



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**DİYABETİK NEFROPATİDE
TRANSGLUTAMİNAZ 2 VE C-PEPTİTİN
FONKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Kübra CANSU CANDAN

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**DIYABETİK NEFROPATİDE
TRANSGLUTAMİNAZ 2 VE C-PEPTİTİN
FONKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI**




Ecz. Kübra CANSU CANDAN

Danışman
Prof. Dr. Nefise Aysun PABUÇÇUOĞLU

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2020

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

Başkan : Prof.Dr. N. Aysun Pabuçcuoğlu 
Üye : Prof.Dr. Hilal Kocadere 
Üye : Prof.Dr. Sibel Konyalıoğlu 

Yüksek lisans tezinin kabul edildiği tarih: 10.02.2020

Önsöz

Dünyada her geçen gün diyabet hastalığı ile yaşamak zorunda kalan insan sayısı artmaktadır. Diyabete bağlı olarak gelişen komplikasyonlardan biri olan diyabetik nefropatinin yüksek mortaliteye sahip olduğu bilinmektedir. Tezimde bu önemli sağlık problemi üzerinde çalışmış olmak; zorlu bir süreç olmakla beraber saygıdeğer hocalarımın birikimi ve katkılarıyla oldukça tatminkar hissettirmektedir.

Global bir sağlık sorunu olan çalışma alanımın bende yarattığı heyecan ve coşku, ilerleyen zamanlarda gerçekleştirmeyi umduğum araştırmalar için beni teşvik etmektedir. Öğrenmek her zaman devam eden bir süreç olmakla birlikte bilim her zaman en önemli ışığımız olmalıdır. Geçmişten bugüne gelen her bilimsel çalışmanın; aydınlık gelecekler için değerli olduğunu düşünmekteyim. Tezimde bana katkıda bulunan çalışmalar gibi, gelecekte benim çalışmamın da diğer bilim insanlarına katkıda bulunması temennisiyle...

İzmir, 16.01.2020

Ecz. Kübra CANSU CANDAN

Özet

Diyabet hastalığının mikrovasküler komplikasyonlarından biri ve en önemlisi olan diyabetik nefropati (DN), diyabetli hastaların yaklaşık % 45' inde görülmekte ve son dönem böbrek yetmezliğine kadar ilerleyebilmektedir. Günümüzdeki tedavi yaklaşımları, mikrovasküler hasarlar üzerine yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle glisemik kontrolün yanı sıra, yüksek glukozla bağlı gelişen hücre hasarlarının tedavisine yönelik araştırmalar hız kazanmıştır.

Bu çalışmada, yüksek glukoz indüksiyonu ile *in vitro* diyabetik nefropati modeli oluşturulan HK-2 hücrelerinde transglutaminaz 2 (TG2) ve C-peptitin olası fonksiyonlarının incelenmesi amaçlandı.

Belirlenen koşullarda, HK-2 hücrelerinde TG2 aktivitesi ve ekspresyonu ile birlikte, hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) düzeyi, kalsiyum düzeyi, nitrit miktarı, apoptozla ilişkili parametreler ve hücre canlılığı incelendi. Ardından, C-peptit uygulamasının bu parametreler üzerine etkisi incelendi.

Yapılan çalışmalar sonucunda; DN oluşturulmuş HK-2 hücrelerinde TG2 aktivitesi ve ekspresyonunda artış ile birlikte, hücre içi ROT düzeyinde, kalsiyum düzeyinde, apoptoz parametrelerinde artma gerçekleştiği belirlendi. TG2 aktivitesi inhibe edildiğinde; hücre içi kalsiyum düzeyi, ROT düzeyi, ve apoptoz parametrelerinde azalma görüldü. Hücre canlılığında ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunda ise artma gözlemlendi. HK-2 hücrelerinde 1 nM C-peptit uygulaması ile TG2 aktivitesinin azaldığı tespit edildi. Bununla birlikte, hücre içi kalsiyum düzeyi, ROT düzeyi, apoptoz belirteçlerinde azalma; anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunda ve hücre canlılığında ise artma tespit edildi.

Sonuç olarak; yüksek glukoz indüksiyonu ile HK-2 hücrelerinde TG2 aktivitesinin ve ekspresyonunun artması, bu enzimin DN patogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir. C-peptit uygulamasının TG2 aktivitesinde azalmaya ve anti-apoptotik proteinlerde artmaya neden olması koruyucu etki olarak değerlendirilebilir. Bu sonuçlar; C-peptitin diyabetik nefropati tedavisinde umut verici bir molekül olduğunu ortaya koymaktadır.

Diyabetik Nefropatide Transglutaminaz 2 ve C-peptitin Fonksiyonlarının
Araştırılması

Anahtar Kelimeler; Diyabetik nefropati; C-peptit; Transglutaminaz 2; Apoptoz



Abstract

Diabetic nephropathy (DN), which is one of the most important microvascular complications of Diabetes Mellitus, affects nearly 45 % of people with diabetes and cause end-stage kidney disease. Current treatment approaches are insufficient on microvascular damage. Therefore, in recent years, besides the glycemic control, studies on the treatment of cell damage due to high glucose have accelerated.

In this study, it was aimed to investigate the possible functions of transglutaminase 2 (TG2) and C-peptide in human renal tubular epithelial cells (HK-2) which exposed to high glucose to realize an *in vitro* diabetic nephropathy model.

For this purpose, TG2 activity and expression, intracellular reactive oxygen species (ROS) and calcium levels, nitrite content, apoptosis related parameters and cell viability were examined under the specified conditions. Then, the effect of C-peptide treatment on these parameters was detected.

As a result of the studies; increased TG2 activity and expression were determined in high glucose-induced HK-2 cells. In addition, increased intracellular ROS, calcium, nitrite levels and apoptosis related parameters were detected. When TG2 activity was inhibited, intracellular calcium and ROS levels and apoptosis markers decreased. In addition, an increase in expression of anti-apoptotic proteins and an increase in cell viability were observed. On the other hand, C-peptide treatment was found to cause a decrease in TG2 activity and expression. However, intracellular calcium level, ROS level, and apoptosis related markers were decreased, whereas expression of anti-apoptotic proteins and cell viability were increased, in the presence of C-peptide.

In conclusion; increased TG2 activity and expression in HK-2 cells as a result of high glucose induction suggests that this enzyme plays a role in the pathogenesis of DN. The decrease in TG2 activity and increase in antiapoptotic proteins in HK-2 cells as a result of C-peptide treatment may be attributed to the protective effect of C-peptide. These results suggest that C-peptide is a promising molecule in the treatment of diabetic nephropathy.

Investigation of Transglutaminase 2 and C-peptide Functions in Diabetic
Nephropathy

Keywords; Diabetic nephropathy; C-peptide; Transglutaminase 2; Apoptosis



İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Listesi	X
Şekiller Listesi	XI
Kısaltma Listesi.....	XIII
1 Giriş.....	1
1.1 Araştırmanın Problemi.....	1
1.2 Araştırmanın Sorusu	1
1.3 Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4 Araştırmanın Varsayımları	2
1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6 Araştırmanın Amacı	2
2 Genel Bilgiler	4
2.1 Diyabetik Nefropati	4
2.2 Diyabete Bağlı Olarak Gelişen Hücresel Hasar	4
2.3 Diyabetik Nefropati	7
2.4 Transglutaminaz 2 (TG2) Enzimi	9
2.5 C-peptit	11
3 Gereç ve Yöntem.....	16
3.1 Kullanılan Gereçler	16
3.2 Kullanılan Sarf Malzemeleri	17
3.3 Kullanılan Çözeltiler.....	19
3.3.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler.....	19
3.3.2 SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözeltiler.....	20
3.3.3 İmmünoablottama Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	21
3.3.4 <i>İn Situ</i> Transamidasyon Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	21
3.4 Kullanılan Yöntemler	22
3.4.1 Hücre Kültürü	22
3.4.2 HK-2 Hücre Kültüründe Gerçekleştirilen İndüksiyonlar	23

3.4.2.1	<i>İn Vitro</i> Diyabetik Nefropati Modeli Oluşturma.....	23
3.4.2.2	Transglutaminaz 2 Aktivitesinin İndüksiyonu ve İnhibisyonu.....	24
3.4.2.3	C-peptit Uygulaması.....	25
3.4.3	SDS-PAGE Elektrofrez ve İmmünoblotlama	26
3.4.3.1	Hücrelerin Lizatlanması	26
3.4.3.2	Protein Miktar Tayini	26
3.4.3.3	SDS-PAGE Elektrofrez:.....	28
3.4.3.4	İmmünoblotlama	29
3.4.4	Griess Yöntemi ile Nitrit Miktar Tayini	29
3.4.5	MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığı Tayini.....	30
3.4.6	DCF-DA Yöntemi ile ROT Düzeyi Tayini	32
3.4.7	Hücre içi Ca ²⁺ Düzeyi Tayini	34
3.4.8	<i>İn Situ</i> Transamidasyon Deneyi	34
4	Bulgular.....	36
4.1	Standart Eğriler	36
4.1.1	Protein Miktar Tayini Standart Eğrisi	36
4.2	HK-2 Hücrelerinde Gerçekleştirilen Optimizasyon Çalışmaları	38
4.2.1	<i>İn Vitro</i> Diyabetik Nefropati Modelinin Oluşturulmasına Yönelik Çalışmalar:	38
4.2.2	Retinoik Asit Uygulaması ile TG2 Aktivitesinin İndüksiyonuna Yönelik Optimizasyon Çalışmaları	40
4.2.3	Sistamin Uygulaması ile TG2 Aktivitesinin İnhibisyonuna Yönelik Optimizasyon Çalışmaları	44
4.3	<i>İn Vitro</i> Diyabetik Nefropati Modelinde TG2'nin Fonksiyonunun İncelenmesi.....	47
4.3.1	TG2 Aktivitesi ve Ekspresyonundaki Değişikliklerin İncelenmesi	47
4.3.2	Hücre İçi Ca ²⁺ Düzeyindeki Değişikliklerin İncelenmesi	50
4.3.3	İnflamasyon (Nitrit) Düzeyindeki Değişikliklerin İncelenmesi	51
4.3.4	Hücre İçi ROT Üretimindeki Değişikliklerin İncelenmesi.....	52
4.3.5	Hücre İçi Apoptoz Belirteçlerindeki Değişikliklerin İncelenmesi	53
4.3.6	Hücre Canlılığının İncelenmesi	54
4.4	<i>İn Vitro</i> Diyabetik Nefropati Modelinde C-peptitin Fonksiyonunun Araştırılması:	55

4.4.1	C-peptitin TG2 Aktivitesi ve Ekpresyon Düzeyi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:.....	56
4.4.2	C-peptitin Hücre İçi Ca ²⁺ Düzeyi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:	58
4.4.3	C-peptitin İnflamasyon Üzerine Etkisinin İncelenmesi:	59
4.4.4	C-peptitin ROT Üretimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:	60
4.4.5	C-peptitin Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi:	61
4.4.6	Hücre Canlılığının Tayini:.....	62
5	Tartışma	64
5.1	<i>İn Vitro</i> Diyabetik Nefropatide TG2' nin Olası Rolü	66
5.2	<i>İn Vitro</i> Diyabetik Nefropatide C-peptitin Olası Fonksiyonları.....	69
5.3	<i>İn Vitro</i> Diyabetik Nefropatide C-peptit ile TG2 Arasındaki Olası ilişki	72
6	Sonuç ve Öneriler	74
7	Kaynaklar	75
8	Teşekkür.....	84
9	Özgeçmiş	85

Tablolar Listesi

Tablo 1. Diabetes Mellitus' un sınıflandırılması	4
Tablo 2. Diabetes Mellitus' a bağlı gelişen komplikasyonlar	5
Tablo 3. Diyabetik nefropatinin evreleri	7
Tablo 4. İnsülin ve C-peptitin vücutta bilinen fonksiyonlarının karşılaştırılması	14
Tablo 5. SDS-PAGE yönteminde kullanılan ayırma jeli içeriği	28
Tablo 6. SDS-PAGE yönteminde kullanılan yığınlama jeli içeriği	28
Tablo 7. BSA standart eğrisine ait ortalama absorbans değerleri	36
Tablo 8. Sodyum nitrit standart eğrisine ait ortalama absorbans değerleri	37



Şekiller Listesi

Şekil 1. TG2 enziminin katalizlediği reaksiyonlar	10
Şekil 2. C-peptit molekülünün insülin ile oluşturduğu kompleks yapı	12
Şekil 3. C-peptit molekülünün hücre içinde önerilen etki mekanizmaları.....	15
Şekil 4. HK-2 hücrelerinde standart <i>in vitro</i> DN modeli oluşturulması	24
Şekil 5. HK-2 hücrelerinde TG2 aktivitesinin standart aktivasyon ve inhibisyon uygulamaları	25
Şekil 6. Diazotizasyon reaksiyonunda, nitrozillenmiş sülfanilamidin NED ile etkileşmesi sonucu renkli azo bileşiği oluşum reaksiyonu	30
Şekil 7. MTT' nin enzimatik indirgenme reaksiyonu	31
Şekil 8. DCFH-DA molekülünün floresan DCF moleküne dönüşüm reaksiyonu	33
Şekil 9. OPD molekülünün peroksidaz enzimi ile katalizlenen reaksiyonu.	35
Şekil 10. BSA standart eğrisine ait grafik.....	36
Şekil 11. Sodyum nitrit standart eğrisine ait grafik.	37
Şekil 12. DN modelinde kullanılacak glukoz konsantrasyonunun optimizasyonuna ait IB görüntüleri	38
Şekil 13. DN modelinde kullanılacak indüksiyon süresinin optimizasyonuna ait IB görüntüleri	39
Şekil 14. Retinoik asit ile TG2 aktivitesinin arttırılmasına yönelik optimizasyon çalışmasında TG2 aktivitesine ait grafik.....	41
Şekil 15. Retinoik asit ile TG2 aktivitesinin arttırılmasına yönelik gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında TG2 aktivitesine ve protein ekspresyon düzeyine ait IB görüntüleri	42
Şekil 16. Retinoik asidin HK-2 hücre canlılığı üzerine olan etkisini gösteren grafik.	43
Şekil 17. Sistamin ile TG2 aktivitesinin inhibe edilmesine yönelik gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında TG2 aktivitesine ait grafik	44
Şekil 18. Sistamin ile TG2 aktivitesinin inhibisyonuna yönelik gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında TG2 aktivitesine ve protein ekspresyon düzeyine ait IB görüntüleri	45
Şekil 19. Sistaminin HK-2 hücre canlılığı üzerine olan etkisini gösteren grafik	46

Şekil 20. DN modelinde RA ve sistamin uygulamasının TG2 aktivitesi üzerine etkisini gösteren grafik	48
Şekil 21. DN modelinde RA ve sistamin uygulamasının TG2 aktivitesi ve protein ekspresyon düzeyi üzerine etkisini gösteren IB görüntüsü	49
Şekil 22. DN modelinde RA ve sistaminin hücre içi kalsiyum düzeyi üzerine etkisini gösteren grafik	50
Şekil 23. DN modelinde retinoik asit ve sistaminin nitrit üzerine etkisini gösteren grafik	51
Şekil 24. DN modelinde retinoik asit ve sistaminin hücre içi ROT düzeyi üzerine etkisini gösteren grafik	52
Şekil 25. DN modelinde retinoik asit ve sistaminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini ait IB görüntüleri	53
Şekil 26. DN modelinde retinoik asit ve sistaminin hücre canlılığı üzerine etkisini gösteren grafik	55
Şekil 27. DN modelinde C-peptitin TG2 enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren grafik	56
Şekil 28. DN modelinde C-peptitin TG2 protein ekspresyon düzeyi üzerine etkisini gösteren IB görüntüsü	57
Şekil 29. DN modelinde C-peptitin hücre içi Ca^{2+} düzeyi üzerine etkisini gösteren grafik	58
Şekil 30. DN modelinde C-peptitin NO_2^- konsantrasyonu üzerine etkisini gösteren grafik	59
Şekil 31. DN modelinde C-peptitin ROT üretimi üzerine etkisini gösteren grafik....	60
Şekil 32. DN modelinde C-peptitin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini gösteren IB görüntüleri	61
Şekil 33. DN modelinde C-peptitin hücre canlılığı üzerine etkisini gösteren grafik..	62

Kısaltma Listesi

AGE	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
AMPK	: 5' Adenozin Monofosfatla Aktive olan Protein Kinaz
AP	: Amonyüm Persülfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAE	: Böbrek Albuminüri Eliminasyonu
BP	: (5-Biotinamido) Pentilamin
BSA	: Bovine Serum Albumin
COX	: Siklooksijenaz
DAG	: Diaçilgliserol
DCFH-DA	: Dikloroflorosein-diasetat
DKA	: Diyabetik Ketoasidoz
DM	: Diabetes Mellitus
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DN	: Diyabetik Nefropati
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGTA	: Etilenglikol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'- Tetraasetik Asit
eNOS	: Endotelial NOS
ER	: Endoplazmik Retikulum

ESRD	: Son Dönem Renal Hastalık
FBS	: Fetal Bovine Serum
FIC	: Fosfataz İnhibitör Kokteyli
G	: Glukoz
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat Dehidrojenaz
GBM	: Glomerüler Bariyer Membran
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GPCR	: G-protein Bağlı Reseptör
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GTPaz	: Guanozin Trifosfataz
HBSS	: Hanks Balanced Salt Solution
HEPES	: Hepes Buffer Solution
HK-2	: İnsan Böbrek Proksimal Tübüler Epitel Hücreleri
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HRP	: Yaban turpu peroksidaz (Horseradish Peroxidase)
IB	: Immün Blotlama
iNOS	: İndüklenebilir NOS
KKH	: Koroner Kalp Hastalığı
M	: Mannitol
MAPK	: Mitojenle-Aktifleşen Protein Kinaz
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit

MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADPH oksidaz	: Nikatinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz
NED	: Naftil Etilen Diamin
NfKβ	: Nükler Faktör Kappa β
NG	: Normal Glukoz
NO$_2^-$: Nitrit
nNOS	: Nöronal NOS
OPD	: o-Fenilendiamin(dihidroklörür)
Ort.	: Ortalama
PARP	: Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PBS	: Fosfat Tamponu (Fosfat Buffer Saline)
PIC	: Proteinaz inhibitör kokteyli
PI3-K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PKa	: Protein Kinaz α
PKC	: Protein Kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C-beta
PVDF	: Polivinilidenflorit
RA	: Retinoik Asit
RAAS	: Renin Anjiotensin-Aldosteron Sistemi
RIPA	: RadioimmunoPrecipitation Assay Buffer

ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
S	: Sistamin
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
SOD	: Süperoksit dismutaz
S.S.	: Standart Sapma
TG2	: Transglutaminaz 2
YG	: Yüksek Glukoz
WB	: Western Blot



1 Giriş

1.1 Araştırmanın Problemi

Dünyada ve Türkiye’ de, Diabetes Mellitus hastalarında gelişen komplikasyonların başında gelen diyabetik nefropati son dönem böbrek hastalıklarının başlıca nedenidir. Diyabet hastalığı içinde bulunduğumuz yüzyılın en önemli sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2019 yılı verilerine göre 2000 yılında dünyada 151 milyon diyabet hastası bulunduğu, günümüzde ise bu sayının 463 milyona ulaştığı belirtilmiştir. Aynı raporda; 2030 yılında 578 milyon, 2045 yılında ise 700 milyon bireyin diyabetle yaşamak zorunda kalacağı tahmin edildiği bildirilmiştir. Yalnızca Türkiye’ de 43503 bireyin diyabet hastalığına bağlı komplikasyonlardan dolayı hayatını kaybettiği de kayıtlarda yer almaktadır. Diyabet hastalarında yaklaşık % 45 oranında diyabetik nefropati geliştiği ve bu hastaların yaklaşık % 10’ unun kronik böbrek yetmezliği nedeniyle hayatını kaybettiği ileri sürülmektedir. Rakamlar ve istatistiksel tahminler diyabet hastalığının her geçen gün artan prevalansını ve beraberinde getireceği komplikasyonları gözler önüne sermektedir. Son 20 yılda bu konu ile ilgili ilaç ar-ge çalışmaları ile önemli gelişmeler kaydedilmesine rağmen, diyabetik nefropatinin ilerlemesini önleyen ilaçlar sınırlı olup, yeni geliştirilen ilaçlarla da hedeflenen etkiler tam olarak elde edilememiştir. Dünya Sağlık Örgütü bu sorunun çözümü için ortak bir çaba ile farkındalık yaratılarak küresel bir hareketin gerekli olduğunu bildirmiştir. Bu kapsamda diyabetik nefropati gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve hastalığın tedavisi için yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

1.2 Araştırmanın Sorusu

C-peptidin diyabetik nefropatideki koruyucu etkisi transglutaminaz 2 ile ilişkili midir?

