropathy: The NATHAN 1 trial. *Diabetes Care* 34(9): 2054-60.
237. Du X, Edelstein D, Brownlee M (2008). Oral benfotiamine plus alpha-lipoic acid normalises complication-causing pathways in type 1 diabetes. *Diabetologia* 51(10): 1930-2.
238. Hotta N, Sakamoto N, Shigeta Y, Kikkawa R, Goto Y (1996). Clinical investigation of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic neuropathy in Japan: Multicenter study. Diabetic Neuropathy Study Group in Japan. *J Diabetes Complications* 10(3): 168-72.
239. Kawai T, Takei I, Tokui M, Funae O, Miyamoto K, Tabata M, Hirata T, Saruta T, Shimada A, Itoh H (2010). Effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes, in relation to suppression of N(ϵ)-carboxymethyl lysine. *J Diabetes Complications* 24(6): 424-32.
240. Bril V, Hirose T, Tomioka S, Buchanan R; Ranirestat Study Group (2009). Ranirestat for the management of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetes Care* 32(7): 1256-60.
241. Hotta N, Akanuma Y, Kawamori R, Matsuoka K, Oka Y, Shichiri M, Toyota T, Nakashima M, Yoshimura I, Sakamoto N, Shigeta Y (2006). Long-term clinical effects

- of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy: The 3-year, multicenter, comparative aldose reductase inhibitor-diabetes complications trial. *Diabetes Care* 29(7): 1538-44.
242. Norcini M, Vivoli E, Galeotti N, Bianchi E, Bartolini A, Ghelardini C (2009). Supraspinal role of protein kinase C in oxaliplatin-induced neuropathy in rat. *Pain* 146(1-2): 141-7.
 243. Nakamura J, Kato K, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Nakashima E, Naruse K, Kasuya Y, Mizubayashi R, Miwa K, Yasuda Y, Kamiya H, Ienaga K, Sakakibara F, Koh N, Hotta N (1999). A protein kinase C-beta-selective inhibitor ameliorates neural dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 48(10): 2090-5.
 244. Singh A, Faccenda D, Campanella M (2021). Pharmacological advances in mitochondrial therapy. *EBioMedicine* 65: 103244.
 245. Brand MD, Nicholls DG (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435(2): 297-312.
 246. Roede JR, Jones DP (2010). Reactive species and mitochondrial dysfunction: Mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environ Mol Mutagen* 51(5):380-90.
 247. Swerdlow RH (2009). The neurodegenerative mitochondrialopathies. *J Alzheimers Dis* 17(4): 737-51.
 248. Lin MT, Beal MF (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443(7113): 787-95.
 249. Martin SD, Morrison S, Konstantopoulos N, McGee SL (2014). Mitochondrial dysfunction has divergent, cell type-dependent effects on insulin action. *Mol Metab* 3(4): 408-18.
 250. Efremov RG, Baradaran R, Sazanov LA (2010). The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465(7297): 441-5.
 251. Baradaran R, Berrisford JM, Minhas GS, Sazanov LA (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494(7438): 443-8.
 252. Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie AG, Walker JE (2000). The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* 10(6): 672-9.
 253. Gresser MJ, Myers JA, Boyer PD (1982). Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model. *J Biol Chem* 257(20): 12030-8.

254. Weissig V (2005). Targeted drug delivery to mammalian mitochondria in living cells. *Expert Opin Drug Deliv* 2(1): 89-102.
255. Bhatti GK, Gupta A, Pahwa P, Khullar N, Singh S, Navik U, Kumar S, Mastana SS, Reddy AP, Reddy PH, Bhatti JS (2022). Targeting mitochondrial bioenergetics as a promising therapeutic strategy in metabolic and neurodegenerative diseases. *Biomed J* 45(5): 733-748.
256. Han S, Yao T, Zhang X, Gan L, Zhu C, Yu H, Gan Y (2009). Lipid-based formulations to enhance oral bioavailability of the poorly water-soluble drug anethol trithione: Effects of lipid composition and formulation. *Int J Pharm* 379(1): 18-24.
257. Lubet RA, Steele VE, Eto I, Juliana MM, Kelloff GJ, Grubbs CJ (1997). Chemopreventive efficacy of anethole trithione, N-acetyl-L-cysteine, miconazole and phenethylisothiocyanate in the DMBA-induced rat mammary cancer model. *Int J Cancer* 72(1): 95-101.
258. NIH (National Institutes of Health), National Cancer Institute (2020). "Definition of Anetholetrithione" [online]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/anetholtrithione>. [Accessed 20 November 2023].
259. Christen MO, Fackir L, Jore D (1995). Use of linoleic acid radiolysis for assay of antioxidant action of anethole dithiolethione. *Methods Enzymol* 252: 324-31.
260. Ben-Mahdi MH, Gozin A, Driss F, Andrieu V, Christen MO, Pasquier C (2000). Anethole dithiolethione regulates oxidant-induced tyrosine kinase activation in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2(4): 789-99.
261. Rat P, Christen MO, Thevenin M, Warnet JM, Adolphe M (1995). Cold light fluorimetry: A microtitration technology for cell culture to evaluate anethole dithiolethione and other biothiols. *Methods Enzymol* 252: 331-40.
262. Drukarch B, Schepens E, Stoof JC, Langeveld CH (1997). Anethole dithiolethione prevents oxidative damage in glutathione-depleted astrocytes. *Eur J Pharmacol* 329(2-3): 259-62.
263. Dringen R, Hamprecht B, Drukarch B (1998). Anethole dithiolethione, a putative neuroprotectant, increases intracellular and extracellular glutathione levels during starvation of cultured astroglial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358(6): 616-22.

