

**SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE YÜKSEK
GLUKOZLA OLUŞTURULAN HASARA KARŞI
NEOERİOSİTRİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF
NEOERIOCTRIN AGAINST HIGH GLUCOSE-INDUCED
DAMAGE IN SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELLS**

Deniz TULUMCUOĞLU

Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE YÜKSEK GLUKOZLA OLUŞTURULAN HASARA KARŞI NEOERİOSİTRİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Deniz TULUMCUOĞLU

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Haziran 2021, 62 Sayfa

Diabetes mellitus günümüzde yaygın olarak görülen bir metabolik hastalıktır ve her geçen gün insidansı önemli ölçüde artmaktadır. Diabetes mellitus'un artışıyla birlikte bu hastalığa bağlı gelişen komplikasyonlarda da önemli bir artış olmaktadır. Diyabetik nöropati bu komplikasyonlar arasında en sık görülenidir. Bu nedenle, diyabetik nöropatiyi hafifletmek, diyabetik nöropatiden korunma yolları bulmak, korumak veya iyileştirmek için çeşitli ilaçlar ve doğal aday ajanlar bulunmaya çalışılmaktadır. Flavonoidler, bitkilerde bol miktarda bulunan ve antioksidan ve antidiyabetik etkiye sahip fenolik bileşiklerdir. Neoeriositrin yeni keşfedilen bir flavonoid olup hakkında fazla bilgi yoktur. Bu nedenle flavonoidlerin antioksidan etkileri dikkate alınarak neoeriositrin'in aday bir ajan olabileceği düşünülerek bu çalışma planlanmıştır. Çalışmada SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonu (350 mM) ile hasar oluşturularak neoeriositrinin (5 µM, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında) koruyucu

etkisi araştırılmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi için kristal viyole ve tripan mavisi boyamalar yapılmıştır. Antioksidan özelliğini tespit etmek için oksidatif strese bağlı ortaya çıkan hücre içi ROS miktarı ve lipid peroksidasyon belirteci olan MDA miktarı ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca hücrenin metabolik aktivitesini belirlemek için ATP seviyeleri ölçülmüş ve apoptotik hücre ölümü TUNEL testi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre neoeriositrinin, konsantrasyona bağlı olarak ROS miktarını düşürdüğü ve 20 µM konsantrasyonda lipid peroksidasyonu azalttığı bulunmuştur. Diğer yandan neoeriositrinin artan konsantrasyonlarında SH-SY5Y hücrelerinde ATP miktarında artışa ve apoptotik hücre sayısında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlarla yüksek glukoz konsantrasyonu ile diyabetik nöropati modellenmesi yapılan SH-SY5Y hücrelerinde oluşan hasara karşı neoeriositrinin koruyucu etkisinin olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diyabetik nöropati, flavonoid, koruyucu etki, neoeriositrin, yüksek glukoz, SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF NEOERIOCITRIN AGAINST HIGH GLUCOSE-INDUCED DAMAGE IN SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELLS

Deniz TULUMCUOĞLU

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

June 2021, 62 Pages

Diabetes mellitus is a common metabolic disease and its incidence increases dramatically. With the spread of diabetes mellitus, there is a significant increase in the complications of disease. Diabetic neuropathy is the most common disease among these complications. Therefore, candidate natural agents have been searching for various medicines for relieving, protecting or remediation against diabetic neuropathy. Flavonoids, which are phenolic compounds found in plants, have antidiabetic and antioxidant effects. Neoeriocitrin is a newly discovered flavonoid and there is not much information about its effect. Therefore, this study has been planned by considering antioxidant effects of flavonoids, neoeriocitrin may be a candidate agent. In this study, the protective effect of neoeriocitrin was investigated by causing damage to SH-SY5Y neuroblastoma cells with high glucose concentration. In the study, crystal violet and trypan blue staining were performed to determine cell viability. In order to determine its antioxidant properties, the amount of intracellular ROS resulting from oxidative stress and the amount of MDA,

which is a lipid peroxidation marker, were measured. According to the results obtained, it was found that neoeriocitrin decreased the amount of ROS at increasing concentrations and had an effect on the reduction of lipid peroxidation at a concentration of 20 μ M. On the other hand, ATP levels were measured to determine the metabolic activity of the cell and apoptotic cell death determined by the TUNEL test. According to the results, it was found that the amount of ATP increased and the number of apoptotic cells decreased in SH-SY5Y neuroblastoma cells at increasing concentrations of neoeriocitrin. Considering all the results obtained from the study, it was revealed that neoeriocitrin had a protective effect against the damage in SH-SY5Y cells that were modeled for diabetic neuropathy with high glucose concentration.


Keywords: Diabetic neuropathy, flavonoids, protective effect, neoeriocitrin, high glucose, SH-SY5Y neuroblastoma cell line.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Diabetes mellitus	3
2.2. Diabetes mellitusun Mikrovasküler Komplikasyonları.....	4
2.3. Diyabetik Nöropati	5
2.4. Diyabetik Nöropatinin Patolojisi.....	6
2.5. Diyabetik Nöropatide Bitkisel Tedavi Yaklaşımları	9
2.6. Flavonoidler.....	10
2.7. Neoeriositrin	12
2.8. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücreleri.....	13
2.9. Hücre Canlılık Testleri	14
2.9.1. Kristal Viyole Canlılık Testi.....	14
2.9.2. Tripkan Mavisi Canlılık Testi.....	14
2.10. Apoptoz ve Apoptoz Tayini	15
2.11. Oksidatif Stres	16
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	18
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	18
3.2. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	18
3.3. Glukoz Konsantrasyonlarının Hazırlanması ve Hesaplanması	21
3.4. Neoeriositrin Stok Çözeltilisinin Hazırlanması ve Neoeriositrin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	21
3.5. Deney Planı	22
3.6. Sitotoksosite Testleri	25
3.6.1. Kristal Viyole Hücre Canlılık Testi.....	25

3.6.2. Tripan Mavisi Hücre Canlılık Testi.....	26
3.7. TUNEL Testi ile Apoptoz Tayini.....	26
3.8. Oksidatif Stres Ölçümü	27
3.8.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçümü.....	27
3.8.2. Lipid Peroksidasyon Ölçümü	29
3.9. ATP Seviyelerinin Ölçümü	31
3.10. İstatistiksel Analizler	33
4. SONUÇLAR.....	34
4.1. Tripan Mavisi Boyası İle Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları	34
4.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Yüksek Glukoz Konsantrasyon Uygulama Sonuçları...35	
4.3. Neeriositrin Konsantrasyonlarını Belirleme Sonuçları.....	36
4.4. ROS Ölçüm Sonuçları	37
4.5. Lipid Peroksidasyon Ölçüm Sonuçları	38
4.6. Hücre İçi ATP Ölçüm Sonuçları	39
4.7. TUNEL Testi Sonuçları.....	40
5. TARTIŞMA.....	43
6. YORUM	50
7. KAYNAKLAR.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Diyabetik nöropatide etkili metabolik yollar [12].	9
Şekil 2.2. Flavonoid grubunun genel kimyasal yapısı [31].	10
Şekil 2.3. Neoeriositrinin kimyasal yapısı.	12
Şekil 3.1. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin 10. pasaj mikroskop görüntüleri.	20
Şekil 3.2. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin 10. pasaj mikroskop görüntüleri.	20
Şekil 3.3. Deney Şeması	23
Şekil 3.4. Deney Planı	24
Şekil 3.5. DCFDA'nın, ROS tarafından floresan bir bileşik olan 2',7'-dikloroflorosein (DCF)'e dönüştürülmesi.	29
Şekil 4.1. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin büyüme eğrisi grafiği.	34
Şekil 4.2. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde kristal viyole testi sonucu hücre canlılık verileri. a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p \leq 0,05$).	35
Şekil 4.3. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde neoeriositrinin farklı konsantrasyonlarının kristal viyole testi ile hücre canlılık testi sonuçları. a: Glukoz kontrol grubundan farklı ($p \leq 0,05$).	36
Şekil 4.4. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre içi ROS ölçüm sonuçları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). b: 200 μ M hidrojen peroksit (H_2O_2) grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$).	38
Şekil 4.5. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde lipid peroksidasyonu ölçüm sonuçları.	39
Şekil 4.6. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre içi ATP miktarlarının ölçüm sonuçları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). b: Glukoz kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$).	40
Şekil 4.7. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde TUNEL testi ile belirlenen apoptotik hücre yüzdeleri. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). b: Glukoz kontrol grubu ile anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$).	41
Şekil 4.8. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin TUNEL testi mikroskop görüntüleri.  : Apoptotik hücre, A: Kontrol, B: 350 mM Glukoz, C: 5 μ M Neo+Glukoz, D: 10 μ M Neo+Glukoz, E: 20 μ M Neo+Glukoz,	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

β	Beta
μM	Mikromol
mM	Milimol
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece

Kısaltmalar

DM	Diabetes mellitus
T1DM	Tip 1 Diabetes mellitus
T2DM	Tip 2 Diabetes mellitus
DCFDA	Dikloroflorosein diasetat
DR	Diyabetik Retinopati
DN	Diyabetik Nöropati
DPN	Distal Simetrik Sensorimotor Polinöropati
DAN	Diyabetik Otonom Nöropati
O-GlcNAc	Protein-O- β -N-Asetil-D-Glukozaminil Transferaz
UDP-GlcNAc	Ürin Difosfat N-Asetil Glukozamin
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
AGE	Gelişmiş Glukasyon Ürünleri
PKC	Protein Kinaz C
DAG	Diaçilgliserol
PARP	Poli-ADP Riboz Polimeraz
FBS	Fetal Bovin Serum
DRG	Dorsal Kök Gangliyonları
ZJF	<i>Ziziphus jujuba</i>

PUFA	Çoklu Doymuş Yağlar
TCA	Trikloroasetik Asit
TBA	Tiobarbitürik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
MDA	Malondialdehit

1. GİRİŞ

Günümüzde obezitenin ve düzensiz beslenmenin artmasıyla birlikte diyabet ve hiperlipidemiye bağlı hastalıkların insidansı da her geçen gün artış göstermektedir. Diyabetin artmasıyla beraber diyabetin komplikasyonlarının görülme sıklığı da günden güne artmaktadır. Bu sebeple diyabetin komplikasyonları arasında en fazla görülen ve ileri dönemlerde amputasyon gibi çok ciddi sonuçlara sebep olan diyabetik nöropati hastalığı insidansında da önemli oranda artış gözlenmektedir. Görülen bu artışa rağmen bu hastalık için uygulanan modern tedaviler tek hedefe odaklanmaktadır ve bu nedenle karmaşık patolojinin bütünsel bir şekilde ele alınmasında başarısız olmaktadır [1].

Hiperglisemi, diyabetik nöropati (DN), retinopati ve nefropati gibi ciddi komplikasyonların gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Diyabetik nöropati, nöronal hasara yol açan ve nöral diyabetik komplikasyonlara neden olan yüksek glukozu uzun süre maruz kalmanın ciddi bir sonucudur [2]. Sunulan deneysel ve klinik kanıtlar, oksidatif strese neden olan hücresel fonksiyondaki değişikliklerin DN'nin gelişmesinde ve ilerlemesinde başta gelen bir faktör olduğunu göstermektedir [3].

Bu hastalıkla ilgili bir hedefe odaklanan ilaçlar, muhtemelen karmaşık fizyolojik dengenin bozulması nedeniyle piyasadan sıklıkla geri çekilmektedir. Bu nedenle diyabetik nöropati için rahatlatıcı, hastalığın seyrini olumlu yönde etkileyen, koruma veya iyileştirmeye yönelik çeşitli ilaçlar, doğal aday ajanlar bulunmaya çalışılmakta ve bu konuda çalışmalara devam edilmektedir. Son zamanlarda yoğun olarak çalışılan, bitkilerle sarı, turuncu, kırmızı gibi renkleri veren, insanlarda antioksidan etkisi olduğu bilinen bitkisel kaynaklı flavonoidlerin diyabetik nöropati üzerinde koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir [4].

Flavonoidler; çeşitli bitkilerden izole edilen fenolik bileşiklerdir. Birçok çalışmada flavonoidlerin antialerjik, antiinflamatuvar ve antioksidan biyolojik aktiviteler sergilediği ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, serbest radikal oluşumunu azaltması ve serbest radikalleri temizleyebilme özelliklerinden dolayı flavonoidlerin antioksidan aktivitesi en çok çalışılan alanlar arasında başta gelmektedir [5]. Flavonoidlerin bilinen bu özelliklerinden dolayı oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu kaynaklı hastalıklarda önemli terapötik ajanlar olabileceğiyle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır [6].

Neeriositrin, yenilerde keşfedilmiş, başta turunçgiller (Citrus) olmak üzere birçok bitki ve meyvede bulunan bir flavonoiddir. Citrus flavonoidlerinin genel anlamda oksidatif

stres kaynaklı hastalıklarda fayda sağladığı bilinmektedir [7]. Bununla birlikte neoeriositrinin antioksidan kapasitesi hakkında bir bilgi bulunmamaktadır.

Mevcut bilgilerden yola çıkarak bu tez kapsamında diyabetik nöropati araştırmalarında en yaygın kullanılan hücre hatlarından biri olan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılarak neoeriositrinin hiperglisemiye bağlı olarak gelişen diyabetik nöropatide koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Bu doğrultuda SH-SY5Y hücrelerine yüksek glukoz konsantrasyonu uygulanarak hasar oluşturulmuş ve bu hasara karşı neoeriositrinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Tezin amacına uygun olarak sitotoksisite testleri, oksidatif stres ölçümleri ve hücre ölüm tayini testleri yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) karakteristik uzun süreli komplikasyonların eşlik ettiği bir metabolik düzensizliktir ve en önemli anormal glukoz metabolizması hastalığıdır [8].

Diabetes mellitus, insülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan kronik hiperglisemik bir durumla karakterize metabolik bozukluktur. Diyabet kaynaklı uzun süreli hiperglisemi özellikle böbrekler, gözler, sinirler, kalp ve kan damarlarını etkilemektedir. Diyabet gelişiminde birçok karmaşık patojenik süreçler yer almaktadır. Bunlar, pankreatik β hücrelerinden, hücrelerde oluşan insülin direncine kadar varan anormallikler gösterebilmektedir. Diyabette karbohidrat metabolizmasının yanı sıra yağ ve protein metabolizmasında da anormallikler gözlenmektedir. Bu anormalliklerin temeli, insülinin hedef dokular üzerindeki yetersiz etkisidir [9, 10].

Hiperglisemi belirtileri arasında özellikle poliüri (belli bir zaman aralığında yüksek miktarda idrarın üretilip atılması), polidipsi (çok fazla su içme isteği), kilo kaybı ve bulanık görme bulunmaktadır. Kontrolsüz diyabetin akut ve hayati olabilecek sonuçları arasında ketoasidozlu hiperglisemi öne çıkmaktadır [9].

Diyabetin uzun vadeli vasküler komplikasyonları arasında retinopati; potansiyel görme kaybına sebep olmaktadır. Nefropati, böbrek yetmezliğine yol açabilmektedir. Periferik nöropati, ayak ülseri, amputasyon ve Charcot eklem hastalığı riski taşımaktadır. Otonom nöropati ise gastrointestinal, genitoüriner, kardiyovasküler semptomlara ve cinsel işlev bozukluğuna neden olabilmektedir [9]. Diyabet vakalarının büyük çoğunluğu iki geniş kategoriye ayrılmaktadır.

Tip 1 diabetes mellitus (T1DM), dünya çapında diyabet vakalarının sadece % 10'unu temsil eder, ancak yaşamda çok daha erken dönemde görülür. T1DM, pankreasın insülin salgılayan β hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanmaktadır [11].

T1DM'nin nedenini insülin sekresyonunun eksikliği oluşturmaktadır. Bu tip diyabet genellikle pankreatik adacıklarda meydana gelen otoimmün patolojik süreç ve genetik belirteçlerle tanımlanabilir. T1DM'de hem insülin direnci hem de β hücreleri tarafından azalmış insülin sekresyonu sinerjistik bir rol oynar. Pankreasın β hücrelerini yok eden ve insülin eksikliğine yol açan faktörler; genetik ve çevresel etkili veya immünolojik faktörler ile ilgili olabilmektedirler [9, 11].

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM), tüm diyabet vakalarının % 90-95'ini oluşturmaktadır ve genellikle 40 yaşından sonra görülmeye başlar; ancak, T1DM'da olduğu gibi T2DM de herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir ve günümüzde çocuklarda da görülebilmektedir.

T2DM'nin ana patofizyolojik özellikleri, bozulmuş insülin sekresyonu ve artan insülin direncidir. Yaşlanma, obezite, alkol, sigara kullanımı vb. faktörler T2DM patogenezinin bağımsız risk faktörleri olmasına rağmen, pankreatik hücre fonksiyonunun bozulması özellikle T2DM'un ilerlemesinde artışa sebep olmaktadır. Genetik yatkınlık, obezite ve fiziksel hareketsizlik T2DM diyabeti tetikleyen etkenler arasındadır. Hastalığın temelinde genetik olarak yatkın kişilerde yaşam tarzı ile tetiklenen insülin direnci ve zamanla insülin salgısı azalması söz konusudur [10].

2.2. Diabetes mellitusun Mikrovasküler Komplikasyonları

Diyabete özgü komplikasyonlar arasında mikrovasküler komplikasyonlar retinopati, nefropati ve nöropatidir.

Diyabetik retinopati (DR), yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 10.000 yeni körlük vakasından sorumludur. Bu istatistik Dünya genelinde ele alındığında çok büyük bir yüzdeyi temsil etmektedir. Genellikle proliferatif retinopati ve arka plan retinopatisi iki gruba ayrılır. Proliferatif retinopati, retinanın yüzeyinde yeni kan damarlarının oluşumu ile karakterizedir ve kanamalara yol açabilmektedir. Arka plan retinopatisi ise retinanın orta katmanlarındaki küçük kanamaları içerir. Klinik olarak “nokta” olarak görünürler ve bu nedenle sıklıkla “nokta kanamaları” olarak adlandırılırlar [12].

Böbrek yetmezliğine sebep olan en büyük hastalık diyabetik nefropatidir. Öncelikli olarak mikroalbuminüri olan diyabetik hastalarda, mikroalbuminürinin ilerleyen dönemlerinde tipik olarak proteinüri ve diyabetik nefropati oluşumu gözlenir. Bu ilerleme hem T1DM hem de T2DM'de görülür. T2DM hastaların %7'si kadarında diyabet teşhisi konulduğu anda mikroalbuminüri görülmektedir. Böbrekteki patolojik değişiklikler, artmış glomerüler bazal membran kalınlığı ve mikroanevrizma oluşumu ile karakterizedir. Diyabetik nefropatinin altında yatan hasar mekanizmaları ayrıca diyabetik retinopatinin hasar mekanizmalarının bir kısmını veya tamamını içerebilmektedir [12].

Diyabetik nöropati, hem T1DM hem de T2DM'in çok yaygın görülen ve maliyeti oldukça yüksek olan bir komplikasyonudur. Hiperglisemi, nöronlarda oksidatif stresi indükler ve çoklu biyokimyasal yolların aktivasyonu ile diyabetik nöropati oluşumuna yol açar. Nöropati prevalansının yeni teşhis edilen hastalarda yaklaşık % 8, uzun süredir devam eden hastalığı olan hastalarda ise % 50'den fazla olduğu tahmin edilmektedir. Diyabetik nöropati hayat standardını düşüren şiddetli ağrı ve en sonunda amputasyon ile sonuçlanabilmektedir [12, 13].

2.3. Diyabetik Nöropati

Diyabetik nöropati (DN), uzun süreli T1DM veya T2DM diyabet hastalarının periferik sinir sisteminde hasar oluşmasıdır ve diyabetin, retinopati ve nefropati de dahil olmak üzere mikrovasküler komplikasyonlarından biridir. Diyabetik nöropati aynı zamanda diyabet hastalarında en sık karşılaşılan komplikasyonudur. Nöropati çoğunlukla uzun süre DM hastalığı olan kişilerde ortaya çıkma eğilimindedir. Diyabetik nöropati insan hayatını olumsuz yönde etkilemekle birlikte hayat kalitesini de oldukça düşüren günümüzün önemli metabolik hastalıklarından biridir [13].