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Yüksek glukoz düzeyleri hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ile oksidatif stres oluşturarak apoptoza ve tübüler hasara neden olmaktadır. ROT üretimindeki artışın transglutaminaz 2 (TG2) aktivasyonu yoluyla hücrelerde apoptotik hücre ölümünü indüklediği ileri sürülmektedir. Transglutaminaz 2;

proteinlerde çapraz bağ oluşumunu katalizleyen, Ca^{+2} -bağımlı bir enzimdir. Fonksiyonu hücre türüne, stres türüne ve şiddetine göre değişen bu enzimin ekspresyonunun artışı bazen hücrelerin hayatta kalmalarını sağlarken, bazen de apoptozun başlaması ile sonuçlanmaktadır. Diğer taraftan, C-peptit, pankreasın *Langerhans* adacıklarının β - hücrelerinden insülinle beraber düşük miktarda salınan bir peptittir. Son yıllarda C-peptitin inert bir molekül olmayıp, hücrelerin sinyal yollarında fizyolojik roller oynadığı kabul edilmektedir. Aynı zamanda, C-peptitin hücreleri apoptozdan koruyabileceği ileri sürülmektedir. Bu çalışmada, diyabetik nefropati modelinde yüksek glukozla oluşturulacak hasarda TG2 aktivitesi ve enzim düzeylerindeki değişiklikler saptanarak TG2'nin bu patolojideki rolünün belirlenmesi ve C-peptitin olası koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.4 Araştırmanın Varsayımları

Çalışma konusuyla ilgili olarak literatürde sadece bir yayında; C- peptitin insan umbilikal ven endotel hücre hattında (HUVEC) hiperglisemi ile indüklenen apoptozu TG2 aktivitesini inhibe ederek önlediği ve koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu etkiyi böbrek tübüler epitel hücrelerinde de gösterebileceği varsayımıyla HK-2 hücrelerinde yüksek glukozla indüklenen apoptozda TG2' nin rolü ve C-peptitin etkisi araştırılmıştır.

1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma planında yer alan, hücre içi inflamasyon yolları ile ilişkili bazı parametrelerin sonuçları tekrarlanabilirlik açısından tutarlılık göstermemiş olup, çalışmanın bulgularına dahil edilmemiştir.

1.6 Araştırmanın Amacı

Diyabetik nefropati; diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından biri olup, tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarının yaklaşık % 45' inde gelişen, son dönem böbrek yetmezliğine neden olan diyabete özgü bir böbrek hastalığıdır. Hiperglisemi; ROT artışı, PKC, TGF- β 1 ve G-protein sinyalizasyonunun aktivasyonu ve çeşitli proteinlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri nedeniyle diyabetik nefropati gelişiminde son derece önemli bir rol oynamaktadır. Bu komplikasyonun patogeneğinde yer alan

mekanizmaların aydınlatılması için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Elde edilen bulgularda oksidatif stres, renin-angiotensin sistemi, TGF- β , protein kinaz C, TNF- α , NF-kB artışı ve apoptotik olaylar DN ile yakın ilişkili bulunmuştur.

Hipergliseminin indüklediği apoptotik hücre ölüm yollarında aktive olan moleküllerden biri de TG2' dir. Son yıllarda, TG2' nin oksidatif stres, apoptoz, hücre adezyonu ve inflamatuvar yanıtlar gibi hücresele olaylar ile ilişkisi olduğu ileri sürülmüştür. Oksidatif stres varlığında, hücrelerdeki TG2 aktivitesinin artışının stres türüne, şiddetine ve süresine bağılı olarak değişiklik gösterdiği ileri sürülmüştür. TG2' nin hücrelerde pro-apoptotik veya anti-apoptotik etkileri olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Ancak, DN gelişiminde TG2' nin fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Diğer taraftan, diyabetik komplikasyonların önlenmesi, hipergliseminin kontrolü ile yani, Tip I diyabette düzenli insülin tedavisi ile, Tip II diyabette ise oral hipoglisemik ajanlarla gerçekleştirilmektedir. Ancak bugüne kadar, diyabetik komplikasyonların önlenmesinde tek başına glisemik kontrole yönelik tedavi çabaları başarılı olamamıştır. Diyabet sonucunda gelişen organa özgü hasarları önlemek için, bu komplikasyonların patogeneğinde yer alan etiyolojik faktörlere yönelik spesifik tedavi stratejilerine gereksinim duyulmaktadır. Bu kapsamda araştırılan moleküllerden birisi de C-peptittir. C-peptit; diyabetin komplikasyonlarının önlenmesinde etkili olduğu ileri sürülen bir biyoaktif peptittir. Çeşitli çalışmalarda, endotel hücrelerinde yüksek glukoz ile indüklenen apoptotik hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir. C-peptidin anti-apoptotik etkisi ile ilişkili öne sürülen mekanizmalardan biri de TG2 ile ilişkili olan transamidasyona bağılı bir mekanizmadır.

Bu çalışmada, yüksek glukoz uygulaması ile *in vitro* diyabetik nefropati modeli oluşturulan HK-2 hücrelerinde TG2 transamidasyon aktivitesi ve ekspresyonundaki değişiklikler ile C-peptitin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2 Genel Bilgiler

2.1 Diyabetik Nefropati

Diabetes Mellitus (DM); insülin etkisindeki ve/veya sekresyonundaki kusurlardan kaynaklanan kronik hiperglisemi ve glukoz intoleransı ile karakterize metabolik bir sendromdur (Sagoo & Gnudi, 2018). Amerikan Diyabet Derneğinin 2017' de yayınlanan yeni diyabet sınıflandırmasına göre 4 tip diyabet mevcuttur (Tablo 1).

Tablo 1. Diabetes Mellitus' un sınıflandırılması (Taslipinar, Corakci, Kaya, & Uysal, 2017).

Diyabet Tipleri	Genel Özellikleri
<i>Tip 1 DM</i>	Otoimmün β hücre hasarı, genellikle mutlak insülin eksikliği görülür. Doğuştan gelen diabetes mellitustur.
<i>Tip 2 DM</i>	35 yaş sonrası başlar, sıklıkla insülin direnciyle başlayan ve geç dönemli insülin sekresyon kaybı görülür. DM' un en sık görülen tipidir. (~% 90)
<i>Tip 3 Gestasyonal D.</i>	Gebeliğin 2. veya 3. trimesterinde tanısı koyulan, gebelik öncesinde belirtisi olmayan DM.
<i>Tip 4 Spesifik D.</i>	Ekzokrin pankreas hastalıkları (kistik fibroz gibi), İlaç ve kimyasallara bağlı gelişen diyabet, Monogenik diyabet sendromları (yenidoğan diyabeti, ergenlik dönemi diyabeti (MODY) gibi), vb.

Dünya Diyabet Federasyonunun 2019 raporuna göre; dünyada 2000 yılında 151 milyon diyabetli varken bugün 463 milyon diyabet hastası mevcuttur (IIDF, 2015). Aynı raporda; 2030 yılında 578 milyon, 2045 yılında ise 700 milyon bireyin diyabetle yaşamak zorunda kalacağı da tahminleri bildirilmiştir (IIDF, 2015). Yalnızca Türkiye' de diyabete bağlı komplikasyonlardan hayatını kaybeden 43503 birey bildirilmiştir (IIDF, 2015). Rakamlar ve istatistiksel tahminler diyabet hastalığının her geçen gün artan prevalansını ve beraberinde getireceği komplikasyonları gözler önüne sermektedir.

2.2 Diyabete Bağlı Olarak Gelişen Hücresel Hasar

DM' de; kanda yükselen glukoz, hücrelerde ve dokularda ciddi hasar gelişimine neden olur. Hiperglisemiye karşı fizyolojik hücresel yanıt mekanizmaları devreye girer.

Hiperglisemi ile birlikte hücre içi sinyal moleküllerinin aktivasyonu, oksidatif stres gelişimi, büyüme faktörleri, sitokinler ve renin anjiotensin sistemi nefropati oluşumunda rol oynamaktadır (Gross et al., 2005). Reaktif oksijen türleri; normal oksijen metabolizmasının ürünleridir ve hücre sinyali, yaşlanma, dejeneratif hastalık gibi süreçlerde rol oynarlar (Sagoo & Gnudi, 2018). Yüksek glukozun en önemli etkisinin oksidatif stresi artırarak hücre hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Hinokio et al., 1999). Hiperglisemi ve artan oksidatif stresle beraber gelişen diyabetin mikro ve makrovasküler komplikasyonları hastalığın seyrinde önemli birer mortalite ve morbidite sebepleridir (Tablo 2) (Sagoo & Gnudi, 2018). Epidemiyolojik çalışmalara göre diyabetik ölümlerin ana nedeni hiperglisemiye bağlı gelişen vasküler hastalıklardır (Asmat, Abad, & Ismail, 2016).

Tablo 2. Diabetes Mellitus' a bağlı gelişen komplikasyonlar (Asmat et al., 2016; Sagoo & Gnudi, 2018).

Akut Komplikasyonlar (Metabolik)	Kronik Komplikasyonlar (Sistemik)
Enfeksiyonlar Diyabetik Ketoasidoz (DKA) Ketonik Olmayan Koma Polidipsi, Poliüri Bulanık Görme	Körlük Ateroskleroz Enfeksiyona Bağlı Amputasyon Serebrovasküler Hastalık Polinöropatiler
Mikrovasküler Komplikasyonlar	Makrovasküler Komplikasyonlar
Diyabetik Nefropati (DN) Diyabetik Retinopati Diyabetik Nöropati	Koroner Kalp Hastalığı (KKH) İskemik İnme Periferik Vasküler Hastalık

Diyabet sürecinde çeşitli mekanizmalarla oksidatif stres gelişmektedir (Asmat et al., 2016). Bu mekanizmalar; nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aktivasyonu, mitokondriyal oksidatif stres, ksantin oksidaz aktivasyonu, siklooksijenaz (COX) ve eNOS ayrışması olarak tanımlanmıştır (Sagoo & Gnudi, 2018).

NADPH oksidaz; elektronları hücre zarı boyunca taşıyan, oksijeni süperoksit indirgeyen farklı enzimlerin birleşmesi ile oluşur. Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1, Duox2 alt birimlerinden oluşmuştur. NADPH oksidaz; büyüme faktörleri, sitokinler, G-protein bağlı reseptör agonistler (anjiotensin II gibi) ve fiziksel uyarımlar

(yüksek glukoz, AGE, lipitler, vb.) ile aktive edilir. Deneysel diyabet modelleri; yüksek glukoz ve serbest yağ asitlerinin dolaşımdaki seviyelerinin NADPH oksidazın güçlü aktivatörleri olduğunu göstermiştir. NADPH oksidaz ile DN patogenezi arasındaki korelasyon deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur (Sagoo & Gnudi, 2018). *Mitokondriyal oksidatif stres*; Hücrelerde hücrel oksidatif stresin ana belirleyicisi olan glukozun hücrelere taşınması ile mitokondride ATP üretimi gerçekleşir. Hiperglisemi ile mitokondriyal süperoksit birikimi; mitokondride fonksiyon bozukluğuna yol açar. Mitokondriyal DNA hasarı gerçekleşir ve DNA onarım enzimi olan poli-ADP-riboz polimerazın (PARP) aktive olmasına yol açar. PARP aktivasyonu ise ADP-ribozun birikmesine neden olarak gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazın (GAPDH) inhibisyonuna neden olur. GAPDH' ın inhibisyonu; protein kinaz C (PKC) aktivasyonu üzerinden hücrel cevap oluşturur. Transkripsiyon faktörü olan Nfk β 'nin aktivasyonu ile hücre hasarı gerçekleşir. Ayrıca PKC aktivasyonu; glukoz artışı ile indüklenen polyol yolu üzerinden üretilen sorbitolün artışı ile de aktive edilmektedir (Sagoo & Gnudi, 2018).

eNOS ayrışması; Nitrik oksit, L-argininden sitrüllin oluşumu sırasında oluşan bir ara üründür. Bu reaksiyon nitrik oksit sentaz (NOS) izoenzimleri tarafından katalizlenir. Nitrik oksit sentaz (NOS); indüklenebilir NOS (iNOS), nöronal NOS (nNOS) ve endotel NOS (eNOS) olarak üç ana izoforma sahiptir (Kashihara, Haruna, K. Kondeti, & S. Kanwar, 2010). Tüm izoformlar böbrek dokularında da bulunur. Hem nNOS hem de eNOS yapısal formlardır, ancak iNOS indüktif formdadır (Kashihara et al., 2010). Metabolik ve hemodinamik bozulmalar eNOS' un nitrik oksit (NO) üretme kabiliyetini değiştirdiğinde, eNOS süperoksit üretimine neden olmaktadır. Diyabette; eNOS aracılı NO oluşumundan kaynaklanan endotel eNOS ayrışması gerçekleşerek süperoksit üretim yeteneği gerçekleşir (Sagoo & Gnudi, 2018).

Ksantin oksidaz aktivasyonu; Ksantin oksidaz ve ksantin dehidrojenaz ekspresyonu; hücre içi hidrojen peroksit miktarıyla yakından ilgilidir. Ksantin oksidaz; süperoksit ve ürik asit üretmek için substrat olarak hipoksantin veya ksantini, elektron alıcısı olarak ise oksijeni kullanır. Ürik asit ise aşırı oksidatif stres üretimini destekleyerek inflamatuvar süreçleri ilerletir ve hücre ölümüne neden olur (Sagoo & Gnudi, 2018).

Siklooksijenaz (COX); Memeli hücrelerinde iki ana COX izoformu tanımlanmıştır. 'Kurucu' COX1 ve inflamatuvar aracılı COX2 izoformları bilinmektedir. COX-2 serbest radikallerin kaynağı olmakla beraber artan aktivitesi diyabetik kültür

hücrelerinde; artan reaktif oksijen türlerinin üretimi ve apoptoz ile ilişkili bulunmuştur. Aktivitesi yaşla beraber arttığı için yaşlanmadaki rolü ön plana çıkmaktadır (Sagoo & Gnudi, 2018).

Bütün bu temel oksidatif stres kaynakları; diyabette beraber çalışarak antioksidan mekanizmanın yetersiz kaldığı ve inflamasyonla başlayıp apoptoz ile biten süreci temsil eder.

2.3 Diyabetik Nefropati

Diyabetin en ciddi mikrovasküler komplikasyonlarından biri olan diyabetik nefropati; tüm diyabet hastalarının yaklaşık % 45' inde görülmektedir (Sagoo & Gnudi, 2018; Taslipinar et al., 2017). Renal replasman tedavisine başlayan hastalarda böbrek hastalığının en önde gelen nedenidir. Diyabetik nefropati; tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarında kardiyovasküler nedenlerden dolayı ölüm riskini arttıran bir hastalıktır (Gross et al., 2005). Diyabetik nefropati; glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ve idrar albuminüri atılımına (BAE) dayanan 5 temel aşama ile seyreder (Tablo 3) (Brunskill, 2017).

Tablo 3. Diyabetik nefropatinin evreleri (Brunskill, 2017).

1. Evre	Glomerüler hiperfiltrasyon ve hipertrofi gelişir.
2. Evre	Mikroalbuminüri olmadan böbrekte yapısal değişiklikler izlenir.
3. Evre	Mikroalbuminürinin görüldüğü dönemdir. Yeni başlayan DN dönemi olarak idrarda günlük 30-300 mg albumin saptanır.
4. Evre	Aşık proteinüriyle beraber ilerleyici renal fonksiyon bozukluğu görülür. İdrarda günlük > 300 mg albumin saptanır.
5. Evre	Son Dönem Renal Hastalık (ESRD) denilen kronik böbrek yetmezliğinin gerçekleştiği dönemdir. Hastalar diyaliz tedavisi alırlar.

Hiperglisemi, hipertansiyon, genetik yatkınlık, yüksek serum lipitleri, sigara içme alışkanlığı, diyet protein miktarı ve kaynağı diyabetik nefropati gelişimi için hastalarda önemli risk faktörlerini oluşturur. Patolojik olarak diyabetik nefropati gelişmiş olan böbrekte; glomerüloskleroz, glomerüler bazal membran genişlemesi, yaygın mesangial skleroz, hyalinoz, mikroanevrizma ve hiyalin arteriyosklerozu görülür (Gross et al., 2005).

Diabetes Mellitusta; hiperglisemi ve hiperlipidemi gibi metabolik değişiklikler ile sistemik hipertansiyon, glomerüler hipertansiyon ve lokal glomerüler anjiyotensin II artışı gibi hemodinamik değişiklikler diyabetik nefropati oluşumunda önemlidir (Sagoo & Gnudi, 2018).

Diyabetik nefropatide oksidatif stresin en çok etkilediği ve albuminüri gelişimine neden olan bölüm glomerüler filtrasyon bariyeridir (GFB). Podositler, glomerüler bazal membran (GBM) ve glomerüler endotel hücrelerden oluşan GFB; sağlıklı hastalarda glomerülün geçirgen fonksiyonunun korunmasından sorumludur. Ancak GFB yapısının bozulması glomerüler geçirgenliği değiştirerek albuminüri gelişimine neden olur. GFB yapısının bozulması; DN' nin bilinen en eski belirteçlerinden biri olup; albuminüri ile doğru orantılı olarak bozulma gerçekleşir (Sagoo & Gnudi, 2018). ESRD' ye doğru ilerlemede GFB önemli bir prediktördür. Diyabetik ortamda podositlerin yapısı ve fonksiyonu bozulur, GBM' de kalınlaşmalar görülür. Ayrıca glomerüler endotel hücrelerin yapısında bulunan glikokaliks tabakası oksidan türler için ana hedeftir (Sagoo & Gnudi, 2018).

