

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



**DIYABETİK NÖROPATİNİN İN VİTRO MODELİNDE**  
**FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ 21'İN**  
**HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE**  
**ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**SEVAL ÜLKÜ ORHAN**  
**2023**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Doç. Dr. Suat TEKİN

Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU



## ETİK BEYAN

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

Seval Ülkü ORHAN

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Biyofizik Anabilim Dalı

ELAZIĞ

## İTHAF

Bu tezi, bana en güzel duyguyu; anneliği yaşatan canım kızım Zeynep Asya  
ORHAN'a ithaf ediyorum.



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, bilimsel ve akademik tecrübesiyle her zaman yol gösteren, her konuda desteğini ve yardımını esirgemeyen, beraber çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum, Saygıdeğer Hocam; Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mete ÖZCAN'a çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim de her türlü akademik bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU'na, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR, Prof. Dr. Sinan CANPOLAT, Doç. Dr. Emine KAÇAR'a teşekkürü borç bilirim.

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım beraber mesai harcadığım değerli ekip arkadaşlarım, Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Ferah BULUT'a ve Mehmet ADAM'a teşekkür ederim.

Çalışmaların bir kısmını gerçekleştirdiğimiz İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'na, Doç. Dr. Suat TEKİN'e, Güldeniz ŞEKERCİ'ye, Tuba KESKİN'e teşekkür ederim.

Bu sürece beraber başladığım yol arkadaşım, sevgili eşim Tayfun'a yüksek lisans çalışmalarım boyunca sonsuz destek ve motivasyon sağladığı, sevgi ve anlayışıyla süreci kolaylaştırdığı için sonsuz şükranlarımı sunarım. Her ihtiyacım olduğunda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen değerli aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yüksek lisans tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde TF.23.03. numaralı proje ile maddi destek sağlayan FÜBAB'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b> .....	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b> .....	<b>ii</b>
<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>İTHAF</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>3. GİRİŞ</b> .....	<b>5</b>
3.1. Diyabetik Nöropati .....	<b>6</b>
3.1.1. Diyabetik Nöropatinin Patofizyolojisi .....	<b>7</b>
3.2. Dorsal Kök Gangliyon Nöronlarının Yapısı ve İşlevleri .....	<b>11</b>
3.2.1. Terapötik Bir Hedef Olarak Dorsal Kök Gangliyonu .....	<b>12</b>
3.3. Fibroblast Büyüme Faktörü Ailesinin Bir Üyesi Olarak FGF21 .....	<b>13</b>
3.3.1. FGF21'in Metabolik Etkileri .....	<b>14</b>
3.3.2. FGF21'in Obezite ve Diyabet Üzerine Etkileri .....	<b>15</b>
3.4. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi.....	<b>16</b>
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>17</b>
4.1. Dorsal Kök Gangliyon Primer Hücre Kültürü .....	<b>17</b>
4.1.1. Dorsal Kök Gangliyon Primer Hücre Kültürü Hazırlanma Protokolü .....	<b>18</b>
4.1.2. Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinde <i>in vitro</i> Diyabet Modeli Oluşturma .....	<b>20</b>
4.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve MTT Analizi .....	<b>20</b>
4.2.1. Hücre Canlılık Analizi .....	<b>21</b>
4.3. İstatistiksel Analizler .....	<b>26</b>
<b>5. BULGULAR</b> .....	<b>27</b>
5.1. FGF21'in DKG Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi .....	<b>27</b>
5.2. EC50 Dozunun Belirlenmesi .....	<b>29</b>

5.3. FGF21'in Hücre Canlılığına Yolak Üzerinden Etkisi.....	29
<b>6. TARTIŞMA.....</b>	<b>31</b>
<b>7. KAYNAKÇA.....</b>	<b>34</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>40</b>



## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Sinir hücre kültür vasatı bileşimi .....	18
--	----



## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	Diyabetik nöropati gelişiminde olası mekanizmalar şematik diyagramı... 10
<b>Şekil 2.</b>	FGF21'in organlar arası iletişimi ve farmakolojik etkilerini gösteren diyagram ..... 14
<b>Şekil 3.</b>	Dorsal kök gangliyonu primer hücre kültürü hazırlanması akış diyagramı ..... 19
<b>Şekil 4.</b>	FGF21'in farklı dozlarının ..... 22
<b>Şekil 5.</b>	FGF21'in DKG hücre canlılığı üzerine olan etkisini hangi hücre yolak aracılığıyla gerçekleştirdiğinin MTT analizi ile incelemek için grupların plate üzerindeki yerleşim şekli. .... 24
<b>Şekil 6.</b>	In vitro diyabetik nöropati modeli oluşturulan DKG nöronlarının hücre canlılığının değerlendirilmesindeki akış diyagramı ..... 25
<b>Şekil 7.</b>	FGF21'in sağlıklı DKG hücrelerinde, hücre canlılığı üzerine doz bağımlı etkisi . .... 27
<b>Şekil 8.</b>	FGF21'in Diyabetik nöropatinin in vitro modelinde DKG hücre canlılığı üzerine doz bağımlı etkisi, ..... 28
<b>Şekil 9.</b>	Hücre canlılığı üzerine log(doz)-yanıt ilişkisi ..... 29
<b>Şekil 10.</b>	FGF21'in, AKT/PI3K yolağı yoluyla DKG hücre canlılığına etkisi. .... 30

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AKT:</b>	Aktive Olmuş Kinaz
<b>BAT:</b>	Kahverengi Yağ Dokusu
<b>DM:</b>	Diabetes Mellitus
<b>DKG:</b>	Dorsal Kök Gangliyonu
<b>ERK:</b>	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenmiş Kinaz
<b>FGF21:</b>	Fibroblast Büyüme Faktörü 21
<b>MAPK:</b>	Mitojenle Aktive Olmuş Kinaz
<b>MSS:</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>MTT:</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
<b>NAFLD:</b>	Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı
<b>NGF:</b>	Sinir Büyütme Faktörü
<b>NO:</b>	Nitrik Oksit
<b>NRF-2:</b>	Nükleer Transkripsiyon Faktörü Eritroid 2 İle İlişkili Faktör 2
<b>PBS:</b>	Fosfat Tamponlu Salin
<b>PI3K:</b>	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
<b>ROS:</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>TG:</b>	Trigliserit
<b>UV:</b>	Ultraviöle
<b>WAT:</b>	Beyaz Yağ Dokusu
<b>YG:</b>	Yüksek Glikoz

## 1. ÖZET

Diyabet, prevalansı son yıllarda giderek artan en büyük sağlık sorunlarından biridir. Diyabetli hastalarda, yaygın ve uzun süre devam eden en önemli komplikasyonlardan biri de nöropatik ağrıdır. Nöropatik ağrının etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, merkezi veya periferik sinir sisteminin patolojisinin neden olduğu ağrıyı ifade eder. Fibroblast Büyüme Faktörü-21 (FGF21) karaciğer, yağ dokusu ve pankreasta eksprese edilen ve açlıktan ölme stresi veya bazı patolojik durumlar tarafından indüklenen endojenik bir hormondur. FGF21'in hipoglisemik, anti-inflamatuar ve anti-oksidatif aktiviteler gibi birçok fizyolojik fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir. Ancak FGF21'in, diyabette meydana gelen nöropatik ağrı mekanizmasında potansiyel bir rolü olup olmadığı bilinmemektedir. Periferden santrale ağrı iletiminden sorumlu olan dorsal kök gangliyonları (DKG) nöronlarının uzun süreli yüksek glikoza (YG) maruz bırakılması diyabetik nöropatinin *in vitro* modeli olarak kabul edilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, diyabetik nöropatinin *in vitro* modelinde FGF21'in hücre canlılığı üzerindeki etkileri belirlemektir.

Bu çalışmada 1-2 günlük Spraque Dawley ırkı sıçan (n=10, cinsiyet ayrımı olmaksızın) kullanılmıştır. Bu sıçanların DKG çıkarılmasını takiben enzimsel ve mekanik tritürasyona tabi tutulup izole hücreler elde edilmiştir. FGF-21'in (12.5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL ve 100 ng/mL) farklı konsantrasyonları YG (45mM) ile birlikte DKG nöronlarına 24 saat uygulanarak hücre canlılığı üzerine etkisi tespit edilmiştir. FGF-21'in hücre canlılığı üzerine olası etkisinin hangi hücresel yolak üzerinden olduğunun belirlenmesi çalışmanın devamında planlanmış ve hücre canlılığı tespitinde 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) analizi kullanılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada diyabetik nöropati modelinde ilk kez FGF21'in hücre sağ kalımı üzerinde nöroprotektif bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Böylece diyabetik nöropati için terapötik bir ajan olarak yeni yaklaşımların ortaya çıkarılması açısından basamak teşkil edecek yeni veriler elde edilmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca FGF21'in hücre canlılığını etkilediği mekanizmaların aydınlatılması ve deneylerin *in vivo* olarak desteklenmesi diyabetik nöropati için hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Fibroblast Büyüme Faktörü-21, *İn Vitro* Model, Diyabetik Nöropati, Dorsal Kök Gangliyonu,

## **2. ABSTRACT**

### **IN VITRO MODEL OF DIABETIC NEUROPATHY FIBROBLAST GROWTH FACTOR 21 ON CELL VITALITY INVESTIGATION OF ITS EFFECT**

Diabetes is one of the major health problems whose prevalence has increased in recent years. One of the most common and long-lasting complications in diabetics is neuropathic pain. Although the etiology of neuropathic pain is not well understood, it is pain caused by pathology of the central or peripheral nervous system. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is an endogenous hormone expressed in the liver, adipose tissue, and pancreas and is induced by starvation stress or certain pathological conditions. FGF21 is known to have many physiological functions, such as hypoglycemic, anti-inflammatory, and antioxidant activities. However, it is not known whether FGF21 has a potential role in the mechanism of neuropathic pain in diabetes. Prolonged exposure of spinal ganglia neurons (DKG), which are responsible for peripheral to central pain transmission, to high glucose (ROI) is recognized as an in vitro model of diabetic neuropathy. The aim of this study is to investigate the effects of FGF21 on cell viability in an in vitro model of diabetic neuropathy.

For this study, 1-2-day-old Spraque Dawley rats (n=10, without sex differentiation) were used. After removal of DKG, these rats were subjected to enzymatic and mechanical titration, and isolated cells were obtained. The effect on cell viability was determined by administering different concentrations of FGF-21 (12.5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, and 100 ng/mL) together with YG (45mM) to DKG neurons for 24 hours. Determination of the cellular pathway through which the possible effect of FGF-21 on cell viability was planned, and 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to determine cell viability.

In conclusion, this study demonstrated for the first time that FGF21 has a neuroprotective effect on cell survival in a diabetic neuropathy model. This provided new data, which is a step towards new approaches for the treatment of diabetic neuropathy. In addition, elucidation of the mechanisms by which FGF21 influences cell survival will.