Diyabetli hastaların yaşamları boyunca % 60-70'e varan kısmında diyabetik nöropati gelişmektedir. Diyabetik nöropati, farklı anatomik dağılımları, klinik seyirleri ve muhtemelen altta yatan patojenik mekanizmaları olan klinik ve subklinik sendromların bir spektrumunu kapsayan tanımlayıcı bir terimdir. Her biri, diabetes mellitustan kaynaklanan periferik somatik veya otonom sinir liflerinde yaygın veya fokal hasar ile karakterize edilir [13].

Diyabetik nöropati sendromları iki genel başlık altında toplanabilir. Bunlar diffuz ve fokal nöropatilerdir. Bunlar arasında distal simetrik sensorimotor polinöropati (DPN) ve diyabetik otonomik nöropati (DAN) yaygındır, genellikle kroniktir ve sıklıkla ilerleyicidir. Fokal nöropatiler daha az yaygındır, genellikle başlangıçta akut ve genellikle kendi kendini sınırlarlar [13].

DPN'de duyu eksiklikleri genellikle motor sinir fonksiyon bozukluğunu gölgede bırakır ve ilk önce ekstremitelerin distal kısımlarında görülür. Diyabetin artan süresi veya şiddeti ile birlikte bir "çorap eldiven" dağılımında (bu dağılım, nöropatili hastalarda genellikle geceleri yoğunlaşan dirsekler ve eller arasında ve dizler ve ayaklar arasında oluşan şiddetli, tipik ağrı ve uyuşma rahatsızlığını belirten bir dağılım modelidir) proksimal

olarak ilerler. Daha ileri asemptomatik nöropati ilk önce ayağın ülserasyonu veya nöroartropati (Charcot eklemleri) gibi geç komplikasyonlarla ortaya çıkabilmektedir.

Diyabetik otonom nöropati (DAN) ise diğer bir yaygın diyabetik nöropati semptomudur. DAN sıklıkla DPN'ye eşlik eder ve herhangi bir sempatik veya parasempatik otonomik fonksiyonu bozabilir. Her ne kadar DAN oldukça yaygın ve belirgin derecede düşük yaşam kalitesi ve artmış mortalite ile ilişkili olsa da, diyabetin en az tanınan ve en az anlaşılan komplikasyonları arasındadır [13, 14].

Diyabetik nöropatinin fokal formları, tek (mononöropati) veya çoklu periferik sinirlere (mononöropati multipleks), kraniyal sinirlere, brakial veya lumbosakral pleksuslara (pleksopati) veya sinir köklerine zarar verir. Fokal diyabetik nöropatiler nispeten nadirdir, başlangıçta akut olarak seyreder ve kendi kendini sınırlar; yaşlı hastalarda ortaya çıkma eğilimindedir. En sık görülen kraniyal nöropati üçüncü sinirleri etkilemektedir [13, 15].

Sonuç olarak, DPN ve DAN çok yaygındır, genellikle dağınık ve ilerleyicidir. Bununla birlikte fokal nöropatiler genellikle nadirdir, başlangıçta ani şekilde görülür, sıklıkla kendi kendini sınırlar ve yaşlı hastalarda ortaya çıkma eğilimindedir [13, 15].

2.4. Diyabetik Nöropatinin Patolojisi

Temel bilimler ve klinik araştırmalar kapsamında yapılan çalışmalar, hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresin nörotoksisite patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Yüksek glukoz seviyesi sonucu serbest radikallerin artışı ve antioksidanların azalmasıyla oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Hipergliseminin neden olduğu artan hücresel oksidatif stres, nöropatinin ilerlemesi ile ilişkili birkaç glukoz metabolik yolunu uyarmaktadır. Bunlar arasında protein kinaz aktivasyonu, poliol yolağı, (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonu bulunmaktadır. Apoptoz hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda yüksek glukoz ile uyarılan nöronal hücre ölümü için potansiyel bir mekanizma olarak bildirilmiştir. Oksidatif stres, çeşitli kimyasal ve fizyolojik indükleyicilerle apoptotik hücre ölümüne neden olabilmektedir. Örneğin, hidrojen peroksit, çeşitli hücre tiplerinde apoptozu indükleyebilmektedir ve bu etki antioksidanlar tarafından inhibe edilebilmektedir. Araştırmalarda, doğal ürünlerin veya bunların aktif bileşenlerinin iyileştirici özellikleri ve nörodejeneratif ve kardiyovasküler bozukluklar gibi kronik hastalıkların önlenmesinde ve/veya tedavisinde antioksidan tedavinin önemi kaydedilmiştir [16].

Diyabette sinir hasarı, özellikle metabolik nedenlerle periferik sinir aksonlarında beslenme bozukluğu, oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi, çeşitli metabolik yollarda aksaklıklar ve yüksek kan yağları gibi faktörlerin etkisi ile oluşmaktadır. Glisemik kontrol ve iyi bir ayak bakımı dışında diyabetik nöropatinin bilinen kesin bir tedavisi yoktur. Bu mekanizmaya dayalı tedavileri belirlemek amacıyla bozukluğun patogenezinin yönelik devam eden araştırmalar ışığında son yıllarda nöropatiye yol açan poliollerin gibi çok sayıda farklı metabolik yolun bozulmuş olduğu görüşü ortaya çıkmıştır. Bu görüşün temelinde de hücreler oksidatif stres yaşamaktadır [17].

Diyabetik nöropati hastalığında etkili metabolik yollar aşağıdaki gibidir.

Diyabetik nöropati hastalığında özellikle polioller yolu karşımıza çıkmaktadır. Polioller yolu, iki aşamalı bir indirgeme/oksidasyon yoluyla glukozu fruktoza dönüştürür: Aldoz redüktaz enzimi, glukozu sorbitole indirger ve daha sonra sorbitol dehidrojenaz, sorbitolu fruktoza okside eder. Hem aldoz redüktaz hem de sorbitol dehidrojenaz, diyabetik komplikasyonlara eğilimli dokularda yaygındır. Aldoz redüktaz yolu, hipergliseminin kitlesel etkisi ile aşırı aktivasyona yatkındır, bu da NADPH ve sorbitol yolları metabolitlerinden ikisinin dengesizliğine yol açar. Yoldan geçen fazla glukoz akışı, azalmış glutatyonun rejenerasyonu için gerekli olan NADPH'nin tüketimine neden olur [18, 19].

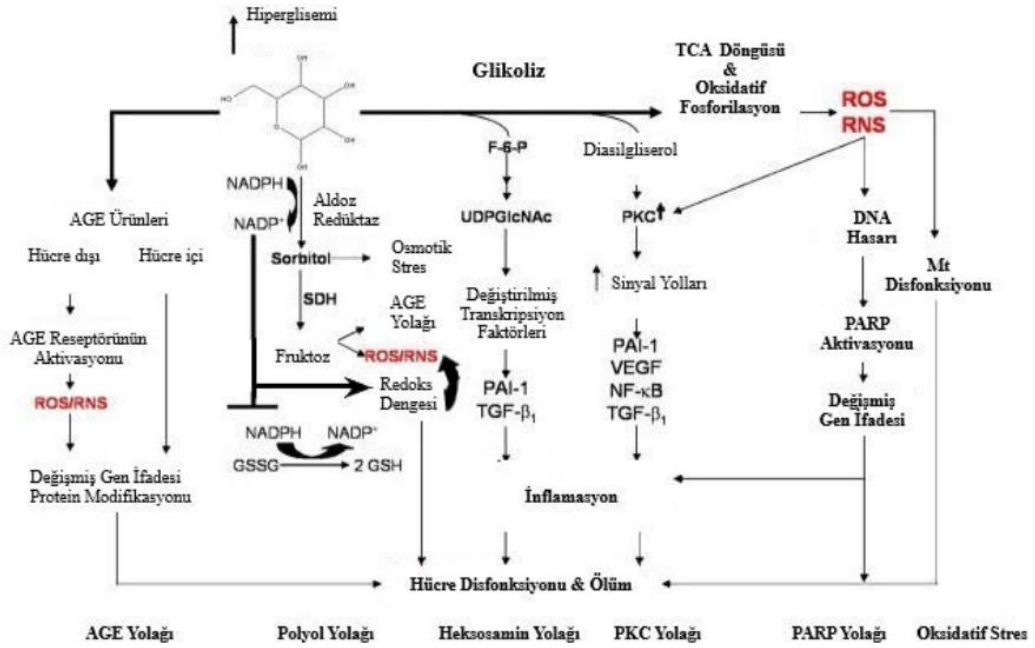
Hücre içi indirgeme potansiyeli, polioller yolundaki ikinci aşama olan fruktoz üretimi ile daha da azalmaktadır. Hiperglisemiye bağlı aşırı fruktoz üretimi, NADPH'nin daha da tükenmesini sağlar. Son olarak aldoz redüktazın aktivasyonu, hücreyi ölüme veya bazı hastalıkların oluşumuna götürebilecek protein kinaz C yolunu aktive eden diaçilgliserol oluşumunu artırır. Polioller yolu, diyabetik nöropatinin tedavisinde ilaç müdahalesinin bir hedefi olmuştur ve olmaya devam etmektedir [17, 20].

İkinci olarak gelişmiş glikasyon ürünleri (AGE), plazma proteinlerinin enzimatik olmayan glikasyonu ile oluşturulan, moleküler konformasyonlarını değiştirerek, enzim aktivitesini bozarak ve reseptör fonksiyonuna müdahale ederek normal işlevlerinde bozulmaya neden olan heterojen bir molekül grubudur. AGE'ler farklı hücre tiplerinde birikir ve sadece proteinlerle değil, aynı zamanda çeşitli diyabetik komplikasyonlara katkıda bulunan lipitler ve nükleik asitlerle çapraz bağlanarak hücre dışı ve hücre içi yapı ve işlevlerini etkiler. Ayrıca, AGE'ler LDL partiküllerini değiştirir ve vasküler hasarla birlikte ateroskleroza hızlandırır [12, 21].

Üçüncü metabolik yol heksozamin metabolik yoludur. Heksozamin metabolik yolunda da poliol yolunda olduğu gibi, mevcut fazla glikoz, heksozamin yolunda kütle etkisinin artmasına neden olur. Normal koşullar altında, az miktarda glikolitik ara madde fruktoz-6 fosfat, glikolizden heksozamin yoluna aktarılır. Heksozamin yolu, glutamin fruktoz-6 fosfat amidotransferaz ile fruktoz-6 fosfatı glukozamin-6 fosfata dönüştürür. Glukozamin-6 fosfat daha sonra O-GlcNAc transferazı için zorunlu substrat olan üridin difosfat-N-asetil glukozamine (UDP-GlcNAc) dönüştürülür ve O-GlcNAc'ı transkripsiyon faktörlerine bağlar, böylece gen ekspresyonunu değiştirir. Böylece, bu yol boyunca hiperglisemiye bağlı bir artış gözlenir ve bu durum gen ekspresyonunda anormalliklere neden olur [12, 22].

Diyabetik nöropatideki başka bir metabolik yol ise protein kinaz C (PKC) metabolik yoludur. Hiperglisemi, PKC'yi aktive eden diaçilgliserol (DAG) sentezini artırarak (PKC) yolunun aşırı aktivasyonunu uyarır. Özellikle PKC β -isoformun, retinopati, nefropati ve kardiyovasküler hastalık gelişimi ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. PKC izoformlarının aşırı ekspresyonu ayrıca doğrudan diyabetik nöropatinin başlamasına katkıda bulunabilecek insülin direncini indüklemektedir [12, 23, 24].

Son olarak Poli-ADP Riboz Polimeraz (PARP) metabolik yolunda, oksidatif stresle yakından ilişkili bir nükleer enzim olan PARP, duyu nöronlarında, Schwann hücrelerinde ve endotel hücrelerinde ifade edilir. Hiperglisemi, serbest radikaller ve oksidanlar PARP aktivasyonunu uyarırken, PARP ayrıca oksidatif strese neden olur. PARP'ın katalitik aktivitesi, gen ekspresyonundaki değişiklikler, serbest radikal ve oksidan konsantrasyonundaki artışlar, NAD⁺ tükenmesi ve glikolitik ara maddelerin PKC aktivasyonuna ve AGE oluşumuna yol açabilecek bir takım zararlı etkilere neden olur (Şekil 2.1.) [12, 25, 26].



Şekil 2.1. Diyabetik nöropatide etkili metabolik yollar [12].

2.5. Diyabetik Nöropatide Bitkisel Tedavi Yaklaşımları

Diyabetik nöropati, kronik bir diabetes mellitus komplikasyonudur. En çok görülen belirtileri arasında, hareket kabiliyetinde yoğun bir azalma ve periferik kısımlarda şiddetli ağrı ve uyuşma olmasıdır. Nöronlardaki oksidatif stres, serbest radikallerin oluşumuyla sonuçlanan çoklu biyokimyasal yolların aktivasyonunu başlatır. Mevcut, formülasyonların yanı sıra, hiperglisemi ve ilişkili komplikasyonları kontrol etmek için bitkisel bazlı doğal ürünler ile ilgili kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır [27].

Modern tıp formülasyonlarında, diyabetin zararlı etkilerini ve komplikasyonlarını azaltmak için çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Bitkisel tedavi yöntemleri daha az yan etkiye sahip olmaları ve daha düşük maliyetli olmaları nedeniyle özellikle son dönemlerde daha sık tercih edilmektedir. Son yıllarda bitkilerin tıbbi amaçlarda kullanılmasında büyük gelişmeler olmuştur ve bu ilaçlar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde doğal kaynaklı oldukları ve daha az yan etkiye sahip oldukları için popülerlik kazanmaktadır. Bu nedenle, farklı şifalı bitkilerin sahip olduğu potansiyel göz önüne alındığında, günümüzdeki mevcut araştırmalar, dünyada büyük bir ekonomik soruna yol açan ve yüksek oranda sakat bırakma ihtimaline sahip bir hastalık olan diabetes

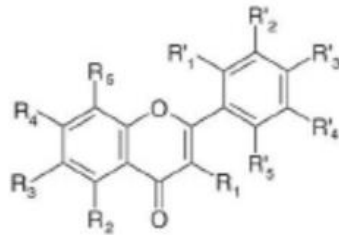
mellitus ve kardiyomiyopati ve nöropati gibi ilişkili komplikasyonların tedavisinde kullanılan bitkisel ilaç preparatlarına ve bitkilere odaklanmaktadır [28].

2.6. Flavonoidler

Flavonoidler, en az 6000 fenolik bileşik içermektedir ve en büyük bitki sekonder metabolit gruplarından biridir. Meyveler, sebzeler, fındık, tahıl tohumları, kakao, çikolata, çay, soya, kırmızı şarap, otlar ve içecek ürünlerinde yaygın olarak bulunurlar [29].

Bu fenolik bileşikler, yapılarına göre çeşitli alt gruplara ayrılır: flavonlar, flavonoller, izoflavonlar, flavanonlar ve antosiyaninler. Flavonoidlerin, antioksidan, anti-enflamatuar, anti kanser, antimikrobiyal, antidiyabetik ve antialerjik özellikleri bilinmektedir. Diyabet, birçok biyokimyasal yolu etkileyen ve retinopati, nöropati, nefropati gibi ikincil komplikasyonlara yol açan kronik ve ilerlemeye meyilli bir metabolik bozukluktur. Bunlar arasında, diyabetik nöropatinin tedavisi ve izlenmesi, doktorlar ve farmasötik endüstrileri için büyük bir zorluktur. Flavonoidler, antioksidan özellikleri sayesinde diyabet ve ilgili komplikasyonlarının tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca flavonoidler, oksidatif stresin azalması, glukoz kullanımının artması, ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumunda azalma ve α -glukozidaz enziminin inhibisyonu gibi diyabetik nöropatinin ilerlemesinde rol oynayan çeşitli metabolik yolları inhibe edebilmektedir [30].

Flavonoidler yapısal olarak, oksijenli heterosiklik bir halka (C halkası) oluşturan bir 3-karbon zinciri ile bağlanan, iki aromatik halkadan (A ve B halkaları) oluşur. Doymamışlık derecesine ve kimyasal modeline bağlı olarak farklı flavonoid sınıfları bulunmaktadır (Şekil 2.2.) [29, 31].



Şekil 2.2. Flavonoid grubunun genel kimyasal yapısı [31].

Flavonoidler, günümüzde çeşitli nutrasötik, farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda vazgeçilmez bir bileşen olarak kabul edilmektedir. Bu, temel hücrel enzim fonksiyonunu düzenleme kapasiteleriyle birlikte antioksidatif, antiinflamatuvar, antimutajenik ve antikanserojen özelliklerine atfedilmektedir [6, 32].

Flavonoidler üzerine araştırma ve geliştirme çalışmalarının mevcut eğilimleri, flavonoidlerin izolasyonu, tanımlanması, karakterizasyonu, fonksiyonları ve son olarak sağlık yararları üzerine uygulamaları ile ilgilidir. Moleküler alandaki yerleri ve biyoinformatik bilgisi de endüstri tarafından potansiyel uygulamaları ve üretimi tahmin etmek için kullanılmaktadır [6].

Flavonoidler uzun zamandır geleneksel tıpta esas olarak antioksidan özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Örneğin, *Radix puerariae* (Puerarin) uzun yıllardır diyabet tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca flavonoidler, antioksidatif, antiinflamatuvar ve antikanserojenik özellikleri ve temel hücrel enzim fonksiyonlarını modüle etme kapasiteleri nedeniyle insan sağlığı açısından yararlı, geniş bir etki yelpazesine sahiptir [32, 33].

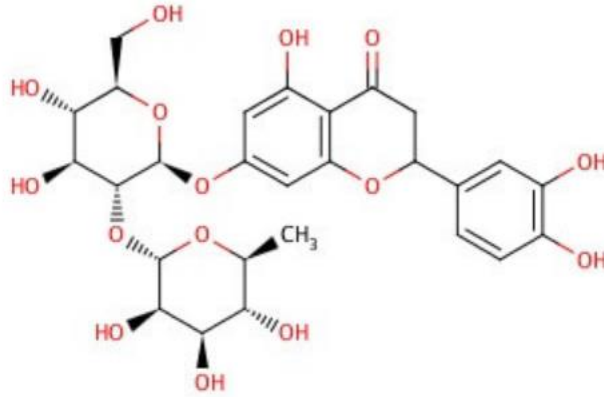
Flavonoidlerin antiinflamatuvar, antioksidan ve antihiperlipidemik etkileri geniş ölçüde gösterilmiştir. Bu nedenle, bu bileşikler özellikle son zamanlarda potansiyel antidiyabetik ilaç çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu konuya, flavonoidlerin diyabet için etkili olabilecek çözümler sunabilmesi hipotezine dayanarak yapılan çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışmada değinilmektedir [34, 35].

Flavonoidler glukoz metabolizmasını veya insülin duyarlılığını farklı seviyelerde düzenler, glukoz alımını ve insülin sekresyonunu artırır ve glukoz üretimini inhibe eder [36]. Flavonoidlerin farklı dokulardaki, örneğin, iskelet kası, beyaz yağ dokusu, karaciğer, ince bağırsak, pankreas ve böbrek gibi antidiyabetik etkisini gösteren birçok yayın bulunmaktadır [37].

Ayrıca flavonoidlerin antimikrobiyal aktiviteleri de bilinmektedir. Bununla beraber birçok çalışmada, flavonoidlerin, antifungal, antibakteriyel ve antiviral aktivite özelliklerine sahip yapıları izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Örneğin quercetin, naringin, hesperetin ve kateşin gibi flavonoidlerin, değişken derecede antiviral aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir ve bu flavonoidler bazı RNA ve DNA virüslerinin çoğalmasını ve enfektivitesini etkilemektedir. Sonuç olarak flavonoidler bilinen bu özellikleri nedeniyle,

günümüzde beslenme, gıda güvenliği ve sağlık alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [38, 39].

2.7. Neeriositrin



Şekil 2.3. Neeriositrinin kimyasal yapısı.

Neeriositrin son dönemlerde keşfedilmiş, başta turuncgiller (*Citrus*) olmak üzere birçok bitki ve meyvede bulunan önemli bir flavonoiddir. Özellikle turuncgil meyvelerinden bergamotun, limon kabuğunun ve kamkat meyvesinin neeriositrin içerdiği bildirilmiştir. Neeriositrinin yapısı naringin flavonoidi ile benzerlik göstermektedir ve *Drynaria* bitkisinin rizomundan da izole edilmiştir (Şekil 2.3.) [40-42].