Oksidatif stresle diyabet arasında tanımlanmış ilişki diyabetik nefropatide de bildirilmiştir. Deneysel çalışmalarda hem glomerulusta (podositlerde, endotel hücrelerde, mezengial hücrelerde) hem de tübüler hücrelerde NADPH oksidaz aktivitesinin artışı ile artan ROT' a bağlı hasar tanımlanmıştır (Gill, P.S. Wilson, 2006). Ayrıca hiperglisemi ile aktive olan lokal doku renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS)' de; NADPH oksidazı ve ROT oluşumunu aktive etmektedir (Sagoo & Gnudi, 2018). Deneysel diyabetik hayval modellerinde; diyabetik sıçanların böbreklerinde anormal şekilde ksantin oksidaz aktivitesi ve oksidatif stres ile DN gelişimi gözlenmiştir (Liu, Wang, Liu, Lu, & Cheng, 2015). Ayrıca diyabetik hayvan deneylerinde; COX-2 aracılı oksidatif stresin, toplam böbrek oksidan tür üretiminin % 20-30' unu yansıttığı belirlenmiştir (Kiritoshi et al., 2003).

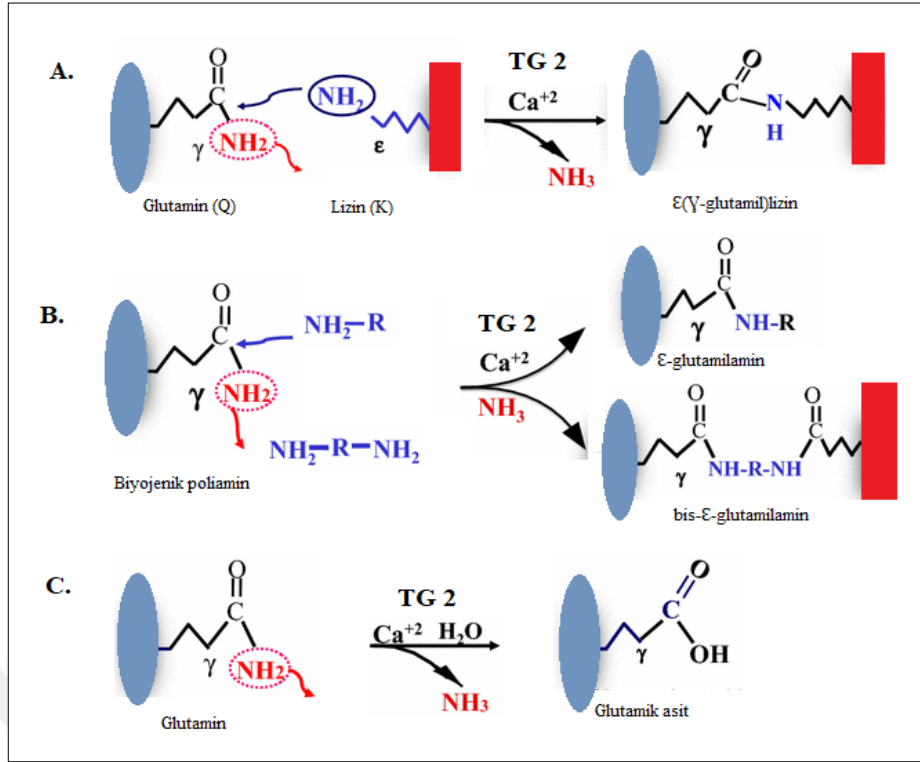
Sağlıklı bir hücrede; hücre dışı Ca^{2+} konsantrasyonu, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonuna göre 10^4 daha fazladır (Pan et al., 2018). Ca^{2+} 'un hücre içi ve dışı konsantrasyonundaki denge; Ca^{2+} -ATPaz, Na^{+2}/K^{+} -ATPaz enzimleri ve Na^{+}/H^{+} , Na^{+}/Ca^{+} değiştirici sistemler ile sağlanır (Onyekachi, 2014). Bu mekanizmalardan herhangi birinin değişikliğe uğraması sonucu hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda azalma veya artış gerçekleşir. Diyabetik nefropatide hiperglisemiye bağlı olarak bozulan mekanizmadan dolayı hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artar (K. Chen et al., 2013; Kashihara et al., 2010;

Pan et al., 2018). Diyabetik nefropatinin renin-anjiyotensin II sistemi ile kan basıncı ve koroner arter hastalığı üzerine olan etkileri; kalbin elektiriksel ve mekaniksel aktivitesinin, özellikle Ca^{2+} dengesinden sorumlu proteinlerin düzeylerinde ve fonksiyonlarında ortaya çıkan değişimlerle azaldığı bildirilmiştir (Rodrigues, Cam, & McNeill, 1998). Koroner arter hastalığının prevalansı diyabetli erişkinlerde yaklaşık % 55 civarındadır (Ali, Narayan, & Tandon, 2010). Diyabetli bireylerde böbrekten sodyum ve su geri emiliminin artışı, sempatik sinir sistemi aktivitesinin uyarılması, vazodilatör prostaglandinlerin sentezinin azalması, vazodilatasyonun bozulması ve endotel hasarı hipertansiyona yol açan mekanizmalar olarak bildirilmiştir (Baldeweg & Yudkin, 2003). Bu bulgular diyabetik nefropatinin önlenmesiyle kardiyak miyopatide de iyileşmeler sağlanabileceğini göstermektedir.

2.4 Transglutaminaz 2 (TG2) Enzimi

Transglutaminaz 2; proteinlerin çapraz bağlarını oluşturmak için Ca^{2+} -bağımlı açıl-transferaz reaksiyonunu katalizlediği bilinen tanımlanmış dokuz transferaz enzim ailesinden biridir (Onyekachi, 2014) . Yapısal olarak 4 bölgeden (domain) oluşur (Szondy, Korponay-Szabó, Király, Sarang, & Tsay, 2017).

Transglutaminaz ailesinin en çok çalışılan, bilinen en işlevsel bireyidir; çünkü GTPaz, protein disülfür izomeraz ve protein kinaz aktivitelere de sahiptir (Şekil 1). Ayrıca TG2 sitoplazma, mitokondri, endozom ve çekirdek gibi hücrelerin çoğu elemanlarında eksprese edilmektedir (Szondy et al., 2017). Hücrelerde çoğalma, büyüme, farklılaşma, sinyal iletimi ve apoptoz gibi hücrel işlevlerde rol alarak; çeşitli hastalıkların patogenezinde yer aldığı bildirilmiştir (Tatsukawa, Furutani, Hitomi, & Kojima, 2016). TG2; hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik etki gösterebilen multifonksiyonel bir enzimdir (Fésüs & Szondy, 2005). TG2; G-protein bağımlı reseptöre bağlandığında transamidasyon reaksiyonunu katalizlemesini önleyen kompakt konformasyona dönüşmekte ve hücrelerin sağkalımını sinyallemektedir. Ancak Ca^{2+} a bağlanması durumunda 'açık' konformasyona dönüşmekte ve hücre ölümünü sinyalize etmektedir. Stres koşullarında TG2 ekspresyonunun artışı hücrelerin hayatta kalmalarını sağlamakta iken; stresin aşırı artması ise mutasyon birikiminden kaçınmak için TG2' nin apoptozu başlatması ile sonuçlanmaktadır (Agnihotri & Mehta, 2016).



Şekil 1. TG2 enziminin katalizlediği reaksiyonlar A. Çapraz bağlanma reaksiyonu B. Aminasyon reaksiyonu C. Deaminasyon reaksiyonu (Lai, Lin, & Greenberg, 2017).

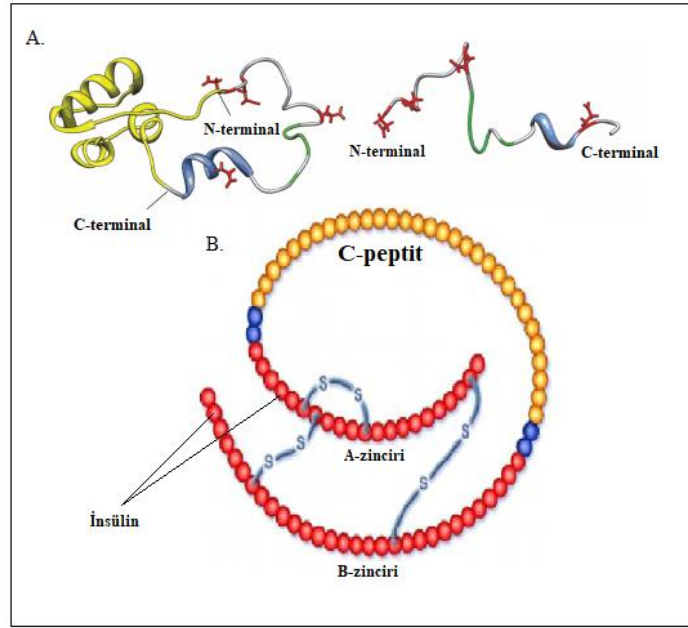
Günümüzde TG2' nin birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığı çalışmalarla gösterilmiş, oldukça aktif ve çeşitli fonksiyonlara sahip olduğu belirtilmiştir (Agnihotri & Mehta, 2016). TG2' nin anti-apoptotik rolünün yanı sıra hala tartışmaları devam eden pro-apoptotik rolünün de varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir (Tatsukawa et al., 2016). Nörodejeneratif hastalıklarda kesin deneysel bulgular elde edilmemiş olsa da TG2 aktivitesinin hastalık süreciyle arttığı, TG2 inhibisyonunun terapötik bir hedef olabileceğini öneren çalışmalar yayınlanmıştır (Szondy et al., 2017). Bunun yanı sıra karaciğer hasarında TG2' nin oluşan hasarın kaynağına ve şiddetine göre hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik özellik gösterdiği bildirilmiştir (Tatsukawa et al., 2016). Kan damarlarının oluşumu ve stabilitesi incelendiğinde TG2' nin önemli pozitif rollere sahip olduğu belirlenmiştir (Tatsukawa et al., 2016). Çölyak hastalığının patogeneğinde ise TG2' ye karşı gluten varlığında üretilen otoantikor nedeniyle hastalığın seyrinde ilerleme gerçekleştiği kanıtlanmıştır (Szondy et al., 2017). Ayrıca TG2' nin taspigargin ile indüklenen apoptoz durumunda kaspaz 3 enzimini çapraz bağlayarak inhibe ettiği, bu yolla hücreyi apoptozdan korumaya yöneldiği gösterilmiştir (Cho et al., 2012). Kanser hücrelerindeki

çalışmalarda; çoklu ilaca dirençli metastatik kanser hücrelerinde TG2' nin ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Agnihotri & Mehta, 2016). Bu farklı hastalıklar üzerine yapılan çalışmalar ve çelişkili bulunan sonuçlar; TG2' nin çeşitli hücre tiplerine, stres kaynağına, süresine ve şiddetine göre farklı yanıtlar verdiğini göstermektedir (Beninati, Piacentini, & Bergamini, 2017; Kumar, Donti, Agnihotri, & Mehta, 2014; Zhang, Lesort, Guttmann, & Johnson, 1998).

TG2' nin pankreas β hücrelerinden glukoz ile uyarılan insülin salınımı için gerekli olan membran aracılı mekanizmada yer aldığı belirtilmektedir (Tatsukawa et al., 2016). Bunun yanında TG2' nin diyabetik retinopati ve nefropatide artmış aktivitesinin ROT artışına bağlı olarak hücreleri apoptoza götürdüğü düşünülmektedir (Beninati et al., 2017; Tatsukawa et al., 2016). Ancak daha ileri çalışmalar yapılarak TG2 fonksiyonlarının anlaşılması, bazı hastalıklarda inhibe edici bazı hastalıklarda aktive edici moleküllerle tedaviyi mümkün kılabilir.

2.5 C-peptit

C-peptit; $C_{112}H_{179}N_{35}O_{46}$ formülüne sahip, molekül ağırlığı 2751,8 g/mol olan, 31 amino asitten oluşan bir peptittir. Yapısındaki amino asit dizilimi; 'H- Glu-Gly- Glu- Asp- Gly- Gln- Val- Gly- Gln- Gly- Glu- Leu- Gly- Gly- Gly- Pro- Gly-Ala- Gly- Gly- Leu- Gln- Gly- Leu- Ala- Leu- Glu- Gly- Gly- Gly- Gln- OH' şeklindedir ("U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information," n.d.). Pankreasın *Langerhans* adacıklarında yer alan β - hücrelerinde insülin biyosentezi sırasında üretilir ve insülin hormonunun zincirlerini birbirine bağlayarak proinsülin formunu oluşturan önemli bir bileşendir (Şekil 2) (Landreh, Johansson, Wahren, & Jörnvall, 2014; Landreh & Jörnvall, 2015). İnsülin ile beraber β hücrelerinden eşit oranda salınır fakat insüline kıyasla C-peptit dolaşımında daha uzun bir yarı ömre sahiptir (Bhatt, Lim, & Ha, 2014). C-peptit ilk kez 1967 yılında Steiner ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (Steiner, Cunningham, Spigelman, & Aten, 1967). Sağlıklı bireylerde; kan dolaşımında C-peptit ve insülin eşit oranlarda bulunurken, diyabetli bireylerde aynı insülin gibi az miktarda veya hiç yoktur (Luppi & Drain, 2016; John Wahren & Larsson, 2015).



Şekil 2. C-peptit molekülünün insülin ile oluşturduğu kompleks yapı *A. Üç boyutlu proinsülin ve C-peptit yapısı, B. Proinsülinin amino asit sayısına göre çizilmiş temsili gösterimi* (Akinlade, Ogbera, Fasanmade, & Olamoyegun, 2014; Landreh et al., 2014).

Keşfinden sonraki süreçte C-peptitin; yalnızca insülin salınımı sırasında görev alan, başka herhangi bir fizyolojik etkisi olmayan bir protein olduğu düşünülmüştür. Ancak yeni çalışmalarda gerçekleşen yeni keşifler C-peptitin; β hücrelerinin iyi bir biyobelirteçi olmasının yanında çeşitli hücrelerde önemli fizyolojik görevleri olan biyoaktif bir peptit olduğunu göstermiştir (Brunskill, 2017; Luppi & Drain, 2016). Çalışmalar genelde C-peptitin oksidatif stres kaynaklı gerçekleşen hücre hasarındaki rolüne odaklanmıştır. Hücrelerde endojen veya eksojen kaynaklı artan serbest radikallerin oluşturduğu ROT artışının bazal seviyelere çekilebilmesi için birincil hücresel savunma; antioksidan enzimlerin (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, vb.) süperoksit radikallerini H_2O_2 ' ye dönüştürerek detoksifiye etmesidir (M. Jiang et al., 2017; Luppi & Drain, 2016). Ancak oksidatif stres kaynağına bağlı ROT artarsa ve hücre adaptif mekanizma yetersiz kalırsa; ROT artışı hücresel başka bir savunma mekanizması olan apoptoz ile sonuçlanır. β hücrelerinde antioksidanların bazal ekspresyonlarının düşük olmasından dolayı bu hücreler oksidatif strese çok duyarlıdır (Brunskill, 2017; Luppi & Drain, 2016). 2007 yılında, Bugliani ve arkadaşları; C-peptitin anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2' yi indükleyerek *Langerhans* adacıklarının β - hücrelerinde apoptozu azalttığını gösteren ve böylece C-peptitin biyoaktif bir madde olduğunu kanıtlayan ilk kişidir (Balducci, Stefano,

Sacchetti, Massimo, Haxhi, Jonida..., Pugliese, 2007). Bu önemli gelişmenin ardından C-peptit molekülünün antioksidan ve anti-apoptotik özellik gösterebileceği düşünülmüştür (Brunskill, 2017). İnsan C-peptit yapısı aydınlatıldıktan sonra diyabet hastalarının klinik yönetiminde kan-idrar C-peptit seviyelerini tespit edebilmek için immünolojik testler geliştirilmiştir. Tip 2 diyabetin erken evrelerinde insülinle birlikte fizyolojik konsantrasyonun üzerinde salgılandığı keşfedilmiştir (Bhatt et al., 2014). C-peptitin bağlanması tam doygunluğu ve fizyolojik serum konsantrasyonu 0,9 nmo/L olarak belirlenmiştir (John Wahren, Kallas, & Sima, 2012). Bu nedenle sağlıklı normal C-peptit serum değerine sahip bireylerde replasman tedavisinde bir değişiklik gözlenmemiştir (John Wahren et al., 2012). Yapılan çalışmalarda tek başına insülin verilmesinin diyabetli hastalarda gerçekleşen mikrovasküler hasar üzerine başarısız olduğu görülmüş, C-peptit ve insülinin kombine tedavisinde; insülin hiperglisemiye düzeltirken C-peptit mikrovasküler hasarlar üzerine olumlu etkiler göstermiştir (Tablo 4) (Bhatt et al., 2014; John Wahren et al., 2012). Böylece C-peptit replasman tedavileri hız kazanmış, hayvan deneyleri ile etkileri anlaşılmasına çalışılmıştır. İnsülinle kombine verilen C-peptit; hayvan çalışmalarında mikrovasküler komplikasyonlar olan nefropati, retinopati ve nöropati üzerine anlamlı iyileşmeler göstermekle beraber diyabetik vaskülopatiye olan olumlu etkileri ile diyabete bağlı koroner arter hastalığı için önemli bir tedavi seçeneği sunmaktadır (Bhatt et al., 2014; Luppi & Drain, 2016; John Wahren et al., 2012). Endotel hücreleri üzerine yapılan çalışmalar, C-peptitin etkileri için önemli gelişmelere neden olmuştur. Henüz farklı hedefler üzerine C-peptitin anti-inflamatuar etkisinin altında yatan mekanizmalar tam açıklanamasa da sonuçlar umut vadetmektedir. Endotel hücrelerde ROT artışı ile indüklenen hücresel inflamasyon yanıtının sonucu olarak gelişen apoptoz üzerine, C-peptitin ROT' u baskılayarak gerçekleştirdiği apoptoz inhibisyonu bildirilmiştir (Luppi & Drain, 2016). Ayrıca endotel hücrelerde, NADPH oksidazı inhibe ederek, protein kinaz a aktivitesi ile oksidatif strese bağlı oluşan ROT artışını baskıladığı gösterildi (Cifarelli et al., 2011; Luppi & Drain, 2016). C-peptitin, endotel hücrelerinde nitrik oksit salınımını konsantrasyon ve zamana bağlı olarak arttırdığı, hızlı başlayan bu etkinin kalsiyum içermeyen ortamda gerçekleşmediği gözlenmiştir (John Wahren & Larsson, 2015). Ayrıca akciğer ve aort endotel hücrelerinin C-peptide maruz bırakılması ile eNOS mRNA ve eNOS protein ekspresyonlarının MAPK' ya bağlı transkripsiyonel aktivasyon yoluyla arttığı gözlenmiştir (Şekil 3) (John Wahren & Larsson, 2015).