264. Khanna S, Sen CK, Roy S, Christen MO, Packer L (1998). Protective effects of anethole dithiolethione against oxidative stress-induced cytotoxicity in human Jurkat T cells. *Biochem Pharmacol* 56(1): 61-9.
265. Chowdhury SKR, Dobrowsky RT, Fernyhough P (2011). Nutrient excess and altered mitochondrial proteome and function contribute to neurodegeneration in diabetes. *Mitochondrion* 11(6): 845–854.
266. Fernyhough P (2015). Mitochondrial dysfunction in diabetic neuropathy: A series of unfortunate metabolic events. *Curr Diab Rep* 15(11): 89.
267. Leininger GM, Edwards JL, Lipshaw MJ, Feldman EL (2006). Mechanisms of disease: Mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol* 2(11): 620-8.
268. Russell JW, Golovoy D, Vincent AM, Mahendru P, Olzmann JA, Mentzer A, Feldman EL (2002). High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J* 16(13): 1738-48.
269. Sifuentes-Franco S, Pacheco-Moisés FP, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG (2017). The role of oxidative stress, mitochondrial function, and autophagy in diabetic polyneuropathy. *J Diabetes Res* 2017: 1673081.
270. Chandrasekaran K, Anjaneyulu M, Inoue T, Choi J, Sagi AR, Chen C, Ide T, Russell JW (2015). Mitochondrial transcription factor A regulation of mitochondrial degeneration in experimental diabetic neuropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309(2): E132-41.
271. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL (1999). Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 6(5): 347-63.
272. Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW (2000). Diabetic peripheral neuropathy: Evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 49(11): 1932-8.
273. Vincent AM, Edwards JL, McLean LL, Hong Y, Cerri F, Lopez I, Quattrini A, Feldman EL (2010). Mitochondrial biogenesis and fission in axons in cell culture and animal models of diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol* 120(4): 477–489.
274. Sivitz WI, Yorek MA (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: From molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 12(4): 537-77.

275. Roy Chowdhury SK, Smith DR, Saleh A, Schapansky J, Marquez A, Gomes S, Akude E, Morrow D, Calcutt NA, Fernyhough P (2012). Impaired adenosine monophosphate-activated protein kinase signalling in dorsal root ganglia neurons is linked to mitochondrial dysfunction and peripheral neuropathy in diabetes. *Brain* 135(Pt 6): 1751-66.
276. Rumora AE, LoGrasso G, Haidar JA, Dolkowski JJ, Lentz SI, Feldman EL (2019). Chain length of saturated fatty acids regulates mitochondrial trafficking and function in sensory neurons. *J Lipid Res* 60(1): 58-70.
277. Akude E, Zhrebetskaya E, Roy Chowdhury SK, Girling K, Fernyhough P (2010). 4-hydroxy-2-nonenal induces mitochondrial dysfunction and aberrant axonal outgrowth in adult sensory neurons that mimics features of diabetic neuropathy. *Neurotox Res* 17(1): 28-38.
278. Jolivald CG, Aghanoori MR, Navarro-Diaz MC, Han MM, Sanchez G, Guernsey L, Quach D, Johe K, Fernyhough P, Calcutt NA (2022). Enhancement of mitochondrial function by the neurogenic molecule NSI-189 accompanies reversal of peripheral neuropathy and memory impairment in a rat model of type 2 diabetes. *J Diabetes Res* 2022: 8566970.
279. Nomenclature Committee on Cell Death Study Group (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25(3): 486-541.
280. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC (2018). Neuronal cell death. *Physiol Rev* 98(2): 813-880.
281. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G (2007). Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14(7): 1237-43.
282. Porter AG, Jänicke RU (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6(2): 99-104.
283. Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y (2011). Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct* 29(6): 468-80.
284. Harrington HA, Ho KL, Ghosh S, Tung KC (2008). Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theor Biol Med Model* 5: 26.

285. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 14: 32.
286. Nomenclature Committee on Cell Death Study Group (2023). Apoptotic cell death in disease-Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death Differ* 30(5): 1097-1154.
287. Tolkovsky A (2002). Apoptosis in diabetic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 50: 145-59.
288. Ohsumi Y (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res* 24(1): 9-23.
289. Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333(1-2): 169-74.
290. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, Choi AM, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Dikic I, Eskelinen EL, Fimia GM, Fulda S, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Harper JW, Jäättelä M, Johansen T, Juhasz G, Kimmelman AC, Kraft C, Ktistakis NT, Kumar S, Levine B, Lopez-Otin C, Madeo F, Martens S, Martinez J, Melendez A, Mizushima N, Münz C, Murphy LO, Penninger JM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Santambrogio L, Scorrano L, Simon AK, Simon HU, Simonsen A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Kroemer G (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 36(13): 1811-1836.
291. Meng T, Lin S, Zhuang H, Huang H, He Z, Hu Y, Gong Q, Feng D (2019). Recent progress in the role of autophagy in neurological diseases. *Cell Stress* 3(5): 141-161.
292. Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH (2005). Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* 26(12): 1421-34.
293. Chen Y, Hua Y, Li X, Arslan IM, Zhang W, Meng G (2020). Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy. *Front Pharmacol* 11: 42.
294. Chen Y, Klionsky DJ (2011). The regulation of autophagy- unanswered questions. *J Cell Sci* 124(Pt 2): 161-70.
295. Yang Z, Klionsky DJ (2010). Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22(2): 124-31.
296. Münz C (2018). Non-canonical functions of macroautophagy proteins during endocytosis by myeloid antigen presenting cells. *Front Immunol* 9: 2765.

297. Parzych KR, Klionsky DJ (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20(3): 460-73.
298. Cuervo AM, Dice JF (2000). Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 275(40): 31505-13.
299. Laplante M, Sabatini DM (2012). mTOR signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(2): a011593.
300. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20(7): 1992-2003.
301. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13(2): 132-41.
302. Wu H, Chen S, Ammar AB, Xu J, Wu Q, Pan K, Zhang J, Hong Y (2015). Crosstalk Between Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy: Implications for the Treatment of Neurological Diseases. *Mol Neurobiol* 52(3): 1284-1296.
303. Levine B, Kroemer G (2019). Biological functions of autophagy genes: A disease perspective. *Cell* 176(1-2): 11-42.
304. Jin SM, Youle RJ (2012). PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J Cell Sci* 125(Pt 4): 795-9.
305. Santos RX, Correia SC, Carvalho C, Cardoso S, Santos MS, Moreira PI (2011). Mitophagy in neurodegeneration: An opportunity for therapy? *Curr Drug Targets* 12(6): 790-9.
306. Giordano S, Darley-Usmar V, Zhang J (2013). Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. *Redox Biol* 2: 82-90.
307. Palikaras K, Tavernarakis N (2014). Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol* 56: 182-8.
308. Yerra VG, Gundu C, Bachewal P, Kumar A (2016). Autophagy: The missing link in diabetic neuropathy? *Med Hypotheses* 86:120-8.
309. Marunouchi T, Tanonaka K (2015). Cell death in the cardiac myocyte. *Biol Pharm Bull* 38(8): 1094-7.
310. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ (2018). Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem* 46(4): 1650-1667.

311. Green DR, Llamby F (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(12): a006080.
312. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW (2002). Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 959: 368-83.
313. Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG (2016). Diabetic polyneuropathy in type 2 diabetes mellitus: Inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function. *J Diabetes Res* 2016: 3425617.
314. Nguyen DV, Shaw LC, Grant MB (2012). Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 170.
315. Liu X, Yang W, Guan Z, Yu W, Fan B, Xu N, Liao DJ (2018). There are only four basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations. *Cell Biosci* 8: 6.
316. Askwith T, Zeng W, Eggo MC, Stevens MJ (2009). Oxidative stress and dysregulation of the taurine transporter in high-glucose-exposed human Schwann cells: implications for pathogenesis of diabetic neuropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(3): E620-8.
317. Obrosova IG (2009). Diabetes and the peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta* 1792(10): 931-40.
318. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182): 1069-75.
319. Martinez-Vicente M, Cuervo AM (2007). Autophagy and neurodegeneration: When the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 6(4): 352-61.
320. Palikaras K, Daskalaki I, Markaki M, Tavernarakis N (2017). Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. *Pharmacol Ther* 178: 157-174.
321. Dong Y, Zhuang X-X, Wang Y-T, Tan J, Feng D, Li M, Zhong Q, Song Z, Shen H-M, Fang EF, et al. (2023). Chemical mitophagy modulators: Drug development strategies and novel regulatory mechanisms. *Pharmacol Res* 194: 106835.
322. Lu G, Wu Z, Shang J, Xie Z, Chen C, Zhang C (2021). The effects of metformin on autophagy. *Biomed Pharmacother* 137: 111286.