**Key Words:** Fibroblast Growth Factor 21, *In Vitro* Model, Diabetic Neuropathy, Dorsal Root Ganglion



### 3. GİRİŞ

Latince “diabetes” idrara geçen ve “mellis” tatlı ya da bal anlamına gelen kelimelerden oluşan Diabetes mellitus (DM) kalıtsal ve çevresel etmenlerin birleşmesiyle meydana gelir ve genellikle diyabet şeklinde kullanılır (1). Diyabet; insülin eksikliği, insülinin kullanılamaması veya her ikisinden kaynaklı sorunlar nedeniyle hedef dokuların karbonhidrat, yağ ve proteinden yeterince yararlanamadığı, sürekli tıbbi bakım gerektiren, kronik bir metabolizma hastalığıdır (2). Kanda glikoz metabolizması, insülin ve glukagon salınımı yoluyla hareket eden negatif bir geri beslenme mekanizmasıyla düzenlenir. İnsülin bilinen en güçlü anabolik hormondur ve dokunun gelişimi, büyümesi ve tüm vücut glikoz homeostazının sürdürülmesi için gereklidir. Bu hormon yemekten sonra dolaşımdaki artan glikoz ve amino asit seviyelerine yanıt olarak pankreasın Langerhans adacıklarının  $\beta$  hücreleri tarafından salgılanır. İnsülin, fazla olan glikozu glikojene çevirip depolamak için karaciğere sinyal gönderir. Aynı zamanda iskelet kası ve yağ hücrelerini de glikoz taşıyıcısı aracılığıyla daha fazla glikoz almaları için uyarır. Bu mekanizma dolaşımdaki glikoz konsantrasyonlarını normal seviyelere getirir. Glukagon ise kandaki azalan glikoz seviyelerine yanıt olarak pankreasın  $\alpha$  hücreleri tarafından salgılanır. Bu hormon karaciğerde depolanmış olan glikojeni kana salınan glikoza dönüştürmek için sinyal verir ve bu sayede homeostazi sağlar (3). Vücutta bu dengenin bozulması, yetersiz insülin veya insüline direnç, hücre içi (hipoglisemi) ve hücre dışı glikozun azalması ile sonuçlanır.

Diyabet, uzun süreli ve metabolik bir hastalık olduğundan mikrovasküler ve makrovasküler birçok komplikasyona neden olur. Bununla birlikte morbidite ve erken ölüm riskini arttırır, bakım ve maliyeti yükseltir. Dünyada gün geçtikçe artan diyabetli hasta sayısı ülkeden ülkeye farklılık göstermekle birlikte bireyi olumsuz etkilemekte ve

hayat kalitesini düşürmektedir (4). Diyabet sonucu meydana gelen komplikasyonları akut ve kronik dönem olarak ayırmak mümkündür. Akut komplikasyonlar, mortalite ile ilişkili olup hipoglisemi, diyabetik ketoasidoz ve hiperglisemik hiperozmolar koma olarak belirtilmektedir. Diyabet kronik dönemde de hastalarda makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlara neden olup morbidite ve mortalite riskinin artmasıyla ilişkilidir (5). Kronik hiperglisemi de artan glikoz seviyeleri sebebiyle ilk olarak vasküler hücreler, Schwann hücreleri ve glikoz alımını düzenleme kapasitesi sınırlı olan periferik ve merkezi sinir sistemi (MSS) hücrelerini etkileyerek mikrovasküler komplikasyonlara yol açar. Bunlar retinopati, nefropati, nöropati olarak bilinmektedir (6). Bu tez çalışmasında bu komplikasyonlardan, araştırma konumuz olan diyabetik nöropatiyi daha detaylı açıklayacağız.

### **3.1. Diyabetik Nöropati**

Nöropati, diyabette karşılaşılan en önemli kronik komplikasyonlardan biridir. Diyabetik nöropatinin önemi son yıllarda daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Diyabetik nöropatiyle ilgili ilk bilgiler 19. yüzyılın başlarında tıp literatüründe yer almış ve 1984'te Marchal de Calvi periferik sinir sistemindeki bazı değişikliklerin diyabet sonucunda meydana geldiğini ileri sürmüştür (7). Diyabetik nöropati, alt ekstremitelerde distal olarak başlayan, aynı zamanda ağrı ve ciddi morbidite ile karakterize duysal fonksiyon kaybıdır. Diyabetik nöropatili hastaların yaklaşık üçte biri aralıklı veya sürekli parestezi ve ağrı bildirmektedir (8). Uzun süre kötü kontrol edilen kan glikoz seviyelerine sahip bireylerin en az %50'sinde zamanla diyabetik nöropati gelişebilir (9). Diyabetik nöropatinin karmaşıklığına ilişkin altta yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte patogenezinde bazı teoriler aşağıda açıklanmıştır.

### 3.1.1. Diyabetik Nöropatinin Patofizyolojisi

Diyabetik nöropati, çeşitli klinik belirtileri olan ve istenmeyen bir durumdur. Patogenezi ile ilgili birçok teori bulunmaktadır: bunlar periferik sinirleri besleyen damarlarda oluşan yapısal ve fizyolojik bozukluklar, glial hücrelerin aktivasyonu, sodyum ve kalsiyum kanal aktivasyonundaki bozukluklar, ağrı duyusunun taşınmasında görev yapan inen çıkan yollardaki bozukluklar ve artmış talamik vaskülerite olarak sıralanabilmektedir (10). Diyabet oluşumu, komplikasyonlarının ortaya çıkması ve patofizyolojik süreçleri büyük oranda ortaya konulmasına rağmen her hastada ağrı oluşup oluşmaması açıklanamamıştır (11).

Periferik sinirlerde glikozun hücrelere alımı insülinle bağımsız olarak gerçekleşir. Bu nedenle glikozun sinir hücrelerine alımı kan glikoz konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır (12). Polyol yolağının hızını sınırlayan enzim Schwann hücrelerinde eksprese edilen aldoz redüktaz enzimidir (13). Glikoz; sorbitole, aldoz redüktaz enzimiyle çevrilir, fruktoza ise sorbitol dehidrogenaz enzimi ile çevrilir. Fruktoz ve sorbitol sinir hücresinde birikme eğiliminde olup sinir hücre membranından göreceli olarak geçerler. Her ikisi de ozmotik aktiviteye sahip bileşiklerdir ve sinir hücresinin su içeriğinin artmasına öncülük ederler (14). Hücrelerde oksidasyon/redüksiyon dengesi, indirgenmiş NADPH'nin kaybı ve glutatyon depolarının boşalması ile değişmektedir. Bu değişimin meydana gelmesi durumunda membran  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz aktivitesinin azalmasına, sinir iletim hızının azalmasına, sinirin yapısal olarak bozulmasına ve intra aksonal sodyum birikmesi gerçekleşir. Hücrelerde miyoinositolün seviyeleri azalır sebebi ise artan glikoz ve sorbitol seviyeleri, miyoinositolün doku ve hücrelere alımı için rekabete girmiş olmasından kaynaklanmaktadır (15). Artmış glikoz ve sorbitol seviyeleri de nitrik oksit sentaz için kofaktör olan NADPH azalmasına ve vazodilatasyonun artmasını sağlayan

nitrik oksit (NO) oluşumunu azalmasına neden olur bu durum da sinirlerin kan desteğinin bozulmasına sebep olur (15, 16). Nöropati gelişimini hücrel stresle sınırlandırmak bütün patofizyolojik süreci açıklamada yetersiz kalabilmektedir. Bozulmuş olan vaskülerite ile DNA'yı ilişkilendirmek mümkündür. Mikrovasküleritenin bozulmasının sonucu olarak periferik ve santral perfüzyon işlevi bozulmakta veya ortadan kalkmaktadır (17). Nöral iskemi, sinirleri besleyen damarların bazal laminalarında kalınlaşma ve hiyalinizasyon sonucu oluşmaktadır (18). Damar yapısındaki bu değişiklikler, kapiller membran plazma protein uzantılarının endonöryuma doğru hareketine neden olarak, şişkinliğe neden olmakta ve bölgede biriken interstisyel sıvı sinirlerdeki basıncı artırmaktadır. Artan bu basınca artmış kapiller basınç eşlik eder ve ilgili bölgede trombus ve fibrin gelişimini baskılamaktadır. Hiperglisemi, duyu sinirlerinde elektriksel stabilitenin değişmesine hipoksiyi tetikleyerek de neden olabilmektedir (19). Sinir iskemisinin bir sonucu olarak hem diyabetik hastalarda hem de deney hayvanlarında özellikle proksimal ve distal segmentlerde sinir kaybı oluşmakta, buna bağlı olarak intraepidal sinir yoğunluğunda azalma gözlenmektedir (20).

Araştırmalar sonucu her ne kadar artan oksidatif stres, antioksidanları aktivasyonunun azalması, mikrovaskülerite bozukluğu, oksijenizasyonda azalma ve prostoglandin metabolizmasındaki değişiklikler periferik sinir fizyolojisini bozsa da tüm bu süreçler ilgili sinir ya da sinirlerin moleküler ve hücrel yapısındaki değişim ile de karakterize olabilmektedir (21). Zamanla beslenemeyen ve hasarlanan sinir sonlarında değişikliklerin meydana gelmesi kaçınılmaz bir durumdur. Bu moleküler ve hücrel değişimlerin de spontan ağrıya neden olduğu düşünülmektedir (22, 23). En yaygın kabul edilen hipoteze göre hasarlı sinir sonlanmalarının ürettiği aksiyon potansiyelleri MSS tarafından ağrı olarak algılanmaya başlamasıdır (24). Sinir hasarı sonucu periferik

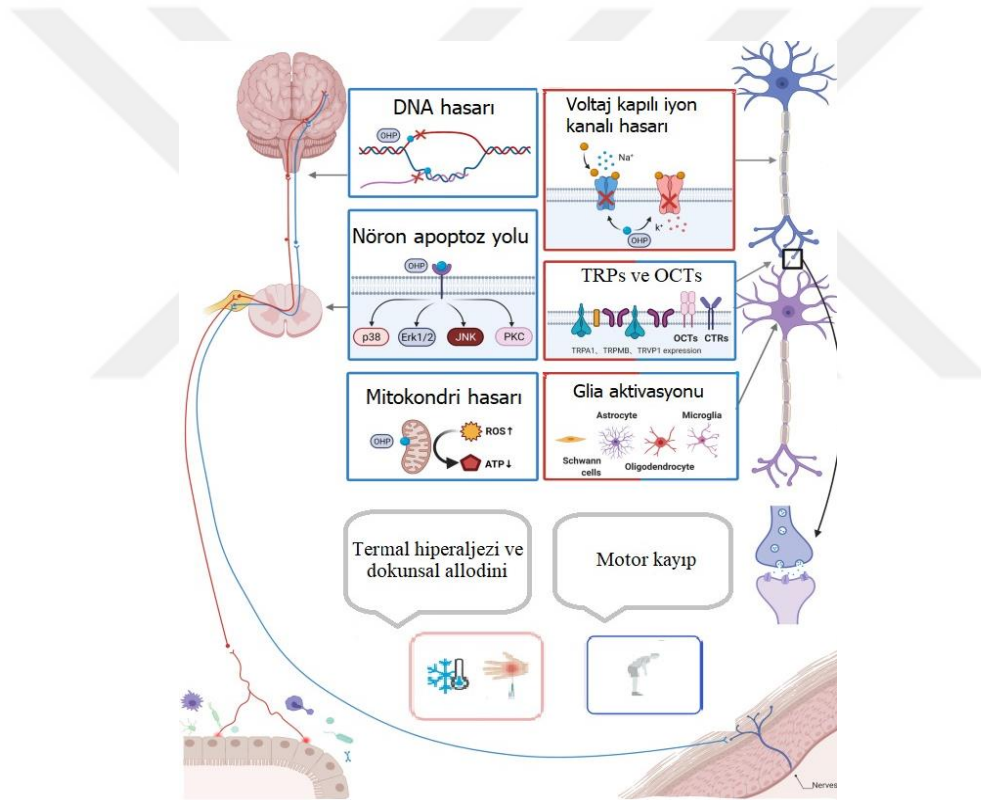
sinirlerde iyon kanalı ekspresyonundaki değişimler ilgili sinirde hipereksitabiliteye neden olmakta ve bu da nöropatik ağrı olarak görölmektedir (25). Nöropatik ağrı gelişimi sırasında voltaj kapılı sodyum kanallarının sayısında ve aktivasyonunda artış olduğu bulunmuş ve DKG özellikle küçük çaplı nöronlarda ortaya çıkan bu değişmiş sodyum akımı, nosiseptif transmisyonu polimodal C liflerinin duysal enformasyon aktarımında artışı ile açıklanmıştır (26, 27).