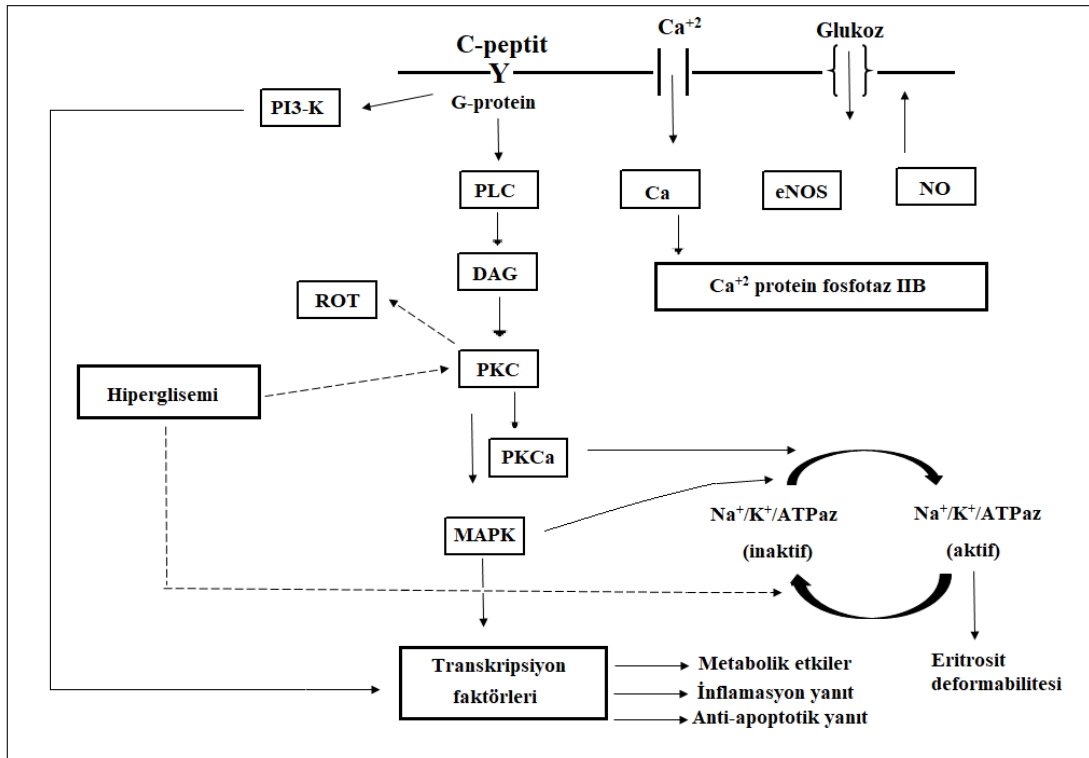
Ayrıca endotel hücrelerinde de β hücrelerinde gösterildiği şekilde; C-peptit varlığında Bcl-2 ekspresyonunun arttığı, kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı ve apoptozun baskılandığı gösterilmiştir (Cifarelli et al., 2011; John Wahren & Larsson, 2015).

Tablo 4. İnsülin ve C-peptitin vücutta bilinen fonksiyonlarının karşılaştırılması (Bhatt et al., 2014).

Fonksiyonu	İnsülin	C-peptit
Diyabetik komplikasyonlar	Etkisiz	Olumlu Etki
Glukoz alımı	Temel etki	İndirekt etkili
AMPK salınımı	İnhibisyon	Aktivasyon
ROT üretimi	Aktivasyon	İnhibisyon
Na ⁺ /K ⁺ /ATPaz	Aktivasyon etkili Ekspresyona etkisiz	Aktivasyon etkili Ekspresyona etkili
NO üretimi	Aktivasyon	Aktivasyon
İnflamasyon	İnhibisyon	İnhibisyon

C-peptitin insülinle bazı ortak sinyal yollarını kullandığı düşünülmüş, ancak yeni gelişmelerle birlikte belirli bir G-protein bağlı reseptör (GPCR) yoluyla kendine özgü sinyalizasyon yolları olduğu görülmüştür (Hills & Brunskill, 2009). Sağlıklı hücrelerde C-peptit molekülü hücre zarında G-proteine bağlanarak kalsiyum kanallarının açılmasına ve hücre içine kalsiyum girişine neden olmaktadır (John Wahren et al., 2000). Na⁺/K⁺/ATPaz enzimini aktifler ve hücre içi eNOS' u uyararak nitrik oksit düzeyinde artışa neden olur (Hills & Brunskill, 2009; John Wahren & Larsson, 2015). Yüksek glukozdan etkilenmiş endotel hücrelerde ve eritrositlerde C-peptitin azalmış Na⁺/K⁺/ATPaz aktivitesini ve hücre içi azalmış eNOS ekspresyonunu arttırdığı çalışmalarla gösterilmiştir (Balducci, Stefano, Sacchetti, Massimo, Haxhi, Jonida,... Pugliese, 2007; Bhatt vd., 2014; J. Wahren, 2017; John Wahren vd., 2012; John Wahren & Larsson, 2015). Ancak diyabetik nefropatide böbrek hücrelerindeki etkisi bu kadar net belirlenmemiştir; yapılan çalışmaların bazıları Na⁺/K⁺/ATPaz ve eNOS aktivitelerinin C-peptit varlığında endotel hücrelerdeki gibi arttığını bazıları ise şaşırtıcı bir şekilde aktivitelerini inhibe ederek diyabet komplikasyonlarından hücreleri koruduğunu iddaa etmektedir (Balducci, Stefano, Sacchetti, Massimo, Haxhi, Jonida,...Pugliese, 2008; Cifarelli vd., 2011; Nordquist, Brown, Fasching, Persson, & Palm, 2009; John Wahren vd., 2012; John Wahren & Larsson, 2015). Bu karşıt görüşlerin önemli ortak söylemleri diyabetik nefropatide C-peptitin glomerüler

hiperfiltrasyonu, albuminüriyi, böbrek hipertrofini azalttığı ve glomerüler hacmi normalize ettiği kanısındır. Replasman tedavilerinin yanı sıra çalışılan hücre çalışmalarında Brunskill; böbrek glomerüler hücrelerinde NOS ekspresyonu üzerinde C-peptitin olumlu etkilerini göstermiştir (Brunskill, 2017). Şimdiye kadar incelenen birçok hücre türü arasından böbrek tübüler hücrelerinin en fazla sayıda C-peptit bağlanma bölgesi içerdiği belirlenmiştir (Hills & Brunskill, 2009). Bu nedenle HK-2 hücreleri üzerinde C-peptit molekülünün önemli etkileri olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda HK-2 hücrelerinin yüksek glukoza maruz bırakılmasından sonra gerçekleşen hasarlar; C-peptit uygulaması ile TG2 üzerinden baskılanabilir mi sorusunu sorduk ve cevabını araştırdık.



Şekil 3. C-peptit molekülünün hücre içinde önerilen etki mekanizmaları.

3 Gereç ve Yöntem

Tez çalışması kapsamında *in vitro* diyabetik nefropati modelinde TG2 aktivitesinin ve C-peptit uygulamasının TG2 enzimi üzerindeki olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla immortalize insan böbrek proksimal tübüler epitel hücrelerinde (HK-2) farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile oluşturulan diyabetik nefropati modelinde TG2 enziminin hücre içi ekspresyonu ve aktivitesi üzerine etkileri değerlendirildi. Ardından oluşturulan modelde TG2 enzimi inhibitörü (sistamin), aktivatörü (retinoik asit) ve C-peptit uygulamasının etkileri incelendi.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların tamamı E.Ü Eczacılık Fakültesi, Biyokimya ABD ve Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı' nda (FABAL) gerçekleştirildi.

3.1 Kullanılan Gereçler

- CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific Model 370),
- Laminer hava akımlı kabin (Thermo Scientific Class II MSC-Advantage),
- Faz kontrast mikroskobu (Leica DMIL),
- Hemositometre (Hausser Scientific),
- Su banyosu (Mettler),
- Fuxion FX7 görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat),
- Dikey elektroforez ve membran transfer sistemi (BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra Cell),
- Spektrofotometrik ve spektrofluorometri Mikroplaka okuyucu (Thermo Varioskan Flash),
- Soğutmalı yer tipi santrifüj (Hitachi),
- pH metre (Hanna Instruments),
- Çalkalamalı blok ısıtıcı (IKA),
- Orbital çalkalayıcı (IKA),
- Manyetik karıştırıcı (Yellowline),
- Hassas ve kaba analitik teraziler (Denver Instrument),
- Buzdolabı ve -20°C derin dondurucu (White Westinghouse),
- Derin dondurucu (Sanyo).

3.2 Kullanılan Sarf Malzemeleri

Kullanılan Kitler:

- BCA protein miktar tayini kiti (Thermo Scientific-Pierce),
- Fluo-4 AM NonWash kalsium kiti (Invitrogen)

Kullanılan Malzemeler:

PVDF membran (Thermo Scientific-Pierce) firmasından, kullanılan tüm steril ve steril olmayan plastik malzemeler Sartstedt firmasında temin edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler:

- 5-(Biotinamido) pentilamin (5-BP, Thermo Scientific),
- Sodyum klorür (NaCl, Serva),
- Sığır serum albumini (BSA, Sigma),
- Sodyum benzoat (Merck),
- Borik asit (Carlo Erba),
- Sodyum dodesil sülfat (SDS, ChemCruz),
- Tween 20 (VWR),
- Hidroklorik asit (HCl, Sigma-Aldrich),
- Tris HCl (VWR),
- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, Sigma-Aldrich),
- Etilen glikol-bis (2-aminoetileter)- N,N,N',N' - tetraasetik asit (EGTA, VWR),
- o-Fenilendiamin (dihidroklorür) (OPD, Thermo Scientific),
- Dibazik sodyum fosfat (NaH₂PO₄, Serva),
- Monobazik sodyum fosfat (Na₂HPO₄, Serva),
- Sitrik asit (Carlo Erba),
- % 30 hidrojen peroksit (H₂O₂, Sigma),
- Fetal sığır serum (PBS, Gibco),
- L-glutamin (Gibco),
- 2-Merkaptoetanol (Ambresco),
- 7-Deoksikolik asit (7-DOC, VWR),
- Nonilfenol etoksilat (NP-40, Ambresco),
- N,N,N',N' tetrametiletildiamin (TEMED, Ambresco),
- Gliserol (VWR),

- Tripan mavisi (Gibco),
- Glisin (VWR),
- Amonyum persülfat (AP, VWR),
- Metanol (Merck),
- Yağsız süt tozu (Bioshop),
- % 0,25 tripsin-EDTA (Gibco),
- Dimetil sülfoksit (DMSO, AppliChem),
- Glukoz (Sigma-Aldrich),
- Mannitol (Sigma-Aldrich),
- Sistamin (Santa Cruze),
- Retinoik asit (Sigma),
- Human C-peptit (Genscript),
- Proteaz inhibitör kokteyli (PIC, Santa Cruze),
- Fosfataz inhibitör kokteyli (FIC, Santa Cruze),
- % 30 akrilamid (Serva),
- Naftil etilen diamin (NED, Sigma-Aldrich),
- Sülfanilamid (Sigma-Aldrich) ,
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT, Invitrogen),
- Dikloroflorosein-diasetat (DCFH-DA, Invitrogen), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco),
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and Ham's F-12 Nutrient Mixture (DMEM:F12, BI) kullanıldı.

Kullanılan Antikorlar

- Monoklonal anti-B-aktin (Sigma),
- Poliklonal anti-TG2 (Sigma),
- Poliklonal anti-Bax (Cell Signalling),
- Poliklonal anti-Bcl-2 (Pierce),
- Poliklonal anti-Bcl-xl (Pierce),
- Poliklonal anti-PARP (Cell Signalling),
- HRP-konjüge anti-Streptavidine (Pierce) ,
- Anti-Rabbit IgG, (H+L) sekonder antikor (Pierce)
- Anti-Mouse IgG, (H+L) sekonder antikor (Pierce).

3.3 Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Glukoz Çözeltilerinin Hazırlanması: 1 M glukoz (Ma: 180,16 g/mol) çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla 18,016 g glukoz hassas terazide tartıldı, 100 ml otoklavlanmış distile suda çözülüp 0,22 µm çapındaki filtreden geçirildi.

Mannitol Çözeltilerinin Hazırlanması: 1 M mannitol (Ma: 182,17 g/mol) çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla 18,217 g mannitol hassas terazide tartıldı, 100 ml otoklavlanmış distile suda çözülüp 0,22 µm çapındaki filtreden geçirildi.

Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS): 500 ml FBS stok çözeltisine 50 ml 100X L-glutamin ve 17.5 µl 2-merkaptoetanol eklendi; 0,22 µm çapındaki filtreden geçirilerek süzüldü. Buzdolabında + 4 °C'de saklandı.

17,5 mM Glukoz İçeren DMEM: F12 Besiyeri: 500 ml DMEM: F12 besiyeri içerisine hazırlanan steril FBS stok çözeltisinden 55,5 ml eklendi. Buzdolabında + 4 °C'de saklandı.

5,5 mM Glukoz İçeren DMEM Besiyeri: 500 ml DMEM besiyeri içerisine hazırlanan steril FBS stok çözeltisinden 55,5 ml eklendi. Buzdolabında + 4 °C'de saklandı.

30 mM Glukoz İçeren DMEM Besiyeri: 500 ml DMEM besiyeri içerisine 55,5 ml FBS stok çözeltisi ve 14,03 ml 1 M steril glukoz çözeltisinden eklendi.

30 mM Mannitol İçeren DMEM Besiyeri: 500 ml DMEM besiyeri içerisine 55,5 ml FBS stok çözeltisi ve 14,03 ml 1 M steril mannitol çözeltisinden eklendi.

30 mM Glukoz İçeren DMEM: F12 Besiyeri: 500 ml DMEM: F12 besiyeri içerisine 55,5 ml FBS stok çözeltisi ve 7,16 ml 1 M steril glukoz çözeltisinden eklendi.

30 mM Mannitol İçeren DMEM:12 Besiyeri: 500 ml DMEM: F12 besiyeri içerisine 55,5 ml FBS stok çözeltisi ve 7,16 ml 1 M steril mannitol çözeltisinden eklendi.

Retinoik asit Çözeltisi: 3 mg RA tartılarak 1 ml DMSO içerisinde çözülerek 10 mM konsantrasyonda RA çözeltisi elde edildi. Argon gazı altında kapatıldı ve -80°C' de saklandı.

Sistamin Çözeltisi: 113 mg sistamin tartılarak 1 ml otoklavlanmış ultra saf suda çözülerek 500 mM konsantrasyonda sistamin çözeltisi elde edildi ve -80°C' de saklandı.

C-peptit Çözeltisi: 0,5 mg C-peptit 0,5 ml 0,22 mm filtreden geçirilip otoklavlanmış ultra saf suda çözüldü. Elde edilen 1 mM konsantrasyondaki C-peptit stoğu -80°C' de saklandı.

3.3.2 SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

10X Fosfat Tamponu (Phosphate Buffer Saline, PBS): 87.5 g NaCl, 11.5 g NaH₂PO₄, 2.3 g Na₂HPO₄ tartılarak bir miktar distile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı ve distile su ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti 121°C' de 20 dakika süre ile otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacağı zaman 1:10 oranında distile su ile 1X PBS'e seyreltildi.

2X Radyoimmünopresipitasyon Assay (RIPA) Lizatlama Tamponu: 40 mg SDS, 200 mg 7-DOC tartılarak bir miktar distile suda çözüldü. Ardından 0.4 ml NP-40 ve 4 ml 10X PBS ilave edilip distile su ile 20 ml' ye tamamlandı.

SDS-PAGE 4X Yığınlama Tamponu (Stacking Buffer): 30.285 g Tris HCl ve 2 g SDS tartılarak bir miktar suda çözüldü. 2 ml TEMED eklendi ve pH' sı 6.9 'a ayarlandıktan sonra distile su ile 500 ml' ye tamamlandı.

4X Protein Yükleme Tamponu: 4 g SDS bir miktar distile su içinde çözüldü. 10 ml 1 M Tris HCl (pH=6.8), 2 ml gliserol, 2 ml 14.7 M 2-ME, 5 ml 0.5 M EDTA ve 40 mg bromofenol mavisi eklendikten sonra distile su ile 50 ml' ye tamamlandı.

10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 30.2 g TRIS baz, 144 g glisin, 10 g SDS tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı.

1X SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 100 ml 10X SDS-PAGE yürütme tamponu distile su ile 1 litreye tamamlandı.

% 10 Amonyum persülfat (AP) Çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 10 ml' ye tamamlandı.

3.3.3 İmmünoblotlama Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler

10X Transfer Tamponu: 30.33 g TRIS-baz, 144 g glisin tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı.

1X Transfer Tamponu: 50 ml 10X transfer tamponu 350 ml distile su ile seyreltildi ve 100 ml metanol ilave edildi.

1X Yıkama Tamponu: 100 ml 10X PBS üzerine 1 ml Tween-20 eklendi. pH 7.4' e ayarlandı ve distile suyla 1 litreye tamamlandı.

%5'lik Yağsız Süt Bloklama Tamponu: 5 g yağsız süt tozu bir miktar 1X yıkama tamponu içerisinde çözüldü. pH 7.4' e ayarlandı ve 1X yıkama tamponu ile 100 ml' ye tamamlandı.

3.3.4 *In Situ* Transamidasyon Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

5-Biotinamido Pentilamin (BP) Çözeltisi: 7 mg 5-BP 100 µl DMSO içerisinde çözüldü. Elde edilen 200 mM konsantrasyondaki çözeltiden 5 µl alınıp 1000 µl besiyerine koyularak final konsantrasyonu 1 mM olarak ayarlandı.

Tris HCL Çözeltisi (50 mM): 1,5 g Tris HCL (MW: 121,414 g/mol) tartılarak bir miktar ultra saf suda çözüldü, pH 7,4' e ayarlandıktan sonra 250 ml' ye tamamlandı.

Kaplama Tamponu: 2,19 g NaCl, 0,365 g EDTA, 0,475 g EGTA tartılarak bir miktar 50 mM Tris (pH 7,4) ile çözüldü. Ardından 250 ml' ye tamamlandı.

Borik Asit Tamponu: 3,09 g borik asit, 1,44 g sodyum benzoat, 2,34 g NaCl bir miktar ultra saf suda ısıtılarak çözüldü ve ardından distile su ile 500 ml' ye tamamlandı.

Bloklama Tamponu: 1 g BSA ve 20 mg SDS tartılarak, 20 ml borik asit tamponunda çözüldü ve 20 µl tween 20 ilave edildi.

Yıkama Tamponu: 1 g BSA tartılarak 100 ml borik asit tamponunda çözüldü ve 10 µl tween 20 ilave edildi.

Fosfat- Sitrat Tamponu: 0,2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi hazırlamak için 2,68 g dibazik sodyum fosfat 50 ml ultra saf suda çözüldü. 0,2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi hazırlamak için 1,05 g sitrik asit 50 ml ultra saf suda çözüldü. 25,7 ml 0,2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi ve 24,3 ml 0,1 M sitrik asit çözeltisi karıştırılarak pH kontrol edilir (pH 5). Ardından 50 ml deiyonize su eklenir. Kullanılmadan hemen önce % 4 oranında % 30' luk H₂O₂ çözeltisinden eklendi.