323. Wang Y, Xu W, Yan Z, Zhao W, Mi J, Li J, Yan H (2018). Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *J Exp Clin Cancer Res* 37(1): 63.
324. Masini M, Bugliani M, Lupi R, del Guerra S, Boggi U, Filipponi F, Marselli L, Masiello P, Marchetti P (2009). Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia* 52(6): 1083-6.
325. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, Kemp BE, Bardeesy N, Dennis P, Schlager JJ, Marette A, Kozma SC, Thomas G (2010). Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 11(5): 390-401.
326. Beyar R, Roguin A (2001). The sirolimus coated stent: Will the Achilles heel of interventional cardiology finally be cured? *Eur Heart J* 22(22): 2054-7.
327. Davies DM, Johnson SR, Tattersfield AE, Kingswood JC, Cox JA, McCartney DL, Doyle T, Elmslie F, Saggat A, de Vries PJ, Sampson JR (2008). Sirolimus therapy in tuberous sclerosis or lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med* 358(2): 200-3.
328. Chen T, Liu L, Zhang L, Lu T, Matos RL, Jiang C, Lin Y, Yuan T, Ma Z, He H, Zhuang X, Li Q (2020). Optimization of the supercritical fluidized bed process for sirolimus coating and drug release. *Int J Pharm* 589: 119809.
329. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN (1975). Rapamycin, a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28(10): 721-6.
330. Wang Y, Zhang H (2019). Regulation of autophagy by mTOR signaling pathway. *Adv Exp Med Biol* 1206: 67-83.
331. Xing X, Wu K, Dong Y, Zhou Y, Zhang J, Jiang F, Hu WP, Li JD (2020). Hyperactive Akt-mTOR pathway as a therapeutic target for pain hypersensitivity in *Cntnap2*-deficient mice. *Neuropharmacology* 165: 107816.
332. Rangaraju S, Verrier JD, Madorsky I, Nicks J, Dunn WA Jr, Notterpek L (2010). Rapamycin activates autophagy and improves myelination in explant cultures from neuropathic mice. *J Neurosci* 30(34): 11388-97.
333. He WY, Zhang B, Xiong QM, Yang CX, Zhao WC, He J, Zhou J, Wang HB (2016). Intrathecal administration of rapamycin inhibits the phosphorylation of DRG Nav and attenuates STZ-induced painful diabetic neuropathy in rats. *Neurosci Lett* 619: 21-28.

334. He WY, Zhang B, Zhao WC, He J, Zhang L, Xiong QM, Wang J, Wang HB (2019). Contributions of mTOR activation-mediated upregulation of synapsin II and neurite outgrowth to hyperalgesia in STZ-induced diabetic rats. *ACS Chem Neurosci* 10(5): 2385-2396.
335. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343(4): 230-8.
336. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9(4): 311-26.
337. Martinet W, Verheye S, De Meyer GR (2007). Everolimus-induced mTOR inhibition selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *Autophagy* 3(3): 241-4.
338. Singh A, D'Amico D, Andreux PA, Dunngalvin G, Kern T, Blanco-Bose W, Auwerx J, Aebischer P, Rinsch C (2022). Direct supplementation with Urolithin A overcomes limitations of dietary exposure and gut microbiome variability in healthy adults to achieve consistent levels across the population. *Eur J Clin Nutr* 76(2): 297-308.
339. Boakye YD, Groyer L, Heiss EH (2018). An increased autophagic flux contributes to the anti-inflammatory potential of urolithin A in macrophages. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862(1): 61-70.
340. Zou D, Ganugula R, Arora M, Nabity MB, Sheikh-Hamad D, Kumar MNVR (2019). Oral delivery of nanoparticle urolithin A normalizes cellular stress and improves survival in mouse model of cisplatin-induced AKI. *Am J Physiol Renal Physiol* 317(5): F1255-F1264.
341. Cásedas G, Les F, Choya-Foces C, Hugo M, López V (2020). The metabolite urolithin-A ameliorates oxidative stress in neuro-2a cells, becoming a potential neuroprotective agent. *Antioxidants (Basel)* 9(2): 177.
342. Kim KB, Lee S, Kim JH (2020). Neuroprotective effects of urolithin A on H₂O₂-induced oxidative stress-mediated apoptosis in SK-N-MC cells. *Nutr Res Pract* 14(1): 3-11.