Sodyum kanallarının sinir boyunca dağılımındaki bu değişim, sinirlerde artmış uyarılmalara bu da ilgili sinir grubunda aksiyon potansiyeli üretimine neden olmaktadır. Artan bu aksiyon potansiyeli frekansı da MSS'de ağrı duyusunun algılanmasında artışa neden olmaktadır (27).

İyon akımındaki bu değişiklikler sadece sodyum kanal değişimi ve buna bağlı sodyum akımındaki değişiklikler ile sınırlı değildir. Kalsiyum kanal ekspresyonunda da bazı değişiklikler görölmekte bunların başında bozulan kalsiyum akımı ile duysal nöronlarda artmış kalsiyum girişi ve P maddesi ile glutamat salınımında artış olabilmektedir (28-30). Hücre dinlenim membran potansiyelini dengeleyen potasyum iyon akımı da değişerek nöronal hipereksitabiliteye sebep olabilmektedir (31). DKG ve spinal kord hasarlanmasında, nöronların beslenmesini ve miyelin kılıf oluşumunu sağlayan glial hücrelerde de yapısal bozukluklar ve anormal çoğalmalar olduğu bilinmektedir (32).

Periferik sinir hasarı sonucu mikroglialardaki artış ile beraber sitokinler, interlökinler, kemokinler, nitrik oksit ve serbest radikallerde artışa sebep olmaktadır (33, 34). Nörotransmitterlerin sinaptik aralıktan uzaklaştırılmasında rol alan bu hücreler, periferik hasar sonucu bu işlevlerini yerine getiremeyerek ağrı duyusunda rol alan nörotransmitterlerin duyarlılaşmasına engel olamamaktadır (35).

Periferel dokulardaki bu patolojik değişikliklerin yanı sıra nöropatik ağrı gelişimi sonrası MSS’de patolojik süreçlere sebep olmaktadır. Bunlardan en belirgin olanı glutamat ve NMDA reseptör salınımında artış olup bu artış santral sensitizasyonu artırmaktadır (36). Başka bir etki ise GABA-B reseptöründeki azalmadır (37). GABA’nın azalması, glutamat etkinliğinin ve kalsiyum akımının artmasına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda eksitator nörotransmitterlerin aktivitesinde de bir artış meydana gelerek ağrı duyusunun MSS tarafından daha fazla algılanmasına neden olmaktadır (38). Yukarıda bahsedilen birkaç mekanizma aşağıda (şekil 1.) gösterilmiştir.



**Şekil 1.** Diyabetik nöropati gelişiminde olası mekanizmalar şematik diyagramı

(39) Kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

### 3.2. Dorsal Kök Gangliyon Nöronlarının Yapısı ve İşlevleri

DKG, ağrı iletimi dahil duyuusal iletim ve modülasyonda kritik bir yapıdır (40). İnsanlarda DKG nöronları yaklaşık 20-150 µm arasında değişen çaplara sahip büyük yuvarlak hücrelerdir (41). Nörofilament yoğunluğunun histolojik boyamasına göre “büyük-hafif” nöronlar (genellikle zararlı olmayan bilgileri ileten A nöronları) veya “küçük-karanlık” nöronlar (genellikle C nöronları, acı verici sinyaller) olarak kategorize edilebilir (42). Her vertebra seviyesinde nöral foramenlerin yakınında bulunurlar. Heterojen yapıya sahip olup, hücrelerin yalnızca %15’ini temsil eden nöronlarla birçok hücre tipini içerir (43). Bu nöronların gövdeleri Schwann hücreleri ve satellit glial hücreler tarafından çevrilidir. Distal aksonları birincil afferent duyu sinirlerini oluştururken, proksimal aksonlar dorsal omurilik kökleri yoluyla dorsal boynuz hücreleri üzerinde sinaps yapar (44). Satellit glial hücrelerinin görevi DKG nöronları arasında fiziksel bir bariyer oluşturmaktır. Ayrıca satellit glialar kimyasal uyarılara yanıt vermede ve çeşitli kemokin, sitokin ve nörotransmitterler için reseptör aracılığıyla glial-glial ve nöron-glial etkileşimlere aracılık etmede kritik öneme sahiptir (45). Ayrıca merkezi ve periferik sinir sistemlerini koruyan kan-beyin bariyeri DKG nöronlarında bulunmaz bu nedenle dolaşımdaki kemokinler ve lökositlerden sızmaya karşı hassas olup nöronal hipereksitabilitenin inflamatuvar mekanizmalarını oluşmasını destekler (46). DKG, dokunma ve propriyosepsiyondan, enflamatuvar ve somatik ağrıya kadar değişen periferik duyuusal sinyallerin MSS’ne geçiş yeridir (47).

### 3.2.1. Terapötik Bir Hedef Olarak Dorsal Kök Gangliyonu

Kronik ağrıya geçişin altında yatan çok sayıda hücresel, moleküler, genetik ve epigenetik değişiklikler göz önüne alındığında, DKG'yi hedefleyen çok çeşitli terapötik modalitelerin oluşturulmuş olması şaşırtıcı değildir. Bu meydana gelen değişikliklerin çoğunun projeksiyon aksonlarında değil de gövdesinde meydana gelmesi DKG'yi tedavide potansiyel bölge yapmaktadır. Özellikle nöropatik ağrının patogenezinde, sinir hasarının oluşmasında hücre ölümünden ziyade periferik nöronal hayatta kalma ile ilişkili hastalıklarda önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Anatomik olarak kolayca erişilebilir olduğu için DKG, gelişmekte olan nöromodülatör tedaviler için çekici bir hedeftir (47). FGF21, diyabette insülin direncini düşürdüğü ve glikoz artışını bastırdığı (48), inflamasyonu ve oksidan stresi baskılayarak sinir hasarını hafiflettiği (49) bilinmektedir. Dolayısıyla nöropatik ağrı sonucu etkilenen DKG üzerinde de terapötik bir hedef olabilir.

Çalışmada kullanılacak *in vitro* model, diyabetik nöropatinin patogenezinde moleküllerin yapısını ve etkileşimini incelemek için objektif ve kullanışlı olduğu için daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca mekanik sorulara cevap bulunmasına ve mekanizmaların incelenmesine olanak sağlar. *In vitro* model, hiperglisemik deneyler için diyabetik hastalarda genellikle ölçülen glikoz seviyelerine uyacak şekilde 45 Mm glikoz içeren yüksek glikoz (YG) ortamı kullanılır. DKG nöronlarının 24 saat YG'ye (45 mmol/L) maruz kalması Diyabetik nöropati'nin *in vitro* modeli olarak kabul edilmektedir (50, 51).

### 3.3. Fibroblast Büyüme Faktörü Ailesinin Bir Üyesi Olarak FGF21

FGF21, 22 üyeden oluşan FGF ailesinin endokrin grubuna girmekte ve hastalıkların risk faktörleri ve belirteçlerinde kullanılmaktadır. FGF21 hormonu 2000 yılında Nishimura T. ve ark tarafından tanımlanan ve 19. kromozomda kodlanan 209 aminoasitlik olgun bir proteinden türevlenerek dolaşıma verilen 181 aminoasitlik (yaklaşık 20 kDa) bir proteindir. FGF ailesinin yeni bir üyesi olan FGF21, lipid metabolizması ve endojen glikoz düzenleyicisidir. Esas olarak karaciğerde üretilmekle birlikte iskelet kası, yağ dokusu, plasenta ve pankreasta da üretilir (52) (Şekil 2.). FGF21; geleneksel bir tirozin kinaz FGF reseptörü 1 (FGFR1) ve  $\beta$ -klotho isimli ko-reseptör proteininden oluşan bir hücre yüzey kompleksi üzerinde çalışır. FGFR1 sinyal aktivasyonu için bu proteinlerin her ikisine de doğrudan bağlanır (53). FGF21 sinyalleşmesi için hem FGFR1 hem de  $\beta$ -klotho gereklidir. Adiposit dokularda  $\beta$ -klotho'nun yıkılması FGF21 kaynaklı sinyalleşmeyi ve eylemleri azaltırken, tüm vücutta bu molekülün yıkılması FGF21'in büyüme ve metabolizma üzerindeki etkisini kaybetmektedir. FGF21'in FGFR1 ve  $\beta$ -klotho'ya bağlanmasıyla monomerik olan FGFR1 molekülü dimerize olmakta ve FGFR substrat 2'deki (FRS2) kalıntıların otofosforilasyonunu ve fosforilasyonunu sağlamaktadır. Fosforile olan FRS2 kenetleme proteini görevini üstlenir ve GRB2/SOS proteinleri ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleks hücre dışı sinyal düzenlenmiş (ERK) ve aktive olmuş kinaz (AKT) sinyal yollarını aktive etmekte ve gelişmiş glikoz alımına yol açmaktadır (54).  $\beta$ -klotho, karaciğerde, beyaz(WAT) ve kahverengi(BAT) yağ dokularında, pankreasta ve MSS'de bulunmaktadır (55).



metabolik fayda sağlar (63-65). Serum TG'yi düşürerek karaciğeri alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) gelişiminden koruyan hepatik lipid birikimini önler (66).

### 3.3.2. FGF21'in Obezite ve Diyabet Üzerine Etkileri

FGF21, çok sayıda prelinik çalışmada gözlemlenen tekrarlanabilir şekilde obezite ve tip 2 diyabette güçlü yararlı etkilere sahiptir. Örneğin, diyabetli farelere ekzojen FGF21 verilmesi; kan glikoz ve lipitlerinde azalma, insülin duyarlılığında iyileşme, enerji harcamasında ve yağ kullanımında artma ile sonuçlanmıştır (67). Yine benzer bir çalışma da insülin ve FGF21 ile tedavi edilen farelerde, adipositlerde GLUT 4 ve GLUT 1 aktivasyonu ile glikoz düzeyini azaltan sinerjistik bir etki oluşturduğu bulunmuştur (68). Leptin eksikliği olan obez farelere tek bir FGF21 enjeksiyonu, tedaviden sonraki 1 saat içinde hem kan glikozunda hem de plazma insülin seviyelerinde % 40-60 düşüşe yol açtığı ve buna hepatik glikoz üretiminin akut baskılanması ve periferik glikoz döngüsünde bir artışın eşlik ettiği bulunmuştur (69). FGF21'in diyetle bağlı ve genetik obezite fare modellerinde kronik olarak uygulanması, vücut ağırlığı ve yağ kütesinde sürekli azalmalara ayrıca insülin duyarlılığında, glisemik kontrolde ve lipidlerde (TG'de, toplam LDL ve kolesterolde ) düşüşe neden olduğu bulunmuştur (70-72). Yapılan başka çalışmalarda FGF21'in hiperglisemi, dislipidemi ve obeziteyi iyileştirmedeki önemli farmakolojik etkileri, diyabetik maymun modellerinde tutarlı bir şekilde tekrarlanmıştır (73-75). Yapılan başka bir çalışmada, uzun süreli yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelerde, adipoz dokularda belirgin şekilde azalmış FGFR1 ve  $\beta$ -klotho ekspresyonu görülmüş ve bunun egzersizin metabolik faydalarına karşı bir direnç meydana getirdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada yapılan kronik koşu bandı egzersizi, obezite kaynaklı insülin direncine ve metabolik komplikasyonlara karşı koruyucu etki

oluşturduğu ve adipoz dokuda FGF21 duyarlılığının restorasyonuna aracılık ettiği bulunmuştur (76). Metabolik regülasyonun yanı sıra, son zamanlarda FGF21'in miyokardiyal iskemi ve nörotravma üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğuna dair artan kanıtlar bulunmaktadır (77, 78).