Hücre modeli olarak insan adipoz dokusundan mezenşimal kök hücreler kullanılarak yapılan bir çalışmada *Citrus bergamia* suyundan elde edilen ekstraktın adipogenez ve lipoliz üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında *Citrus bergamia* ekstraktı analiz edilmiş ve içeriğinde apigenin, neeriositrin, naringin başta olmak üzere birçok flavonoidin tayini yapılmıştır [43].

İnsan keratinosit hücre hattı olan NCTC 2544 hücrelerinde yapılan çalışmada interferon-gama (IFN- γ) ve histamin (H) ile muamele edilen hücrelerde neeriositrin, naringin, neohesperidin ve diğer flavonoidleri içeren *Citrus bergamia*, Risso ve Poiteau'dan elde edilen ekstraktların antienflamatuar/antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. Aynı zamanda ekstrakt içerisinde bulunan flavonoid içeriği de değerlendirilmiş ve neeriositrinin varlığı %72 oranında tespit edilmiştir. Kullanılan yöntemler ve yapılan

testler sonucunda elde edilen ekstraktın antienflamatuar/antioksidan etki gösterdiği bulunmuştur [44].

Bir başka çalışmada naringin ve neoeriositrin açısından zengin olduğu tespit edilen tıbbi bir eğrelti türü olan *Drynaria roosii* ile yapılmıştır. Bu çalışmada preosteoblast MC3T3-E1 hücreleri kullanılarak naringin ile neoeriositrinin osteojenik farklılaşma ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonunda neoeriositrinin, naringinden daha fazla hücre proliferasyonuna ve osteojenik farklılaşmaya neden olduğu bildirilmiştir [45].

Citrus flavonoidleri ve bu flavonoidlerin biyolojik özelliklerini araştırmak için yüksek konsantrasyonlarda flavonoid içeren turuncgil meyvelerinin incelendiği çalışmada ise Citrus flavonoidlerinin antikanserojen ve antitümör aktivitesi içeren geniş bir biyolojik spekturuma sahip olduğu bildirilmiştir [46].

Yapılan literatür araştırmasında neoeriositrin flavonoidinin etkileriyle ilgili fazla bilgiye ulaşılamamış ve diyabetik nöropati ile yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla, bu tez çalışması kapsamında *in vitro* koşullarda SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında yüksek glukozla diyabetik nöropati modeli oluşturularak neoeriositrinin olası etkileri araştırılmıştır.

2.8. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücreleri

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı ilk olarak SK-N-SH hücre hattı adıyla 1973 yılında nöroblastoması olan 4 yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliğinden izole edilmiştir. Daha sonra alt kültür yöntemi ile sırasıyla SH-SY ve en son olarak üçüncü kültürde SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı elde edilmiştir. SH-SY5Y hücre hattını diğer alt kültürlerinden ayıran özelliği dopamin beta hidroksilaz enzim aktivitesi sayesinde dopamini noradrenaline çevirebilmesidir. Ayrıca glutamati dekarboksilleyerek gamma amino bitürik asit formuna (GABA) dönüştürebilmektedir [47].

SH-SY5Y hücre hattı nörotoksisite çalışmalarında kullanılmasının yanı sıra diyabetik nöropati araştırmalarında da en yaygın kullanılan hücre hatlarından biridir. Bu hücreler, yüksek glukoz ile muamele edildiğinde diyabetik nöropati modeli oluşturulabilmektedir [48].

Son dönemde diyabetik nöropati ile ilgili yapılan çalışmalarda hem hayvan modellerinde hem de insan sinir biyopsilerindeki bulgulara göre; oksidatif stres, mitokondriyal (Mt) membran depolarizasyonu (MMD) ve programlanmış hücre ölümünün (PCD) indüksiyonu ile diyabetik nöropatinin yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı ile yapılan bir çalışmada diyabetik nöropati açısından oksidatif stres ve programlanmış hücre ölümünün ayrıntılı mekanizması streptozotosin (STZ) ile nöropati oluşturularak incelenmiştir [49].

SH-SY5Y hücrelerinin kullanıldığı bir diğer çalışma konusu ise sinyal iletim değişiklikleridir. Sinyal yollarında, anormal nitrik oksit üretimi ve Na⁺/K⁺ pompasının aktivitesinin incelendiği çalışmalarda da bu hücre hattı kullanılarak araştırmalar yapılmaktadır.

2.9. Hücre Canlılık Testleri

2.9.1. Kristal Viyole Canlılık Testi

Kristal viyole boyaması *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında canlılık analizleri için kullanılan ve DNA'yı ve proteinleri boyayan güvenilir bir yöntemdir. Kristal viyole boyası özellikle yüzeye tutunan hücrelerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücrelerde ölüm gerçekleşirse, hücreler yüzeye tutunamaz hale gelir ve daha sonra hücre popülasyonundan kaybolur, bu da bir kültürdeki mor boyama miktarını azaltır. Kristal viyole boyası canlı hücrelerdeki DNA ve proteinlere bağlanarak mavi-mor renge boyar. Ölü hücrelerin DNA ve proteinlerine bağlanamayacağı için açık renk bir ışıma görülerek düşük OD değerlerinin okunmasına sebep olur. Bununla birlikte, canlı hücrelerde DNA ve proteinler boyandığı için yüksek absorbans değeri verir ve spektrometrede bu değerler karşılaştırılarak % canlılık oranı hesaplanır [50].

2.9.2. Tripan Mavisi Canlılık Testi

Tripan mavisi canlılık testi bir süspansiyondaki canlı veya ölü hücre sayısını belirlemek için kullanılır. Özellikle yüzeye tutunan hücrelerde etkili ve çok tercih edilen bir yöntemdir. Tripan mavisi negatif yüklü büyük bir moleküldür. Bu boyama yöntemi ölü hücrelerin zar bütünlüğünün bozularak boyayı hücre içine alabilme prensibine dayanmaktadır. Canlı hücrelerde hücre zar bütünlüğü korunmaktadır ve negatif yüklü büyük bir molekül olan tripan mavisini hücre içine alamaz. Bu sayede canlı hücrelerde

mavi bir renk görülmez. Bununla birlikte, ölü hücreler tripan mavisi boyasını hücre içine alabildiği için mavi renkte görülürler. Deney düzeneğine göre ölü ve/veya canlı hücreler sayılarak % canlılık hesabı yapılmaktadır [51].

2.10. Apoptoz ve Apoptoz Tayini

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, fetal gelişim sırasında ve yetişkin dokularda çok çeşitli fizyolojik süreçlerde kritik roller oynamaktadır. Çoğu durumda, fizyolojik hücre ölümü, nekrozun aksine apoptozla gerçekleşmektedir. Apoptotik hücre ölümü düzenlenmesindeki kusurlar, hücre birikiminin meydana geldiği bozukluklar (kanser, restenoz) veya hücre kaybının meydana geldiği durumlar (felç, kalp yetmezliği, nörodejenerasyon, AIDS) gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır [52].

Apoptoz, morfolojik bir süreçtir. Işık (veya elektron) mikroskobu ile görülebilmektedir. Kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma (piknoz), plazma membran kalınlaşması ve hücre küçülmesi apoptotik hücrelerin belirgin özellikleri arasında bulunmaktadır. Sonunda hücreler, enflamatuvar bir tepkiye neden olmadan fagositozla temizlenen küçük zarla çevrili parçalara (apoptotik cisimlere) ayrılır. Apoptotik cisimlerin serbest bırakılması, Yunanca'dan "apoptoz" terimine ilham veren, "uzaklaşmak" anlamına gelmektedir ve sonbaharda yaprak döken ağaçlardan yaprakların düşmesi kavramlarını çağrıştırmaktadır [52].

Apoptoz (programlanmış hücre ölümü), yetişkin dokuların normal gelişimi ve homeostazında önemli bir rol oynar. Hücrelerin apoptotik özellik göstermesi, kanser dahil birçok hastalık mekanizmasıyla da bağlantılıdır. Apoptozun biyokimyasal özelliklerinden biri, kromatinin tek ve çoklu oligonükleozom uzunluğundaki fragmanlara bölünmesi yoluyla DNA üzerinde serbest 3'-hidroksil uçlarının üretilmesidir. TdT aracılı dUTP-biyotin çentik uç etiketleme (TUNEL) testi, DNA'nın açıkta kalan uçlarını etiketleyerek bu biyokimyasal özelliklerden yararlanır ve böylelikle parçalanmış DNA içeren çekirdeklerin görselleştirilmesini sağlar [53].

Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) dUTPNick-EndLabeling (TUNEL) testi, apoptozun geç aşamalarında kapsamlı DNA bozunmasına uğrayan apoptotik hücreleri saptamak için tasarlanmıştır. Bu yöntem, TdT'nin çift sarmallı DNA kırılmalarının kör uçlarının etiketlenmesine dayanmaktadır [54].

2.11. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksijen açısından zengin bir dünyada yaşamın beklenen bir sonucudur. Hücredeki oksijen tüketiminin artmasıyla % 3-5 oranında reaktif oksijen türleri üretilir ve oksijen radikalleri ve diğer aktif oksijen türleri, aerobik metabolizmanın yan ürünleri olarak ve çeşitli doğal ve sentetik toksik maddelere maruz kalmanın bir sonucu olarak üretilir. Hücreler, dokular, organlar ve organizmalar oksijenin neden olduğu stres ve hasarla başa çıkmak için birden fazla antioksidan savunma mekanizmasını kullanmaktadır. Bu koruyucu sistemlerin çoğu enzimleri içermektedir. Bu enzimler, 40'tan fazla memeli geninin ekspresyonunun yukarı regüle edildiği oksidatif stres koşulları altında indüklenebilmektedir. Mitotik hücreler, DNA'nın histon proteinleri ile korunduğu, enerji gereksinimi olmayan genlerin azalan ekspresyonu ile korunduğu geçici bir büyüme durumuna (adaptasyonun ilk aşamalarında) girme ve ek savunma kabiliyetine sahiptir. Oksidatif stresle tam anlamıyla başa çıkamama durumunda, mitotik hücreleri kalıcı büyümenin durduğu bir duruma sürekleyebilir ve bu durum yaşlanmaya benzetilebilir. Hücreler daha şiddetli oksidatif stresle karşılaştıklarında ya da koruyucu enzimler azaldığında, yaşlanmayla ilişkili adaptif kapasiteye bağlı olarak hücreler, etrafını saran sağlıklı dokuyu daha fazla hasardan koruyan apoptoz ile programlı ölüm yoluna gitmeyi seçebilirler. Yalnızca en şiddetli oksidatif stres koşullarında, hücreler, kendilerini çevreleyen dokuları bir enflamatuar immün tepkisinin diğer değişikliklerine maruz bırakan nekrotik bir ölümle sonlandırır [55].

Süperoksit iyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksit (NO), normal fizyoloji için ihtiyaç olan ancak aynı zamanda yaşlanmayı hızlandırdığına ve hücrel dejenerasyona sebep olduğu bilinen reaktif oksijen türleridir (ROS). Hastalık durumlarında bu serbest radikallere karşı koymak için vücut, kendini savunmak için bir antioksidan cephanesi üretmektedir. Flavonoidler, ürik asit, bilirubin, albumin, E vitamini, C vitamini, a-lipoik asit (ALA), tioredoksin (Trx) ve glutatyon (GSH) gibi bileşikler; ve katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), peroksiredoksinler, glutatyon peroksidaz gibi enzimler ve antioksidanlar olarak tarif edilmiştir. Halliwell, bir antioksidanı "oksitlenebilir bir substratınla karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bulunduğu bu substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya inhibe eden herhangi bir madde" olarak tanımlamıştır [56]. Oksidatif stresin nedeni,

serbest radikallerin üretiminin sistemin antioksidan kapasitesini aşmasından kaynaklanmaktadır [57].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Tez çalışması kapsamında koruyucu etkisi araştırılan Neoeriositrin (Kat no: 13241-32-2, %95 saflıkta) Santa Cruz firmasından satın alınmıştır. Neoeriositrin, dimetil sülfoksit içerisinde çözülmüştür ve çözücü etkisinin araştırılması için çözücü kontrol olarak deney gruplarına DMSO grubu da eklenmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonu hazırlamak için toz glukoz (Merck, ORM108337.1000) DMEM/F12 besiyeri içerisinde çözülerek hazırlanmıştır ve 0.22 µM filtre ile süzülerek steril edilmiştir. Çalışmada canlılık testi için kristal viyole (Merck, C.I. 42555) boyası kullanılmıştır. Her deney öncesi hücre sayısının belirlenmesi için Tripan mavisi (Hyclone, Logan, UT) boyası kullanılmıştır. Asetik asit (Merck), deneylerde çözücü olarak kullanılmıştır.

Tez kapsamında hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ölçümü DCFDA boyası (sc-359840, Santa Cruz) kullanılarak yapılmıştır ve sonuçlar fluorimetri cihazında ölçülmüştür. Lipid peroksidasyonu belirlemek için TBARS Kolorimetrik Ölçüm Kiti (Cayman, 10009055) kullanılarak yapılmıştır. Hücre içi ATP seviyeleri, ATP Kolorimetrik Ölçüm Kiti (Elabscience, E-BC-K157-S) kullanılarak ölçülmüştür. Hücre ölüm tipi tayininde kullanılan testlerden birisi olan TUNEL Testi ise (Elabscience, E-CK-A331) apoptotik hücrelerin tayininde kullanılmıştır.

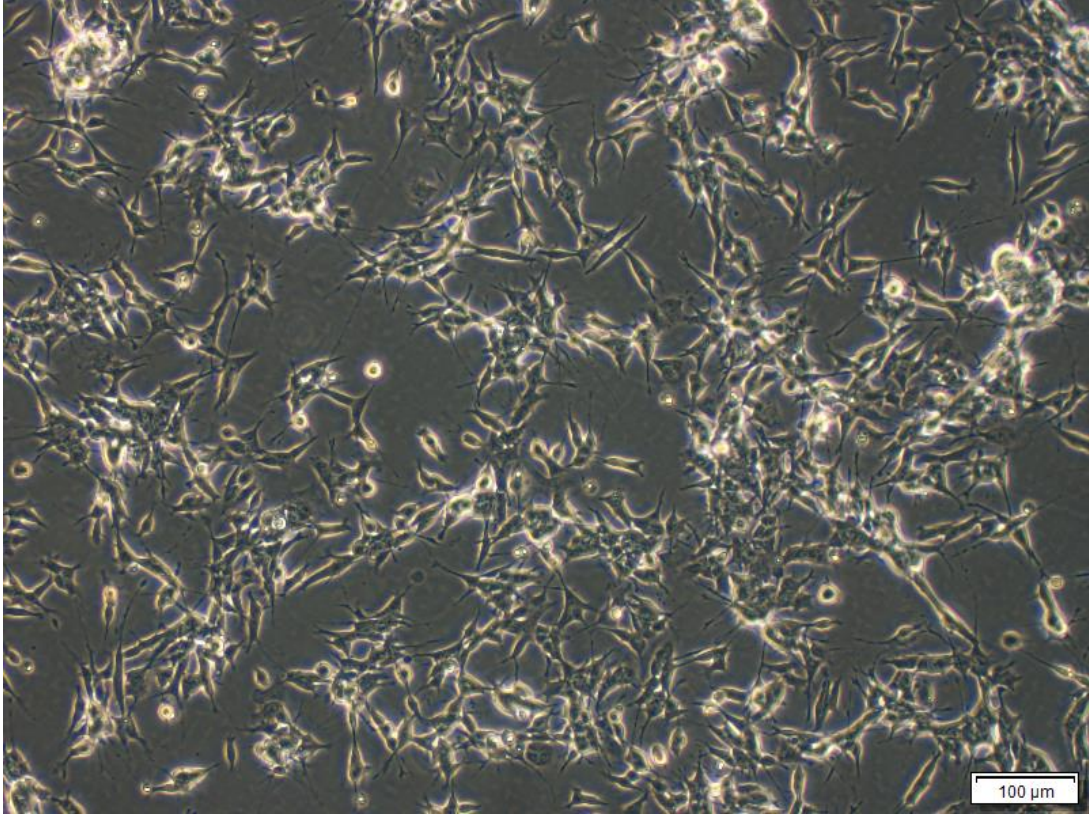
3.2. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

Hücreler % 1 antibiyotik (gentamisin), % 20 fetal sıgır serum (FBS) içeren DMEM/F-12 besiyerinde, % 5 CO₂ içeren etüvde 37 °C'de inkübe edilerek kültüre edilmiştir. Her 2 günde bir besiyerleri değiştirilerek hücre sel devamlılık sağlanmıştır. Hücreler kültür ortamında genel olarak sahip oldukları kısa çomak şekli ile ayırt edilmektedir (Şekil 3.1). SH-SY5Y hücreleri adherent özellik göstermektedirler (Şekil 3.2.) ve yaklaşık 5-7 gün arasında flask yüzeyini kaplayacak hale gelmektedir. Hücrelerin analizlerde kullanılmak üzere flask yüzeyinden kaldırılması, her pasajlama aşamasında ve hücre dondurması için tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Tripsinizasyon işlemi için öncelikle hücre üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve 25 cm² flask için 1 ml, 75 cm² flask için Tripsin/EDTA

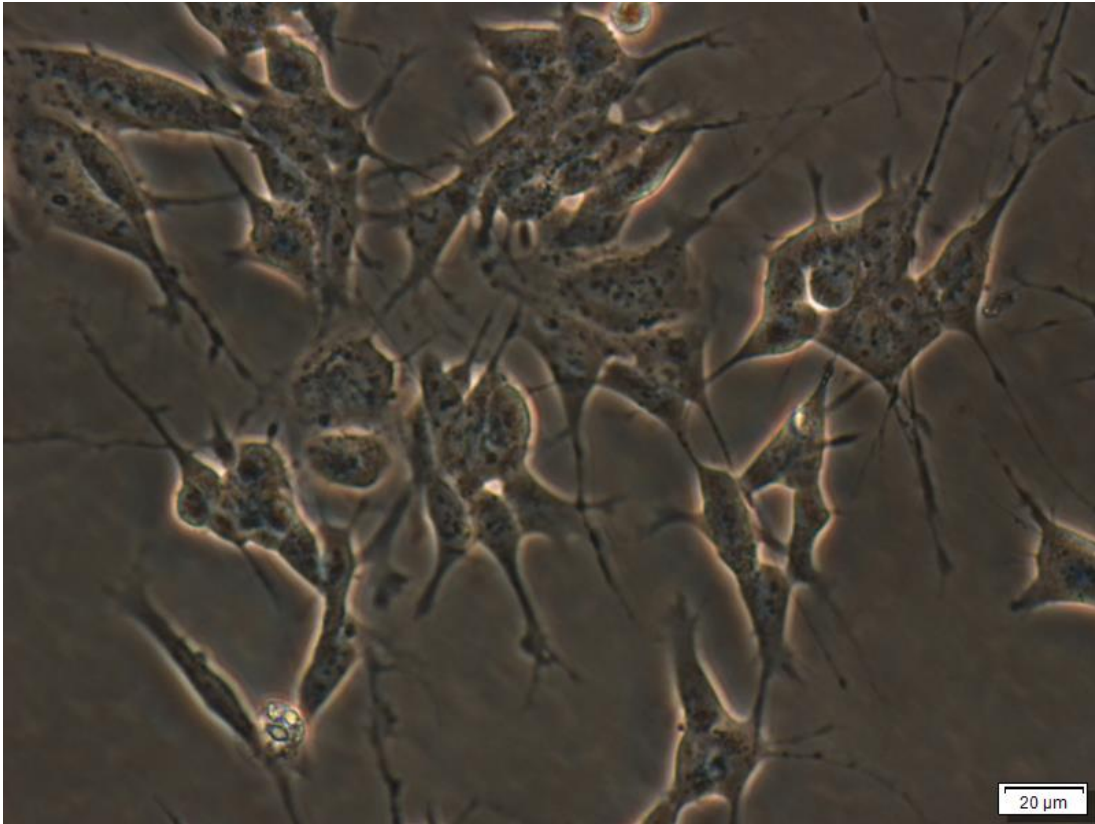
solüsyonu hücrelerin üzerine eklenerek besiyerinin etkisini inhibe etmek için hücelere ilk yıkama yapılmıştır. Daha sonra ilk yıkamadaki tripsin flasktan çekilerek aynı şekilde ikinci yıkama yapılarak kullanılan tripsinin yarısı flask içinde bırakılmış ve hücrelerin kalkması amacıyla flask 37 °C etüvde bekletilmiştir. SH-SY5Y hücreleri yapısal olarak kümeli üremeye çok yatkın oldukları için etüvde bekleme süresi bittikten sonra DMEM/F12 besiyeri 25 cm² flask için 5 ml, 75 cm² flask için 10 ml olarak hücelere eklenmiş ve hücrelerin kümeli yapısını ayırmak ve tripsinin etkisini inhibe etmek amacıyla 10 ml serolojik pipet kullanılarak 1-2 dk süreyle pipetaj yapılmıştır. Deneysel çalışmaların tamamında 6 ve 14 pasaj aralığındaki hücreler kullanılmıştır.