343. Lee HJ, Jung YH, Choi GE, Kim JS, Chae CW, Lim JR, Kim SY, Yoon JH, Cho JH, Lee SJ, Han HJ (2021). Urolithin A suppresses high glucose-induced neuronal amyloidogenesis by modulating TGM2-dependent ER-mitochondria contacts and calcium homeostasis. *Cell Death Differ* 28(1): 184-202.
344. Tuohetaerbaik B, Zhang Y, Tian Y, Zhang NN, Kang J, Mao X, Zhang Y, Li X (2020). Pancreas protective effects of Urolithin A on type 2 diabetic mice induced by high fat and streptozotocin via regulating autophagy and AKT/mTOR signaling pathway. *J Ethnopharmacol* 250: 112479.
345. Savi M, Bocchi L, Mena P, Dall'Asta M, Crozier A, Brighenti F, Stilli D, Del Rio D (2017). *In vivo* administration of urolithin A and B prevents the occurrence of cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 16(1): 80.
346. Yang J, Guo Y, Henning SM, Chan B, Long J, Zhong J, Acin-Perez R, Petcherski A, Shirihai O, Heber D, Li Z (2020). Ellagic acid and its microbial metabolite urolithin alleviate diet-induced insulin resistance in mice. *Mol Nutr Food Res* 64(19): e2000091.
347. D'Amico D, Andreux PA, Valdés P, Singh A, Rinsch C, Auwerx J (2021). Impact of the natural compound urolithin A on health, disease and aging. *Trends Mol Med* 27(7): 687-699.
348. Dirimanov S, Högger P (2019). Screening of inhibitory effects of polyphenols on Akt-phosphorylation in endothelial cells and determination of structure-activity features. *Biomolecules* 9(6): 219.
349. Lin J, Zhuge J, Zheng X, Wu Y, Zhang Z, Xu T, Meftah Z, Xu H, Wu Y, Tian N, et al. (2020). Urolithin A-induced mitophagy suppresses apoptosis and attenuates intervertebral disc degeneration via the AMPK signaling pathway. *Free Radic Biol Med* 150: 109-119.
350. Kothe B, Klein S, Petrosky SN (2023). Urolithin A as a potential agent for prevention of age-related disease: A Scoping Review. *Cureus* 15(7): e42550.
351. Liu C, Li X, Zhang Z, Qiu L, Ding S, Xue J, Zhao G, Li J (2019). Antiaging effects of urolithin A on replicative senescent human skin fibroblasts. *Rejuvenation Res*. 22(3): 191-200.
352. Velagapudi R, Lepiarz I, El-Bakoush A, Katola FO, Bhatia H, Fiebich BL, Olajide OA (2019). Induction of autophagy and activation of SIRT-1 deacetylation mechanisms mediate neuroprotection by the pomegranate metabolite urolithin A in BV2 microglia

- and differentiated 3D human neural progenitor cells. *Mol Nutr Food Res* 63(10): e1801237.
353. Esselun C, Theyssen E, Eckert GP (2021). Effects of Urolithin A on Mitochondrial Parameters in a Cellular Model of Early Alzheimer Disease. *Int J Mol Sci* 22(15): 8333.
 354. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 37: 1163–7.
 355. Rebuffé-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, Kuhn C, Rodin J (1993). Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 42: 1405–9.
 356. Cooper MA, O'Meara B, Jack MM, Elliot D, Lamb B, Khan ZW, Menta BW, Ryals JM, Winter MK, Wright DE (2018). Intrinsic activity of C57BL/6 substrains associates with high-fat diet-induced mechanical sensitivity in mice. *J Pain* 19(11): 1285-1295.
 357. Canta A, Chiorazzi A, Carozzi VA, Meregalli C, Oggioni N, Bossi M, Rodriguez-Menendez V, Avezza F, Crippa L, Lombardi R, de Vito G, Piazza V, Cavaletti G, Marmiroli P (2016). Age-related changes in the function and structure of the peripheral sensory pathway in mice. *Neurobiol Aging* 45:136-148.
 358. Stepanović-Petrović R, Micov A, Tomić M, Pecikoza U (2017). Levetiracetam synergizes with gabapentin, pregabalin, duloxetine and selected antioxidants in a mouse diabetic painful neuropathy model. *Psychopharmacology* 234(11): 1781-1794.
 359. Guilford BL, Ryals JM, Wright DE (2011). Phenotypic changes in diabetic neuropathy induced by a high-fat diet in diabetic C57BL/6 mice. *Exp Diabetes Res* 2011:848307.
 360. Lennertz RC, Medler KA, Bain JL, Wright DE, Stucky CL (2011). Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetic neuropathy. *J Neurophysiol* 106(2): 905-14.
 361. Perner C, Sokol CL (2021). Protocol for dissection and culture of murine dorsal root ganglia neurons to study neuropeptide release. *STAR Protoc* 8;2(1): 100333.
 362. Russell J, Feldman E (1999). Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in sympathetic neurons exposed to high glucose. *Hormone and Metabolic Research* 31: 90–6.
 363. Hattangady N, Rajadhyaksha M (2009). A brief review of *in vitro* models of diabetic neuropathy. *Int J Diabetes Dev Ctries* 29(4):143-9.