### 3.4. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi

Bu tez çalışmasında, “antiapoptotik, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu bilinen FGF21 hormonunun diyabetik nöropatinin *in vitro* modelinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi nelerdir ve olası bu etkiyi hangi yolak üzerinden gerçekleştirmektedir?” araştırma sorusuna yanıt aranmaktadır. FGF21 birçok çalışmada terapötik ajan olarak kullanılmış ve bazı sinir sistemi hastalıklarında, nöroprotektif özelliği olduğu bulunmuştur. Ayrıca, FGF21'in metabolik etkileri ve diyabetle ilişkisi bilinmektedir. Ancak, FGF21'in diyabetik nöropatinin oluşturulan modellerde hücre canlılığı üzerindeki etkisi tam anlamıyla anlaşılammıştır. Bu sebeple bu tez çalışmasının hipotezi FGF21'in diyabetik nöropati *in vitro* modeli olarak kabul edilen uzun süreli YG maruz bırakılmış DKG nöronlarında, hücre canlılığını koruyucu bir etkiye sahip olacağı ve bu etkinin AKT/ fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) hücresel yolağı aracılığı ile gerçekleştireceği yönündedir.

Bu tez çalışmasını amacı diyabetik nöropatinin *in vitro* modelinde FGF21'in hücre canlılığı üzerine etkisinin ve bu olası etkinin hangi hücresel yolak aracılığıyla gerçekleşeceğini araştırmaktır.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasına başlamadan önce, Fırat Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Komitesine başvuruda bulunuldu ve çalışmanın gerçekleştirilmesi için etik izinler alındı (26.12.2022 tarih 2022/21-14 oturumu). Deneysel çalışmalar Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapıldı. Aynı zamanda bu çalışma TF.23.03 No'lu Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) birimi tarafından desteklenmiştir.

### 4.1. Dorsal Kök Gangliyon Primer Hücre Kültürü

DKG primer hücre kültürü hazırlanması Forda ve Kelly (1985) isimli araştırmacıların geliştirmiş oldukları metod referans alınarak yapıldı (79). Hücre kültürü işlemine başlamadan önce kullanılacak alet-ekipmanın sterilizasyon işlemleri yapıldı veya hazır steril halde satın alındı. Tüm cerrahi setler, cam malzemeler otoklav kullanılarak 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dk boyunca sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Malzemeler otoklavlandıktan sonra sterilitesinin bozulmaması için (%70) konsantre etanol ile muamele edildi ve dikkatli bir şekilde hücre kültürünün yapılacağı laminar hava akışlı güvenlik kabinine (Thermo SCIENTIFIC Safe 2020, Almanya) aktarıldı. Hücre kültürü işleminin yapılmadığı süre zarfı içerisinde laminar flow cihazının güvenlik kapağı kapalı pozisyonda tutuldu ve çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce Ultraviyole (UV) ışık kaynağı açık bırakıldı. UV ışık kaynağı açık durumda iken Laminar Flow cihazı içerisinde UV ışık kaynaklı zarar görecekt herhangi bir protein yapılı kimyasal, izole edilen hücre vs. olmadığına dikkat edildi.

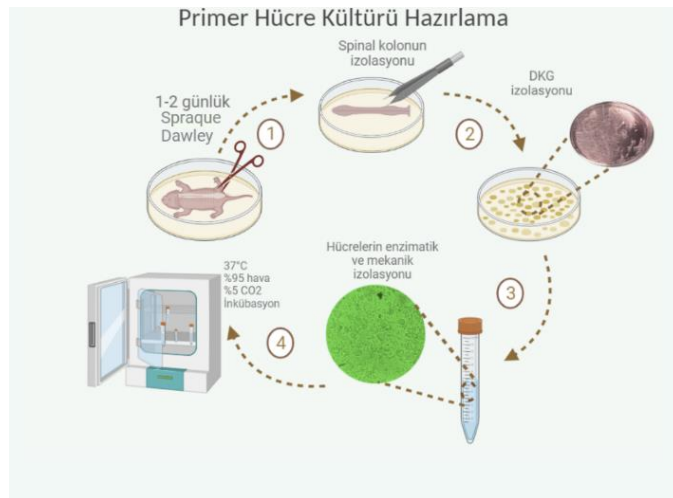
**Tablo 1.** Sinir hücre kültür vasatı bileşimi

<b>Kimyasal</b>	<b>Miktarı</b>
Nörobasal-A (GIBCO, ThermoFisher Scientific)	500 mL
B27 (GIBCO, ThermoFisher Scientific)	10 mL
Glutamaks (GIBCO, ThermoFisher Scientific)	5 mL
Penisilin-Streptomisin (GIBCO, ThermoFisher Scientific)	5 mL

#### **4.1.1.Dorsal Kök Gangliyon Primer Hücre Kültürü Hazırlanma Protokolü**

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilen 1-2 günlük Sprague Dawley cinsi sıçanlar geniş bir petri kutusuna alındı. Daha sonra petri kutusu kapağı kapalı şekilde (%70) konsantre alkol ile muamele edilerek kabin içine aktarıldı. Sıçanlar dekapite edildikten sonra küçük uçlu bir makas kullanılarak vertebral kolon dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Spinal kolonun içi kaudal uçtan başlanarak servikal bölgeye doğru yaylı küçük uçlu bir makas kullanılarak her iki yönden açıldı. Temiz başka bir petri kutusuna alınan spinal kolon mekanik manipülasyon işlemlerinin daha kolay yapılabilmesi amacıyla fosfat tamponlu salinde (PBS) ile 3 kez yıkandı. DKG'ler diseksiyon mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) kullanılarak forseps ile izole edildi. İzole edilen DKG'ler içerisinde B27, Penisilin streptomisin ve Glutamax bulunan Nörobasal-A mediumuna konuldu (Tablo.1). DKG spinal kolondan izole edildikten sonra alınan tüm gangliyonların bir araya toplanması için petri kutusu hassas dairesel hareketlerle sallandırarak işlemlere devam edildi. Bir araya toplanan gangliyonların bulunduğu petri kutusundaki Nörobasal-A mediumu dikkatli bir şekilde pastör pipeti ile çekildi işlem esnasında pastör pipet içerisinde Nörobasal-A mediumu birlikte gangliyonların olmadığına emin olundu. 37 °C'de inkübe edilmiş 900 µL Nörobasal-A medium ve 100 µL kollagenaz (% 0.125) ilave edilerek küçük dairesel hareketler yapıldıktan sonra 13 dakika boyunca inkübatörde tutuldu. İlgili sürenin bitiminden hemen

sonra enzim ile muamele edilmiş hücreler inkübatörden hızlı bir şekilde alınarak hızlıca 3 kez PBS ile yıkandı. Bu işlemin devamında 900 µL PBS ve 100 µL tripsin (% 0.25) ilave edilerek hafif bir şekilde dairesel hareketlerle çalkalandı ve 6 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında hücreleri içeren solusyona 4 mL Nörobasal-A mediumuna ilave edildi. Gangliyonlar tüpün alt kısmına çöktükten sonra kültür vasatı pastör pipet kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldı ve bu işlem 3 kez aynı şekilde tekrarlandı. Daha sonra gangliyonların mekanik ayrıştırma işlemi için 100 µL DNAz ve 900 µL Nörobasal-A mediumuna cam tüpe ilave edilip bir pastör pipet yardımıyla tritürasyon işlemi yapıldı. Tritürasyon işlemine hücrelerin iyice izole olması için bir süre kademeli olarak devam edildi. Çekilip boşaltma işlemi kademeli olarak devam ederken her kademede üst kısımda kalan süspansiyon ortamdan uzaklaştırılarak tüp içerisinde bulunan gangliyon hücrelerine tritürasyon işlemi uygulanmaya devam edildi. Tritürasyon işleminin sona ermesinden sonra hücre süspansiyonunun bulunduğu tüpün içine 200 µL sinir büyüme faktörü (NGF) eklendi. DKG hücreleri MTT testinde kullanılmak üzere 37°C'de %95hava /%5CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş bir inkübatöre (Heracell, Kendro Lab GmbH, Almanya) kaldırıldı (Şekil 3).



Şekil 3. Dorsal kök gangliyonu primer hücre kültürü hazırlanması akış diyagramı

#### 4.1.2.Dorsal Kök Ganliyn Hücrelerinde *in vitro* Diyabet Modeli Oluşturma

YG' nin (35 mM üzeri konsantrasyonda) DKG nöronlarında hiperglisemiye bağlı ölümüne yol açtığı bilinmektedir (80). Diyabetin *in vitro* modelini oluşturmak için DKG hücrelerine 24 saat boyunca 45 mM glikoz uygulaması yapıldı. DKG hücrelerinin canlılık oranı %90'ın üstünde olduğunda MTT testine başlandı. FGF21'in DKG hücrelerinde AKT yolağı aracılığıyla etkisi olup olmadığını değerlendirmek için AKT/PI3K inhibitörü olan LY294002 kullanıldı.

#### 4.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve MTT Analizi

DKG hücreleri, hücre canlılığının MTT yöntemiyle belirlenmesi için 96'lık platelerdeki kuyucuklara ekildi. FGF21 serum fizyolojik içerisinde çözdürüldü. Öncelikli olarak FGF21'in 4 farklı dozu (12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL) literatür araştırılarak karar verildi ve sağlıklı hücre gruplarına uygulandı. Ardından diyabetik nöropati'nin *in vitro* modelinde FGF21'in 4 farklı dozu (12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL) YG ile birlikte uygulandı. Diyabetik nöropati modelini oluşturmak amacıyla 24 saat boyunca YG'ye (45 mmol/L) maruz bırakıldı.

Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilme prensibine dayanmaktadır. Çalışma prensibi ise MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünemeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, sadece aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülür. Bu da hücre canlılığının biyobelirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir.