Hücrelerin yeniden kullanılması ve hücre stoğu hazırlanması amacıyla dondurma aşamasında, öncelikle % 10 DMSO ve % 90 FBS kullanılarak dondurma vasatı hazırlanmıştır. Hücreler tripsinizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra süspansiyon, 5 dk, 800 rpm 24 °C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Hücreler, önceden hazırlanmış dondurma vasatı içine alınarak pipetaj yapılmış ve istenilen miktar kadar kriyotüplere dağıtılmıştır. Hücreler dondurma aşamasında öncelikle 24 saat -80 °C'de bekletilmiş ve daha sonra uzun ömürlü stoklar yapılması amacıyla -196 °C sıvı azot tankında saklanmıştır.

Dondurulan hücreler tekrar kullanılacağı zaman öncelikle hücrelerin bulunduğu kriyotüpler buzun çözülmesi amacıyla 1 dk su banyosunda (37°C) bekletilmiştir. Daha sonra 800 rpm, 5 dk santrifüj edilerek süpernatantlar atılmıştır. Hücrelerin bulunduğu pelet kısmına 1 ml besi ortamı eklenerek pipetaj yapılmıştır. Daha sonra hücreler sayısına göre 25 cm²'lik veya 75 cm²'lik flaslara aktarılmıştır. Hücrelerin üremesini arttırmak ve tutunmalarını sağlamak amacıyla flask başına gereken miktar kadar besi ortamı hücrelerin üzerine eklenmiştir[58].



Şekil 3.1. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin 10. pasaj mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.2. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin 10. pasaj mikroskop görüntüleri.

3.3. Glukoz Konsantrasyonlarının Hazırlanması ve Hesaplanması

Diyabetik nöropati modeli oluşturmada kullanılacak glukoz konsantrasyonunu belirlemek için SH-SY5Y hücrelerine 300-600 mM aralığında glukoz konsantrasyonları uygulanmıştır. Öncelikle gerekli hesaplamalar yapılarak toz glukoz miktarları 20 ml DMEM/F12 besiyeri içerisinde vorteks yardımıyla çözdürülmüştür. Toz glukozun tartımı steril kabinin dışında yapıldığı için her deney öncesi glukoz konsantrasyonları uygulanmadan önce 0.22 µM filtre kullanılarak glukoz konsantrasyonları kabin içerisinde steril edilmiştir. DMEM/F12 besi ortamı içerisinde bulunan glukoz miktarı hesaplanarak, uygulanan glukoz konsantrasyonu ayarlanmıştır. Hücreler öncelikle ml'inde 1×10^5 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra en az 3 tekrarlı olacak şekilde 300 mM-600 mM arasındaki glukoz konsantrasyonları hazırlanarak hücrelerin üzerine eklenmiştir ve hücreler tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Yapılan tekrarlı kristal viyole canlılık testleri (en az üç tekrar yapılmıştır) sonucunda SPSS/Probit istatistiksel analiz programı ile IC₅₀ değeri 350 mM olarak hesaplanmıştır. Daha sonraki bütün analizlerde bu konsantrasyon kullanılmıştır.

Konsantrasyonların bu değerler arasında seçilme nedeni, yapılan ön çalışmalar sonucunda 100-250 mM yüksek glukoz konsantrasyonlarının modelleme için hücre canlılığı üzerinde yeterli etkisi olmamasıdır.

3.4. Neeriositrin Stok Çözeltisinin Hazırlanması ve Neeriositrin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Neeriositrin flavonoidi dimetilsulfoksit (DMSO) içerisinde çözülebilmektedir [45].

Neeriositrin ana stok hazırlanması amacıyla toz neeriositrin üzerine 1 ml DMSO eklenerek, vorteks yardımıyla neeriositrin kabin içerisinde steril ortamda çözdürülmüştür. Daha sonra neeriositrin ana stok konsantrasyonları 500 µl'lik tüplere 10 adet olacak şekilde dağıtılmış ve ana stoklar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılacak neeriositrinin koruyucu konsantrasyonlarının belirlenmesi için 5 µM-30µM aralığında neeriositrin konsantrasyonları hazırlanarak kristal viyole canlılık testi ile hücre canlılığı test edilmiştir. Bu testlerden elde edilen tekrarlı sonuçlar doğrultusunda

5 µM, 10 µM ve 20 µM neoeriositrin konsantrasyonları seçilerek yapılacak diğer analizlerde bu konsantrasyonlar kullanılmıştır.

Çalışma konsantrasyonları da besiyeri içinde dilüe edilerek kullanılmıştır. Bu nedenle tez çalışmaları kapsamında neoeriositrin DMSO içinde çözülerek stok solüsyon hazırlanmış ve çalışma konsantrasyonlarının hazırlanması için DMEM/F12 besi yeri ortamı kullanılmıştır.

Çözücünün etkisinin gözardı edilmesi amacıyla deney gruplarına çözücü kontrol grubu olarak DMSO içeren besi ortamı uygulanan grup eklenmiştir.

Neoeriositrinle yapılmış fazla çalışma olmaması nedeniyle neoeriositrinin konsantrasyonları benzer flavonoid çalışmaları esas alınarak 5 µM-30 µM konsantrasyon aralığında uygulanmıştır.

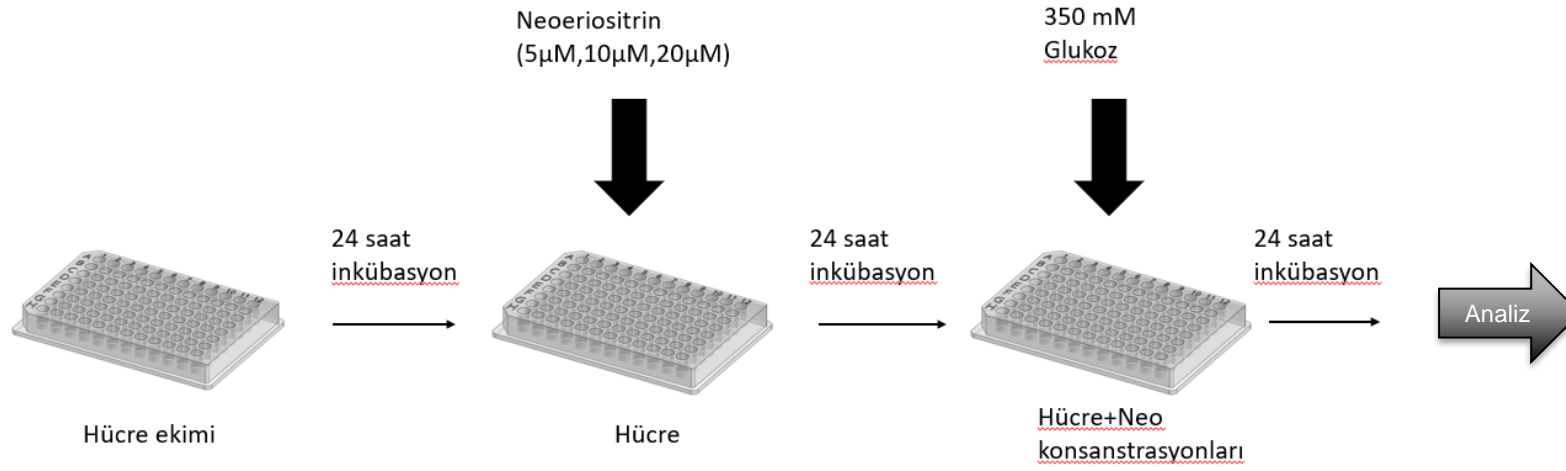
Deneylerde kullanılacak neoeriositrin konsantrasyonları belirlendikten sonra neoeriositrinin koruyucu etkisini araştırmak için seçilen neoeriositrin konsantrasyonları (5 µM, 10 µM ve 20 µM) hücrelere glukoz ile hasar oluşturmadan önce uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Daha sonra ortama SH-SY5Y hücrelerinde IC₅₀ değeri belirlenen glukoz konsantrasyonu (350 mM) eklenerek 24 saat inkübasyondan sonra kristal viyole canlılık testi yapılmış ve neoeriositrinin koruyucu etkisi incelenmiştir. Böylece yüksek glukoz uygulanan grup ile neoeriositrin+glukoz uygulanan grupların hücre canlılık test sonuçları karşılaştırılmıştır.

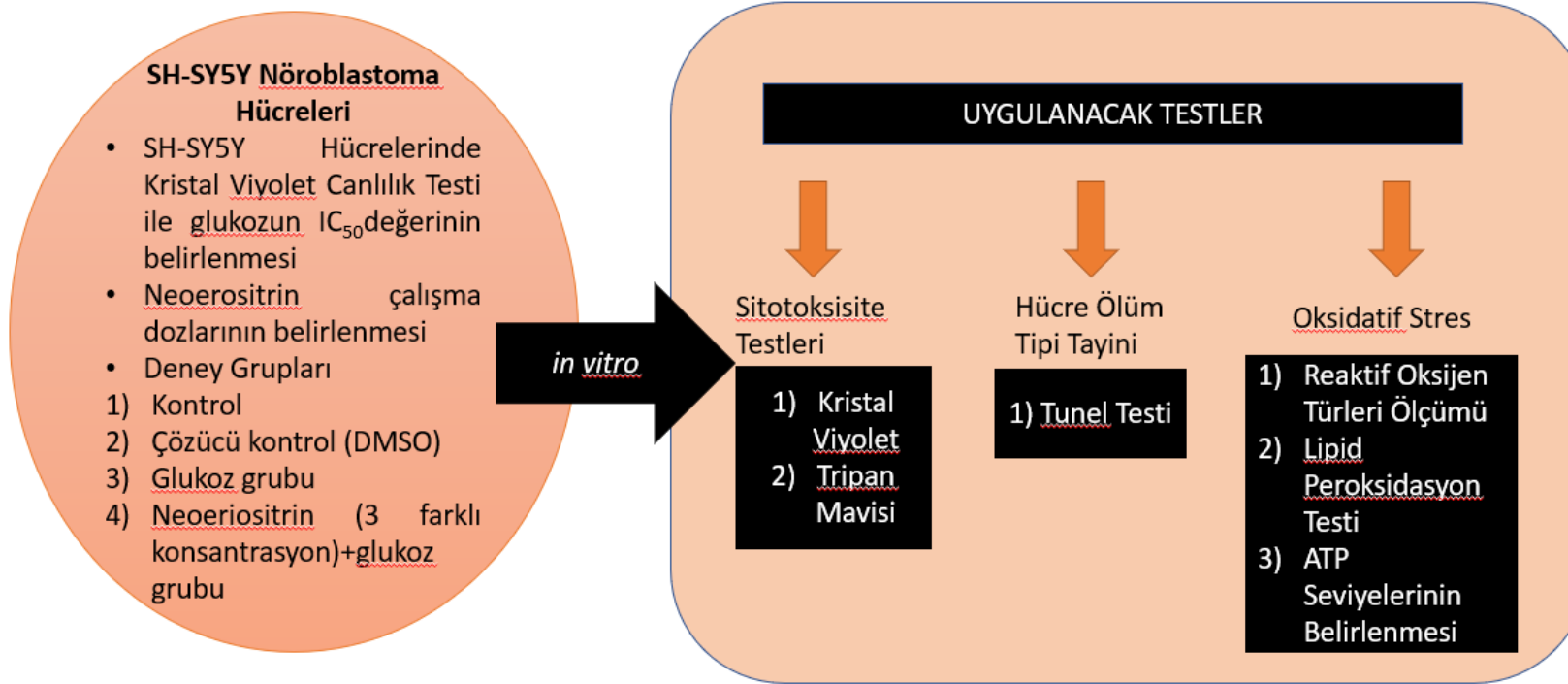
3.5. Deney Planı

Çalışmada izlenen deney şeması Şekil 3.3.'de verilmiştir. Ayrıca deney planı ve deney grupları Şekil 3.4.'de görülmektedir. Çalışmada yer alan gruplar aşağıdaki gibidir.

1. Grup: Kontrol
2. Grup: Glukoz (350 mM)
3. Grup: Çözücü (DMSO) kontrol
4. Grup: 5 µM Neo+350 mM Glukoz
5. Grup: 10 µM Neo+350 mM Glukoz
6. Grup: 20 µM Neo+350 mM Glukoz



Şekil 3.3. Deney Şeması



Şekil 3.4. Deney Planı

3.6. Sitotoksosite Testleri

3.6.1. Kristal Viyole Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılık testleri, hücre çalışmalarında kültür ortamında canlı kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılan testlerdir.

Kristal viyole hücre canlılık testinde kristal viyole boyası hücrelerdeki proteinler ve DNA'ya bağlanarak canlı hücrelerin mor renkte görünmesini sağlamaktadır [59]. Bu amaçla:

- 1) Öncelikle hücreler 96 gözlü plaklara (1×10^5 hücre/ml) ekilerek, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 2) 24 saat inkübasyondan sonra koruyucu etkisi araştırılacak olan neoeriositrinin belirlenen konsantrasyonları (5 μ mol, 10 μ mol ve 20 μ mol) hücrelere uygulanmış ve hücreler tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 3) İnkübasyon süresinin sonunda hücrelere IC₅₀ (350 mmol) glukoz konsantrasyonu uygulanmış ve hücreler tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 4) Daha sonra hücreler, %10 (V/V) formaldehit (PBS içinde hazırlanmış) 100 μ l olacak şekilde her kuyucuğa eklenerek 1 saat süresince oda sıcaklığında fikse edilmiştir.
- 5) 1 saat sonunda formaldehit dökülerek kristal viyole boyası (0,1 gr'ı 100 ml distile suda çözülmüş) 100 μ l'şer her kuyucuğa dağıtılarak hücreler 30 dk karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.
- 6) İnkübasyon sonunda boya dökülerek 2 kez distile su ile yıkama yapılmıştır. Yıkama tamamlandıktan sonra her kuyucuğa %10 asetik asit (çözücü) eklenerek 595 nm'de ELİSA cihazında okuma yapılmıştır.
- 7) Hücre canlılık yüzdeleri kontrol grubu %100 canlı alınarak aşağıdaki formülasyon ile hesaplama yapılmıştır.

$$\%Canlılık = (OD_{\text{Örnek}} - OD_{\text{Background}} / OD_{\text{Kontrolgrup}} - OD_{\text{background}}) \times 100$$

3.6.2. Tripan Mavisi Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığını ölçmekte kullanılan en yaygın yöntemlerden biri de tripan mavisi hücre canlılık testidir. Tripan mavisi non-vital özellik gösteren bir boyadır ve yaklaşık olarak 960 dalton ağırlığında bir moleküldür. Tripan mavisi hücre membranı sağlam olan hücrelerden geçemez. Bununla birlikte tripan mavisi boyası ölü hücrelerin veya membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin hücre zarından geçebilmekte ve bu sayede bu hücreler mavi renkte boyanmaktadır [60].

SH-SY5Y hücrelerinin ikileme zamanlarının tespit edilmesi için tripan mavisi boyaması yapılarak canlı hücreler sayılmıştır.

Canlı hücre sayımı hemasitometre lamında (Bürker lamında) mikroskop altında gerçekleştirilmiş ve hücrelerin % canlılık oranı tespit edilmiştir.

Hücre sayımı için hücre süspansiyonundan ependorf tüpüne 900 µL koyularak üzerine 100 µL tripan mavisi boyası eklenmiş ve Bürker lamında canlı hücreler sayılmıştır. Kontrol grubu esas alınarak canlı hücre yüzdeleri aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlı Hücre} = (\text{Canlı hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$$

3.7. TUNEL Testi ile Apoptoz Tayini

TUNEL testi terminal deoksinükleotit transferaz (TdT) aracılı dUTP-biotin nick-end-labeling (TUNEL) olarak hücrelerde DNA kırıklarını belirleyen ve apoptoz tespitinde kullanılan bir testtir. Bu yöntemde apoptotik hücrelerde kırılan DNA zincirinin 3'-OH ucu, TdT enzimi kullanılarak biyotinlenmiş nükleotitlerle etiketlenmektedir. Tez kapsamında TUNEL testiyle, yüksek glukoz uygulaması sonucu SH-SY5Y hücrelerinde ortaya çıkan apoptoz tespit edilerek hücre ölüm tipi belirlenmiştir [61]. Neoeriositrin uygulamasıyla da yüksek glukozla oluşturulan hücre hasarı ve ölümünde neoeriositrinin koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. TUNEL testi, ticari kit kullanılarak ve kit direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir [61].

- 1) Bu test için hücreler öncelikle PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra 15-60 dk boyunca oda sıcaklığında (15-25 °C) son konsantrasyon % 4 olacak şekilde PBS

içinde çözülmüş paraformaldehit ile hücreler fikse edilerek tekrar PBS ile 5'er dk 3 kez yıkama yapılmıştır.

- 2) Daha sonra hücrelerin üzerine son konsantrasyonu % 3 olacak şekilde metanol içinde çözdürülmüş H₂O₂ bloklama tamponu eklenmiş ve hücreler 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- 3) PBS ile yıkama yapılmış ve hücelere son konsantrasyon % 0,1 olacak şekilde Triton-100 % 0,1'lik sitrat sodyum içinde çözdürülmüş permeabilizasyon tampon eklenerek tekrar PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 4) Her kuyucuğa 50 µl TdT enzimi içeren çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37 °C'de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra PBS ile yıkama yapılmış ve her kuyucuğa 50 µl Streptavidin-HRP enzimi içeren çalışma solüsyonu eklenerek 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- 5) İnkübasyon sonunda tekrar PBS ile yıkama yapılmış ve her kuyucuğa 50 µl DAB solüsyonu eklenmiştir.
- 6) 30 sn-5 dk inkübasyon sonucu PBS ile yıkama yapıldıktan sonra lamalar kurutulmuş ve entellan ile kapatılarak mikroskopta görüntüleme yapılmıştır

3.8. Oksidatif Stres Ölçümü

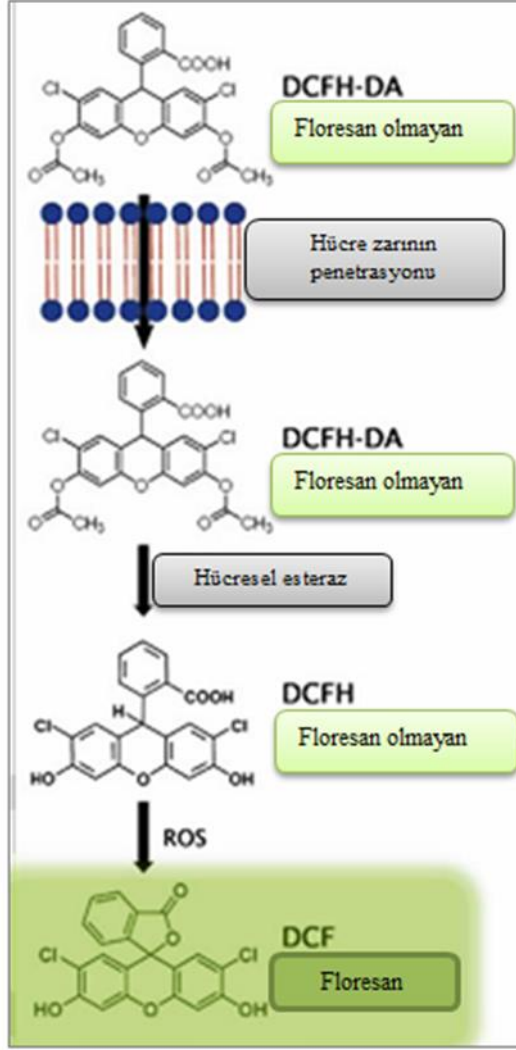
3.8.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçümü

Diyabetik nöropati oksidatif stres kaynaklı ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres sonucunda antioksidan seviyesinde azalma ve reaktif oksijen türlerinde (ROS) artış gözlenmektedir. Bu tez kapsamında ROS ölçümünde florojenik bir boya olan 2',7'-dikloroflorosein diasetat (DCFDA) kullanılmıştır. DCFDA boyası hidroksil, peroksil ve diğer reaktif oksijen türlerinin ölçümünü sağlar. Hücelere DCFDA'nın difüzyonu sonrası hücresel esterazlar tarafından parçalanır, nonfloresan olan DCFDA, ROS tarafından floresan bir bileşik olan 2',7'-dikloroflorosein (DCF)'e dönüşür (Şekil 3.5) [62].