364. Vincent AM, Mclean LL, Backus C, Feldman EL (2005). Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *FASEB J* 19(6): 638-40.
365. Nair A, Jacob S (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7(2): 27-31.
366. Flier J, van Muiswinkel FL, Jongenelen CAM, Drukarch B (2002). The neuroprotective antioxidant α -lipoic acid induces detoxication enzymes in cultured astroglial cells. *Free Radic Res* 36(6): 695-9.
367. Zhang Y, He X, Wu X, Lei M, Wei Z, Zhang X, Wen L, Xu P, Li S, Qu S (2017). Rapamycin upregulates glutamate transporter and IL-6 expression in astrocytes in a mouse model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis* 8(2): e2611.
368. Das V, Kroin JS, Moric M, McCarthy RJ, Buvanendran A (2020). Early treatment with metformin in a mice model of complex regional pain syndrome reduces pain and edema. *Anesth Analg* 130(2): 525-534.
369. Mao-Ying QL, Kavelaars A, Krukowski K, Huo XJ, Zhou W, Price TJ, Cleeland C, Heijnen CJ (2014). The anti-diabetic drug metformin protects against chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a mouse model. *PLoS One* 9(6): e100701.
370. Ota K, Nakamura J, Li W, Kozakae M, Watarai A, Nakamura N, Yasuda Y, Nakashima E, Naruse K, Watabe K, Kato K, Oiso Y, Hamada Y (2007). Metformin prevents methylglyoxal-induced apoptosis of mouse Schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun* 357(1): 270-5.
371. Pereira AF, Pereira LMS, Silva CMP, Freitas Alves BW, Barbosa JS, Pinto FMM, Pereira AC, Silva KO, Pontes RB, Alencar NMN, Lima-Júnior RCP, Vale ML (2019). Metformin reduces c-Fos and ATF3 expression in the dorsal root ganglia and protects against oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy in mice. *Neurosci Lett* 709: 134378.
372. Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth CP, O'Carroll SJ, du Mez E, Angel CE, Graham ES (2015). Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors (Basel)*. 5(2): 199-222.
373. Chiu CH, Lei KF, Yeh WL, Chen P, Chan YS, Hsu KY, Chen AC(2017). Comparison between xCELLigence biosensor technology and conventional cell culture system for real-time monitoring human tenocytes proliferation and drugs cytotoxicity screening. *J Orthop Surg Res* 12(1): 149.