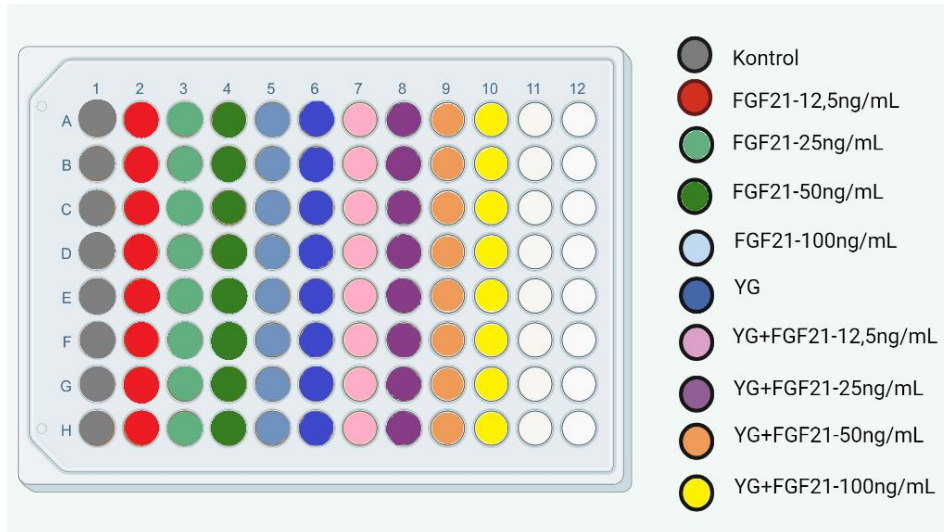
Primer hücre kültürü ile hazırlanan DKG hücrelerinin canlılık oranları %0.4 tripan mavisi kullanılarak belirlendi. Tripan mavisi, canlı hücrelerde membran yapısı zarar görmediği için hücrelerin içine giremezken cansız hücrelerde ise hücre tarafından absorbe edilir. Platelere ekilen hücrelerin canlılık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

#### 4.2.1. Hücre Canlılık Analizi

FGF21'in Diyabetik Nöropati'nin in vitro modelinde hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek için DKG nöronları Şekil 4'te gösterildiği gibi kontrol, FGF21-12,5ng/mL, FGF21-25ng/mL, FGF21-50ng/mL, FGF21-100ng/mL, YG, YG+FGF21-12,5ng/mL , YG+FGF21-25ng/mL, YG+FGF21-50ng/mL, YG+FGF21-100ng/mL, grupları şeklinde her bir kuyucukta en az  $5 \times 10^4$  hücre/kuyucuk içeren 96'lık platelere ve her bir kuyucuk 200  $\mu$ L'ye tamamlanacak şekilde aşağıdaki protokole göre ekilmiştir:

- **1.Adım:** Tüm kuyucuklara 100  $\mu$ L DKG hücreleri ( $5 \times 10^4$ ) içeren medium konuldu.
- **2.Adım:** Kontrol için belirtilen kuyucuklara 100  $\mu$ L Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **3.Adım:** FGF21-12,5ng/mL ile gösterilen kuyucuklara 40  $\mu$ L FGF21 (12,5ng/mL), 60  $\mu$ L Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **4.Adım:** FGF21-25ng/mL ile gösterilen kuyucuklara 40  $\mu$ L FGF21 (25ng/mL), 60  $\mu$ L Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **5.Adım:** FGF21-50ng/mL ile gösterilen kuyucuklara 40  $\mu$ L FGF21 (50ng/mL), 60  $\mu$ L Nörobasal-A mediumu konuldu.

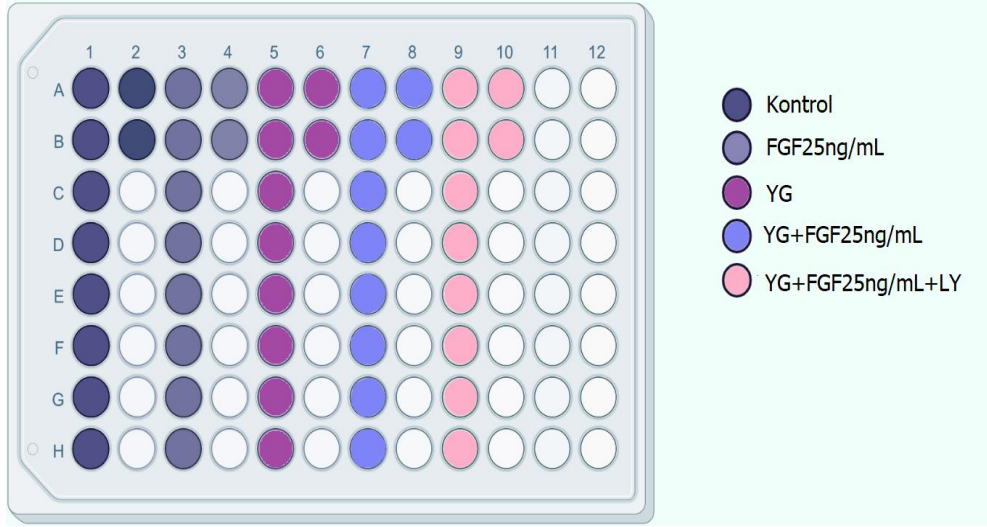
- **6.Adım:** FGF21-100ng/mL ile gösterilen kuyucuklara 40 µL FGF21 (100ng/mL), 60 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **7.Adım:** YG ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG, 80 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **8.Adım:** YG+FGF21-12,5ng/mL ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 20 µL FGF21 (12,5ng/mL), 60 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **9.Adım:** YG+FGF21-25ng/mL ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 20 µL FGF21 (25ng/mL), 60 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **10.Adım:** YG+FGF21-50ng/mL ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 20 µL FGF21(50ng/mL), 60 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **11.Adım:** YG+FGF21-100ng/mL ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG (45 mmol/L), 20 µL FGF21 (100ng/mL), 60 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.



Şekil 4. FGF21'in farklı dozlarının (12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL ve 100 ng/mL) DKG hücre canlılığına etkisini MTT analizi ile incelemek için grupların 96'lık plate üzerindeki yerleşim şekli.

FGF21'in diyabetik nöropati modelinde hücre canlılığı üzerine etkisini PI3K/AKT inhibitörü (LY294002, 50 µL) kullanılarak yolak üzerinden incelemek için DKG nöronları Şekil 5'te gösterildiği gibi kontrol, FGF25 (25 ng/mL), YG, YG+FGF25 ve YG+FGF25+LY gruplarına ayrıldı. Her bir kuyucukta en az  $5 \times 10^4$  hücre/kuyucuk içeren 96'lık plate'lere ve her bir kuyucuk 100 µL'ye tamamlanacak şekilde aşağıdaki protokole göre ekildi.

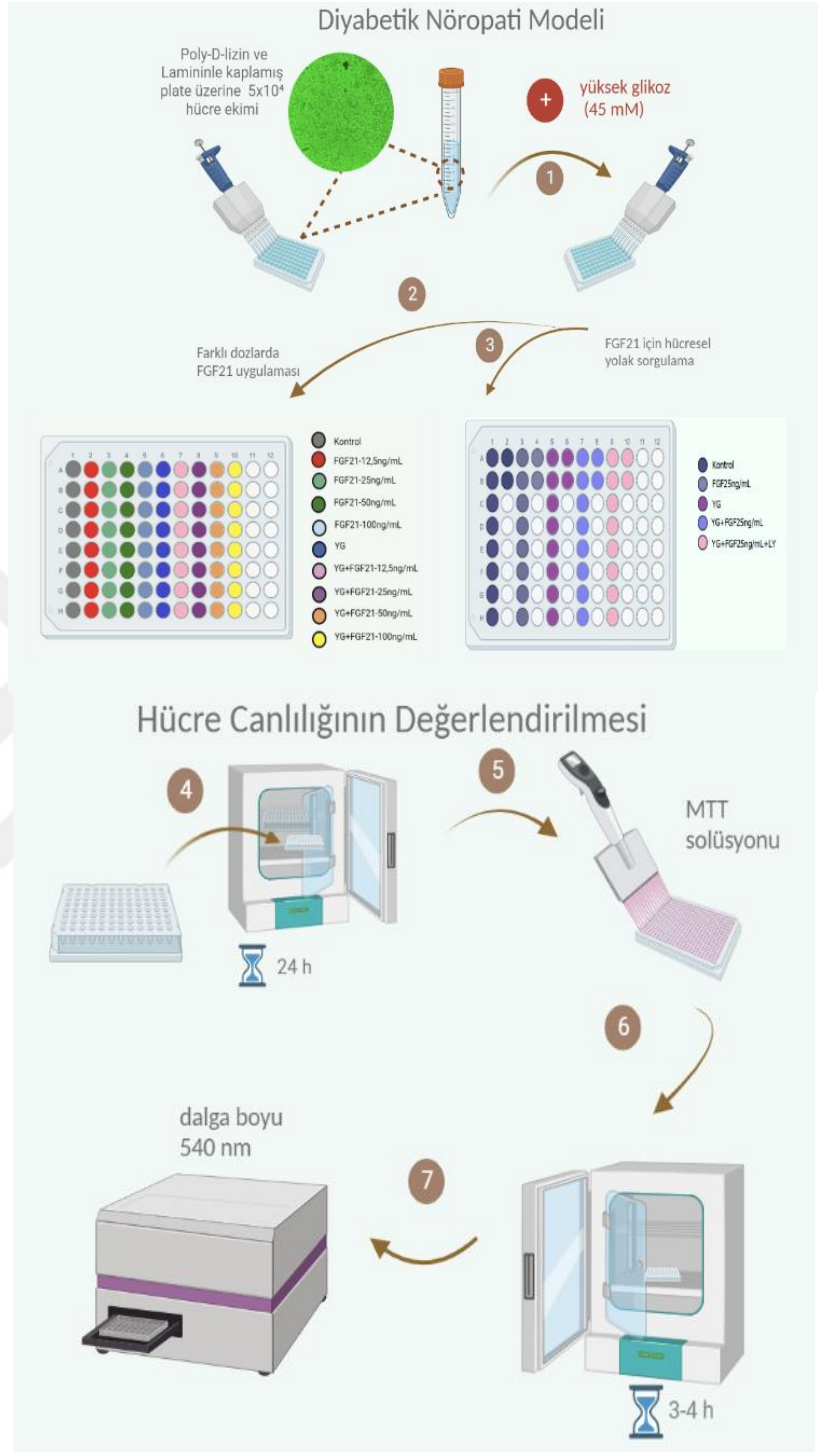
- **1. Adım:** Tüm kuyucuklara 100 µL DKG hücreleri ( $5 \times 10^4$ ) içeren medium konuldu.
- **2. Adım:** K harfi ile gösterilen kuyucuklara 100 µL Nörobasal-A mediumu konuldu (Kontrol amacıyla).
- **3. Adım:** FGF25 ile gösterilen kuyucuklara 20 µL FGF21 (25 ng/mL), 80 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **4. Adım:** YG ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG, 80 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **5. Adım:** YG+FGF25 ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG, 20 µL FGF21 (25 ng/mL), 60 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.
- **6. Adım:** YG+FGF25+LY ile gösterilen kuyucuklara 20 µL YG, 20 µL LY294002 (50 µM) ile kodlanan kimyasal konulup 2 saat beklendi. 2 saat beledikten sonra 20 µL FGF21 (25 ng/mL), 40 µL Nörobasal-A mediumu konuldu.



**Şekil 5.** FGF21'in DKG hücre canlılığı üzerine olan etkisini hangi hücre yolak aracılığıyla gerçekleştirdiğinin MTT analizi ile incelemek için grupların plate üzerindeki yerleşim şekli.