Çalışmada SH-SY5Y hücrelerine yüksek glukoz uygulanmasıyla (hiperglisemi koşulu sağlama) hücreler oksidatif strese girmiştir. Koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanan neirositrinin hücre içi ROS aktivitesinin baskılanmasında bir antioksidan etkisinin olup olmadığının ortaya çıkarılması için ROS ölçümü yapılmıştır.

ROS ölçümü için SH-SY5Y hücreleri 6 gözlü plaklara 1 ml'de 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir.

- 1) Hücreler, tutunması için 24 saat boyunca 37°C etüvde inkübasyona bırakılmış, daha sonra hücrelere neoeriositrinin belirlenen konsantrasyonları uygulanmıştır. Neoeriositrin konsantrasyonları DMEM/Fenol red (-) besiyerinde hazırlanmıştır.
- 2) Hücreler 24 saat süre ile neoeriositrin konsantrasyonları ($5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ ve $20 \mu\text{M}$) ile inkübe edilmiştir.
- 3) İnkübasyon süresi sonunda DMSO içerisinde çözülmüş olan DCFDA boyası konsantrasyonu $10 \mu\text{M}$ olacak şekilde DMEM/Fenol red (-) besiyerinde hazırlanmış ve hücrelere eklenerek 37°C 'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 4) Hücrelere 350 mM glukoz konsantrasyonları eklenerek tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 5) İnkübasyon süresi sonrasında scraper kullanılarak hücreler 6 gözlü plaklardan kazanmış ve 15 ml 'lik falkonlarda toplanmıştır.
- 6) Toplanan hücreler 5 dk, 800 rpm 'de santrifüj edilmiştir.
- 7) Daha sonra hücrelerin üzerindeki besiyerleri 1000 ml 'lik pipetör ile çekilerek hücrelere 1X PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 8) PBS ile yıkamadan sonra hücreler tekrar 5 dk, 800 rpm 'de santrifüj edilmiştir.
- 9) Her grup için süpernatantlar toplanarak siyah 96 gözlü plakalara yüklenmiştir.
- 10) Fluorimetrik olarak $485/535 \text{ nm}$ 'de okuma yapılmıştır.



Şekil 3.5. DCFDA'nın, ROS tarafından floresan bir bileşik olan 2',7'-dikloroflorosein (DCF)'e dönüştürülmesi.

3.8.2. Lipid Peroksidasyon Ölçümü

Oksidatif strese bağlı olarak lipid peroksidasyon sonucunda hücre zarında hasar meydana gelmektedir. Çoklu doymamış yağlardan (PUFA) türetilen peroksitlerin ayrışması, tiyobarbitürik asit ile kontrollü reaksiyonunu takiben kolorimetrik olarak ölçülebilen malondialdehit (MDA) ve lipid peroksidasyon yan ürünleri oluşumuna yol açmaktadır [62].

MDA, organizmalardaki lipid peroksidasyonunun yaygın ürünlerinden biridir. Klinik bilimde, MDA, organizmadaki lipid peroksidasyonunun derecesini yansıtabilen ve

dolaylı olarak hücre zarı hasarının derecesini gösteren bir lipid peroksidasyon biyobelirtecidir.

Koruyucu etkisi araştırılacak olan neoeriositrinin lipid peroksidasyona etkisi MDA miktarının ölçümüyle ortaya çıkarılmıştır. Lipid peroksidasyonu hasarı, Cayman TBARS Assay Kit doğrultusunda solüsyonlar manuel olarak hazırlanarak (Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddelerinin) ölçülmüştür [62].

1) Hücre lizatları, kit içerisinde yazan direktifler doğrultusunda hazırlanmıştır.

Öncelikle SH-SY5Y hücreleri sayıları 2×10^7 hücre/ml olacak şekilde 1x75 ml flasklara ekilmiştir.

Hücrelerin ekimi takiben 24 saat sonra belirlenen neoeriositrin konsantrasyonları (5 μ mol, 10 μ mol ve 20 μ mol) hücrelere uygulanmıştır. Neoeriositrin uygulama konsantrasyonları % 3 FBS ve % 1 gentamisin içeren DMEM-F12 besi ortamı ile hazırlanmıştır.

Neoeriositrin uygulamasını takiben 24 saat sonra hücrelere 350 mmol konsantrasyonunda glukoz uygulanmıştır. DMSO ve kontrol gruplarına glukoz ve neoeriositrin uygulaması yapılmamıştır.

Glukoz uygulamasının ardından hücreler 37°C etüvde 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda SH-SY5Y hücre lizatlarının hazırlanması amacıyla 1 ml PBS hücrelere eklenmiştir ve hücreler flaskların yüzeyinden scraper ile kazınarak 2 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır.

Daha sonra Cayman TBARS Assay Kit direktifleri doğrultusunda hücreler, 1600 g'de 4°C'de santrifüj edilmiş ve en az 3'er örnek olacak şekilde 500 μ l'lik santrifüj tüplerine supernatantlar dağıtılmıştır.

Hücre lizatları, kit ölçümüne kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

2) Kit ile çalışmaya başlamadan önce kit içerisinde bulunan reaktifler ve kromojenik ajan kitte verilen direktifler doğrultusunda hazırlanmıştır.

- ✓ % 20 TCA (Trikloroasetik asit) hazırlanmıştır. (50 ml ultra saf distile su içerisinde 20 gram olarak hazırlanmıştır)
- ✓ % 0,53 TBA solüsyonu hazırlanmıştır. (50 ml TCA asetik asit + 50 ml % 0,1 Molar NaOH (pH= 3,5))
- ✓ Standartlar TBA solüsyonu ile hazırlanmıştır.

- 3) Standart eğri oluşturmak için 200 µmol/L standart çözelti ile çift damıtılmış suyla seri dilüsyon yöntemi kullanılarak standartlar hazırlanmıştır. Seyreltme gradyanı; 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 0 µmol/L'dir.
- 4) Standartlar hazırlandıktan sonra hazırlanan örneklerin ölçümüne geçilmiştir. İlk olarak, standart tüpler içine daha önceden numaralandırılan 10 ml cam tüplere farklı konsantrasyonlarda 100'er µl standart solüsyonları koyulmuştur.
- 5) Örnek tüplerine her örnek için 100 µl olacak şekilde örnekler eklenmiştir.
- 6) Daha sonra kit direktifleri doğrultusunda, standartları ve örnekleri içeren her cam tüp içerisine 100 µl %7 SDS (sodyum dodesil sülfat) solüsyonu eklenmiştir.
- 7) İnkübasyondan önceki son aşamada reaksiyonu başlatmak için her cam tüpe 4 ml kromojenik ajan eklenmiştir.
- 8) Her cam tüpün ağzı parafilm ile kaplanarak üstlerine delikler açılmıştır ve 1 saat boyunca 100 °C'de örnekler ve standartlar inkübasyona bırakılmıştır.
- 9) 1 saat inkübasyondan sonra reaksiyonu durdurmak için standartlar ve örnekler 10 dk boyunca buz üzerinde bekletilmiştir.
- 10) Daha sonra örnekler ve standartlar 15 ml plastik falcon tüplere alınarak 1600 g, 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 11) Örnekler ve standartların supernatantları 96 kuyucuklu plaklara mikropipet ile 250 µl alınarak 530-540 nm dalga boyunda florimetride okutulmuştur.

3.9. ATP Seviyelerinin Ölçümü

Adenozin trifosfat (ATP) tüm canlı sistemlerde enerji kaynağı olarak kullanılan yüksek enerjili bir moleküldür. ATP'nin fosfat bağında bulunan kimyasal enerji, çoğu hücresel süreci yönlendirmektedir. Bu nedenle çalışmada yüksek glukoz konsantrasyonu ile hasar oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ATP seviyesi ölçümü yapılmıştır [63].

ATP test kiti, hücre ve doku lizatlarında, biyolojik sıvılarda ve kan hücrelerinde toplam ATP'yi ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Kitin çalışma esası gliserolün fosforilasyonu ile oluşan ürünün kolorimetrik olarak (OD 570 nm) tayinine dayanmaktadır.

- 1) Hücre lizatları, kit içerisinde yazan direktifler doğrultusunda hazırlanmıştır.

- I. Öncelikle SH-SY5Y hücreleri sayıları 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 24 kuyucuklu plaklara ekilmiştir.
 - II. Hücrelerin ekildiği saati takiben 24 saat sonra belirlenen neoeriositrin konsantrasyonları (5 μ mol, 10 μ mol ve 20 μ mol) hücelere uygulanmıştır. Neoeriositrin uygulama konsantrasyonları % 3 FBS ve % 1 gentamisin içeren DMEM-F12 besi ortamı ile hazırlanmıştır.
 - III. Neoeriositrin uygulamasını takiben 24 saat sonra hücelere 350 mmol glukoz konsantrasyonu uygulanmıştır. DMSO ve kontrol gruplarına glukoz ve neoeriositrin uygulaması yapılmamıştır.
 - IV. Glukoz uygulamasının ardından hücreler 37°C etüvde 24 saat sonra lizatların hazırlanması için inkübasyona bırakılmıştır.
 - V. İnkübasyondan sonra hücreler pipetaj yöntemi ile 0.3 ml kaynatılmış su ile 1.5 ml santrifüj tüplerine alınmıştır.
 - VI. Toplanan hücreler 10 dk boyunca kaynar suda (100°C) inkübe edilmiştir.
 - VII. Daha sonra her bir tüp vorteks yardımıyla karıştırılarak Elabscience ATP Kolorimetrik Assay Kit direktifleri doğrultusunda 10000 g ve 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
 - VIII. Daha sonra en az 3'er örnek olacak şekilde 500 μ l'lik santrifüj tüplerine supernatantlar dağıtılmıştır.
 - IX. Hücre lizatları, kit ölçümüne kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.
- 2) Kit çalışılmaya başlanmadan önce kit içerisinde bulunan reaktifler ve kromojenik ajan kitte verilen direktifler doğrultusunda hazırlanmıştır.
 - 3) Kit içerisinde yazan direktifler doğrultusunda kontrol, standart, blank ve örnek tüpleri hazırlanmıştır.
 - 4) Daha sonra kontrol, standart, blank ve örnekler 37°C'de su banyosunda 30 dk boyunca inkübe edilmiştir.
 - 5) İnkübasyon süresi dolduktan sonra her tüpe 50 μ l reaktif 5 eklenmiş ve her örnek 3'er saniye vorteks ile karıştırılmıştır.
 - 6) Daha sonra örnekler, 4°C 10000 g ve 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
 - 7) Santrifüj sonrası her örnekten 2'şer tekrar olacak şekilde 300 μ l supernatantlar 96 kuyucuklu plaklara alınmıştır ve her kuyucuğa rekasiyonu başlatmak için 50 μ l kromojenik ajan eklenmiştir.
 - 8) 2 dk boyunca oda sıcaklığında reaksiyonun gerçekleşmesi beklenmiştir.

- 9) Daha sonra her örnek en az 3'er tekrarlı olacak şekilde her kuyucuğa 50 µl reaktif 8 eklenerek reaksiyonu durdurulmuştur.
- 10) 96 kuyucuklu plak oda sıcaklığında 5 dk boyunca karıştırıldıktan sonra 636 nm dalga boyunda mikropalak okuyuculu spektrofotometrede (BIO-TEK µQuant, BIO-TEK Instruments, Inc, USA) okutulmuştur.

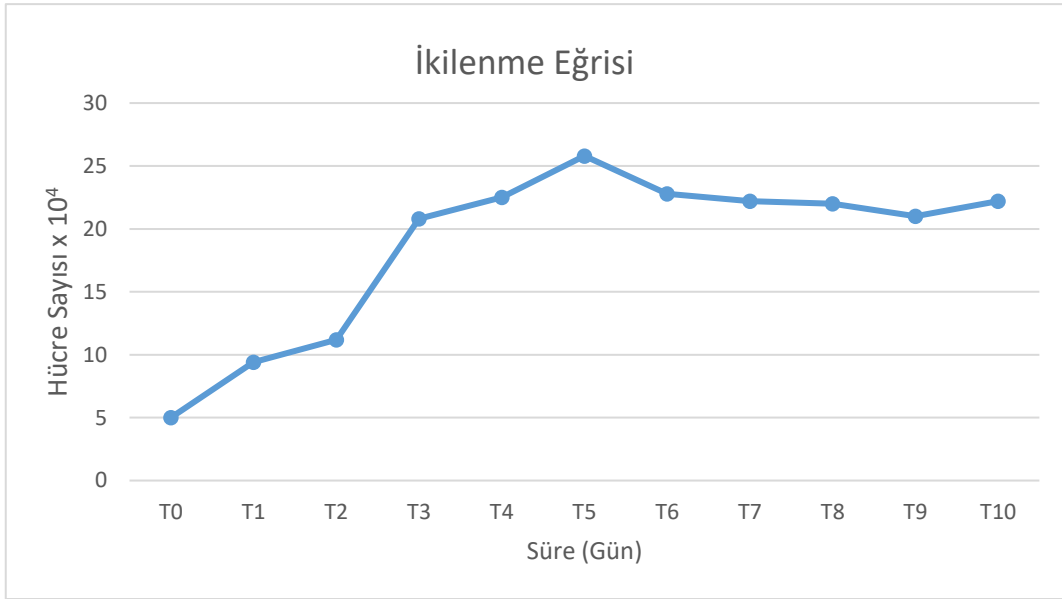
3.10. İstatistiksel Analizler

Tez kapsamında yapılan her deney en az 3 kez tekrarlanmıştır. Veriler, IBM SPSS statistics 23 programı ile analiz edilmiştir. Deneylerde tek değişken olarak uygulama ve farklı konsantrasyon miktarları kullanılmıştır. Zaman faktörü her deney için sabit olduğu için elde edilen verilerin istatistiksel analizleri tek yönlü varyans (one way ANOVA) kullanılarak hesaplanmıştır. Her deney için önem kontrol düzeyi $p \leq 0,05$ olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Tripan Mavisi Boyası İle Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları

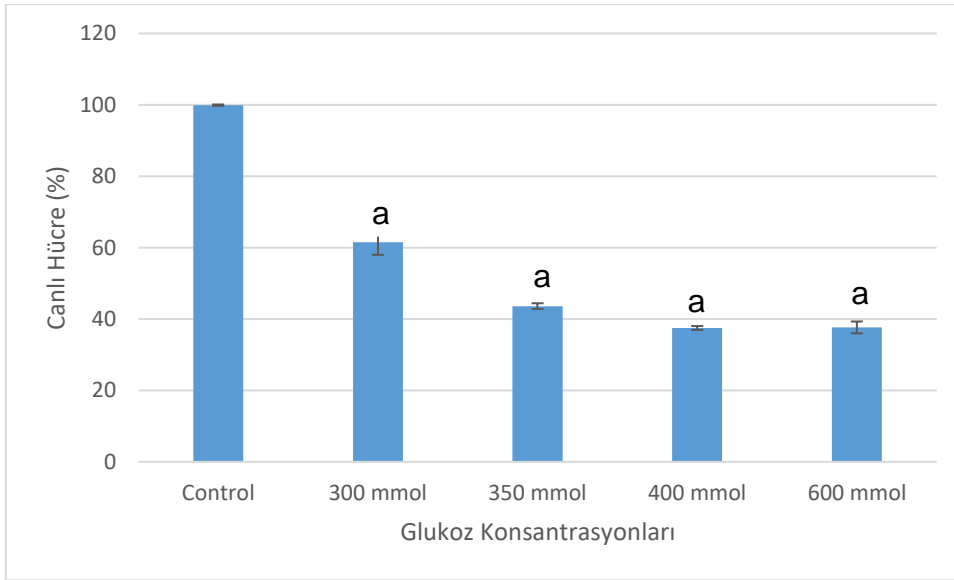
SH-SY5Y hücrelerinin ikilenme zamanları, tez deneylerinde kullanılmak üzere belirlenmiştir. Bu deney kapsamında hücreler 6 kuyucuklu plaklara hücre başlangıç sayısı 5×10^4 olacak şekilde ekim yapılmıştır. 10 günlük bir yaşam döngüsü boyunca hücreler her gün tripan mavisi boyaması ile sayılarak ikileme süresi tespit edilmiştir (Şekil 4.1.) 10. günün sonunda SH-SY5Y hücreleri için ikileme süresi doubling time ölçüm üzerinden 48,28 saat olarak hesaplanmıştır [64].



Şekil 4.1. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin büyüme eğrisi grafiği.

4.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Yüksek Glukoz Konsantrasyon Uygulama Sonuçları

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde diyabetik nöropati modellemesi için yüksek glukoz konsantrasyonları uygulanmıştır. 300-600 mM aralığında uygulanan konsantrasyonlar ile hücreler 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu inkübasyon sonucunda IC₅₀ konsantrasyonu 350 mM olarak tespit edilmiştir. 350 mM glukoz uygulaması sonrası hücrelerdeki canlılık oranı kristal viyole testi ile ölçülmüştür ve % 49,77 canlılık oranı bulunmuştur (Şekil 4.2.). Sonuç olarak yüksek glukoz konsantrasyonları ile indüklenen diyabetik nöropati modellemesi için çalışmada 350 mM glukoz kullanılmıştır.

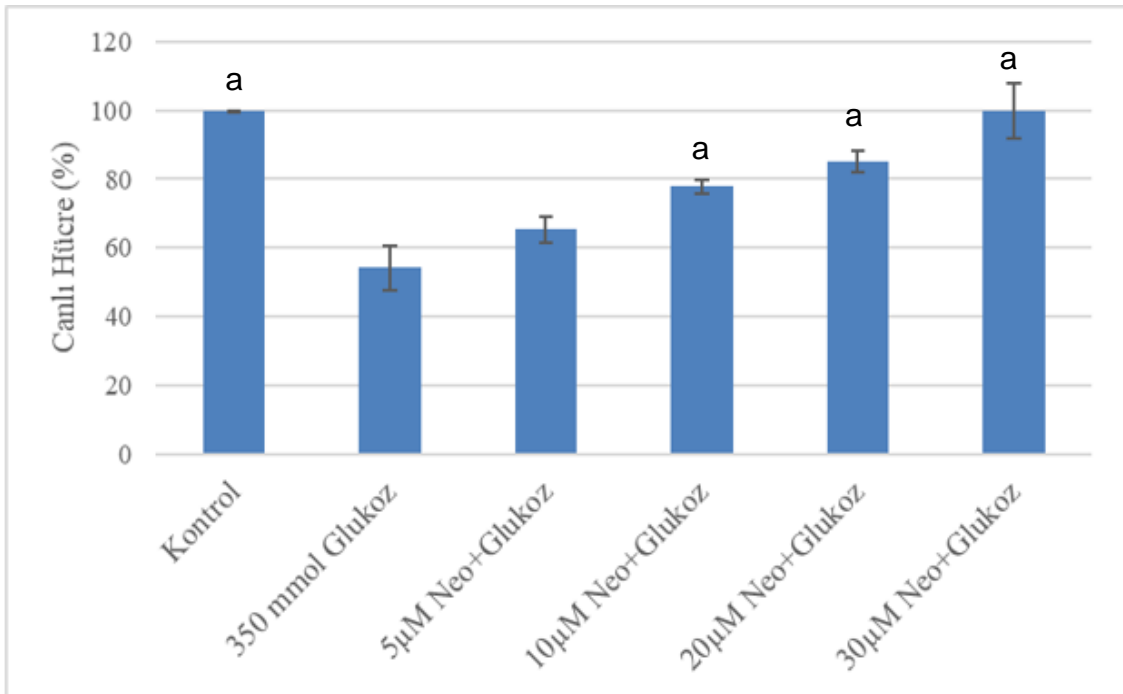


Şekil 4.2. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde kristal viyole testi sonucu hücre canlılık verileri. a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p \leq 0,05$).