374. Pan T, Khare S, Ackah F, Huang B, Zhang W, Gabos S, Jin C, Stampfl M (2013). *In vitro* cytotoxicity assessment based on KC(50) with real-time cell analyzer (RTCA) assay. *Comput Biol Chem* 47: 113-20.
375. Türker Şener L, Albeniz G, Dinç B, Albeniz I (2017). iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp Ther Med* 14(3): 1866-1870.
376. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 740: 33-43.
377. O'Callaghan JP, Kelly KA, VanGilder RL, Sofroniew MV, Miller DB (2014). Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLoS One* 9(7): e102003.
378. Zhao WZ, Wang HT, Huang HJ, Lo YL, Lin AM (2018). Neuroprotective effects of baicalein on acrolein-induced neurotoxicity in the nigrostriatal dopaminergic system of rat brain. *Mol Neurobiol* 55(1): 130-137.
379. Chen W, Mi R, Haughey N, Oz M, Höke A (2007). Immortalization and characterization of a nociceptive dorsal root ganglion sensory neuronal line. *J Peripher Nerv Syst* 12(2): 121-30.
380. Freund WD, Reddig S (1994). AMPA/Zn(2+)-induced neurotoxicity in rat primary cortical cultures: involvement of L-type calcium channels. *Brain Res* 654(2): 257-64.
381. Baskar MK, Murthy PB (2018). Acute *in vitro* neurotoxicity of some pyrethroids using microelectrode arrays. *Toxicol In Vitro* 47: 165-177.
382. Salihoglu AK, Ayar A (2022). Investigation on the effect of selected autophagy/mitophagy modulator and antioxidant agents on cell viability of mouse sensory neurons. *Acta Physiol* 236(S725): 774.
383. Kleman AM, Yuan JY, Aja S, Ronnett GV, Landree LE (2008). Physiological glucose is critical for optimized neuronal viability and AMPK responsiveness *in vitro*. *J Neurosci Methods* 167(2): 292-301.
384. Verkhatsky A, Fernyhough P (2008). Mitochondrial malfunction and calcium dyshomeostasis drive neuronal pathology in diabetes. *Cell Calcium* 44(1): 112-22.
385. Sango K, Saito H, Takano M, Tokashiki A, Inoue S, Horie H (2006). Cultured adult animal neurons and Schwann cells give us new insights into diabetic neuropathy. *Curr Diabetes Rev* 2(2): 169-83.

386. Sanada M, Yasuda H, Omatsu-Kanbe M, Sango K, Isono T, Matsuura H, Kikkawa R (2002). Increase in intracellular calcium and calcitonin gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 111(2): 413-22.
387. Huang TJ, Price SA, Chilton L, Calcutt NA, Tomlinson DR, Verkhatsky A, Fernyhough P (2003). Insulin prevents depolarization of the mitochondrial inner membrane in sensory neurons of type 1 diabetic rats in the presence of sustained hyperglycemia. *Diabetes* 52(8): 2129-36.
388. Gummy LF, Bampton ETW, Tolkovsky AM (2008). Hyperglycaemia inhibits Schwann cell proliferation and migration and restricts regeneration of axons and Schwann cells from adult murine DRG. *Mol Cell Neurosci* 37(2): 298-311.
389. Yazar U, Ayar A (2023). Cortixin® ameliorates high glucose-induced neuropathy in cultured rat sensory neurons. *Neuroendocrinology* 113(9): 924-929.
390. Dey S, Murmu N, Mondal T, Saha I, Chatterjee S, Manna R, Haldar S, Dash SK, Sarkar TR, Giri B (2022). Multifaceted entrancing role of glucose and its analogue, 2-deoxy-D-glucose in cancer cell proliferation, inflammation, and virus infection. *Biomed Pharmacother* 156: 113801.
391. Pajak B, Siwiak E, Sołtyka M, Priebe A, Zieliński R, Fokt I, Ziemniak M, Jaśkiewicz A, Borowski R, Domoradzki T, Priebe W (2019). 2-deoxy-D-glucose and its analogs: From diagnostic to therapeutic agents. *Int J Mol Sci* 21(1): 234.
392. Pascoe WS, Smythe GA, Storlien LH (1989). 2-deoxy-D-glucose-induced hyperglycemia: role for direct sympathetic nervous system activation of liver glucose output. *Brain Res* 505(1): 23-8.
393. Borg WP, Sherwin RS, During MJ, Borg MA, Shulman GI (1995). Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. *Diabetes* 44(2): 180-4.
394. Chowdhury SKR, Zherebitskaya E, Smith DR, Akude E, Chattopadhyay S, Jolivald CG, Calcutt NA, Fernyhough P (2010). Mitochondrial respiratory chain dysfunction in dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats and its correction by insulin treatment. *Diabetes* 59(4): 1082-91.
395. Wu SB, Wu YT, Wu TP, Wei YH (2014). Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1840(4): 1331-44.