Maddelerin 24 saat süreyle inkübasyonu sonrası inkübatörden alınan platelerdeki medium ve maddeler mikropipet yardımıyla plate ortamından uzaklaştırıldı. Platelere her kuyucuğa 50 µL olacak şekilde tekrarlayıcı pipet yardımıyla steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan 0,5 mg/mL eklendi ve inkübasyon için 3 saat süreyle inkübatör cihazına konuldu. 3 saat sonunda eklenen MTT solüsyonu ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa 100 µL hacimde Nörobasal-A eklenerek hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında (Thermo, ABD) 540 nm dalga boyunda okutuldu (Şekil 6). Kontrol hücreleri okutularak elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edilmiştir. Çözücü ve ajan uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlanmış ve yüzde canlılık olarak kabul edilmiştir. MTT deneyleri farklı günlerde en az 7 kez tekrarlanmış ve sonuçlar rapor edilmiştir.

A)



B)

**Şekil 6.** In vitro diyabetik nöropati modeli oluşturulan DKG nöronlarının hücre canlılığının değerlendirilmesindeki akış diyagramı

### 4.3.İstatistiksel Analizler

Bütün verilerin istatistiksel analizleri SPSS programı kullanılarak yapıldı. Grafikler GraphPad yazılımı (GraphPad Prism version 9.2.0 for macOS, GraphPad Software, San Diego, California USA) ve Originpro 8.0 grafik programı kullanılarak yapıldı. Şekiller biorender.com kullanılarak yapıldı.

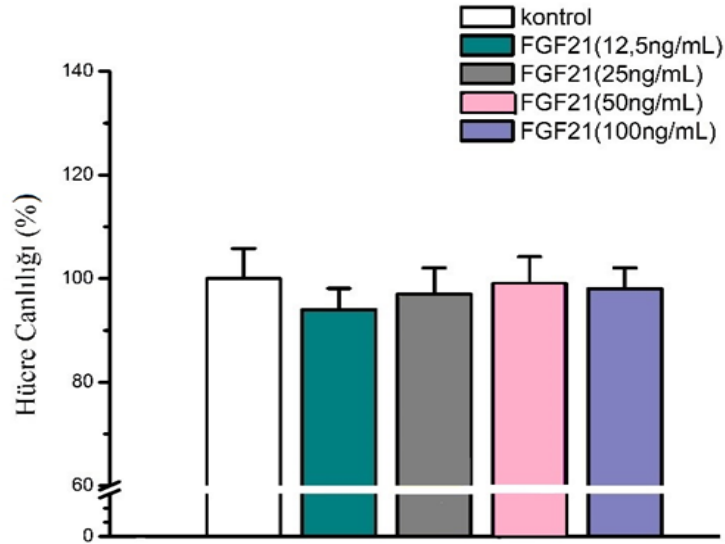
Gruplar arası farklılıklar için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve post-hoc Tukey testleri kullanıldı. Tüm analizlerde  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. MTT deneyleri farklı günlerde en az 7 defa tekrarlandı.

## 5. BULGULAR

### 5.1. FGF21'in DKG Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

#### a) Sağlıklı Hücreler Üzerine Etkisi

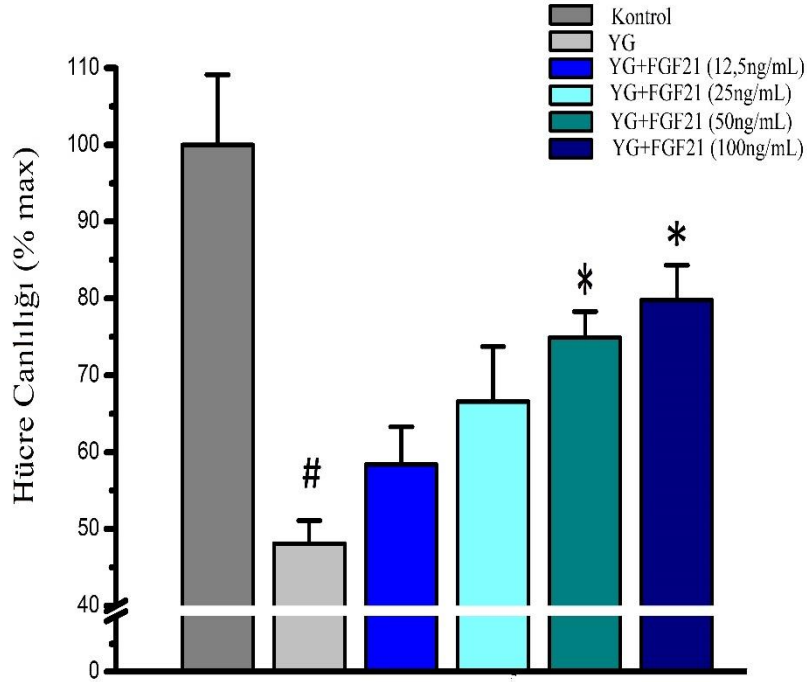
Öncelikli olarak FGF21'in sağlıklı DKG hücrelerinde hücre canlılığını üzerine etkisi olup olmadığı incelendi. FGF21'in farklı dozları (12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL) DKG hücrelerine uygulandı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tek başına FGF21'in uygulamasının DKG hücrelerinin canlılığı üzerine herhangi bir etkisi olmadığı belirlendi (Şekil 7).



Şekil 6. FGF21'in sağlıklı DKG hücrelerinde, hücre canlılığı üzerine doz bağımlı etkisi (tek yönlü varyans analizi ve ardından post-hoc Tukey HSD testi).

## b) Diyabetik Nöropati Modeli Üzerine Etkisi

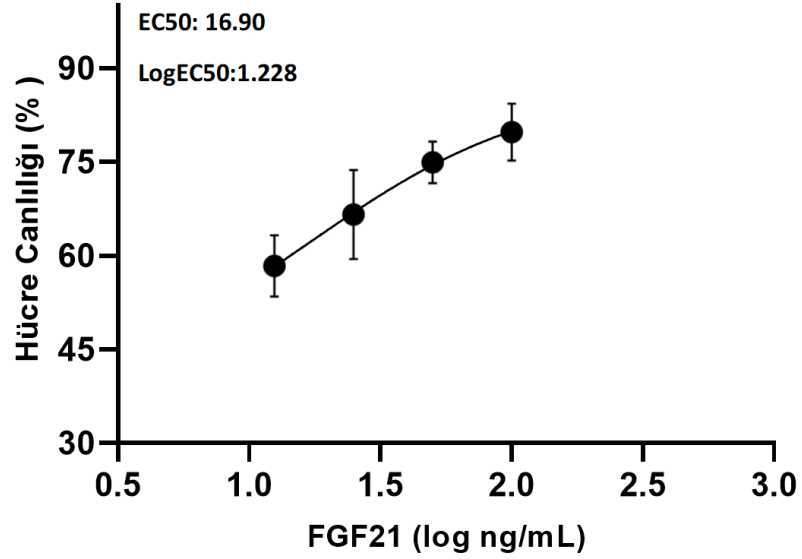
DKG hücrelerine YG ile birlikte FGF21'in (12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL ) farklı dozlarda uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkisi incelendi. YG uygulanmış gruptaki hücre canlılığı oranı ( $48.08 \pm 3,01$ ) hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubuna ( $100 \pm 9,10$ ) göre anlamlı ölçüde azalmıştır ( $p < 0.001$ , şekil 8). YG ile birlikte FGF21'in farklı dozlarının (12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL ) uygulandığı gruplarda hücre canlılığı (sırasıyla  $58.39 \pm 4.90$ ,  $66.6 \pm 7.13$ ,  $74.92 \pm 3.36$ ,  $79,76 \pm 4.55$ ) YG grubuyla karşılaştırıldığında doz bağımlı olarak FGF21'in 50 ng/mL ve 100 ng/mL dozlarında koruyucu bir etki gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ , şekil 8).



**Şekil 7.** FGF21'in Diyabetik nöropatinin in vitro modelinde DKG hücre canlılığı üzerine doz bağımlı etkisi, YG: Yüksek Glikoz, # $p < 0.001$ ; kontrole karşı YG, \* $p < 0,05$ ; YG'ye karşı YG+FGF21 (50ng/mL), \* $p < 0,05$ ; YG'ye karşı YG+FGF21 (100ng/mL) (tek yönlü varyans analizi)

## 5.2. EC50 Dozunun Belirlenmesi

FGF21'in farklı dozlarının (12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL ) DKG'lerin YG ile diyabetik nöropati modeli oluşturulmuş gruplara uygulanmasının ardından canlılık oranının yüzdesel değişimi dikkate alınarak log(doz)-yanıt eğrisi oluşturulmuş ve FGF21 için  $\log EC_{50}=1.228$  (  $EC_{50}=16.90$  ng/mL) olarak bulunmuştur (Şekil 9).

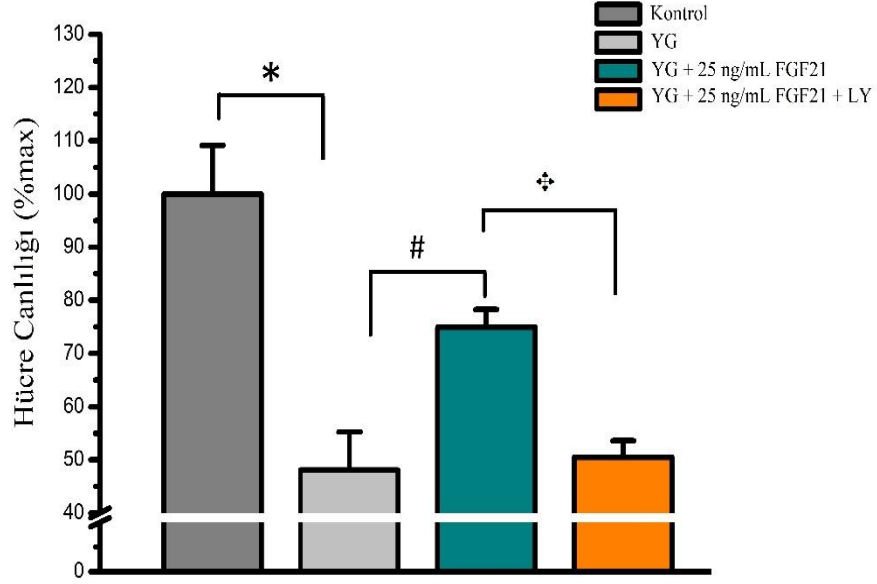


Şekil 8. Hücre canlılığı üzerine log(doz)-yanıt ilişkisi

## 5.3. FGF21'in Hücre Canlılığına Yolak Üzerinden Etkisi

FGF21'in DKG hücre canlılığı üzerine etkinliği AKT /PI3K yolağı üzerinden sorgulandı. DKG hücrelerine YG uygulaması DKG hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı ( $*p<0.001$ ). FGF21 (25 ng/mL) uygulaması DKG hücre canlılığını arttırdı ( $\#p<0.05$ ). LY'nin DKG hücrelerine uygulanması FGF21'in meydana getirdiği etkiyi

ortadan kaldırarak DKG hücre canlılığında anlamlı bir düşüşe neden oldu ( $\clubsuit p < 0.05$ ; şekil 10).