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde diyabetik nöropati modeli oluşturmak için glukoz uygulaması 24 saat ve 350 mM konsantrasyon olarak seçilmiştir. Çeşitli çalışmalarda glukoz uygulama süresi ve konsantrasyonu değişiklik gösterse de bu çalışmada hücre ortam koşulları ve pasaj sayısına uygun olarak belirtilen konsantrasyon ve süre saptanmıştır. SH-SY5Y hücrelerine daha yüksek konsantrasyonlarda glukoz uygulaması sonucu hücre canlılığında belirgin azalmalar gözlenmezken, seçilen 350 mM glukoz konsantrasyonunda 24 saat sürede IC₅₀ değeri elde edilmiştir. Ayrıca daha kısa sürelerde daha yüksek konsantrasyon denemeleri de yapılmıştır. Denemeler sonucunda en uygun glukoz konsantrasyonu ve süresi 350 mM ve 24 saat olarak bulunmuştur.

4.3. Neeriositrin Konsantrasyonlarını Belirleme Sonuçları

Çalışmada kullanılan neeriositrin konsantrasyonları kristal viyole canlılık testi ile belirlenmiştir. Koruyucu etkisi araştırılan neeriositrin, hücrelere glukoz uygulamasından önce uygulanmıştır. 5-30 μM konsantrasyon aralığında yapılan tekrarlı deneyler sonucunda 5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM ve 30 μM neeriositrin konsantrasyonlarında glukoz hasarının azaldığı ve hücre canlılığının arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre 5 μM , 10 μM ve 20 μM neeriositrin konsantrasyonları, daha sonraki analizlerde kullanılacak konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde neeriositrinin farklı konsantrasyonlarının kristal viyole testi ile hücre canlılık testi sonuçları. a: Glukoz kontrol grubundan farklı ($p \leq 0,05$).

Kontrol grubu ve DMSO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı için DMSO (çözücü kontrol) grubu grafiklerde verilmemiştir. Glukoz kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 μM Neo+Glukoz, 20 μM Neo+Glukoz ve 30 μM Neo+Glukoz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. Hücre canlılığı, neeriositrin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak artmıştır. 5 μM Neo+Glukoz grubunda ise hücre

canlılık miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemesine rağmen glukoz kontrol grubuna oranla canlılık yüzdesinde % 11,35 artış tespit edilmiştir (Şekil 4.2.).

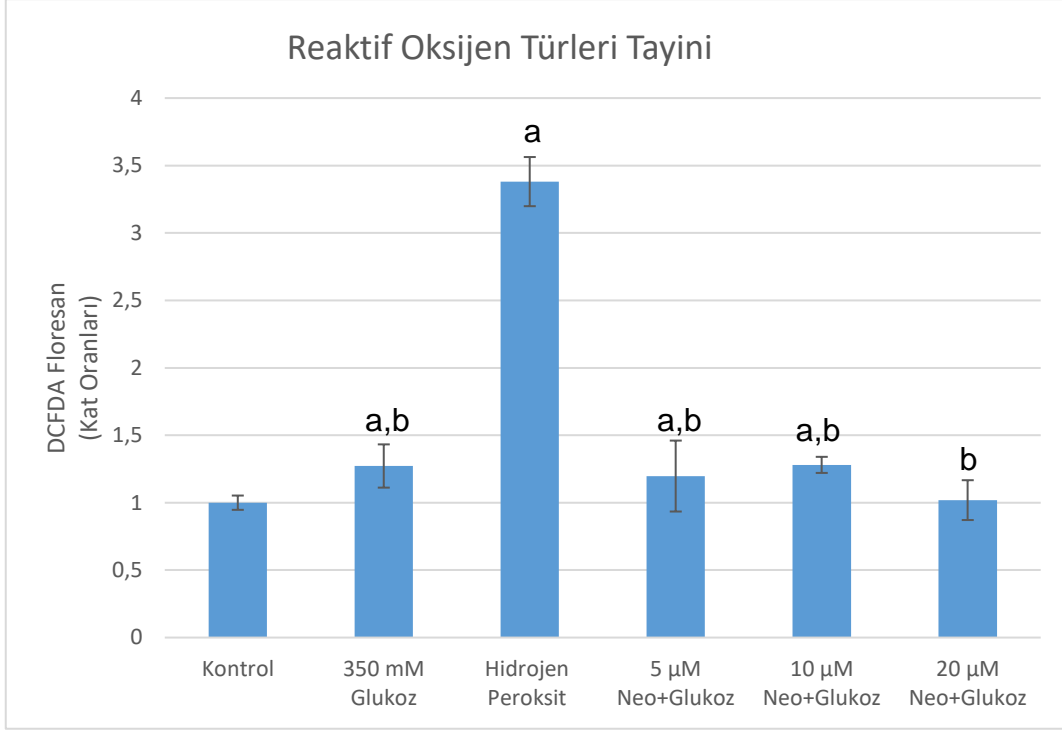
Kristal viyole canlılık testi sonuçları doğrultusunda daha sonra yapılacak analizler için 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M neoeriositrin konsantrasyonları seçilmiştir.

4.4. ROS Ölçüm Sonuçları

Hücre içinde biriken reaktif oksijen türleri, oksidatif stres belirteçidir. Tez kapsamında SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin ölçümü DCFDA boyası kullanılarak belirlenmiştir. ROS sonuçları Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Kontrol, glukoz kontrol grubu ve hidrojen peroksit uygulama grupları karşılaştırıldığında bu üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu durumda, yüksek glukoz uygulaması, reaktif oksijen türleri miktarını negatif kontrol grubu olan hidrojen peroksit kadar arttırmamış olmasına rağmen, kontrole oranla reaktif oksijen türlerinde artış gözlenmiştir. Yüksek glukoz uygulanan grupta ROS miktarında kontrol grubuna göre artış tespit edilmiş, ancak ROS miktarındaki artış negatif kontrol grubu olan hidrojen peroksit grubundan daha düşük olmuştur. Deney sonuçlarına göre 5 μ M Neo+Glukoz ve 10 μ M Neo+Glukoz grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Bu iki deney grubunda ROS miktarının kontrole göre arttığı tespit edilmiş, fakat bu artış hidrojen peroksit grubundaki kadar fazla olmamıştır.

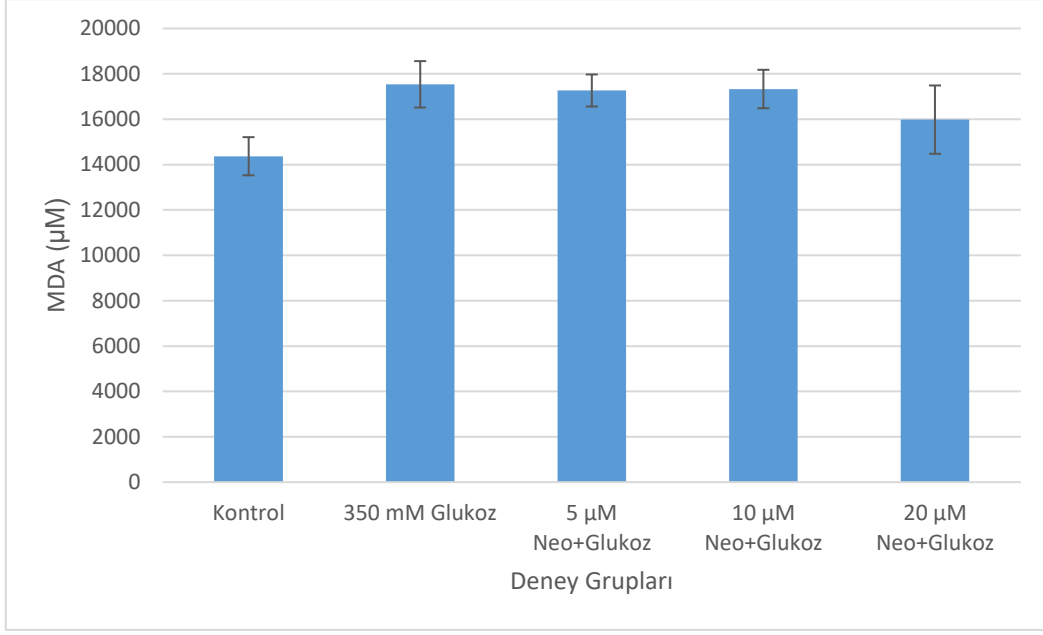
20 μ M Neo+Glukoz grubunun ROS miktarı ise hidrojen peroksit grubunun ROS miktarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunurken, kontrol grubu ile bir fark bulunmamıştır. Bu sonuç neoeriositrinin reaktif oksijen türlerinin azalmasında etkisinin olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.4. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre içi ROS ölçüm sonuçları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). b: 200 µM hidrojen peroksit (H_2O_2) grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$).

4.5. Lipid Peroksidasyon Ölçüm Sonuçları

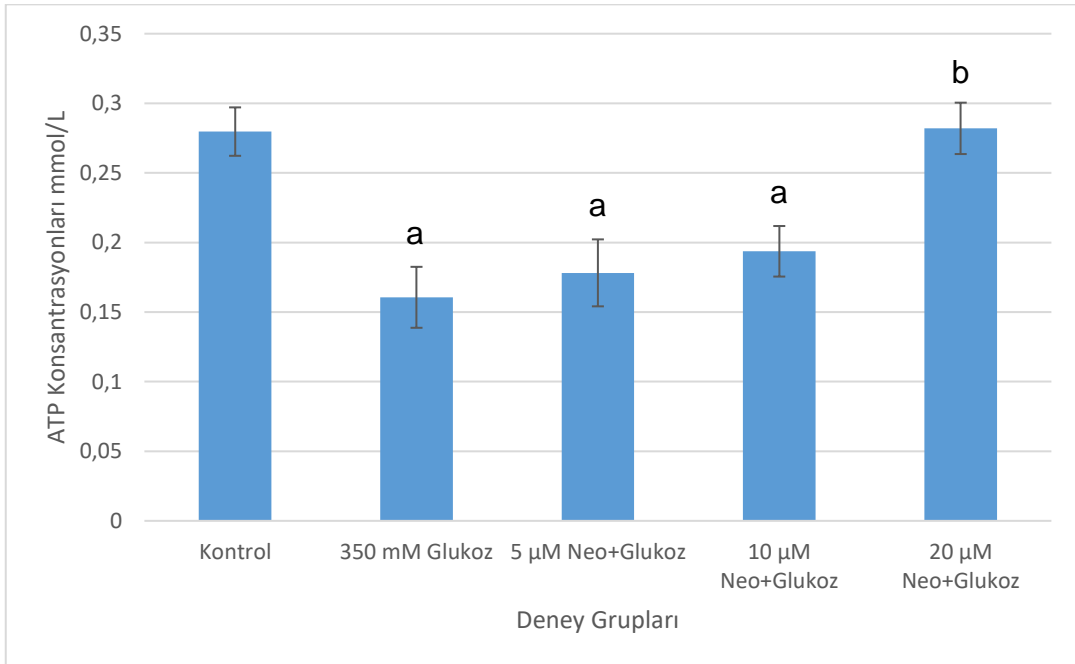
Deney gruplarının MDA miktar sonuçları Şekil 4.5.'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında glukoz grubunda MDA miktarının arttığı belirlenmiştir. SH-SY5Y hücrelerine neoeriositrin uygulaması sonucu 20 µM Neo+Glukoz grubundaki MDA miktarının düştüğü ve kontrol grubu değerine yakın değerde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5.)



Şekil 4.5. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde lipid peroksidasyonu ölçüm sonuçları.

4.6. Hücre İçi ATP Ölçüm Sonuçları

Hücrelerdeki ATP seviyeleri, hücrelerin metabolik aktivitesini göstermektedir. Çalışma kapsamında hücre içi ATP analizinden elde edilen ATP miktar sonuçları Şekil 4.6.'de verilmiştir.



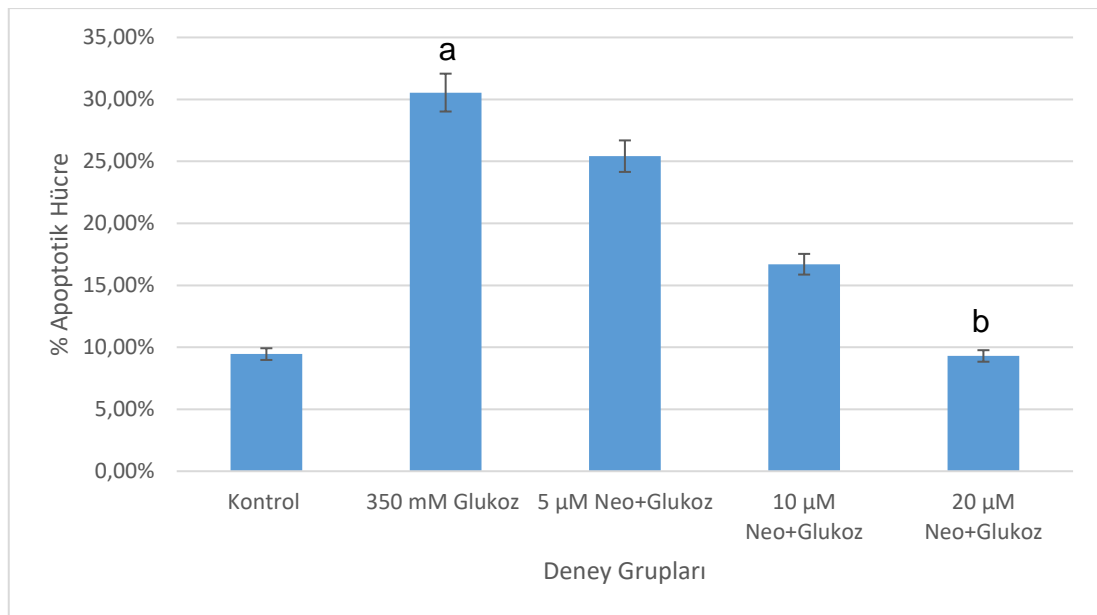
Şekil 4.6. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre içi ATP miktarlarının ölçüm sonuçları. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). b: Glukoz kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$).

Elde edilen verilere göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında glukoz, 5 μ M Neo+Glukoz ve 10 μ M Neo+Glukoz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Glukoz kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise 20 μ M Neo+Glukoz grubu ile glukoz kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir.

ATP ölçüm sonuçlarına göre istatistiksel olarak 5 μ M Neo+Glukoz ve 10 μ M Neo+Glukoz grupları için anlamlı olmasa da neoeriositrin uygulaması yapılan hücrelerin ATP seviyelerinde artış gözlenmiştir.

4.7. TUNEL Testi Sonuçları

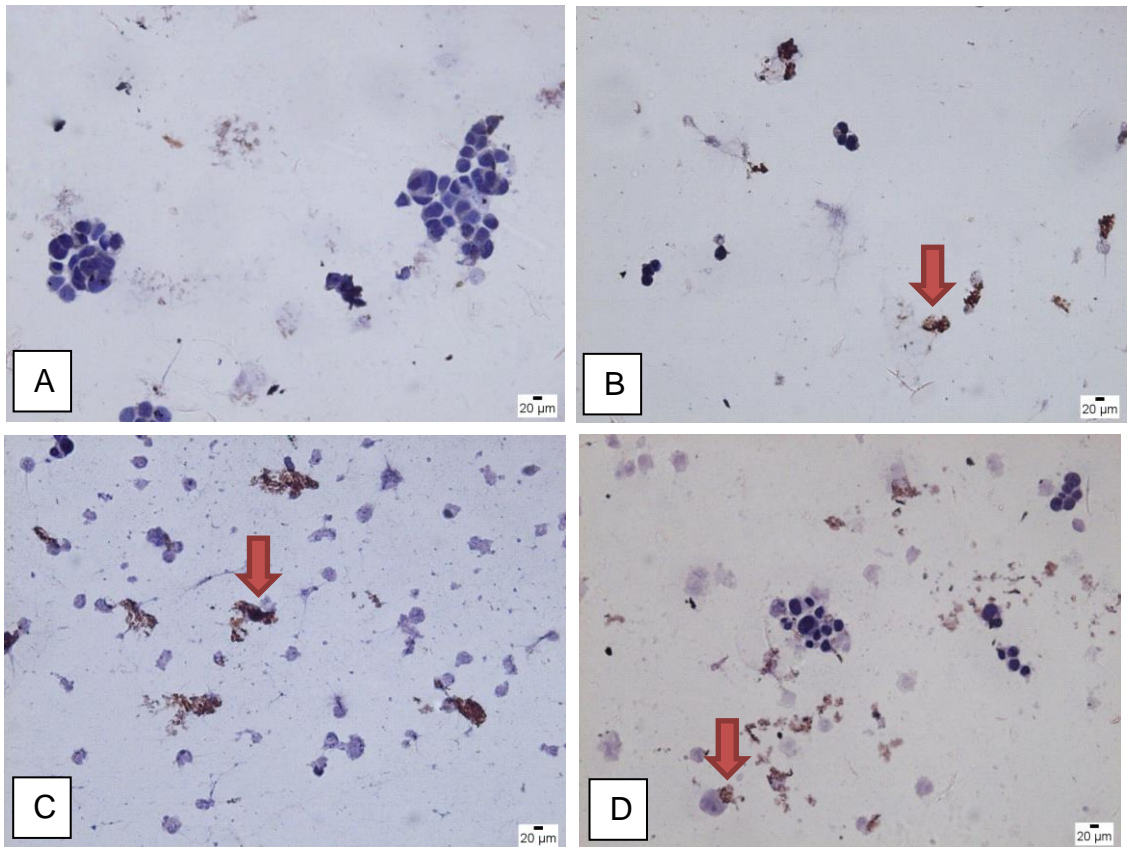
Yüksek glukoz hasarı oluşturulan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde neoeriositrinin koruyucu etkisinin araştırılması amacıyla hücrelerdeki ölüm tipi TUNEL apoptoz testi ile belirlenmiştir. Her deney grubu için apoptotik hücreler DAB boyası ile kahverengi boyanmıştır, canlı hücre çekirdekleri ise hematoksilin boyası ile mor renkte boyanmıştır. Işık mikroskopunda çekilen fotoğraflara göre hücre sayımları yapılmıştır. Apoptotik hücre yüzdeleri Şekil 4.7.'de, mikroskop görüntüleri Şekil 4.8.'de verilmiştir.

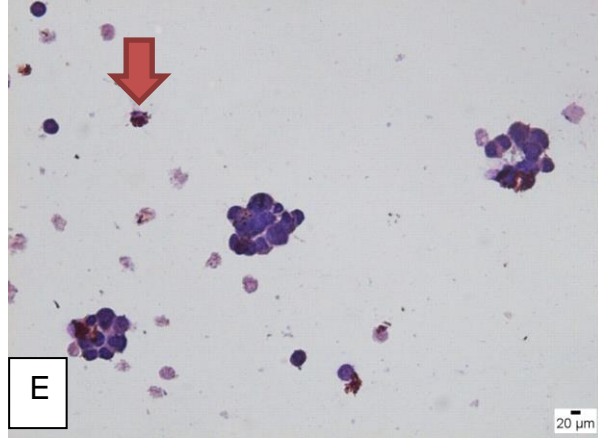


Şekil 4.7. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde TUNEL testi ile belirlenen apoptotik hücre yüzdeleri. a: Kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$). b: Glukoz kontrol grubu ile anlamlı bir fark ($p \leq 0,05$).