396. Zhao P, Dou Y, Chen L, Li L, Wei Z, Yu J, Wu X, Dai Y, Xia Y (2015). SC-III3, a novel scopoletin derivative, induces autophagy of human hepatoma HepG2 cells through AMPK/mTOR signaling pathway by acting on mitochondria. *Fitoterapia* 104: 31-40.
397. Zhang K, Zhou X, Wang J, Zhou Y, Qi W, Chen H, Nie S, Xie M (2021). Dendrobium officinale polysaccharide triggers mitochondrial disorder to induce colon cancer cell death via ROS-AMPK-autophagy pathway. *Carbohydr Polym* 264: 118018.
398. Zou J, Tan W, Liu K, Chen B, Duan T, Xu H (2022). Wnt inhibitory factor 1 ameliorated diabetic retinopathy through the AMPK/mTOR pathway-mediated mitochondrial function. *FASEB J* 36(10): e22531.
399. Totiger TM, Srinivasan S, Jala VR, Lamichhane P, Dosch AR, Gaidarski AA 3rd, Joshi C, Rangappa S, Castellanos J, Vemula PK, Chen X, Kwon D, Kashikar N, VanSaun M, Merchant NB, Nagathihalli NS (2019). Urolithin A, a novel natural compound to target PI3K/AKT/mTOR pathway in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 18(2): 301-11.
400. Al-Harbi SA, Abdulrahman AO, Zamzami MA, Khan MI (2021). Urolithins: The gut based polyphenol metabolites of ellagitannins in cancer prevention, a review. *Front Nutr* 8: 647582.
401. Tomás-Barberán FA, González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MA, Selma MV, García-Conesa MT, Espín JC (2017). Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol Nutr Food Res* 61(1).
402. Lisi L, Aceto P, Navarra P, Dello Russo C (2015). mTOR kinase: A possible pharmacological target in the management of chronic pain. *Biomed Res Int* 2015: 394257.
403. Abe N, Borson SH, Gambello MJ, Wang F, Cavalli V (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR) activation increases axonal growth capacity of injured peripheral nerves. *J Biol Chem* 285(36): 28034-43.
404. Clarke JP, Mearow K (2016). Autophagy inhibition in endogenous and nutrient-deprived conditions reduces dorsal root ganglia neuron survival and neurite growth *in vitro*. *J Neurosci Res* 94(7): 653-70.
405. Sun Q, Chen X, Ma J, Peng H, Wang F, Zha X, Wang Y, Jing Y, Yang H, Chen R, Chang L, Zhang Y, Goto J, Onda H, Chen T, Wang MR, Lu Y, You H, Kwiatkowski

- D, Zhang H (2011). Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(10): 4129-34.
406. Fendt SM, Bell EL, Keibler MA, Davidson SM, Wirth GJ, Fiske B, Mayers JR, Schwab M, Bellinger G, Csibi A, Patnaik A, Blouin MJ, Cantley LC, Guarente L, Blenis J, Pollak MN, Olumi AF, Vander Heiden MG, Stephanopoulos G (2013). Metformin decreases glucose oxidation and increases the dependency of prostate cancer cells on reductive glutamine metabolism. *Cancer Res* 73(14): 4429-38.
407. Ahsan A, Zheng YR, Wu XL, Tang WD, Liu MR, Ma SJ, Jiang L, Hu WW, Zhang XN, Chen Z (2019). Urolithin A-activated autophagy but not mitophagy protects against ischemic neuronal injury by inhibiting ER stress *in vitro* and *in vivo*. *CNS Neurosci Ther* 25(9): 976-986.
408. Griffith F (1928). The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond)* 27(2): 113-59.



EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Arif Kamil SALİHOĞLU
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Ana Bilim Dalı	2023
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi	2014
Lise	Trabzon Yomra Fen Lisesi	2004

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. İntörn hekim	Bologna Üniversitesi Tıp ve Cerrahi Fakültesi	2013-2014
2. Aile hekimi	T.C. Sağlık Bakanlığı Ardahan Merkez Toplum Sağlığı Merkezi	2014-2015
3. Başhekim	T.C. Sağlık Bakanlığı Ardahan Merkez Toplum Sağlığı Merkezi	2015-2016
4. Pratisyen Tabip ve İlçe Farmakovijilans Sorumlusu	T.C. Sağlık Bakanlığı Trabzon Çaykara Dr. İlhan Durgun İlçe Devlet Hastanesi	2017-2019
5. Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı	2019- ...
6. Asistan Temsilcisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri	2019-2021

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Fizyoloji

ÖDÜLLER / TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. Conference Grant of European Molecular Biology Organization (EMBO & EMBL) Symposium, Şubat 2022.
2. Federation of European Neuroscience Societies (FENS), ALBA Network, FENS-Kavli Network of Excellence (FKNE), Young International Brain Research Organization (YIBRO) – ALBA-FKNE-YIBRO Diversity Grant, Temmuz 2020.
3. Federation of European Physiological Sciences (FEPS) Travel Grant, Eylül 2019.
4. Travel Grant for Oral Presentation, The Physiological Society, Eylül 2019.
5. Student Travel Award Certificate, Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinir Bilimleri Derneği ve Türkiye Cumhuriyeti Belgrad Büyükelçiliği, Temmuz 2019.
6. Erasmus Öğrenim Hareketliliği Bursu, Eylül 2013-Temmuz 2014.