**Şekil 10.** FGF21'in, AKT/PI3K yolağı yoluyla DKG hücre canlılığına etkisi. \* $p < 0.01$ ; kontrole karşı YG, # $p < 0.05$  YG karşı YG+FGF21 (50 ng/mL),  $\clubsuit p < 0.01$  YG+FGF21 (50 ng/mL) karşı YG+FGF21+LY (50 ng/mL), (tek yönlü varyans analizi ve ardından post-hoc Tukey HSD test

## 6. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında FGF21'in, diyabetik nöropatinin *in vitro* modelinde hücre canlılığına etkisi ve bu etkiyi hangi hücresel yolağı kullanarak yaptığı incelendi. Elde ettiğimiz bulgulara göre; FGF21'in diyabetik nöropati oluşturulan DKG hücrelerinde doz bağımlı olarak hücre canlılığını koruduğı ve bu etkiyi AKT/PI3K hücresel yolağı aracılığıyla gerçekleştirdiğı gösterildi.

Çalışmamızda kullandığımız DKG nöronları periferden gelen ağrı, ısı duyusunu MSS'e taşımakla görevli olan nöron gruplarıdır ve diyabetik nöropati oluşumunda hipergliseminin zarar verdiği nöron grupları içerisinde yer alır (81, 82). Hiperglisemi nöronlarda mitokondriyal hasara ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olduğı ve bunun sonucunda; aksonal hasara, demiyelinizasyona ve sinir lifi kaybına yol açtığı bilinmektedir (83-86). Literatürde DKG nöronlarına 24 saat YG ile muamele edilmesi diyabetik nöropatinin *in vitro* modeli olarak kabul edilmektedir (80). Bizim de yaptığımız çalışmada DKG nöronlarına 24 saat boyunca YG ile muamele edildiğinde, literatürle uyumlu olarak hücre canlılığının azaldığı görüldü. Hücre ölümünün, hiperglisemi sonucu ROS'ların birikmesinden ve apoptozdan kaynaklandığı düşünülebilir. Fakat bu çalışmada bu parametrelere bakılmadı.

FGF21, diyabette karaciğerde glikojenezi arttırıp, kandaki glikoz artışını baskılar (48). FGF21 sadece diyabet gibi metabolik hastalıklarda değil diğer sinir sistemi hastalıklarında da önemli etkisi bulunmuştur (87). Yaşlanma modeli oluşturulan farelerde uygulanan FGF21'in, hipokampus hasarını hafiflettiğı, nöronların apoptozunu inhibe ettiği ve mitokondriyal stabiliteyi koruduğı bulunmuştur. Yine aynı çalışmada FGF21'in mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/AKT yollarıyla mitokontri fonksiyonunu arttırarak nöronları inflamasyona karşı koruduğı bulunmuştur (87). FGF21'in beyinde

reseptörlerinin bulunması ve kan beyin bariyerini geçebilmesi (88, 89) nedeniyle MSS hastalıklarında terapötik hedef olabileceği düşünülmüştür. Bu düşünce doğrultusunda Chen ve ark yaptığı çalışmada FGF21'in Alzheimer hastalığının *in vivo* ve *in vitro* modellerde nörodejenerasyonu iyileştirdiği, apoptozu azalttığı ve MAPK yoluyla nöroprotektif etkisi olduğu bulunmuştur (90). Dolaşımdaki FGF21 düzeylerinin, travmatik beyin hasarından sonra  $\beta$ -klotho ile etkileşimler yoluyla oligodendrosit öncü hücrelerinin çoğalmasını sağlayarak remiyelinizasyonu desteklediği bilinmektedir (91). MSS'nin yanı sıra, periferik sinir yaralanmasında da koruyucu etkinliği bulunan FGF21'in, yaralanma sonrası güçlü nöroprotektif etkiye neden olduğu, fonksiyonel iyileşme sağladığı, hem aksonal uzamayı hem de remiyelizasyonu teşvik ettiği, Schwann hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı ve bunu hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK)/nükleer transkripsiyon faktörü eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf-2) sinyali ile gerçekleştirildiği bulunmuştur (92). Bu tez çalışmasında da periferik nöronlar olan DKG nöronlarında FGF-21 literatürle uyumlu olarak koruyucu role sahip olduğu belirlendi.

Hücre yolaklarından AKT önemli bir metabolik düzenleyicidir ve diyabetik farelerde fosforile edilerek aktive edilebilir (93, 94). PI3K, plazma zarında difosfoinositidin trifosfoinositide dönüşümünü teşvik ederek AKT'yi aktive eder (95). Hücre döngüsünün G1-S fazının geçişini düzenleyen hücre içi bir sinyal yolağı olan AKT/PI3K yolağı; hücrenin canlılığının, proliferasyonun ve apoptotik süreçlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (96). Yapılan bir çalışmada diyabetik farelerde sinir hasarı sonrası FGF21 uygulaması, AKT fosforilasyonunu arttırdığı ve sonrasında oksidan stresin azaldığı bulunmuştur (97). Hücre kültürü çalışmalarında FGF21'in PI3K/AKT sinyal yolunu aktive ederek; prostat kanser hücrelerinde otofajiyi kolaylaştırdığı (98), insan endotel hücrelerinde apoptoz, otofaji ve oksidatif stresi

düzenlediği (99) bilinmektedir. Farelerin iskelet kası hücrelerinde yapılan çalışmada FGF21'in PI3K/AKT'ye bağlı bir şekilde iskelet kası hücreleri tarafından salgılanabileceğini göstermektedir (100). Yapılan bu çalışmalar bize FGF21'in, DKG nöronları üzerindeki etkisinin de PI3K/AKT yolağı üzerinden olabileceğini düşündürdü.

Çalışmalarla tutarlı bir şekilde bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler FGF21'in doz bağımlı olarak diyabetik nöropati modelinde nöroprotektif bir etkisi olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte bu çalışmada ilk defa FGF21'in nöroprotektif etkisi, yavru sıçanlardan elde edilen DKG nöronlarında oluşturulan diyabetik nöropati modelinde gösterilmektedir. 50 ve 100 ng/ml dozlarında FGF21, 24 saat YG'ye maruz bırakılan DKG nöronlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre canlılığını koruduğu ve bu etkiyi PI3K/AKT yolağı üzerinden gerçekleştiği ortaya konuldu. Literatürde yapılan çalışmalar dikkate alınarak bizim çalışmamızın sonucu doğrultusunda, FGF21'in PI3K/AKT yolunu kullanarak hücrelerde oksidatif stresi azaltıp hücre canlılığını koruduğu ve nöroprotektif etki ettiği düşünülebilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada diyabetik nöropati modelinde ilk kez FGF21'in hücre sağ kalımı üzerinde nöroprotektif bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Böylece diyabetik nöropati için terapötik bir ajan olarak yeni yaklaşımların ortaya çıkarılması açısından basamak teşkil edecek yeni veriler elde edilmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca FGF21'in hücre canlılığını etkilediği mekanizmaların aydınlatılması ve deneylerin *in vivo* olarak desteklenmesi diyabetik nöropati için hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKÇA

1. Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA. Current medical diagnosis & treatment, in Current medical diagnosis & treatment. 2005. p. 1887-1887.
2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2015; 38 Suppl: S8-s16.
3. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106(2): 165-9.
4. Group IDA. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. *Diabetes research and clinical practice* 2015; 109(3): 461-465.
5. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews* 2013; 93(1): 137-188.
6. Nguyen DV, Shaw LC, Grant MB. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Frontiers in endocrinology* 2012; 3: 170.
7. Tomlinson D, MAYER JH. Defects of axonal transport in diabetes mellitus—a possible contribution to the aetiology of diabetic neuropathy. *Journal of autonomic pharmacology* 1984; 4(1): 59-72.
8. Abbott CA, Malik RA, van Ross ER, Kulkarni J, Boulton AJ. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. *Diabetes Care* 2011; 34(10): 2220-4.
9. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, et al. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5(1): 42.
10. Tesfaye S, Boulton AJ, Dickenson AH. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. *Diabetes Care* 2013; 36(9): 2456-65.
11. Gibbons CH, Freeman R. Treatment-induced neuropathy of diabetes: an acute, iatrogenic complication of diabetes. *Brain* 2015; 138(Pt 1): 43-52.
12. Joly-Amado A, Soty M, Philippe E, et al. Portal Glucose Infusion, Afferent Nerve Fibers, and Glucose and Insulin Tolerance of Insulin-Resistant Rats. *J Nutr* 2022; 152(8): 1862-1871.
13. Niimi N, Yako H, Takaku S, Chung SK, Sango K. Aldose Reductase and the Polyol Pathway in Schwann Cells: Old and New Problems. *Int J Mol Sci* 2021; 22(3).
14. Clements RS. The Polyol Pathway. *Drugs* 1986; 32(2): 3-5.
15. Bhadada SK, Sahay R, Jyotsna VP, Agrawal JK. Diabetic Neuropathy: Current Concepts. 2003.
16. Kaur S, Pandhi P, Dutta P. Painful diabetic neuropathy: an update. *Ann Neurosci* 2011; 18(4): 168-75.
17. Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther* 2008; 88(11): 1322-35.
18. Pavy-Le Traon A, Fontaine S, Tap G, et al. Cardiovascular autonomic neuropathy and other complications in type 1 diabetes. *Clin Auton Res* 2010; 20(3): 153-60.
19. Fuchs D, Birklein F, Reeh PW, Sauer SK. Sensitized peripheral nociception in experimental diabetes of the rat. *Pain* 2010; 151(2): 496-505.

20. Jelacic Kadic A, Boric M, Vidak M, Ferhatovic L, Puljak L. Changes in epidermal thickness and cutaneous innervation during maturation in long-term diabetes. *J Tissue Viability* 2014; 23(1): 7-12.
21. Obrosova IG. Diabetes and the peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(10): 931-40.
22. Ahlgren SC, White DM, Levine J. Increased responsiveness of sensory neurons in the saphenous nerve of the streptozotocin-diabetic rat. *Journal of neurophysiology* 1992; 68(6): 2077-2085.
23. Burchiel KJ, Russell LC, Lee RP, Sima AA. Spontaneous activity of primary afferent neurons in diabetic BB/Wistar rats: a possible mechanism of chronic diabetic neuropathic pain. *Diabetes* 1985; 34(11): 1210-1213.
24. Vollert J, Magerl W, Baron R, et al. Pathophysiological mechanisms of neuropathic pain: comparison of sensory phenotypes in patients and human surrogate pain models. *Pain* 2018; 159(6): 1090-1102.
25. Aurilio C, Pota V, Pace MC, Passavanti MB, Barbarisi M. Ionic channels and neuropathic pain: pathophysiology and applications. *J Cell Physiol* 2008; 215(1): 8-14.
26. Sun W, Miao B, Wang XC, et al. Reduced conduction failure of the main axon of polymodal nociceptive C-fibres contributes to painful diabetic neuropathy in rats. *Brain* 2012; 135(Pt 2): 359-75.
27. Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG. The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of pain. *Pain* 2007; 131(3): 243-257.
28. Hall KE, Liu J, Sima AA, Wiley JW. Impaired inhibitory G-protein function contributes to increased calcium currents in rats with diabetic neuropathy. *J Neurophysiol* 2001; 86(2): 760-70.
29. White DM, Zimmermann M. The bradykinin-induced release of substance P from nerve fibre endings in the rat saphenous nerve neuroma is not related to electrophysiological excitation. *Neurosci Lett* 1988; 92(1): 108-13.
30. Zamponi GW, Lewis RJ, Todorovic SM, Arneric SP, Snutch TP. Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. *Brain Research Reviews* 2009; 60(1): 84-89.
31. Vydyanathan A, Wu ZZ, Chen SR, Pan HL. A-type voltage-gated K<sup>+</sup> currents influence firing properties of isolectin B4-positive but not isolectin B4-negative primary sensory neurons. *J Neurophysiol* 2005; 93(6): 3401-9.
32. Kettenmann H, Verkhratsky A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 2008; 31(12): 653-9.
33. McMahon SB, Malcangio M. Current challenges in glia-pain biology. *Neuron* 2009; 64(1): 46-54.
34. Inoue K, Tsuda M. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nature Reviews Neuroscience* 2018; 19(3): 138-152.
35. Afsari ZH, Renno WM, Abd-El-Basset E. Alteration of glial fibrillary acidic proteins immunoreactivity in astrocytes of the spinal cord diabetic rats. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291(4): 390-9.
36. Li JQ, Chen SR, Chen H, Cai YQ, Pan HL. Regulation of increased glutamatergic input to spinal dorsal horn neurons by mGluR5 in diabetic neuropathic pain. *J Neurochem* 2010; 112(1): 162-72.