Substrat Çözeltisi: o-Fenilendiamin (dihidroklörür)-ODP stoğundan 4 mg tartılarak 10 ml fosfat-sitrat tamponunda çözümlü üzerine 4 µl H₂O₂ eklenir.

3.4 Kullanılan Yöntemler

3.4.1 Hücre Kültürü

DN'de yüksek glukozaya maruz kalan renal dokuda en karakteristik hücre hasarının renal tübüler hücrelerde olduğu belirlenmiştir (Jiao, Li, Zhang, Liu, & Chi, 2016). Bu nedenle çalışmamızda *in vitro* DN modeli oluşturmak üzere, American Type Culture Collection' dan (ATCC) satın alınan insan proksimal tübüler epitelyal (HK-2) hücre hattı kullanılmıştır. HK-2 hücreleri, 1997 yılında insan böbrek korteksinden izole edilen proksimal tübüler epitelyal hücrelerinin insan pappilloma virüsü kullanılarak ölümsüzleştirilmesi ile oluşturulmuştur (Ryan et al., 1994).

Hücreler % 10 FBS içeren DMEM-F12 besiyeri ile beslendi ve konvansiyonel hücre kültürü şartları olan 37°C' de, % 5' lik CO₂ inkübatöründe çoğaltıldı. Aralıklarla faz kontrast mikroskobu ile kontrol edildi. Hücrelerin yoğunluğu yaklaşık % 80 oranına ulaştığında, besi ortamı vakumla uzaklaştırılıp, 1 ml % 0.05' lik tripsin-EDTA ile yıkandı ve vakumla tripsin-EDTA uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyden ayrılması için

37 °C' deki CO₂ inkübatöründe 5 dk bekletildi. Kullanılan tripsin-EDTA çözeltilisini etkisizleştirmek için hücreler % 10 FBS içeren besiyeri ile toplanarak 125 x rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından üst kısımdaki besiyeri vakumla uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler taze besiyeri ile tekrar süspende edilerek 1:4 oranında yeni kültür kabına ekildi ve çoğaltılmaya devam edildi.

Hücre hattına ait ana stoğu korumak için, ilk pasajdaki hücrelerin bir kısmı, 1.5 x 10⁶ hücre/ml sayıda hücre olacak şekilde, % 7,5 DMSO içeren besiyeri ile kriyovial tüplere alınarak -80 °C' de saklandı.

Hücre hattının tüm kültür işlemleri laminar hava akımlı sınıf II steril hücre kültürü kabininde, steril sarf malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4.2 HK-2 Hücre Kültüründe Gerçekleştirilen İndüksiyonlar

3.4.2.1 *In Vitro* Diyabetik Nefropati Modeli Oluşturma

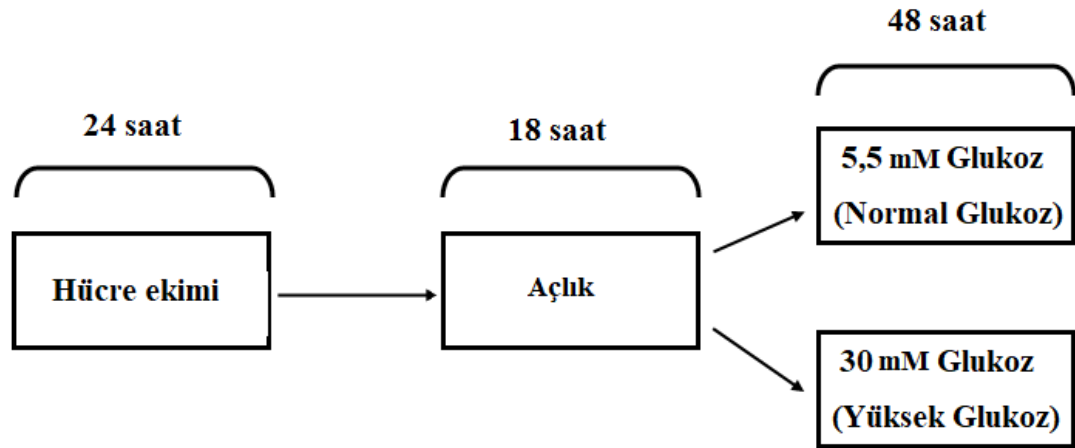
Yapılan literatür araştırmasında, hücre kültüründe gerçekleştirilen diyabetik nefropati modelleme çalışmalarında, normal glukoz konsantrasyonu olarak 5 ve 5,5 mM, yüksek glukoz olarak 25 ve 30 mM glukoz içeren besiyerleri kullanıldığı belirlenmiştir (Bhatt et al., 2016; Jiao et al., 2016; Krupa et al., 2010). Optimizasyon çalışmalarımızda apoptoz parametrelerindeki değişiklikler göz önüne alınarak uygun glukoz konsantrasyonları ve inkübasyon süresi belirlendi (Bhatt et al., 2016).

Besiyerlerindeki artan glukoz konsantrasyonu nedeniyle hücrelerde oluşan osmotik basınç değişikliğini değerlendirmek için mannitol ile kıyaslama yapıldı (K. Chen et al., 2013; He et al., 2014). Farklı glukoz ve mannitol konsantrasyonları kullanılarak inkübasyon gerçekleştirildi. 2 adet 6-kuyucuklu plakanın 4' er kuyucuğunun her birine 1x10⁶ HK-2 hücresi eklenerek yüzeye yapışmaları için bir gün beklendi. Ertesi gün 18 saat FBS içermeyen DMEM (free-FBS) ile açlık (starvasyon) sonrasında birinci plaka kuyucuklarına 5,5 mM, 30 mM, 50 mM, 75 Mm glukoz; ikinci plaka kuyucuklarına ise aynı konsantrasyonlarda mannitol içeren besiyeri eklendi. 48 saat sonra inkübasyon sonlandırıldı ve hücreler toplandı. İçerdikleri protein miktarları tayin edildi ve IB yöntemiyle sonuçlar değerlendirildi.

Glukoz inkübasyon süresinin belirlenmesi için 3 farklı süre çalışıldı. 6 adet 30 mm hücre kaplarının her birine 1x10⁶ HK-2 hücresi ekildi; ertesini gün 18 saat süre ile FBS içermeyen DMEM ile açlığa maruz bırakıldı. Sürenin sonunda 3 grup hücreye kontrol

olarak kullanılacak glukoz konsantrasyonu olan 5,5 mM glukoz içeren besiyeri, diğer üç grup hücreye ise yüksek glukoz konsantrasyonu olan 30 mM glukoz içeren besiyeri verildi. 24 saat sonra bir kontrol ile bir yüksek glukoz içeren hücre kabı, 48 saat sonra bir kontrol ile bir yüksek glukoz içeren hücre kabı, 72 saat sonunda ise son kalan bir kontrol ile yüksek glukoz içeren hücre kabındaki hücreler toplanıp lizatlandı ve içerdikleri protein miktarları tayin edildi. IB tekniği ile değerlendirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda diyabetik nefropati oluşturulacak uygun glukoz konsantrasyonu ve inkübasyon saati belirlendi.

Çalışmada kullanılan standart in vitro DN modeli: Ekilen hücrelerin 24 saat süre ile yüzeye yapışmaları beklendikten sonra hücreler 18 saat FBS içermeyen besiyeri ile açlığa maruz bırakıldı. Ardından 48 saat süreyle 30 mM glukoz inkübasyonu yapılarak diyabetik nefropati modeli oluşturuldu (Şekil 4).

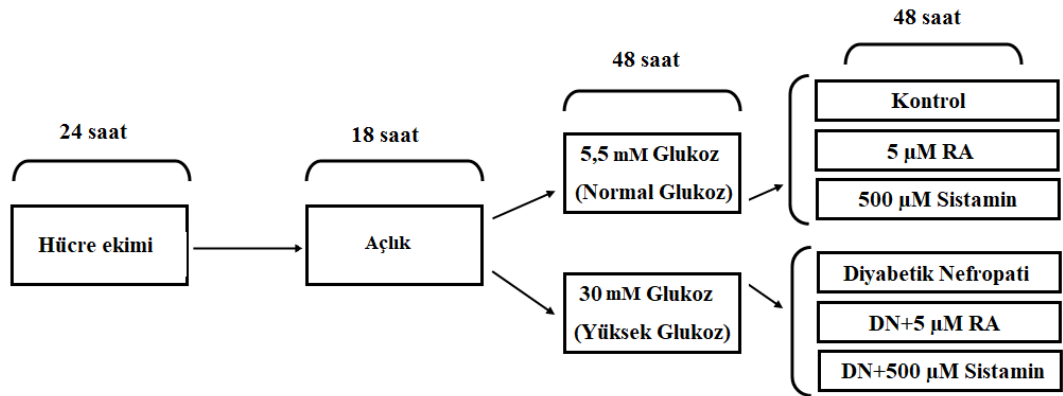


Şekil 4. HK-2 hücrelerinde standart *in vitro* DN modeli oluşturulması

3.4.2.2 Transglutaminaz 2 Aktivitesinin İndüksiyonu ve İnhibisyonu

Yapılan çalışmalarda transglutaminaz 2 aktivitesinin indüksiyonu için retinoik asit kullanılmaktadır (Antonyak et al., 2001; Singh & Cerione, 1996). TG2 aktivitesinin inhibisyonu için en çok kullanılan bileşiklerden biri sistamindir (Davies, Rose, Sarkar, & Rubinsztein, 2010). Bu nedenle çalışmamızda farklı retinoik asit ve sistamin

konsantrasyonları ile indüksiyon ve inhibisyonu optimize etmek için çalışmalar yapıldı. 30 mm hücre kaplarına ekilen 1×10^6 HK-2 hücrelerinin 24 saat yüzeye yapışması beklendikten sonra yarısına kontrol konsantrasyonda, diğer yarısına ise yüksek konsantrasyonda glukoz içeren besiyeri ile diyabet modeli oluşturuldu. Ardından farklı konsantrasyonlarda (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) retinoik asit ve farklı konsantrasyonlarda (125 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 750 μ M) sistamin ile farklı sürelerde (48 ve 72 saat) inkübe edildi. Süre sonunda hücreler toplandı ve IB yöntemiyle sonuçlar değerlendirildi. Kullanılacak optimum RA konsantrasyonu; 5 μ M, sistamin konsantrasyonu; 500 μ M ve inkübasyon süresi 48 saat olarak belirlendi. TG2 aktivitesinin indüksiyonu ve inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalarda hücrelerde DN modeli oluşturulduktan sonra Şekil 5’ de verilen konsantrasyonlarda 48 saat süre ile inkübasyon gerçekleştirildi.



Şekil 5. HK-2 hücrelerinde TG2 aktivitesinin standart aktivasyon ve inhibisyon uygulamaları

3.4.2.3 C-peptit Uygulaması

C-peptitin plazmadaki fizyolojik konsantrasyonu 0,9 nM’ dır (Bhatt et al., 2014). Çalışmamızda C-peptitin hücredeki fonksiyonlarını araştırmak için 1 nM C-peptit kullanıldı. Fizyolojik konsantrasyonun üzerindeki etkisini de görmek için 5 nM C-peptit uygulaması yapıldı. Hücrelerde diyabet modeli oluşturulduktan sonra 1 ve 5 nM konsantrasyonlarında C-peptit ile 48 saat inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda hücreler toplandı ve IB yöntemiyle sonuçlar değerlendirildi.

3.4.3 SDS-PAGE Elektroforezi ve İmmünooblottama

Western blote tekniği proteinlerin tanımlanması ve ayrıştırılmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin prensibi; elektroferez işlemiyle poliakrilamid jel üzerinde proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması, membrana transfer edilmesi ve membrandaki proteinlerin immünojenik metodlarla tayin edilmesidir. Tanımlanmak istenen proteine özgü antikorlar kullanılarak görüntüleme ilgili proteine ait bant elde edilmesi amaçlanır ve bant kalınlığı protein miktarı ile doğru orantılıdır (Mahmood & Yang, 2012). Bu yöntemde hücreler lizatlanarak protein içerikleri açığa çıkartılır ve her örnekteki protein miktarı spektrofotometrik olarak tayin edilir. Ardından her örnekten eşit miktarda total protein yüklemesi yapılarak sistem kurulur.

3.4.3.1 Hücrelerin Lizatlanması

Yapılan çalışmalardan sonra hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler soğuk 1X PBS ile yıkanarak toplandı. Tüp içeriği 10.000 rpm' de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Örnek tüpü başına 30 µl 1X PBS, 30 µl 2X RIPA ve 0,6 µl 100X PIC eklendi, tüpler 5 dakikada bir vortekslenerek 20 dakika süreyle lizatlandı. Hücre pelletini uzaklaştırmak için 14 000 rpm' de 10 dakika boyunca 4 °C' de santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar temiz tüplere transfer edildi.

3.4.3.2 Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry yöntemine göre yapılmıştır (Lowry, Randall, & Lewis, 1951). Bu yöntemin temeli, alkali çözeltideki proteinlerin biüret reaktifindeki Cu^{+2} 'yi, Cu^{+1} ' e indirgemesi ve daha sonra Cu^{+1} ' in BCA ile verdiği renkli kompleksin 562 nm' deki spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Peptid bağları bakır tuzları ile alkali ortamda mor renkli kompleks oluşturur. Ayrıca protein yapısındaki triptofan ve tirozin amino asitleri fosfomolibdat-fosfotungstat çözeltisi (Folin-Ciocalteu) ile indirgenir. Örneklerin protein miktarı, çeşitli konsantrasyonlardaki sığır serum albumini (BSA) proteini kullanılarak hazırlanan standart eğri grafiği ve denklemi üzerinden hesaplandı.

BCA Çalışma Reaktiflerinin Hazırlanması: Çalışma reaktifi kit içeriğinde hazır halde gelen reaktif A ve reaktif B ile deney günü taze olarak hazırlandı. Çalışma reaktifi hazırlanırken 50 kısım Reaktif A üzerine, 1 kısım Reaktif B (50:1, Reaktif A:B) ilave edildi ve karıştırıldı. Mikroplaka kuyucuklarına örnek başına 200 µl çalışma reaktifi kullanıldı.

BSA Standartlarının Hazırlanması: İçerisindeki protein miktarı tayin edilecek örnek; konsantrasyonları bilinen standart albumin çözeltileri ile hazırlanan, BSA standart eğrisine ait doğru denklemi üzerinden hesaplandı.

Standart Albumin Çözeltilerinin Hazırlanması ve Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi:

Kitle birlikte verilen 1 ml' lik ampüllerin her biri 2 mg/ml sığır serum albumini (BSA) içermektedir. Bu stok çözeltiden alınan belirli hacimler, distile su ile seyreltildi; ml' de 25, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg BSA taşıyan çalışma çözeltileri hazırlandı.

Standart eğri grafiği çizmek için, mikroplakanın her bir kuyucuğuna 25 µl standart çözelti ve 200 µl BCA çalışma reaktifi eklendikten sonra, 1 dakika orbital çalkalayıcıda karıştırıldı ve 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi. Distile su ve BCA reaktifi ile hazırlanan köre karşı mikroplaka okuyucuda 562 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Okunan absorbans değerleri ve protein konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren standart bir grafik çizildi.

Örneklerdeki Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi: Mikroplakanın her bir kuyucuğuna 8 µl distile su eklendikten sonra, 2 µl protein miktarı belirlenecek hücre lizatları eklendi. Ardından her bir kuyucuğa 200 µl BCA çalışma reaktifi ilave edildi ve bir dakika süre ile çalkalandı. Hazırlanan mikroplaka 37 °C' de 30 dakika boyunca inkübe edildi, inkübasyon süresi sonunda mikroplaka içeriği köre karşı (1X PBS: 2X RIPA, 1:1) mikroplaka okuyucuda 562 nm dalga boyunda okundu. Absorbans değerlerinin ortalaması alındıktan sonra, doğru denkleminde yerine konularak protein miktarları bulundu.

Hücrelerin lizatlanması sonucu elde edilen her örnek için yukarıdaki protokole göre total protein miktar tayini yapıldı.

3.4.3.3 SDS-PAGE Elektroforezi:

Örneklerde fraksiyonlarına ayrılmak istenen proteinlerin molekül ağırlıkları göz önünde tutularak % 8 ve % 12' lik ayırma jelleri hazırlandı (Tablo 5 ve 6). Örnekler jel kuyucuklarına 32 µl yüklenecek şekilde 4x yükleme tamponu ile 95 °C' de 5 dakika kaynatıldı ve jel kuyucuklarına yüklenerek 200 voltta yürütüldü.

Tablo 5. SDS-PAGE yönteminde kullanılan ayırma jeli içeriği.

	% 8' lik Jel	% 12' lik Jel
% 30 Akrilamid	2,67 ml	4 ml
4x Ayırma tamponu	2,5 ml	2,5 ml
Distile su	4,8 ml	3,5 ml
% 10 AP	75 µl	75 µl

Tablo 6. SDS-PAGE yönteminde kullanılan yığınlama jeli içeriği.

	% 3,5' luk Jel
% 30 Akrilamid	0,35 ml
4x Yığınlama tamponu	0,75 ml
Distile su	1,9 ml
% 10 AP	25 µl

Protein taşıyan poliakrilamid jel ile membran doğrudan temas ettirilip iletici bir çözelti içerisinde birleşen iki elektrot arasına yerleştirildi. 200 mA' lik elektrik akımı soğukta 90 dakika uygulandı, negatif yüklü proteinler pozitif kutba doğru hareket etmiş; membran ile karşılaştıklarında hareketsiz kalmış ve membrana bağlanmışlardır. Bu şekilde membran sürüklenmelerini durdurmuştur. Membran olarak polivinilidinden diflorit (PVDF) membran kullanıldı. PVDF membranlar, kullanılmadan önce metanol ile ıslatılarak etkinleştirildi.

3.4.3.4 İmmünoblotlama

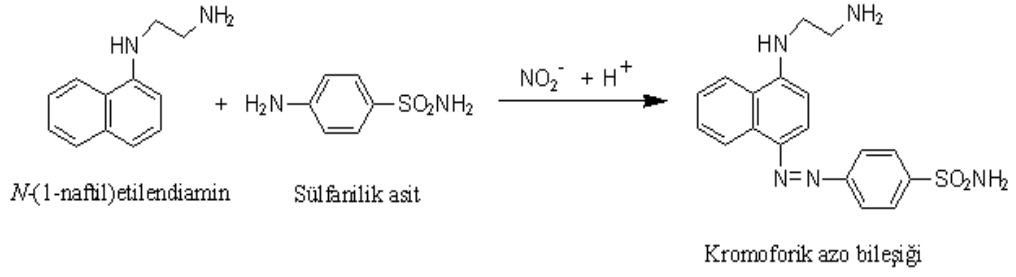
Transfer işleminden sonra blotlama işlemi sırasında oluşabilecek spesifik olmayan protein bağlanmalarını engellemek için, membranın transfer sırasında protein bağlanmayan bölgeleri 1X yıkama tamponu içerisinde hazırlanan % 5' lik süt tozu ile membran, bir saat boyunca inkübe edildi.