İstatistiksel olarak kontrol ve glukoz kontrol grupları arasında anlamlı bir fark vardır ve glukoz kontrol grubundaki apoptotik hücre sayısının kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede artmış olduğu tespit edilmiştir. Glukoz kontrol grubu ile 20 μM neoeriositrin konsantrasyonunun uygulandığı grup arasında da apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. Apoptotik hücre sayısı 20 μM Neo+Glukoz grubunda, glukoz kontrol grubuna göre % 22 oranda azalmıştır. 5 μM Neo+Glukoz ve 10 μM Neo+Glukoz grupları, kontrol ve glukoz kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen apoptotik hücre sayısının neoeriositrin konsantrasyonları arttıkça azaldığı gözlenmiştir.

TUNEL testi sonuçlarına göre 20 μM Neo+Glukoz grubundaki apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna çok yakın değerde olduğu bulunmuştur. Bu durumda, 20 μM Neo+Glukoz grubunda neoeriositrinin apoptotik hücre sayısını azalttığını söyleyebiliriz.





Şekil 4.8. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin TUNEL testi mikroskop görüntüleri. ➡ : Apoptotik hücre, A:Kontrol, B: 350 mM Glukoz, C: 5 µM Neo+Glukoz, D: 10 µM Neo+Glukoz, E: 20 µM Neo+Glukoz.

5. TARTIŞMA

Diabetes mellitus, insülin yetersizliğine bağlı, kandaki yüksek glukoz seviyesi (hiperglisemi) ve bozulmuş glukoz metabolizması ile karakterize edilen bir grup heterojen bozukluğu ifade etmektedir [65]. Diabetes mellitusun en çok görülen iki formu tip 1 diabetes mellitus (T1DM) ve tip 2 diabetes mellitustur (T2DM). T1DM, insülin bağımlılığına ve hiperglisemiye yol açan pankreatik β hücrelerinin otoimmün yıkımının sonucunda çocuklarda ve ergenlerde yaygın olarak ortaya çıkmaktadır. Batı toplumlarında obezitenin artması ile aynı zamanda T2DM tanılarının sayısında da artış meydana gelmiştir; dünya nüfusunun tahmini % 7'si T2DM'den etkilenmektedir ve gençler de giderek daha fazla etkilenmeye başlamıştır [29, 66].

T1DM veya T2DM'li hastaların büyük bir kısmında, geniş ölçüde mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar şeklinde vasküler komplikasyonların gelişmesi beklenmektedir. Mikrovasküler komplikasyonlar vücudun en karmaşık şekilde damarlanmış organlarını, özellikle sinir sistemini, retinayı ve böbrekleri etkilemektedir [67]. Diyabetik retinopati, nefropati ve nöropati, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) üretimi ve oksidatif stresin indüklenmesi gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla kronik hipergliseminin neden olduğu başlıca bilinen mikrovasküler komplikasyonlardır [68]. Makrovasküler komplikasyonlar, erken miyokard enfarktüsü, iskemik olaylar, felç ve erken ölüm ile sonuçlanan büyük kan damarlarının bozukluklarını kapsamaktadır [22]. T1DM ve T2DM'un belirgin komplikasyonları arasında en yaygın görüleni diyabetik nöropatidir. Diyabetik nöropati, alt ekstremitelerde distalde başlamaktadır ve aynı zamanda ağrı ve uyuşma ile karakterize bir duyuşsal fonksiyon kaybıdır. Zamanla, diyabetli hastaların en az % 50'sinde diyabetik nöropati gelişmektedir [69].

Dislipidemi ve hiperglisemi, değişmiş insülin sinyaliyle birlikte, nöronlarda, glia ve vasküler hücrelerde sinir disfonksiyonuna ve sonucunda DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi, nörodejenerasyon, mitokondriyal disfonksiyon, ve nörotrofik sinyal kaybı dahil nöropatiye yol açabilen çeşitli patolojik değişikliklere yol açmaktadır ve bu durum makrofaj aktivasyonunu tetikleyebilmektedir. Bu yolların nöropati gelişimindeki önemi hücre tipine, hastalık profiline ve zamana göre değişmektedir, çünkü farklı hücre tipleri metabolik bozukluklara bağlı olarak yaralanmalara farklı şekilde tepkiler göstermektedir.

Diabetes mellitusta, yüksek glukoz seviyesinin vasküler komplikasyonları başlatan ana patolojik süreç olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, diyabetik nöropatiye etki eden yolların aynı zamanda diabetes mellitus gelişimi ile de ilgili olduğu son dönemde yapılan çalışmalar doğrultusunda giderek daha netleşmektedir [65]. Glukozun diyabet ve diyabetik nöropatiye olan etkisi göz önünde bulundurularak tez kapsamında hücrel hasar oluşturmak için yüksek glukoz seviyeleri (350 mM) kullanılmıştır.

Diyabetik nöropati, hastalarda ellerde ve ayaklarda his kaybına neden olmakta ve özellikle geceleri karıncalanma ve uyuşma ile kendini göstermektedir. Bu hastalık, diyabetin ileri dönemlerinde ortaya çıkmaya daha yatkın olmasına rağmen diyabetin ilk safhalarından itibaren erken evrelerde gelişmeye başlar. Henüz diyabetik nöropati ile ilgili kesin bir tedavi yöntemi olmamakla birlikte birçok bilimsel araştırma ve son dönem çalışmaları diyabetik nöropatinin etkilerinin iyileştirilmesinden çok ilerlememesine veya önlenmesine odaklanmıştır. Bu sebeple özellikle diyabetik nöropati hastaları piyasadaki ilaçlardan çok, doğal ajanlara yönelmektedir.

Biyolojik özellikleriyle bağlantılı olarak polifenoller, şeker hastalığının çeşitli yönleri için faydalı nutrasötikler ve tamamlayıcı tedaviler için ajan olarak gösterilmiştir. Birkaç *in vitro* dayanağı olan hayvan ve bazı insan çalışmalarında, polifenollerin birçok metabolik süreçte rol oynayabildiği gösterilmiştir. Polifenoller, lipid ve ayrıca karbonhidrat metabolizmasını düzenleyebilmektedir. Bu düzenleyici etkisi ile hiperglisemi, dislipidemi ve insülin direncini azaltabilmekte, yağ dokusunu iyileştirebilmekte ve oksidatif stresi, strese duyarlı sinyal yollarını ve inflamatuvar süreçleri hafifletebilmektedir [70, 71].

Tip 2 diyabetik sıçanlardan alınan, serumda kültüre edilen sıçan Schwann hücrelerinde ve T2DM sıçanlarında yapılan bir çalışmada, proantosiyanidinlerin etkisi araştırılmıştır. Üzüm çekirdeğinde bulunan proantosiyanidinlerin T2DM'lu sıçanlara verilmesi sonucunda lipoprotein miktarında ve diyabetik sıçanlarda sinir iletim hızında artış saptanmıştır [72]. Başka bir çalışmada, diğer bir flavonoid olan, epigallokateşin-gallat (EGCG)'in hücrel DNA'yı reaktif oksijen türlerinden (ROS) korumada alfa-lipoik asidinkine benzer bir etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, lipid peroksidasyonunu azaltmada çok daha etkili bir antioksidan olduğu belirlenmiştir [73].

Narenciye meyvelerinde bulunan birçok flavonoidin oksidatif stresi azalttığı, insülin duyarlılığını iyileştirdiği ve glukoz toleransını azalttığı bildirilmiştir. Ek olarak, yapılan

çalışmalarda narenciye flavonoidlerinin lipid metabolizmasını dzenlediği, inflamasyonu ve apoptozu baskıladığı ve endotelial disfonksiyonu iyileştirdiği bildirilmiştir [74, 75]. Neeriositrin ise yenilerde keşfedilmiş bir flavonoiddir ve turunđgil meyvelerinde bulunduğu bildirilmiştir [43]. Bununla birlikte neeriositrinin yksek glukoz hasarına etkisi ile ilgili bir araştırma literatürde mevcut değildir. Bu tez kapsamında flavonoidlerin antioksidan ve antidiyabetik etkileri dikkate alınarak SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde yksek glukoz uygulaması ile diyabetik modelleme yapılarak hücredeki hasara karşı bir flavonoid olan neeriositrinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında hücre canlılık analizleri, hücre içi ATP miktarının belirlenmesi, reaktif oksijen türlerinin ölçülmesi, lipid peroksidasyon ürünü ölçümü ve hücre ölüm tipi tayini yapılmıştır.

Yksek glukoz konsantrasyonları kullanılarak diyabetik nöropati modelinin oluşturulduğu ve çeşitli flavonoidlerin antioksidan ve antidiyabetik etkilerinin incelendiği *in vivo* ve *in vitro* alışmalar bulunmaktadır [76, 77].

Bir Citrus flavonoidi olan neeriositrin ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Neeriositrinin glukoz hasarına karşı etkisi ilk kez bu tez kapsamında çalışılmıştır. Neeriositrinin SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerindeki glukoz hasarına karşı olan koruyucu etkisinin araştırılması amacıyla kristal viyole canlılık testi kullanılmıştır. Genel olarak hücre canlılık analizlerinde MTT testi kullanılmakla beraber çalışmamızda kristal viyole boyama testi yapılmıştır. Flavonoidler ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda MTT testi içerisinde bulunan tetrazolyum kristalleri ile bazı flavonoidlerin etkileşime girerek test sonuçlarında hatalar olabileceği gösterildiğinden [78] kristal viyole hücre canlılık analizi tercih edilmiştir.

Yapılan kristal viyole boyaması sonuçlarına göre SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde glukoz için IC₅₀ konsantrasyonu 350 mM olarak bulunmuştur. Koruyucu etkisi araştırılan neeriositrin konsantrasyonları için kristal viyole canlılık testi sonuçlarında ise neeriositrin konsantrasyonları arttıa hücre canlılığında da artış olduğu ve 20 µM Neo+Glukoz grubunda canlı hücre sayısının kontrol grubu hücre sayısına ulaştığı bulunmuştur. Kristal viyole canlılık testi sonuçlarımıza göre neeriositrinin yksek glukoz hasarına karşı SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre canlılığında koruyucu etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

İçerisinde quersetin ve kaempferol flavonoidlerinin bulunduğu *Ziziphus jujuba* bitkisinin glukoz kaynaklı nörotoksisite üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada PC12 hücre hattı kullanılmış ve canlılık testi olarak MTT testi yapılmıştır. 0, 75, 100, 125 ve 150 mM'de artan glukoz seviyelerine maruz bırakılan PC12 hücrelerinde, 100 mM glukoz konsantrasyonunda maksimum toksik etki tespit edilmiştir. 300 µg/ml dozundaki ZJF özütü, 24 saat sonra PC12 hücrelerinde yüksek glukoz kaynaklı toksisiteyi önemli ölçüde inhibe etmiştir [16]. Farklı bir nöron hücre hattı olan PC12 hücrelerinde hasar oluşturan glukoz konsantrasyonu 100 mM iken, çalışmamızda kullanılan SH-SY5Y hücrelerinde daha yüksek bir glukoz konsantrasyonu tespit edilmiş ve IC₅₀ konsantrasyonu 350 mM olarak bulunmuştur.

Meyan kökü olarak bilinen *Glycyrrhiza glabra*'nın yüksek glukoz hasarına karşı SH-SY5Y hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı 2021 yılında yapılan bir çalışmada, yüksek glukoz konsantrasyonu 300 mM olarak bulunmuştur. Meyan kökü bitkisi birçok flavonoid içermektedir ve çalışma sonuçlarına göre bu bitkinin, SH-SY5Y hücrelerinde yüksek glukoz kaynaklı hücre ölümüne karşı etkili olduğu bildirilmiştir [79]. Aynı hücre hattıyla yapılan çalışmada uygulanan yüksek glukoz konsantrasyonu, bu tez kapsamında belirlenmiş olan yüksek glukoz konsantrasyonları birbiri ile uyumluluk göstermektedir.

Rotenon hasarına karşı SH-SY5Y hücreleri üzerine naringin flavonoidinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, flavonoid konsantrasyonları 2 µM, 5 µM ve 10 µM seçilmiş ve bu konsantrasyonlarda naringinin, rotenon hasarına karşı SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde nörokoruyucu etkisi olduğu bulunmuştur [80]. Naringin flavonoidinin hücrel apoptoz üzerine koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Naringin için belirlenen flavonoid konsantrasyonlarının, çalışmamızda seçilen neoeriositrin konsantrasyonlarıyla yakın konsantrasyonlar olduğu görülmektedir. Kimyasal yapısı neoeriositrine benzerlik gösteren naringin uygulamasıyla elde edilen TUNEL testi sonuçları, çalışmamızdan elde edilen TUNEL testi sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Diğer yandan naringin flavonoidinin sitokrom P450 enzim inhibisyonuna neden olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır [81].

SH-SY5Y hücrelerinde bir flavonoid olan fisetinin, ROS üretimini indüklediği bilinen 6-Hidroksidopamin (6-OHDA)'e karşı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada DCFDA boyası kullanılarak hücrel ROS seviyesi ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan fisetin konsantrasyonu 10 µM olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar fisetin ile ön muamele edilen

hücrelerde ROS üretiminin yaklaşık % 58 oranda düştüğünü bulmuşlardır [82]. Çalışmamızda DCFDA boyama sonuçlarına göre neoeriositrin konsantrasyonundaki artışla ters orantılı bir şekilde ROS miktarında azalma tespit edilmiştir ve özellikle de 20 μ M neoeriositrin grubunda ROS miktarı kontrol grubu değeri seviyesinde bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen ROS sonuçları fisetin flavonoidi uygulanan çalışmanın sonuçlarıyla karşılaştırıldığında benzer konsantrasyonlarda benzer koruyucu etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Diyabetik nöropati için bir *in vitro* hücre model olarak PC12 hücrelerinde yüksek glukozla (HG) indüklenen nörotoksisite üzerine sildenafilin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, lipid peroksidasyon ölçümü yapılmış, ATP miktarları tayin edilmiş ve hücrede biriken reaktif oksijen türlerini ölçülmüştür. Çalışma sonuçlarına göre sildenafilin PC12 hücrelerinde glukozla bağlı hasarı azaltarak lipid peroksidasyonu ve hücre içi ROS miktarını azalttığı ve hücre ATP miktarını düzenlediği bulunmuştur [83]. Çalışmamızda da bir sinir hücre hattı olan PC12 hücreleriyle yapılan çalışmada olduğu gibi yüksek glukoz konsantrasyonları ile diyabetik nöropati modeli oluşturularak neoeriositrinin koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Propoliste bulunan bir flavonoid olan pinocembrinin SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde mitokondriyal koruma üzerine etkisinin mekanizmasının araştırıldığı çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde flavonoid uygulaması sonucu ATP miktarlarındaki değişiklikler gözlenmiştir. Flavonoid ile muamele edilen SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde 25 μ M konsantrasyonundaki pinocembrin flavonoidinin ATP seviyelerindeki düşüşü ortadan kaldırdığı bildirilmiştir [84]. Bu tez kapsamında yapılan ATP ölçümü analizlerine göre, 20 μ M neoeriositrin uygulamasında hücre ATP miktarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Pinocembrin ile yapılan bu çalışmanın sonuçları ile tez kapsamında yapılan ATP ölçüm sonuçları hem uygulanan flavonoid konsantrasyonları açısından hem de flavonoid uygulaması sonucu elde edilen veriler açısından uyumluluk göstermektedir.

Myrica cerifera'nın kök kabuğundan izole edilen bir flavonoid olan myricitrin'in SH-SY5Y hücrelerinde metilglioksal ile indüklenen mitokondriyal disfonksiyon üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada ise flavonoidlerin antioksidan etkisi dikkate alınarak hücre ATP miktarı ve DCFDA boyama ile hücre içi ROS miktarları ölçülmüştür. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 10 μ M myricitrin konsantrasyonunun SH-SY5Y

hücrelerinde metilglioksal kaynaklı ROS birikimini azalttığı ve hücre içi ATP miktarını arttırdığı bildirilmiştir [85]. Aynı hücre ile yapılan bu çalışma sonuçları ile bu tez kapsamında ölçülen ATP miktarlarının sonuçları tutarlılık göstermektedir. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine 10 µM neoeriositrin uygulaması sonucunda SH-SY5Y hücrelerinin ATP miktarlarında kontrol ve glukoz kontrol gruplarına göre artış bulunmuştur.

Phloretin ve phlorizin flavonoidlerinin SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde rotenon kaynaklı nörohasara karşı koruyucu etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada DCFDA boyama ile hücre içi ROS miktarı ve TBARS testiyle lipid peroksidasyon ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada phloretin veya phlorizin flavonoidlerinin çalışma konsantrasyonu 10 µM olarak seçilmiştir. Rotenon konsantrasyonlarına maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerine kıyasla hem phloretin hem de phlorizin ile muamele edilen hücrelerde ROS üretiminde önemli düşüşler gözlemlenmiştir. Rotenon inkübasyonundan önce SH-SY5Y hücrelerine phloretin veya phlorizin (10 µM) eklenmesinin, kontrol gruplarına kıyasla lipid peroksidasyonunda bir azalmaya sebep olduğunu bulmuşlardır. Yani, phloretin veya phlorizin flavonoidlerinin 10 µM konsantrasyonda rotenon tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde engellediğini bulmuşlardır [86]. Tez kapsamında, elde edilen verilere göre 20 µM neoeriositrin konsantrasyonunda SH-SY5Y hücrelerinde lipid peroksidasyon miktarının kontrol grubu değerine yakın olduğu, neoeriositrinin lipid peroksidasyonu azalttığı bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ile phloretin ve phlorizin flavonoidlerinin kullanıldığı çalışmadaki lipid peroksidasyon sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Birçok bitki ve arı ürününde bulunan ve güçlü nöroprotektif ve antioksidan özellikleri olan doğal olarak aktif bir flavon olan chrysinin SH-SY5Y hücrelerinde diklofenak ile indüklenen apoptoz üzerinde nöroprotektif etkilerinin araştırıldığı 2020 yılında yayınlanan çalışmada apoptotik hücrelerin tayini için TUNEL testi, reaktif oksijen türlerinin ölçümü için DCFDA boyama ve lipid peroksidasyonunun ölçümü için TBARS testi kullanılmıştır. Diklofenak ile SH-SY5Y hücrelerinin muamelesi sonucu hücrelerde ROS miktarının, lipid peroksidasyonun ve apoptotik hücre sayısının arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte 50 µM konsantrasyonda chrysin flavonoidinin SH-SY5Y hücrelerine ön muamelesinin, diklofenak ile indüklenen lipid peroksidasyonu sonucu artan MDA seviyelerini önemli derecede düşürdüğü bildirilmiştir. Chrysin flavonoidinin

ön uygulamasının ayrıca diklofenak ile indüklenen apoptozu da önemli ölçüde inhibe ettiği kaydedilmiştir [87].

Sonuç olarak bu tez kapsamında yapılan hücre canlılık analizleri, oksidatif stres testleri ve hücre ölüm tipi tayini deneylerinden elde edilen sonuçlara göre neoeriositrinin SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde yüksek glukoz hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre yenilerde keşfedilmiş olan bir flavonoid olan neoeriositrinin antioksidan ve nörokoruyucu etkisi sayesinde diyabetik nöropatiye karşı güçlü bir potansiyel ajan olabileceğini ileri sürebiliriz. Bu tez kapsamında neoeriositrinin diyabetik nöropati üzerine koruyucu etkisiyle ilgili ilk veriler elde edilmiş ve bu koruyucu etkinin mekanizmasının daha ayrıntılı olarak analiz edilmesi için yapılacak araştırmaların önü açılmıştır.

6. YORUM

Bitkisel kaynaklı flavonoidlerin bilinen birçok koruyucu etkisi vardır. Bunlar içinde en önemlileri antioksidan, antiinflamatuvar, antidiyabetik ve antikanserojen etkileridir. Doğada keşfedilmiş fazla sayıda flavonoid vardır ve keşfedilmeye devam etmektedir. Bu tez kapsamında yenilerde keşfedilmiş ve genel olarak Citrus meyvelerinde bulunan bir flavonoid olan neoeriositrinin SH-SY5Y hücrelerinde yüksek glukoz hasarına koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Tez kapsamında yapılan deneyler sonucunda neoeriositrinin yüksek glukoz hasarına karşı SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. Bu sonuçların diyabetik nöropati hastalığına karşı geliştirilmekte olan tedavi yöntemlerine ve ilaçlara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Tez kapsamında neoeriositrinin yüksek glukoz hasarına karşı koruyucu etkisi ilk kez araştırılmış olması çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır. Literatürdeki çoğu çalışmada neoeriositrin bazı meyve özütlerinde birden çok flavonoid ile beraber karışım olarak ele alınmıştır. Tez kapsamında ise neoeriositrinin tek flavonoid olarak yüksek glukoz hasarına etkisi incelenmiştir.