37. Wang XL, Zhang Q, Zhang YZ, et al. Downregulation of GABAB receptors in the spinal cord dorsal horn in diabetic neuropathy. *Neurosci Lett* 2011; 490(2): 112-5.
38. Wang XL, Zhang HM, Chen SR, Pan HL. Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy. *J Physiol* 2007; 579(Pt 3): 849-61.
39. Yang Y, Zhao B, Gao X, et al. Targeting strategies for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical syndrome, molecular basis, and drug development. *J Exp Clin Cancer Res* 2021; 40(1): 331.
40. Hogan QH. Labat lecture: the primary sensory neuron: where it is, what it does, and why it matters. *Reg Anesth Pain Med* 2010; 35(3): 306-11.
41. Amir R, Devor M. Electrical excitability of the soma of sensory neurons is required for spike invasion of the soma, but not for through-conduction. *Biophys J* 2003; 84(4): 2181-91.
42. Devor M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain* 1999; Suppl 6: S27-s35.
43. Ng K-Y, Wong YH, Wise H. The role of glial cells in influencing neurite extension by dorsal root ganglion cells. *Neuron glia biology* 2010; 6(1): 19-29.
44. Bird MM, Lieberman A. Microtubule fascicles in the stem processes of cultured sensory ganglion cells. *Cell and Tissue Research* 1976; 169: 41-47.
45. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain research reviews* 2005; 48(3): 457-476.
46. Hu P, McLachlan E. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. *Neuroscience* 2002; 112(1): 23-38.
47. Guha D, Shamji MF. The Dorsal Root Ganglion in the Pathogenesis of Chronic Neuropathic Pain. *Neurosurgery* 2016; 63 Suppl 1: 118-126.
48. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, et al. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 2007; 5(6): 426-37.
49. Lu Y, Li R, Zhu J, et al. Fibroblast growth factor 21 facilitates peripheral nerve regeneration through suppressing oxidative damage and autophagic cell death. *J Cell Mol Med* 2019; 23(1): 497-511.
50. Yamakawa I, Kojima H, Terashima T, et al. Inactivation of TNF- $\alpha$  ameliorates diabetic neuropathy in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301(5): E844-52.
51. Ma W, Chabot JG, Vercauteren F, Quirion R. Injured nerve-derived COX2/PGE2 contributes to the maintenance of neuropathic pain in aged rats. *Neurobiol Aging* 2010; 31(7): 1227-37.
52. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(3): 235-53.
53. Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. A Dozen Years of Discovery: Insights into the Physiology and Pharmacology of FGF21. *Cell Metab* 2019; 29(2): 246-253.
54. Yie J, Wang W, Deng L, et al. Understanding the physical interactions in the FGF21/FGFR/ $\beta$ -Klotho complex: structural requirements and implications in FGF21 signaling. *Chem Biol Drug Des* 2012; 79(4): 398-410.

55. Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, et al. BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(18): 7432-7.
56. Geng L, Lam KSL, Xu A. The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. *Nat Rev Endocrinol* 2020; 16(11): 654-667.
57. Kleiner S, Douris N, Fox EC, et al. FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & development* 2012; 26(3): 271-281.
58. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR $\alpha$ -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell metabolism* 2007; 5(6): 415-425.
59. Von Holstein-Rathlou S, BonDurant LD, Peltekian L, et al. FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metab* 2016; 23(2): 335-43.
60. Talukdar S, Owen BM, Song P, et al. FGF21 Regulates Sweet and Alcohol Preference. *Cell Metab* 2016; 23(2): 344-9.
61. Baruch A, Wong C, Chinn LW, et al. Antibody-mediated activation of the FGFR1/Klotho $\beta$  complex corrects metabolic dysfunction and alters food preference in obese humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117(46): 28992-29000.
62. Owen BM, Ding X, Morgan DA, et al. FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab* 2014; 20(4): 670-7.
63. Xu J, Lloyd DJ, Hale C, et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009; 58(1): 250-9.
64. Kharitonov A, Wroblewski VJ, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 2007; 148(2): 774-81.
65. Talukdar S, Zhou Y, Li D, et al. A Long-Acting FGF21 Molecule, PF-05231023, Decreases Body Weight and Improves Lipid Profile in Non-human Primates and Type 2 Diabetic Subjects. *Cell Metab* 2016; 23(3): 427-40.
66. Sanyal A, Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet* 2019; 392(10165): 2705-2717.
67. Zhang F, Yu L, Lin X, et al. Minireview: Roles of Fibroblast Growth Factors 19 and 21 in Metabolic Regulation and Chronic Diseases. *Mol Endocrinol* 2015; 29(10): 1400-13.
68. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005; 115(6): 1627-35.
69. Xu J, Stanislaus S, Chinookoswong N, et al. Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models—association with liver and adipose tissue effects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2009; 297(5): E1105-E1114.
70. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation* 2005; 115(6): 1627-1635.
71. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 2008; 149(12): 6018-6027.

72. Berglund ED, Li CY, Bina HA, et al. Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. *Endocrinology* 2009; 150(9): 4084-4093.
73. Kharitononkov A, Wroblewski VJ, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 2007; 148(2): 774-781.
74. Adams AC, Halstead CA, Hansen BC, et al. LY2405319, an engineered FGF21 variant, improves the metabolic status of diabetic monkeys. *PloS one* 2013; 8(6): e65763.
75. Talukdar S, Zhou Y, Li D, et al. A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell metabolism* 2016; 23(3): 427-440.
76. Geng L, Liao B, Jin L, et al. Exercise Alleviates Obesity-Induced Metabolic Dysfunction via Enhancing FGF21 Sensitivity in Adipose Tissues. *Cell Rep* 2019; 26(10): 2738-2752.e4.
77. Li Q, Zhang Y, Ding D, et al. Association Between Serum Fibroblast Growth Factor 21 and Mortality Among Patients With Coronary Artery Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(12): 4886-4894.
78. Chen J, Hu J, Liu H, et al. FGF21 Protects the Blood-Brain Barrier by Upregulating PPAR $\gamma$  via FGFR1/ $\beta$ -klotho after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 2018; 35(17): 2091-2103.
79. Forda S, Kelly JS. The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion cells by the presence of 5-HT-containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Developmental Brain Research* 1985; 22(1): 55-65.
80. Forda S, Kelly JS. The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion cells by the presence of 5-HT-containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Brain Res* 1985; 354(1): 55-65.
81. Eftekharpour E, Fernyhough P. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Associated with Peripheral Neuropathy in Type 1 Diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2022; 37(7-9): 578-596.
82. Esposito MF, Malayil R, Hanes M, Deer T. Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation. *Pain Med* 2019; 20(Suppl 1): S23-s30.
83. Leininger GM, Backus C, Sastry AM, et al. Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis* 2006; 23(1): 11-22.
84. Berent-Spillson A, Russell JW. Metabotropic glutamate receptor 3 protects neurons from glucose-induced oxidative injury by increasing intracellular glutathione concentration. *J Neurochem* 2007; 101(2): 342-54.
85. Vincent AM, Edwards JL, McLean LL, et al. Mitochondrial biogenesis and fission in axons in cell culture and animal models of diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol* 2010; 120(4): 477-89.
86. Zochodne DW, Verge VM, Cheng C, Sun H, Johnston J. Does diabetes target ganglion neurones? Progressive sensory neurone involvement in long-term experimental diabetes. *Brain* 2001; 124(Pt 11): 2319-34.
87. Kang K, Xu P, Wang M, et al. FGF21 attenuates neurodegeneration through modulating neuroinflammation and oxidant-stress. *Biomed Pharmacother* 2020; 129: 110439.

88. Sa-Nguanmoo P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Potential roles of fibroblast growth factor 21 in the brain. *Metabolic Brain Disease* 2016; 31: 239-248.
89. Hsueh H, Pan W, Kastin AJ. The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides* 2007; 28(12): 2382-2386.
90. Chen S, Chen ST, Sun Y, et al. Fibroblast growth factor 21 ameliorates neurodegeneration in rat and cellular models of Alzheimer's disease. *Redox Biol* 2019; 22: 101133.
91. Kuroda M, Muramatsu R, Maedera N, et al. Peripherally derived FGF21 promotes remyelination in the central nervous system. *J Clin Invest* 2017; 127(9): 3496-3509.
92. Lu Y, Li R, Zhu J, et al. Fibroblast growth factor 21 facilitates peripheral nerve regeneration through suppressing oxidative damage and autophagic cell death. *Journal of cellular and molecular medicine* 2019; 23(1): 497-511.
93. Kanungo J, Zheng Y-l, Amin ND, Pant HC. Targeting Cdk5 activity in neuronal degeneration and regeneration. *Cellular and molecular neurobiology* 2009; 29: 1073-1080.
94. Zhong Z, Chen A, Fa Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells upregulate PI3K/AKT pathway and down-regulate NF- $\kappa$ B pathway by secreting glial cell-derived neurotrophic factors to regulate microglial polarization and alleviate deafferentation pain in rats. *Neurobiology of disease* 2020; 143: 104945.
95. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery* 2014; 13(2): 140-156.
96. Jin D, Yang J-p, Hu J-h, Wang L-n, Zuo J-l. MCP-1 stimulates spinal microglia via PI3K/Akt pathway in bone cancer pain. *Brain research* 2015; 1599: 158-167.
97. Kang K, Xu P, Wang M, et al. FGF21 attenuates neurodegeneration through modulating neuroinflammation and oxidant-stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020; 129: 110439.
98. Dai H, Hu W, Zhang L, et al. FGF21 facilitates autophagy in prostate cancer cells by inhibiting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. *Cell Death Dis* 2021; 12(4): 303.
99. Zheng J, Ma X, Zhou Y, et al. GATA2/FGF21 Axis Regulates the Effects of High Glucose on the Apoptosis, Autophagy and Oxidative Stress of Human Umbilical Vein Endothelial Cell via PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Ann Clin Lab Sci* 2022; 52(2): 278-291.
100. Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, et al. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett* 2008; 582(27): 3805-10.