Bloklama işleminden sonra membran yıkama solüsyonu ile bir kez 5 dakika boyunca yıkandı ve primer antikor eklenerek her antikorun yanıt verme süresine göre 4 derecede muameleye bırakıldı. Primer antikor ile inkübasyonun ardından membranlar, 3 defa 5 dakikalık sürelerle yıkama tamponu ile muamele edildi. Ardından kullanılan primer antikorun türüne göre, 1:7500 oranında % 5' lik yağsız sütte hazırlanan yaban turpu peroksidaz (horseradish peroxidase, HRP) enzimi ile işaretlenmiş sekonder antikorlar (goat anti-rabbit ve goat anti-mouse) ile 1 saat çalkalandı.

Membrandaki Proteinlerin Görüntülenmesi: HRP enzimi ile işaretlenmiş sekonder antikorlar ile inkübe edilen membranların görüntülenmesi için kemilüminesans substratı (SuperSignal WestPico) kullanıldı. Substrat olarak kullanılan luminol, HRP ve H₂O₂ varlığında okside olmakta ve uyarılmış ürün olan 3-aminoftalat oluşmaktadır. Bu ürün, 425 nm'de ışımaya vermektedir. Çalışma esnasında membranlar, kemilüminesans substrat çalışma solüsyonları membran başına 2 ml olacak şekilde 1:1 oranında karıştırılarak taze hazırlandı ve membranla 1 dakika inkübe edildi. Fazla solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra membran protein kısmı yukarı bakacak şekilde Vilber Lourmat Fuxion-FX7 görüntüleme cihazı ile kemilüminesans görüntülemesi yapıldı.

3.4.4 Griess Yöntemi ile Nitrit Miktar Tayini

Oluşturulan deney modelinde hücre içi nitrit miktarını belirlemek için Griess yöntemi uygulandı. İlk kez 1879' da Griess tarafından tanımlanan yöntemin temeli; nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamid) diazotizasyonu ve N-(1-naftil)etilendiamin hidroklorit (NED) ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına dayanır (şekil 6) (Green et al., 1982).



Şekil 6. Diazotizasyon reaksiyonunda, nitrozillenmiş sülfanilamidin NED ile etkileşmesi sonucu renkli azo bileşiği oluşum reaksiyonu

HK-2 hücrelerinin inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerinden toplanan besiyerleri 10 000 x rpm' de 5 dk santrifüjlendi. İçeriğindeki nitrit miktar tayini için Griess yöntemi uygulandı.

Standart NaNO₂ Çözeltilerinin Hazırlanması ve Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi:

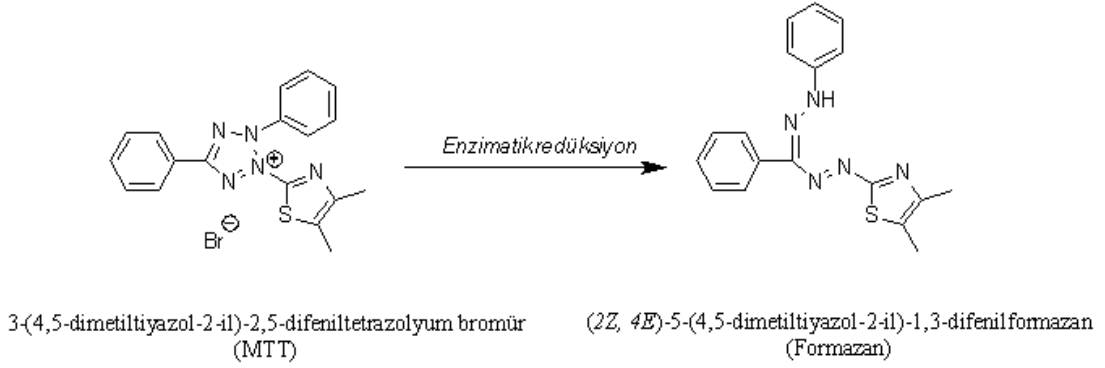
100 mM konsantrasyonda çalışma stoğu hazırlandı, bu stoktan besiyeri kullanılarak seri dilüsyon ile ara konsantrasyonlar hazırlandı. 25 µM; 12,5 µM; 6,25 µM; 3,13 µM; 1,56 µM konsantrasyonları ve sade besiyeri kullanıldı. Mikroplakanın kuyucuklarına 50 µl standart çözeltinin üzerine 50 µl % 0,1 naftil etilen diamin (NED, Reaktif A) eklendi ve 10 dk karanlıkta inkübe edildi. Ardından kuyucuklara 50 µl % 1 sülfanilamid (Reaktif B) eklendi, 10 dk karanlıkta inkübe edildi. Spektrofotometrede 480 nm dalga boyunda ölçüm alındı ve standart eğri grafiği çizildi.

Örneklerdeki Nitrit Miktarının Belirlenmesi: Örneklerin herbirinden mikroplaka kuyucuklarına yukarıdaki protokole uygun şekilde ekildi. Okunan absorbanslar standart eğri grafiğinin denkleminde yerine koyularak örneklerdeki miktar tayini yapıldı. Sonuçlar µM nitrit konsantrasyonu olarak ifade edildi.

3.4.5 MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığı Tayini

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) bir tetrazolyum tuzu olup hücre proliferasyonu veya hücre canlılığının kantitatif ve kolorimetrik olarak ölçülmesinde kullanılmaktadır. Yöntemin esası; sarı renkte olan MTT reaktifinin, canlı hücrelerde NADPH-bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimine spesifik olarak

bağlanarak suda çözünmeyen mor kristaller oluşturmasına dayanır. MTT molekülü indirgenerek formazan molekülünü oluşturur (Şekil 7) (Kupcsik, 2011). Oluşan kristaller DMSO veya izopropil alkol gibi organik çözücüler yardımı ile çözülerek gerçekleşen renk değişimi 570 ve 650 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçülür. Renk şiddetindeki artış canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Tolosa, Donato, & Lechon, 2015).



Şekil 7. MTT' nin enzimatik indirgenme reaksiyonu

Çalışmamızdaki hücre canlılığı deneyleri, 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında gerçekleştirildi. Hücreler ekildikten sonra yüzeye oturması için 24 saat beklendi. Ardından belirlenen sürelerde indüksiyon ajanları ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerinin üzerindeki besiyeri dikkatlice uzaklaştırıldı ve her kuyucuk, 200 µl PBS ile iki defa yıkandı. Ardından kuyucuklara 200 µl besiyeri ve 20 µl MTT (5 mg/ml) eklendi. Hücreler, 37 °C' de, % 5' lik CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyonun 3. saatinin sonunda hücrelerin bulunduğu besiyeri dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra, 100 µl DMSO eklendi. Oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda kristallerin tamamı çözününceye kadar inkübe edildi; toplam inkübasyon süresi sonunda örneklerin absorbansı, hücre içermeyen besiyeri ve MTT karışımına karşı mikropłaka okuyucuda 570 ve 650 nm' de ölçüldü.

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formüle yerleştirildi ve sonuçlar % hücre canlılığı olarak ifade edildi.

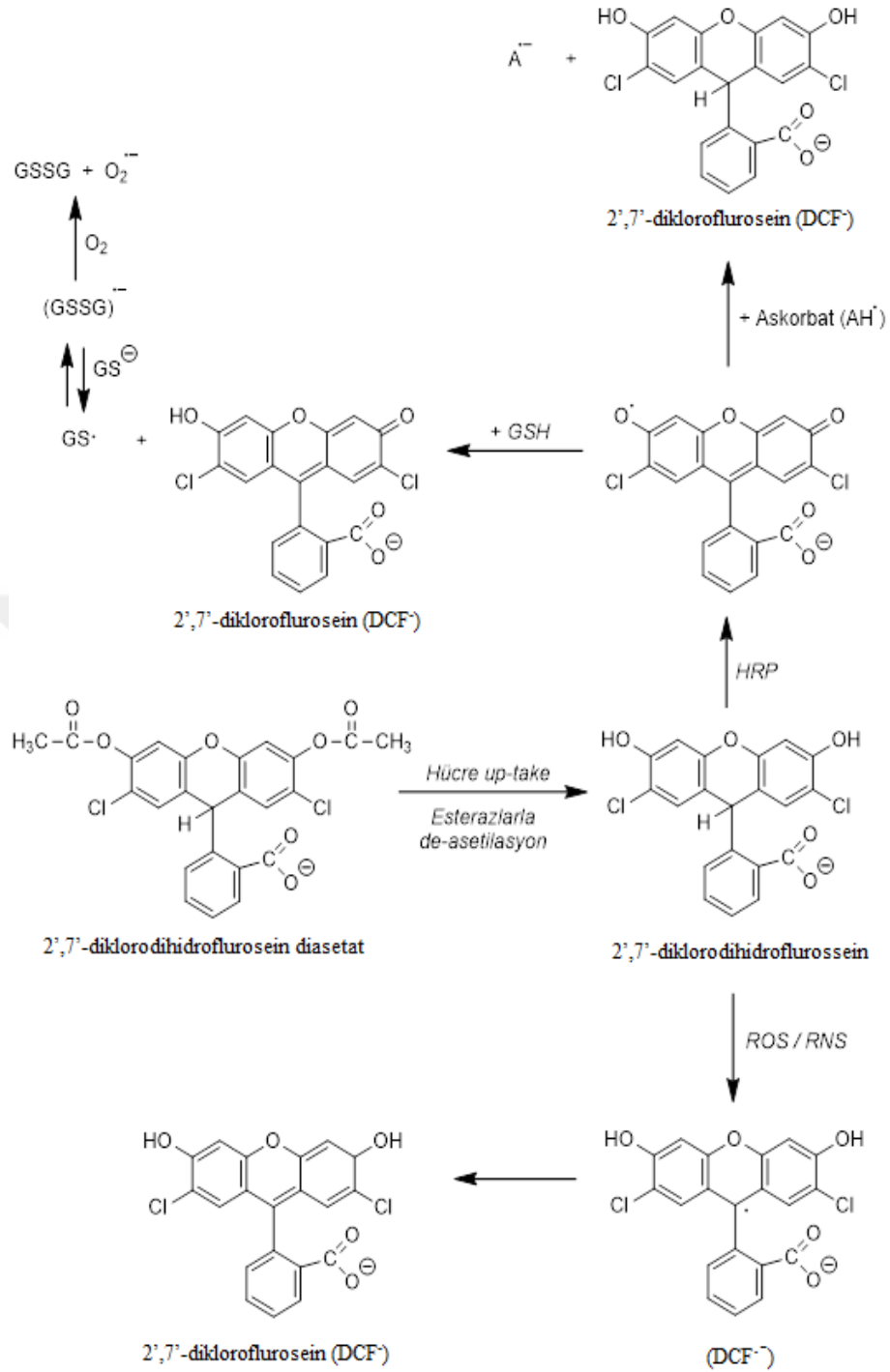
$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = 100 \times \frac{[\text{Absorbans}_{\text{Örnek}} - \text{Absorbans}_{\text{Kör}}]}{\text{Absorbans}_{\text{Kontrol}}}$$

3.4.6 DCF-DA Yöntemi ile ROT Düzeyi Tayini

Bu yöntemin temelinde dikloroflorosein-diasetat (DCFH-DA) yükseltgenebilen bir substrat olarak kullanılmaktadır. Ortamda bulunan peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucu yüksek floresan özelliğe sahiptir dikloroflorosein (DCF) molekülü açığa çıkmaktadır (Şekil 8). DCF molekülünün floresan özelliği ile reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonu arasında doğru orantı vardır. Spektroflorometrede DCF; 485 nm de ışımaya (ex.), 535 nm de ise uyarılma (em.) yapmaktadır (Halliwell & Whiteman, 2004).

İnkübasyon süresi biten hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve karanlıkta 50 µM konsantrasyona sahip DCFH-DA çözeltisinden 100 µl eklendi. Hücreler; inkübatöre kaldırıldı ve 45 dk inkübe edildi. Süre sonunda DCFH-DA ortamdan uzaklaştırıldı, kuyucuklara 100 µl PBS eklendi. Bir buçuk saat süreyle 20 dakikada bir floresans ölçüm alındı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formüle yerleştirildi ve sonuçlar % ROT düzeyi olarak ifade edildi.

$$\% \text{ ROT Düzeyi} = 100 \times [\text{Floresans}_{\text{örnek}} - \text{Floresans}_{\text{kör}}] / \text{Floresans}_{\text{kontrol}}$$



Şekil 8. DCFH-DA molekülünün floresan DCF moleküne dönüşüm reaksiyonu (Halliwell & Whiteman, 2004).

3.4.7 Hücre içi Ca²⁺ Düzeyi Tayini

Hücre içi kalsiyum düzeyini tayin etmek için kullanılan bu yöntem; Fluo-3 ve Fluo-4 gibi kalsiyum duyarlı boyalar argon lazeri (488 nm) gibi ışık kaynaklarında floresan özellik gösterirler (Blass, 2015). Bu floresan özellik, artan Ca²⁺ konsantrasyonu ile şiddetlenir. Bu nedenle kalsiyum konsantrasyonunda değişiklikler meydana getiren biyolojik olayların tanımlanmasında kullanılırlar (Blass, 2015). Çalışmamızda Fluo-4 NW Calcium Assay Kit kullanılarak Ca²⁺ tayini yapıldı. Kit içeriği; Fluo-4 NW dye mix (kompleks A), Probenecid water soluble (kompleks B), Assay buffer (1X HBSS-hanksbalanced salt solution, 20 mM HEPES-hepes buffer solution) (kompleks C) şeklindedir. Deney günü stok kompleks C içerisine HEPES ve HBSS eklenir. Ardından kompleks B stoğuna kompleks C' den 1 ml eklenir. Daha sonra kompleks A stoğuna kompleks B' den 100 µl eklenir.

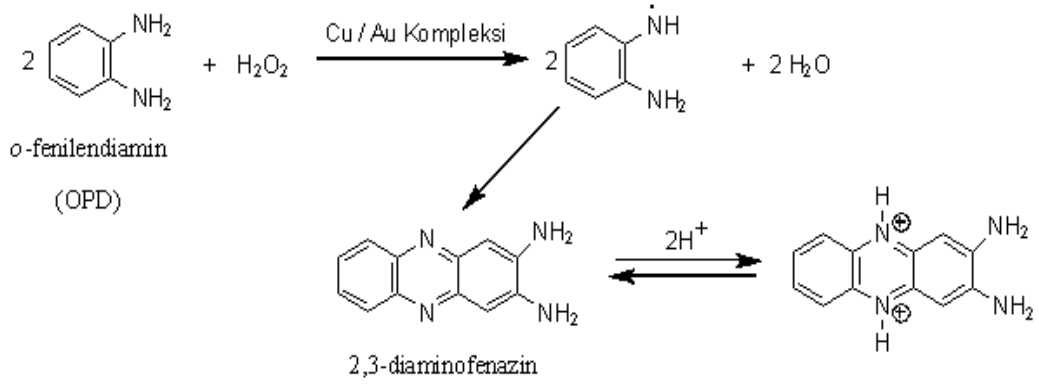
96 well plate kuyucuklarına ekilen ve inkübasyonları tamamlanan hücrelerin üzerinden besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Hücelere 100 µl kompleks A eklendi, 30 dk inkübasyona bırakıldı. Floresans ölçümü ışığa (eksitasyon) 494 nm; uyarılma (emisyon) 516 nm' de gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formüle yerleştirildi ve sonuçlar hücre içi % Ca²⁺ düzeyi olarak ifade edildi.

$$\% \text{ Ca}^{2+} \text{ Düzeyi} = 100 \times [\text{ Floresans}_{\text{örnek}} - \text{ Floresans}_{\text{kör}}] / \text{ Floresans}_{\text{kontrol}}$$

3.4.8 *In Situ* Transamidasyon Deneyi

Deneyin temel prensibi; o-Fenilendiamin(dihidroklörür)-OPD, yaban turbu peroksidaz konjugatlarının tespiti için ELISA prosedürlerinde kullanıma uygun bir kromojenik substrattır. Bu reaksiyonda turuncu-kahverengi renkte çözünebilir bir son ürün oluşur (Şekil 9). Spektrofotometrik olarak 450 nm' de absorbansı okunabilir veya OPD reaksiyonu 3 N HCL veya 3 M H₂SO₄ ile durdurulduktan sonra 492 nm' de absorbans okuması yapılabilir.



Şekil 9. OPD molekülünün peroksidaz enzimi ile katalizlenen reaksiyonu.

Hücrelere gerekli inkübasyonlar yapıldıktan sonra inkübasyon süresinin son saatinde 1 mM 5-BP ile muamele edildi. Ardından 1 saatin sonunda hücreler toplandı ve lizatlandı. BCA yöntemi ile protein miktar tayini yapıldı. 96 kuyucuklu mikrolakaya 50 µl hücre lizatı (10 µg protein içeren) ve üzerine 50 µl kaplama tamponu (coating buffer) eklendi. Mikrolaka kapağı kapatıldıktan sonra +4°C’ de 16-18 saat inkübe edildi. Süre sonunda her kuyucuğa 200 µl bloklama tamponu eklendi ve 2 saat süreyle 37°C’ de inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardan sıvı uzaklaştırıldı, 1 kere yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı. Kuyucuklara 100 µl 1:1000 oranında hazırlanmış HRP-SA içeren yıkama tamponu eklendi. 1 saat süre ile 37°C’ de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı, 200 µl substrat çözeltisi eklendi. 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve ardından 100 µl 3 N HCl eklenerek reaksiyon durduruldu. 492 nm’ de absorbansı okundu (N. X. Chen et al., 2013; Zhang et al., 1998). Kit çalışmasının kontrolü olarak elde edilen lizatlardan 50 µg protein içerecek şekilde örnekler hazırlandı ve %12’ lik jelde yürütüldü. Ardından Western Blote prosedürüne tabii tutuldu. PVDF membran; 1:1000 oranında hazırlanmış HRP-SA antikoruna ile 12 saat muamele edildi ve görüntüleme yapıldı (Zhang et al., 1998).