Neoeriositrin flavonoidi, nöroblastoma hücrelerinde yüksek glukoz hasarını oldukça azaltmıştır. Tez kapsamında yapılan sitotoksosite, oksidatif stres ve hücrelölüm yolu tayini deneyleri çalışmamızın hipotezi desteklenmiştir. Yapılan kristal viyole canlılık testi sonuçlarına göre neoeriositrin konsantrasyonları arttıkça SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücrelölüm oranının attığı bulunmuştur. Glukoz kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Hücrelölümü gösteren başka bir boyama yöntemi ise Tripan Mavis boyamasıdır. Bu boyama ile canlı hücre sayımları yapılarak kristal viyole sonuçları desteklenmiştir.

TUNEL testi ile neoeriositrinin 20 µM konsantrasyonda apoptotik hücre ölümü üzerinde koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur.

Tez kapsamında elde edilen ATP ölçüm sonuçlarına göre, neoeriositrinin artan konsantrasyonlarının ATP miktarını arttırdığı bulunmuştur. Lipid peroksidasyon belirteci olan MDA ölçüm sonuçlarına göre ise neoeriositrinin 20 µM konsantrasyonda MDA miktarını azalttığı ancak 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda büyük bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

SH-SY5Y hücrelerinde neoeriositrinin artan konsantrasyonlarında ROS miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar neoeriositrinin antioksidan etkisini göstermektedir.

Bu tez kapsamında yapılan *in vitro* deneylerin ileride flavonoidler ve özellikle neoeriositrin ile ilgili yapılacak olan *in vivo* deneylere öncülük edeceği düşünülmektedir. Flavonoidlerin ve neoeriositrinin antidiyabetik ve antioksidan özellikleri dikkate alındığında klinik çalışmalarda diyabetik nöropati hastalığının tedavisine katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- [1] B.C. Callaghan, G. Gallagher, V. Fridman, E.L. Feldman, Diabetic neuropathy: what does the future hold?, *Diabetologia*, (2020) 1-7.
- [2] S.J. Cho, K.A. Kang, M.J. Piao, Y.S. Ryu, P. Fernando, A.X. Zhen, Y.J. Hyun, M.J. Ahn, H.K. Kang, J.W. Hyun, 7,8-Dihydroxyflavone Protects High Glucose-Damaged Neuronal Cells against Oxidative Stress, *Biomol Ther (Seoul)*, 27 (2019) 85-91.
- [3] M.A. Babizhayev, I.A. Stokov, V.V. Nosikov, E.L. Savel'yeva, V.F. Sitnikov, Y.E. Yegorov, V.Z. Lankin, The Role of Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Generation of Free Radical Species in the Glycation Reaction and Gene Polymorphisms Encoding Antioxidant Enzymes to Genetic Susceptibility to Diabetic Neuropathy in Population of Type I Diabetic Patients, *Cell Biochem Biophys*, 71 (2015) 1425-1443.
- [4] R. Testa, A.R. Bonfigli, S. Genovese, V. De Nigris, A. Ceriello, The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications, *Nutrients*, 8 (2016).
- [5] P.G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *J Nat Prod*, 63 (2000) 1035-1042.
- [6] A.N. Panche, A.D. Diwan, S.R. Chandra, Flavonoids: an overview, *J Nutr Sci*, 5 (2016) e47.
- [7] O.I. Aruoma, B. Landes, D. Ramful-Baboolall, E. Bourdon, V. Neergheen-Bhujun, K.-H. Wagner, T. Bahorun, Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes, *Preventive medicine*, 54 (2012) S12-S16.
- [8] D.M. Nathan, Long-term complications of diabetes mellitus, *New England Journal of Medicine*, 328 (1993) 1676-1685.
- [9] A.D. Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes care*, 37 (2014) S81-S90.
- [10] J. Ozougwu, K. Obimba, C. Belonwu, C. Unakalamba, The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus, *Journal of physiology and pathophysiology*, 4 (2013) 46-57.
- [11] S.A. Paschou, N. Papadopoulou-Marketou, G.P. Chrousos, C. Kanaka-Gantenbein, On type 1 diabetes mellitus pathogenesis, *Endocrine connections*, 7 (2018) R38-R46.
- [12] M.J. Fowler, Microvascular and macrovascular complications of diabetes, *Clinical diabetes*, 26 (2008) 77-82.
- [13] J.L. Edwards, A.M. Vincent, H.T. Cheng, E.L. Feldman, Diabetic neuropathy: mechanisms to management, *Pharmacology & therapeutics*, 120 (2008) 1-34.
- [14] R. Freeman, Autonomic peripheral neuropathy, *The Lancet*, 365 (2005) 1259-1270.

- [15] A. Vinik, A. Mehrabyan, Diabetic neuropathies, *The Medical clinics of North America*, 88 (2004) 947-999, xi.
- [16] A. Kaeidi, M. Taati, Z. Hajializadeh, F. Jahandari, M. Rashidipour, Aqueous extract of *Zizyphus jujuba* fruit attenuates glucose induced neurotoxicity in an in vitro model of diabetic neuropathy, *Iranian journal of basic medical sciences*, 18 (2015) 301.
- [17] C. Figueroa-Romero, M. Sadidi, E.L. Feldman, Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 9 (2008) 301-314.
- [18] V.B. Djordjevic, Free radicals in cell biology, *International review of cytology*, 237 (2004) 57-91.
- [19] J. Mathers, J.A. Fraser, M. McMahon, R.D. Saunders, J.D. Hayes, L.I. McLellan, Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress, *Biochemical Society Symposia*, Portland Press Limited, (2004), pp. 157-176.
- [20] E.L. Feldman, M.J. Stevens, D.A. Greene, Pathogenesis of diabetic neuropathy, *Clinical neuroscience (New York, NY)*, 4 (1997) 365-370.
- [21] V.P. Singh, A. Bali, N. Singh, A.S. Jaggi, Advanced glycation end products and diabetic complications, *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 18 (2014) 1-14.
- [22] M. Brownlee, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, 414 (2001) 813-820.
- [23] R.N. Cortright, J.L. Azevedo Jr, Q. Zhou, M. Sinha, W.J. Pories, S.I. Itani, G.L. Dohm, Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle, *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 278 (2000) E553-E562.
- [24] E. Arikawa, R.C. Ma, K. Isshiki, I. Luptak, Z. He, Y. Yasuda, Y. Maeno, M.E. Patti, G.C. Weir, R.A. Harris, Effects of insulin replacements, inhibitors of angiotensin, and PKC β 's actions to normalize cardiac gene expression and fuel metabolism in diabetic rats, *Diabetes*, 56 (2007) 1410-1420.
- [25] I.G. Obrosova, U.A. Julius, Role for poly (ADP-ribose) polymerase activation in diabetic nephropathy, neuropathy and retinopathy, *Current vascular pharmacology*, 3 (2005) 267-283.
- [26] I.G. Obrosova, J.G. Mabley, Z. Zsengellér, T. Charniauskaya, O.I. Abatan, J.T. Groves, C. Szabó, Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst, *The FASEB journal*, 19 (2005) 401-403.

- [27] R. Tiwari, M.H. Siddiqui, T. Mahmood, P. Bagga, F. Ahsan, A. Shamim, Herbal Remedies: A Boon for Diabetic Neuropathy, *Journal of dietary supplements*, 16 (2019) 470-490.
- [28] S.J. Lee, G.F. Zhang, N.J. Sung, Hypolipidemic and hypoglycemic effects of *Orostachys japonicus* A. Berger extracts in streptozotocin-induced diabetic rats, *Nutrition research and practice*, 5 (2011) 301.
- [29] R. Vinayagam, B. Xu, Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review, *Nutrition & metabolism*, 12 (2015) 60.
- [30] A. Sood, B. Kumar, S.K. Singh, P. Prashar, A. Gautam, M. Gulati, N.K. Pandey, I. Melkani, A. Awasthi, S.A. Saraf, Flavonoids as Potential Therapeutic Agents for the Management of Diabetic Neuropathy, *Current Pharmaceutical Design*, (2020).
- [31] O. Deveoğlu, R. Karadağ, Genel bir bakış: doğal boyarmaddeler, *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 23 (2011) 21-32.
- [32] T. Caro-Ordieres, G. Marín-Royo, L. Opazo-Ríos, L. Jiménez-Castilla, J.A. Moreno, C. Gómez-Guerrero, J. Egido, The coming age of flavonoids in the treatment of diabetic complications, *Journal of Clinical Medicine*, 9 (2020) 346.
- [33] S. Zhang, J. Wang, H. Zhao, Y. Luo, Effects of three flavonoids from an ancient traditional Chinese medicine *Radix puerariae* on geriatric diseases, *Brain Circulation*, 4 (2018) 174.
- [34] R.K. AL-Ishaq, M. Abotaleb, P. Kubatka, K. Kajo, D. Büsselberg, Flavonoids and their anti-diabetic effects: cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels, *Biomolecules*, 9 (2019) 430.
- [35] B. Burton-Freeman, M. Brzeziński, E. Park, A. Sandhu, D. Xiao, I. Edirisinghe, A selective role of dietary anthocyanins and flavan-3-ols in reducing the risk of type 2 diabetes mellitus: A review of recent evidence, *Nutrients*, 11 (2019) 841.
- [36] H. Alkhalidy, Y. Wang, D. Liu, Dietary flavonoids in the prevention of T2D: An overview, *Nutrients*, 10 (2018) 438.
- [37] H. M. Eid, P. S. Haddad, The antidiabetic potential of quercetin: underlying mechanisms, *Current medicinal chemistry*, 24 (2017) 355-364.
- [38] H.-K. Wang, Y. Xia, Z.-Y. Yang, S.L.M. Natschke, K.-H. Lee, Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents, *Flavonoids in the living system*, Springer (1998), pp. 191-225.
- [39] T.N. Kaul, E. Middleton Jr, P.L. Ogra, Antiviral effect of flavonoids on human viruses, *Journal of medical virology*, 15 (1985) 71-79.

- [40] L. Di Donna, G. De Luca, F. Mazzotti, A. Napoli, R. Salerno, D. Taverna, G. Sindona, Statin-like principles of bergamot fruit (*Citrus bergamia*): isolation of 3-hydroxymethylglutaryl flavonoid glycosides, *Journal of natural products*, 72 (2009) 1352-1354.
- [41] A. Bocco, M.-E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset, Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (1998) 2123-2129.
- [42] S. Tan, X. Zhao, Y. Yang, Z. Ke, Z. Zhou, Chemical Profiling Using Uplc Q-Tof/Ms and Antioxidant Activities of Fortunella Fruits, *Journal of food science*, 81 (2016) C1646-C1653.
- [43] D. Lo Furno, A.C.E. Graziano, R. Avola, R. Giuffrida, V. Perciavalle, F. Bonina, G. Mannino, V. Cardile, A Citrus *Bergamia* extract decreases Adipogenesis and increases Lipolysis by modulating PPAR levels in Mesenchymal stem cells from human adipose tissue, *PPAR research*, 2016 (2016).
- [44] A.C. Graziano, V. Cardile, L. Crascì, S. Caggia, P. Dugo, F. Bonina, A. Panico, Protective effects of an extract from *Citrus bergamia* against inflammatory injury in interferon-gamma and histamine exposed human keratinocytes, *Life sciences*, 90 (2012) 968-974.
- [45] L. Li, Z. Zeng, G. Cai, Comparison of neoeriocitrin and naringin on proliferation and osteogenic differentiation in MC3T3-E1, *Phytomedicine*, 18 (2011) 985-989.
- [46] O. Benavente-García, J. Castillo, F.R. Marin, A. Ortuño, J.A. Del Río, Uses and properties of citrus flavonoids, *Journal of agricultural and food chemistry*, 45 (1997) 4505-4515.
- [47] M.F. Molina-Jimenez, M.I. Sanchez-Reus, J. Benedi, Effect of fraxetin and myricetin on rotenone-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells: comparison with N-acetylcysteine, *European journal of pharmacology*, 472 (2003) 81-87.
- [48] N.G. Hattangady, M.S. Rajadhyaksha, A brief review of in vitro models of diabetic neuropathy, *International journal of diabetes in developing countries*, 29 (2009) 143.
- [49] A.M. Vincent, M. Brownlee, J.W. Russell, Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy, (2002).
- [50] M. Feoktistova, P. Geserick, M. Leverkus, Crystal violet assay for determining viability of cultured cells, *Cold Spring Harbor Protocols*, (2016) pdb. prot087379.
- [51] Ö.S. Aslantürk, In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages, *InTech* (2018).

- [52] J.C. Reed, Mechanisms of apoptosis, *The American journal of pathology*, 157 (2000) 1415-1430.
- [53] D.T. Loo, In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques, *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo*, (2011) 3-13.
- [54] K. Kyrylkova, S. Kyryachenko, M. Leid, C. Kioussi, Detection of apoptosis by TUNEL assay, *Odontogenesis*, Springer (2012), pp. 41-47.
- [55] K.J. Davies, Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems, *IUBMB life*, 50 (2000) 279-289.
- [56] B. Halliwell, Antioxidant characterization: methodology and mechanism, *Biochemical pharmacology*, 49 (1995) 1341-1348.
- [57] M. Shakeel, Recent advances in understanding the role of oxidative stress in diabetic neuropathy, *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9 (2015) 373-378.
- [58] H. Xicoy, B. Wieringa, G.J. Martens, The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review, *Molecular neurodegeneration*, 12 (2017) 1-11.
- [59] A. Akinrinde, T. Koekemoer, M. Van De Venter, G. Bradley, In vitro investigation of potential anti-diabetic activity of the corm extract of *Hypoxis argentea* Harv. Ex Baker, *Acta Pharmaceutica*, 68 (2018) 389-407.
- [60] E. Karacaoğlu, G. Selmanoğlu, T-2 toxin induces cytotoxicity and disrupts tight junction barrier in SerW3 cells, *Environmental toxicology and pharmacology*, 56 (2017) 259-267.
- [61] C. Li, Y. Wang, H. Zhang, M. Li, Z. Zhu, Y. Xue, An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized gold nanoparticles using *Cardiospermum halicacabum* on AGS gastric carcinoma cells, *International journal of nanomedicine*, 14 (2019) 951.
- [62] S.J. Cho, K.A. Kang, M.J. Piao, Y.S. Ryu, P.D.S.M. Fernando, A.X. Zhen, Y.J. Hyun, M.J. Ahn, H.K. Kang, J.W. Hyun, 7, 8-dihydroxyflavone protects high glucose-damaged neuronal cells against oxidative stress, *Biomolecules & therapeutics*, 27 (2019) 85.
- [63] Y. Alhindi, L.M. Vaanholt, M. Al-Tarrach, S.R. Gray, J.R. Speakman, C. Hambly, B.S. Alanazi, B.M. Gabriel, A. Lionikas, A. Ratkevicius, Low citrate synthase activity is associated with glucose intolerance and lipotoxicity, *Journal of nutrition and metabolism*, 2019 (2019).
- [64] Weblet Importer, (accessed June 13, 2021).

- [65] B.E. Harcourt, S.A. Penfold, J.M. Forbes, Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation, *Nature Reviews Endocrinology*, 9 (2013) 113-123.
- [66] S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King, Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes care*, 27 (2004) 1047-1053.
- [67] C. Mogensen, C. Christensen, E. Vittinghus, The stages in diabetic renal disease: with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy, *Diabetes*, 32 (1983) 64-78.
- [68] N. Chilelli, S. Burlina, A. Lapolla, AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a “glycoxidation-centric” point of view, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23 (2013) 913-919.
- [69] E.L. Feldman, B.C. Callaghan, R. Pop-Busui, D.W. Zochodne, D.E. Wright, D.L. Bennett, V. Bril, J.W. Russell, V. Viswanathan, Diabetic neuropathy, *Nature Reviews Disease Primers*, 5 (2019) 1-18.
- [70] Z. Bahadoran, P. Mirmiran, F. Azizi, Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review, *Journal of diabetes & metabolic disorders*, 12 (2013) 1-9.
- [71] K. Johnston, P. Sharp, M. Clifford, L. Morgan, Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells, *FEBS letters*, 579 (2005) 1653-1657.
- [72] Y. Ding, X. Dai, Z. Zhang, Y. Jiang, X. Ma, X. Cai, Y. Li, Proanthocyanidins protect against early diabetic peripheral neuropathy by modulating endoplasmic reticulum stress, *The Journal of nutritional biochemistry*, 25 (2014) 765-772.
- [73] S.R. Lee, K.J. Im, S.I. Suh, J.G. Jung, Protective effect of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates, *Phytotherapy Research*, 17 (2003) 206-209.
- [74] C. Li, H. Schluesener, Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin, *Critical reviews in food science and nutrition*, 57 (2017) 613-631.
- [75] C.L. Millar, Q. Duclos, C.N. Blesso, Effects of dietary flavonoids on reverse cholesterol transport, HDL metabolism, and HDL function, *Advances in Nutrition*, 8 (2017) 226-239.
- [76] S. Afrazi, S. Esmaeili-Mahani, V. Sheibani, M. Abbasnejad, Neurosteroid allopregnanolone attenuates high glucose-induced apoptosis and prevents experimental diabetic neuropathic pain: in vitro and in vivo studies, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 139 (2014) 98-103.
- [77] A. Kaeidi, S. Esmaeili-Mahani, V. Sheibani, M. Abbasnejad, B. Rasouljan, Z. Hajjalizadeh, S. Afrazi, Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic

neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: in vitro and in vivo studies, *Journal of ethnopharmacology*, 136 (2011) 188-196.

[78] L. Peng, B. Wang, P. Ren, Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45 (2005) 108-111.

[79] L. Ciarlo, F. Marzoli, P. Minosi, P. Matarrese, S. Pieretti, Ammonium Glycyrrhizinate Prevents Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction Induced by High Glucose in SH-SY5Y Cell Line and Counteracts Neuropathic Pain in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice, *Biomedicines*, 9 (2021) 608.

[80] H.-J. Kim, J.Y. Song, H.J. Park, H.-K. Park, D.H. Yun, J.-H. Chung, Naringin protects against rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 13 (2009) 281.

[81] U. Fuhr, A.L. Kummert, The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions?, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 58 (1995) 365-373.

[82] R. Watanabe, T. Kurose, Y. Morishige, K. Fujimori, Protective effects of fisetin against 6-OHDA-induced apoptosis by activation of PI3K-Akt signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Neurochemical research*, 43 (2018) 488-499.

[83] S. Saberi Firouzi, N. Namazi Sarvestani, A. Bakhtiarian, M. Ghazi Khansari, M.Y. Karimi, A. Ranjbar, M. Safa, A. Hosseini, Sildenafil protective effects on high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells: the role of oxidative stress, apoptosis, and inflammation pathways in an in vitro cellular model for diabetic neuropathy, *Neurological research*, 40 (2018) 624-636.

[84] M.R. de Oliveira, A. Peres, C.S. Gama, S.M. Dal Bosco, Pinocembrin provides mitochondrial protection by the activation of the Erk1/2-Nrf2 signaling pathway in SH-SY5Y neuroblastoma cells exposed to paraquat, *Molecular neurobiology*, 54 (2017) 6018-6031.

[85] Y.-H. Wang, H.-T. Yu, X.-P. Pu, G.-H. Du, Myricitrin alleviates methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction and AGEs/RAGE/NF- κ B pathway activation in SH-SY5Y cells, *Journal of Molecular Neuroscience*, 53 (2014) 562-570.

[86] D. Barreca, M. Currò, E. Bellocco, S. Ficarra, G. Laganà, E. Tellone, M. Laura Giunta, G. Visalli, D. Caccamo, A. Galtieri, Neuroprotective effects of phloretin and its glycosylated derivative on rotenone-induced toxicity in human SH-SY5Y neuronal-like cells, *BioFactors*, 43 (2017) 549-557.

[87] E. Darendelioglu, Neuroprotective effects of chrysin on diclofenac-induced apoptosis in SH-SY5Y cells, *Neurochemical research*, (2020) 1-8.