4 Bulgular

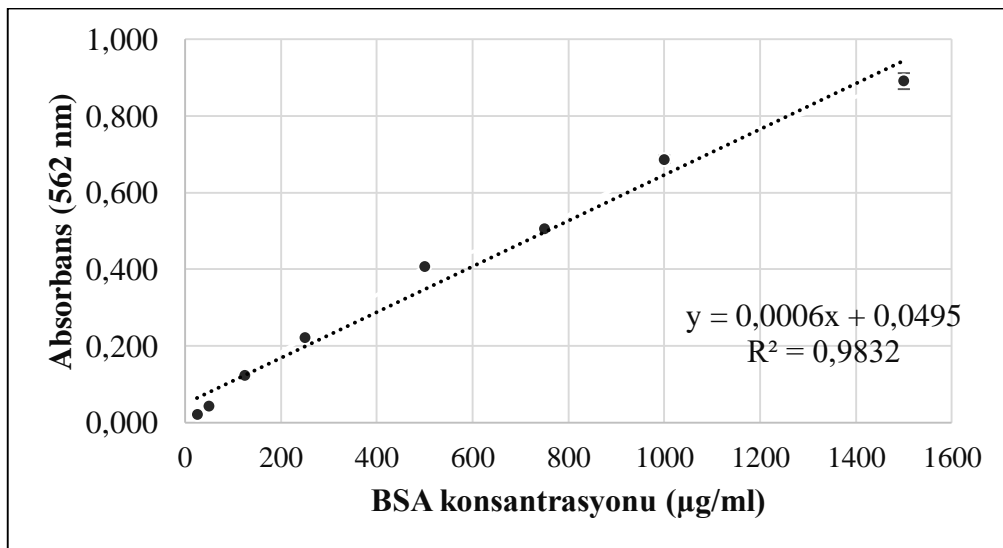
4.1 Standart Eğriler

4.1.1 Protein Miktar Tayini Standart Eğrisi

Protein miktar tayini hesaplanmasında kullanılmak üzere, çeşitli konsantrasyonlarda (25, 50, 125, 250, 500, 1000 µg/ml) BSA içeren çözeltiler ile BCA deneyi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 7’de ortalama absorbands değerleri ± standart sapma (Ort. ± S.S) olarak sunulmuştur. Bu değerlere göre çizilen standart eğri grafiği ve hesaplamada kullanılan eğri denklemi Şekil 10’ da gösterilmiştir.

Tablo 7. BSA standart eğrisine ait ortalama absorbands değerleri

BSA (µg/ml)	Absorbans (Ort ± S.S.)
25	0,022 ± 0,001
50	0,043 ± 0,002
125	0,123 ± 0,008
250	0,222 ± 0,002
500	0,407 ± 0,001
1000	0,687 ± 0,009



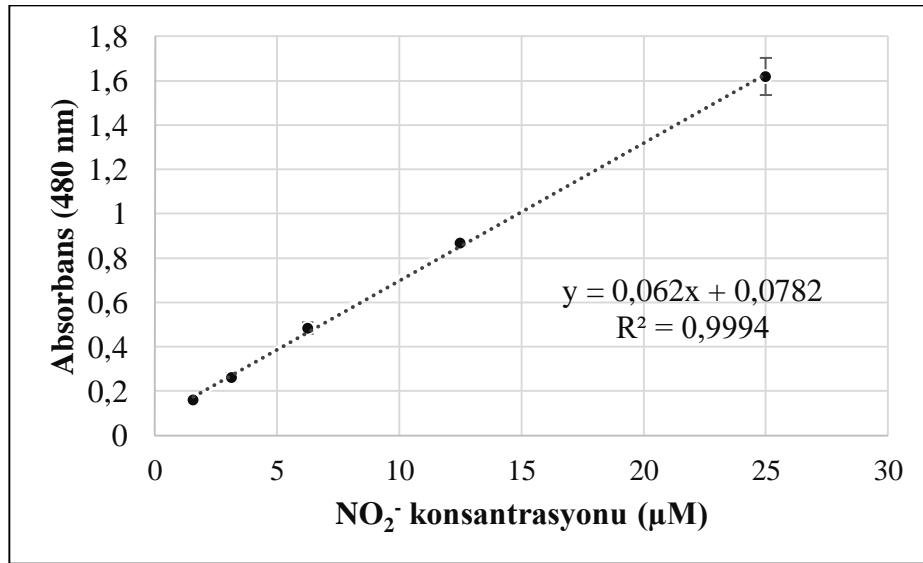
Şekil 10. BSA standart eğrisine ait grafik

4.1.1 Nitrit Düzeyi Tayini Standart Eğrisi

Hücrelerdeki nitrit (NO_2^-) düzeylerinin tayininde standart eğri olarak kullanılmak üzere, farklı konsantrasyonlarda NaNO_2 içeren çözeltiler (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25 μM) ile Griess deneyi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 8’ de ortalama absorbans değerleri \pm standart sapma (Ort. \pm S.S.) olarak sunulmuştur. Bu değerlere göre çizilen standart eğri grafiği ve hesaplamada kullanılan eğri denklemi Şekil 11’ de gösterilmiştir.

Tablo 8. Sodyum nitrit standart eğrisine ait ortalama absorbans değerleri

[NaNO_2] (μM)	Absorbans (Ort \pm S.S.)
1,56	0,162 \pm 0,012
3,13	0,263 \pm 0,019
6,25	0,4839 \pm 0,026
12,5	0,8679 \pm 0,014
25	1,619 \pm 0,084

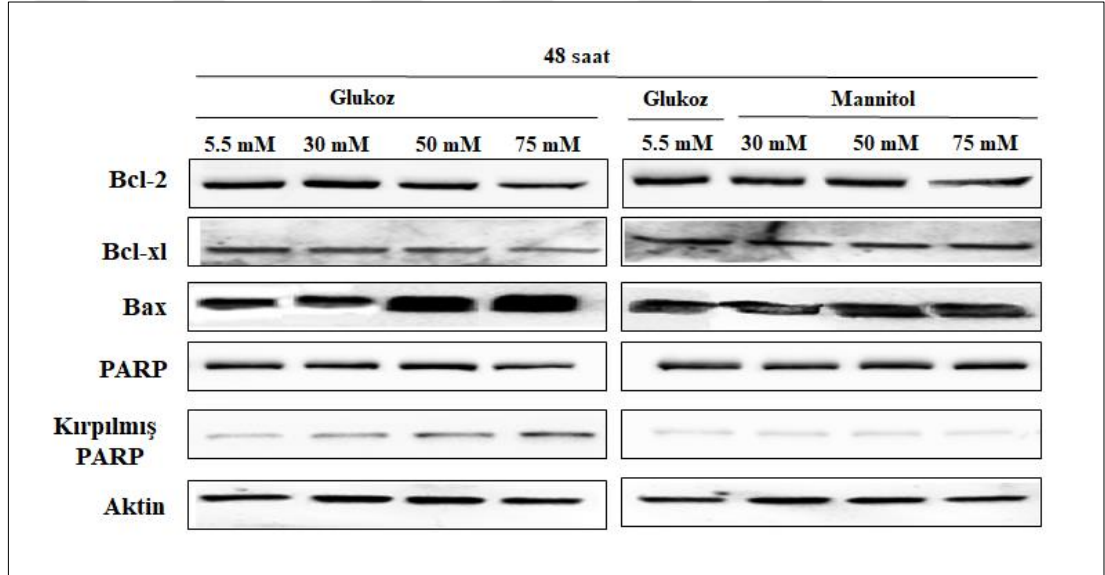


Şekil 11. Sodyum nitrit standart eğrisine ait grafik.

4.2 HK-2 Hücrelerinde Gerçekleştirilen Optimizasyon Çalışmaları

4.2.1 *In Vitro* Diyabetik Nefropati Modelinin Oluşturulmasına Yönelik Çalışmalar:

Hücrelerde DN modeli oluşturmak için kullanılacak glukoz konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, HK-2 hücreleri bölüm 3.4.2.1’ de belirtildiği şekilde farklı konsantrasyonlarda glukoz ve mannitol içeren besiyerleri ile 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, yüksek glukoz ile indüklenen nefropatik hücre hasarı immünoiblatlama (IB) yöntemi kullanılarak hücre içi apoptotik belirteçlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler ile belirlenmiştir (Şekil 12).

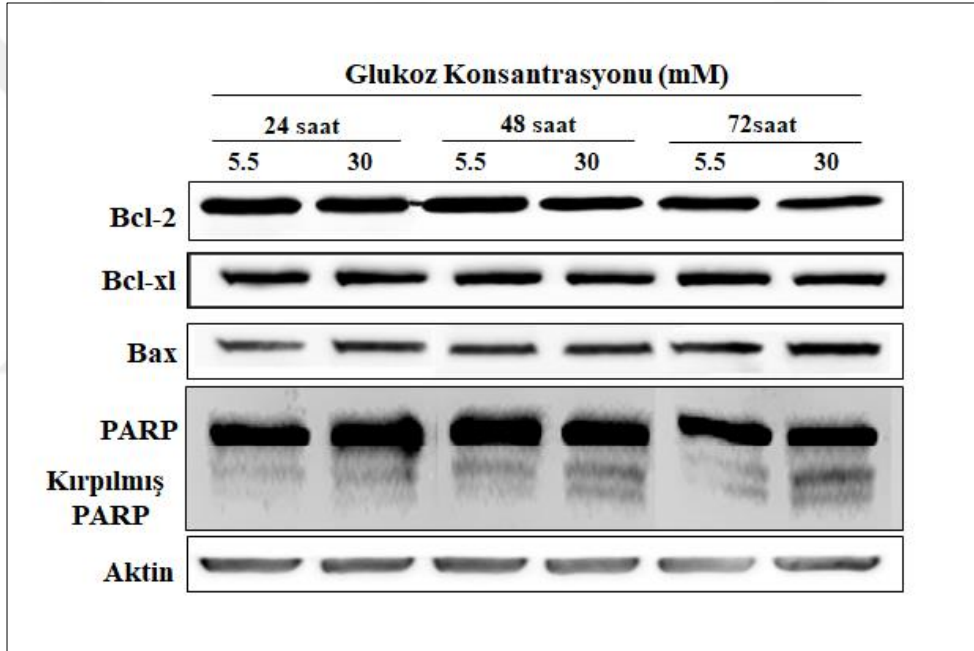


Şekil 12. DN modelinde kullanılacak glukoz konsantrasyonunun optimizasyonuna ait IB görüntüleri. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz ve mannitol içeren besiyeri ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda IB yöntemi ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

Elde edilen bulgularda 30, 50 ve 75 mM glukoz içeren her üç besiyeri ile inkübasyonun da hücrelerdeki apoptotik belirteçlerde anlamlı düzeyde değişikliği neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Deney koşullarında, artan ozmotik baskının kontrolü amacıyla uygulanan mannitol gruplarında ise; 30 mM’lık mannitol uygulamasının

apoptotik belirteçler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı ancak 50 ve 75 mM uygulanan gruplarda Bcl-2 ve Bax protein ekspresyonlarında anlamlı değişikliğe neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, DN modelinin 30 mM glukoz içeren besiyeri ile gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

En uygun indüksiyon süresinin belirlenmesi için, hücreler bölüm 3.4.2.1’ de anlatıldığı gibi 30 mM konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyerleri ile 24, 48 ve 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. İndüksiyon süreleri sonunda toplanan hücrelerde IB yöntemi kullanılarak apoptotik hücre ölümü ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir (Şekil 13).



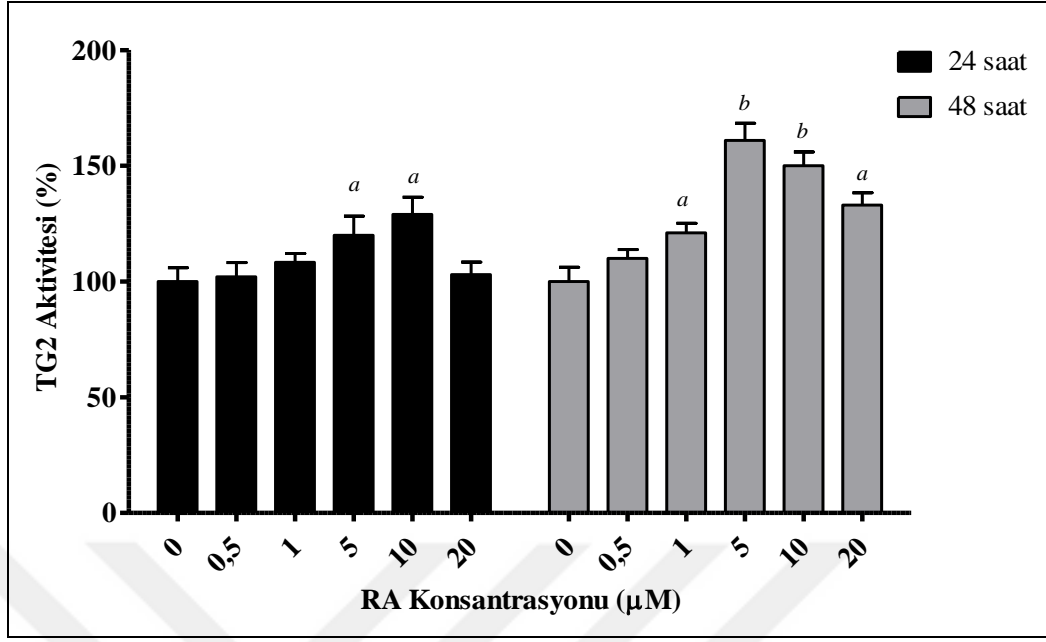
Şekil 13. DN modelinde kullanılacak indüksiyon süresinin optimizasyonuna ait IB görüntüleri. Hücreler belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile 24, 48 ve 72 saat süre inkübe edildikten sonra, toplam inkübasyon süresi sonunda IB yöntemi ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlarda, 30 mM glukoz içeren besiyeri ile inkübasyonunun 24. saatinde Bax düzeyinin 5,5 mM glukoz içeren kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte yüksek glukoz ile 48. saatten itibaren Bcl-2 ve Bcl-xl düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtığı, kırpılmış- PARP

düzeyinde ise anlamlı artışa neden olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu bulgulardan yola çıkılarak DN modeli için 30 mM'lık glukoz ile 48 saat indüksiyon gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

4.2.2 Retinoik Asit Uygulaması ile TG2 Aktivitesinin İndüksiyonuna Yönelik Optimizasyon Çalışmaları

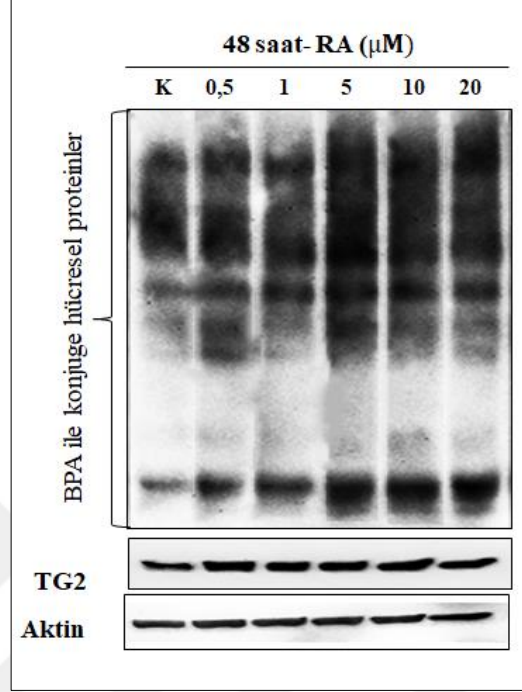
Çalışmamızda TG2 transamidasyon aktivitesinin retinoik asit (RA) ile artırılması planlanmıştır. Bu amaçla, HK-2 hücrelerinde kullanılacak en uygun RA dozunun ve aktivasyon süresinin belirlenmesine yönelik olarak, Bölüm 3.4.2.2' de belirtildiği şekilde hücrelere farklı konsantrasyonlarda (0, 0,5, 1, 5, 10, 20 μ M) RA uygulanarak 24 ve 48 saat süre ile aktivasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde *in situ* transamidasyon yöntemi ile TG2 aktivite düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlenmiş olup, sonuçlar kontrole oranlanarak % TG2 aktivitesi olarak Şekil 14' de sunulmuştur.



Şekil 14. Retinoik asit ile TG2 aktivitesinin artırılmasına yönelik optimizasyon çalışmasında TG2 aktivitesine ait grafik. Hücreler belirtilen konsantrasyonlarda RA ile 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilip, *in situ* transamidasyon yöntemi ile spektrofotometrik olarak TG2 aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu hücrelerine göre oranlanarak % TG2 aktivitesi (Ort. ± S.S.) olarak verilmiştir olarak verilmiştir ($n=3$) (kontrolle göre anlamlı yüksek, $a: p < 0.01$; $b: p < 0.001$).

Aktivite çalışmasından elde edilen bulgularda, 24 saat süre ile gerçekleştirilen RA uygulamasında 5 ve 10 µM RA' nın TG2 aktivitesinde kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$). RA' nın 48 saatlik uygulamasında, 1 µM'lık konsantrasyondan itibaren TG2 aktivitesinde anlamlı artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$).

In situ transamidasyon yöntemiyle RA' nın TG2 üzerine aktivatör etkisinin incelenmesi ile eş zamanlı olarak, hücre lizatlarında IB yöntemi ile TG2 protein ekspresyon düzeyleri de incelenmiştir (Şekil 15).

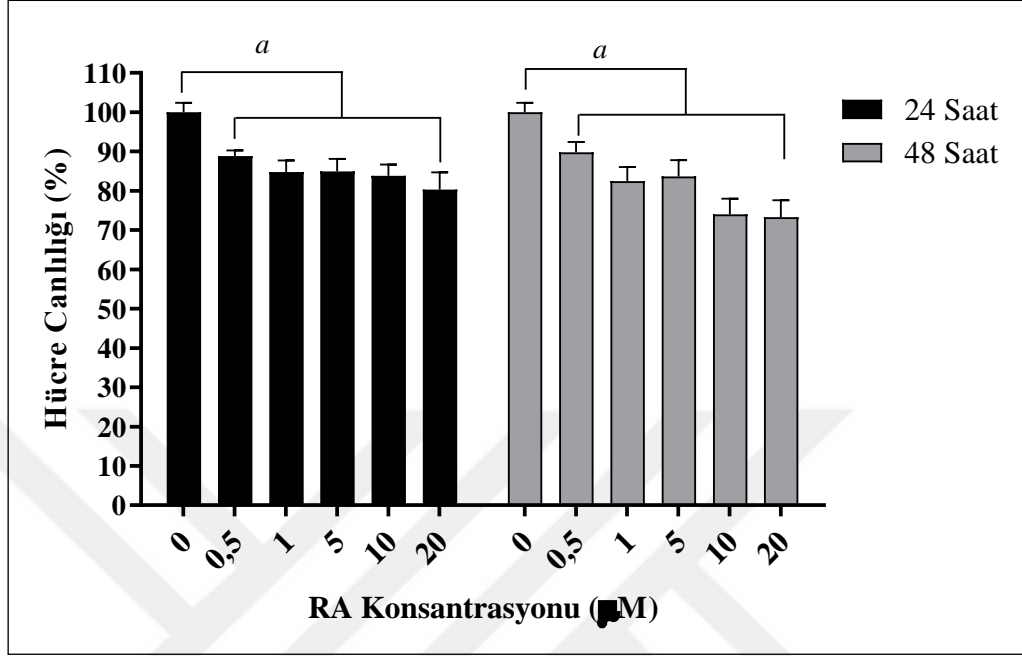


Şekil 15. Retinoik asit ile TG2 aktivitesinin artırılmasına yönelik gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında TG2 aktivitesine ve protein ekspresyon düzeyine ait IB görüntüleri. Hücreler şekilde belirtilen konsantrasyonlarda RA ile 48 saat süre ile inkübe edilip, IB yöntemi ile hücre içi total biyotillenmiş pentilamin (BPA) düzeyi ile TG2 aktivitesi, anti-TG2 antikorunu kullanılarak TG2 protein ekspresyon düzeyleri gösterilmiştir.

Şekil 14' de gösterilen *in situ* TG2 aktivite tayinine ait hücre lizatları ile gerçekleştirilen IB çalışmalarında, 48 saat indüksiyon sonucunda 5µM' lık RA uygulamasının hücre içi biyotillenmiş-peptilamin (BPA) düzeyinde anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 15, $p < 0,05$).

Enzim aktivitesini indüklemek için kullanılan RA' nın HK-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi amacıyla, HK-2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (0, 0,5, 1, 5, 10, 20 µM) RA uygulanarak 24 ve 48 saat süre ile aktivasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi ile hücre canlılığı

düzeyi ölçülmüştür (Bölüm 3.4.5). Elde edilen sonuçlar kontrole oranlanarak % hücre canlılığı olarak Şekil 16' da verilmiştir.

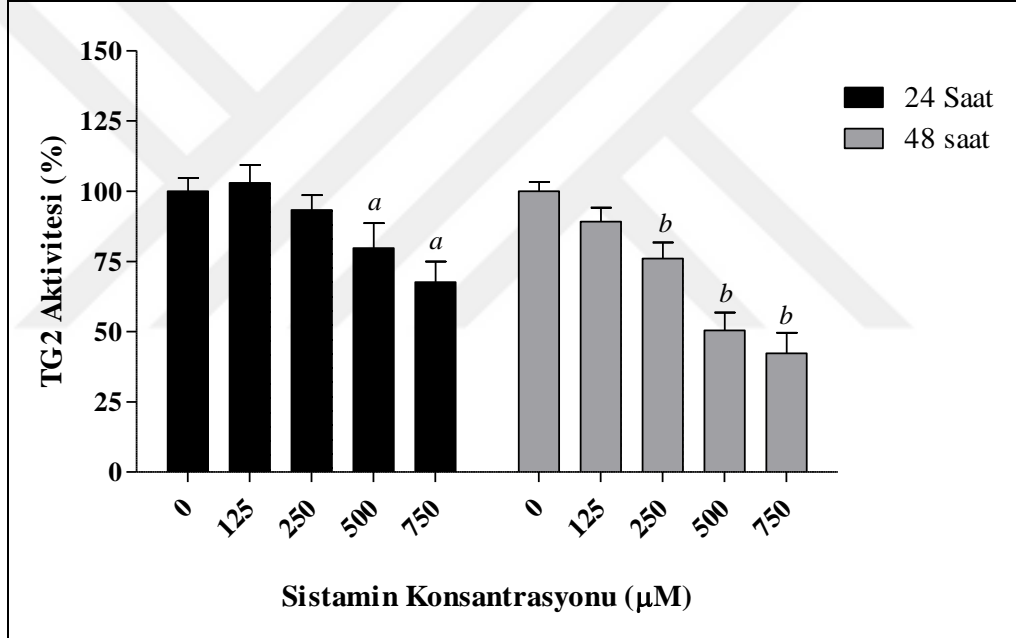


Şekil 16. Retinoik asidin HK-2 hücre canlılığı üzerine olan etkisini gösteren grafik. Hücreler şekilde belirtilen konsantrasyonlarda RA ile 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilip MTT yöntemi ile spektrofotometrik olarak hücre canlılığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu hücrelerine göre oranlanarak % hücre canlılığı (Ort. ± S.S.) olarak verilmiştir (n=3) (a: kontrole göre anlamlı derece azalmış, $p < 0.05$).

Elde edilen bulgularda, HK-2 hücrelerinde RA' nın 0,5 µM'dan itibaren 24 ve 48 saatlik sürelerde hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte kullanılan en yüksek RA konsantrasyonu (20 µM) ile 48 saatlik indüksiyon süresinde dahi hücre canlılığının kontrole göre % 73.3 gibi yüksek bir düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

4.2.3 Sistamin Uygulaması ile TG2 Aktivitesinin İnhibisyonuna Yönelik Optimizasyon Çalışmaları

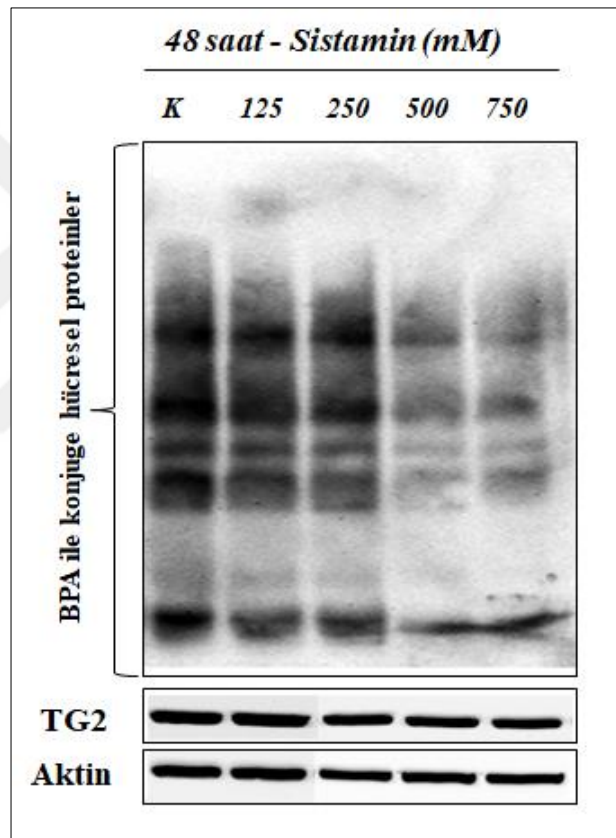
Çalışmamızda TG2 aktivitesinin sistamin ile inhibisyonu planlanmıştır. Bu amaçla, kullanılacak en uygun sistamin dozunun ve inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik olarak, Bölüm 3.4.2.2’ de belirtildiği şekilde HK-2 hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0, 125, 250, 500, 750, 1000 μM) sistamin ile 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde *in situ* transamidasyon yöntemi ile TG2 aktivite düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlenmiş olup, sonuçlar kontrole oranlanarak % TG2 aktivitesi (Ort. \pm S.S.) olarak Şekil 17’ de sunulmuştur.



Şekil 17. Sistamin ile TG2 aktivitesinin inhibe edilmesine yönelik gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında TG2 aktivitesine ait grafik. Hücreler şekilde belirtilen konsantrasyonlarda sistamin ile 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilip, *in situ* transamidasyon yöntemi ile TG2 aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu hücrelerine göre oranlanarak % TG2 aktivitesi (Ort. \pm S.S.) olarak verilmiştir ($n=3$) (Kontrole göre anlamlı düzeyde azalmış, $a: p < 0.01$; $b: p < 0.001$).

Aktivite çalışmalarında elde edilen bulgularda, 24 saat süre ile gerçekleştirilen sistamin uygulamasında 500 ve 750 μM sistamin ile hücrelerdeki TG2 aktivitesinin kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0.01$). Bununla birlikte 48 saatlik sistamin uygulamasında ise, 250 μM 'lık konsantrasyondan itibaren TG2 aktivitesinde anlamlı azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$).

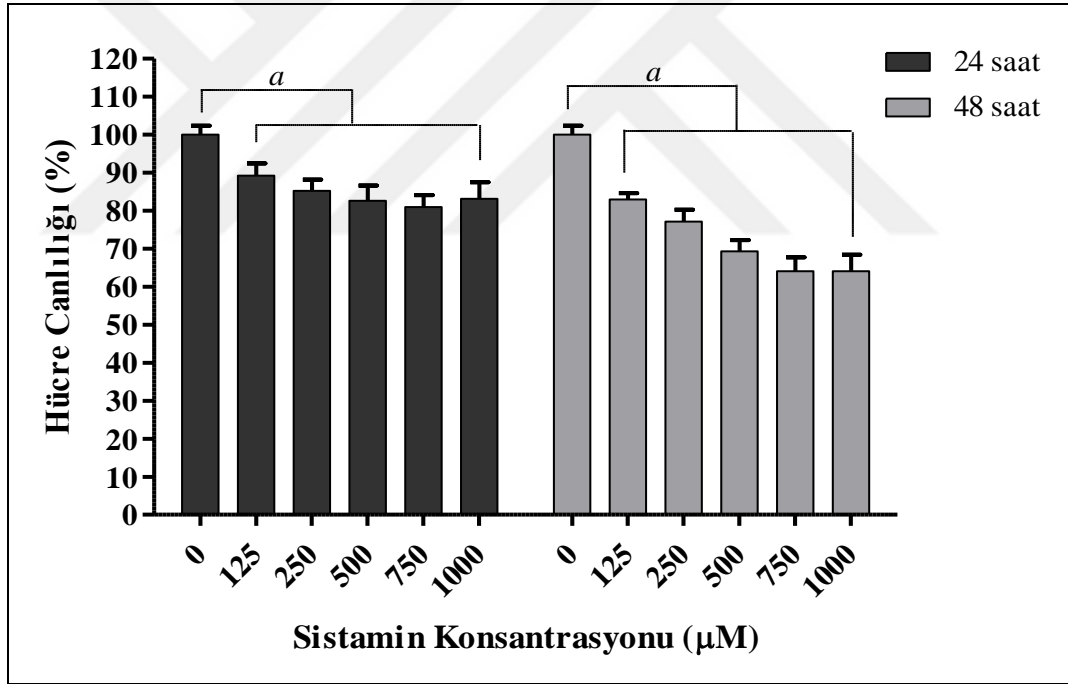
In situ transamidasyon yöntemiyle sistaminin TG2 aktivitesi üzerine inhibitör etkisinin incelenmesi ile eş zamanlı olarak, hücre lizatlarında IB yöntemi ile TG2 protein ekspresyon düzeyleri de incelenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Sistamin ile TG2 aktivitesinin inhibisyonuna yönelik gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında TG2 aktivitesine ve protein ekspresyon düzeyine ait IB görüntüleri. Hücreler şekilde belirtilen konsantrasyonlarda sistamin ile 48 saat süre ile inkübe edilip, IB yöntemi ile hücre içi total biyotillenmiş pentilamin içeriği ile TG2 aktivitesi, anti-TG2 antikoruna ile TG2 protein ekspresyon düzeyi gösterilmiştir.

Şekil 17’ de gösterilen *in situ* TG2 aktivite tayinine ait hücre lizatları ile gerçekleştirilen IB çalışmalarında, 48 saat indüksiyon sonucunda 500 ve 750 μM ’lık sistamin uygulamasının hücre içi biyotillenmiş-pentilamin (BPA) düzeyinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 18, $p < 0,01$).

Enzim aktivitesini inhibe etmek için kullanılan sistamin molekülünün HK-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin incelenmesi amacıyla HK-2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (0, 125, 250, 500, 750, 1000 μM) sistamin uygulanarak 24 ve 48 saat süre ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.4.2.2). İnkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi ile hücre canlılığı düzeyi ölçülmüştür (Bölüm 3.4.5). Elde edilen sonuçlar kontrole oranlanarak % hücre canlılığı olarak Şekil 19’ da sunulmuştur.



Şekil 19. Sistaminin HK-2 hücre canlılığı üzerine olan etkisini gösteren grafik. Hücreler belirtilen konsantrasyonlarda sistamin ile 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilip MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular kontrol grubu hücrelerine göre oranlanarak % hücre canlılığı (Ort. \pm S.S) olarak verilmiştir ($n=3$) (a: kontrole göre anlamlı derece azalmış, $p < 0.05$).

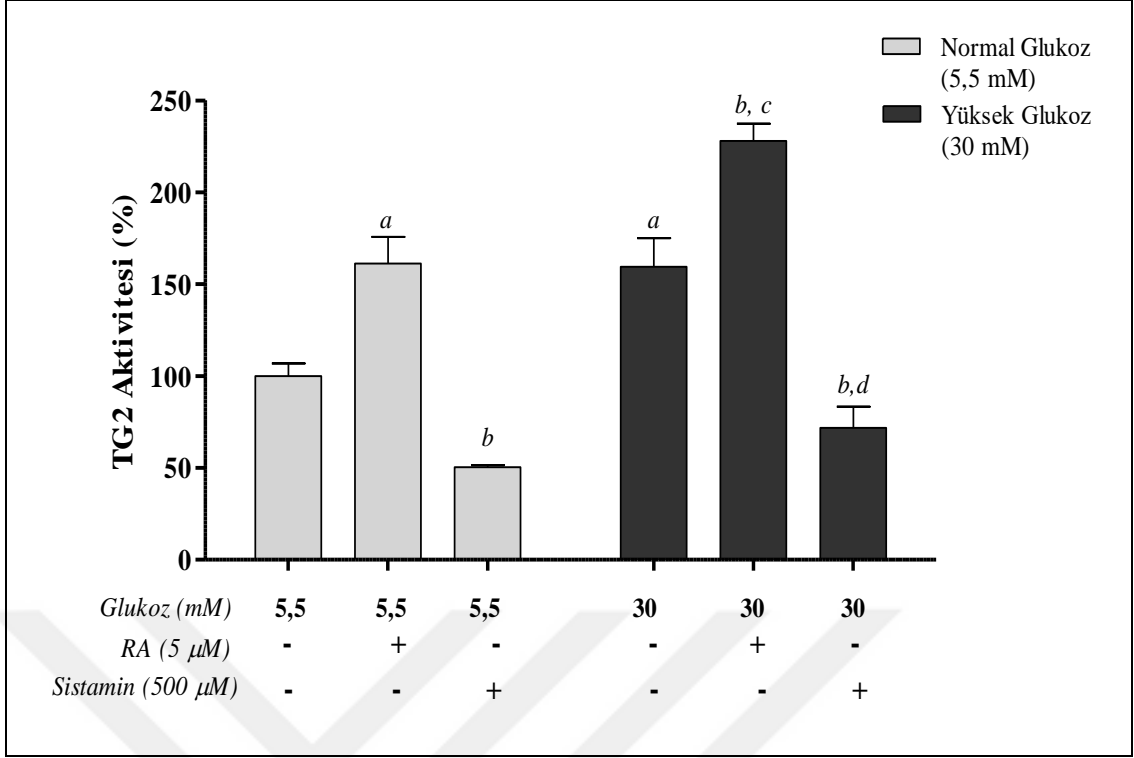
Elde edilen bulgularda, HK-2 hücrelerinde yapılan 24 ve 48 saatlik indüksiyonlarda sistamin molekülünün 125 μM ' dan itibaren hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). En düşük hücre canlılık düzeylerinin, 750 ve 1000 μM ' lık sistamin ile 48 saatlik inkübasyon sonucunda olduğu belirlenmiştir (sırası ile % 64,1 \pm 3,64; % 64,11 \pm 4,37).

4.3 *İn Vitro* Diyabetik Nefropati Modelinde TG2'nin Fonksiyonunun İncelenmesi

HK-2 hücrelerinde bölüm 3.4.2.1' de detaylı şekilde anlatıldığı gibi DN modeli oluşturulmuştur. Ardından bir grup hücre 5 μM RA ile diğer bir grup hücre ise 500 μM sistamin ile 48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 5). İnkübasyon süresi sonunda hücreler toplanarak aşağıda belirtilen tayinler gerçekleştirilmiştir.

4.3.1 TG2 Aktivitesi ve Ekspresyonundaki Değişikliklerin İncelenmesi

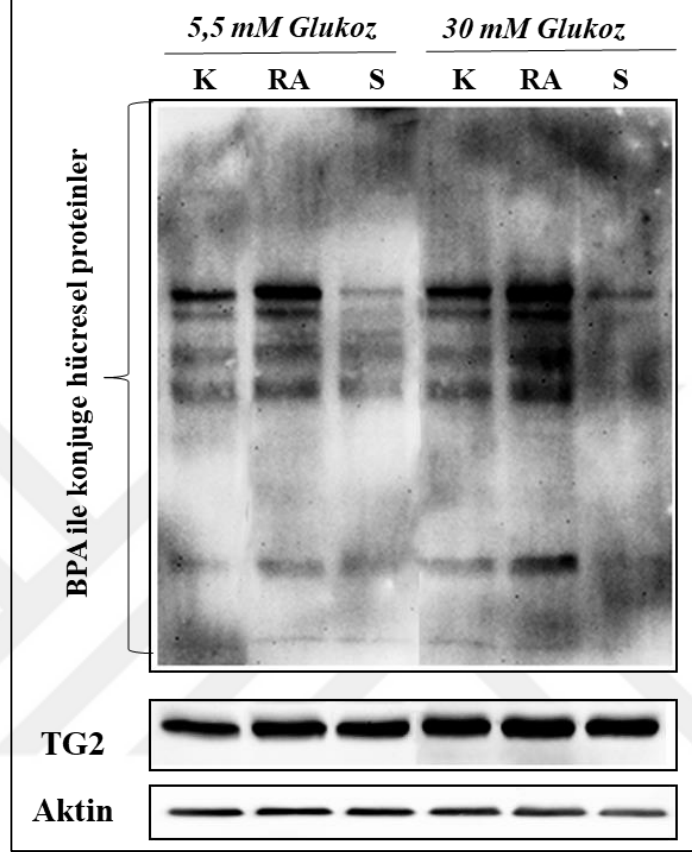
Çalışmanın temel amaçlarından biri de DN modelinde TG2' nin aktivasyonu ve inhibisyonu yolu ile HK-2 hücrelerindeki olası fonksiyonlarının incelenmesidir. Bu doğrultuda, öncelikle oluşturulan deney modelinde hücrelerdeki TG2 aktivitesi bölüm 3.4.8' deki yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar 5,5 mM glukoz ile inkübe edilen ve herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücrelerine göre % değişim olarak Şekil 20' de sunulmuştur.



Şekil 20. DN modelinde RA ve sistamin uygulamasının TG2 aktivitesi üzerine etkisini gösteren grafik. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra, RA veya sistamin ile (48 saat) inkübe edilmiştir. Toplam inkübasyon süresi sonunda *in situ* transamidasyon yöntemi ile TG2 aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu hücrelerine göre oranlanarak % TG2 aktivitesi (Ort. ± S.S.) olarak verilmiştir (n=3) (a: 5,5 mM Glukoz ile inkübe edilen kontrole göre anlamlı derece yükselmiş, $p < 0.001$; b: kontrole göre anlamlı derecede azalmış, $p < 0.01$; c: 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelere göre anlamlı düzeyde artmış, $p < 0.001$; d: 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelere göre anlamlı düzeyde azalmış, $p < 0.001$).

Elde edilen sonuçlarda, HK-2 hücrelerinde yüksek glukoz uygulamasının TG2 aktivitesi üzerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). DN modeli 5 µM RA uygulamasının TG2 aktivitesini hem normal hem de yüksek glukoz uygulanan hücreler göre anlamlı düzeyde yükselttiği tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Aynı koşullarda 500 µM sistamin uygulanan hücrelerde ise TG2 aktivitesinin normal ve yüksek glukoz uygulanan hücrelere göre anlamlı düzeyde azalmış olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$).

In situ transamidasyon yöntemi ile eş zamanlı olarak hazırlanan hücre lizatlarında IB yöntemi ile TG2 enzim aktivitesi ve TG2 protein ekspresyon düzeyleri de incelenmiştir (Şekil 21).

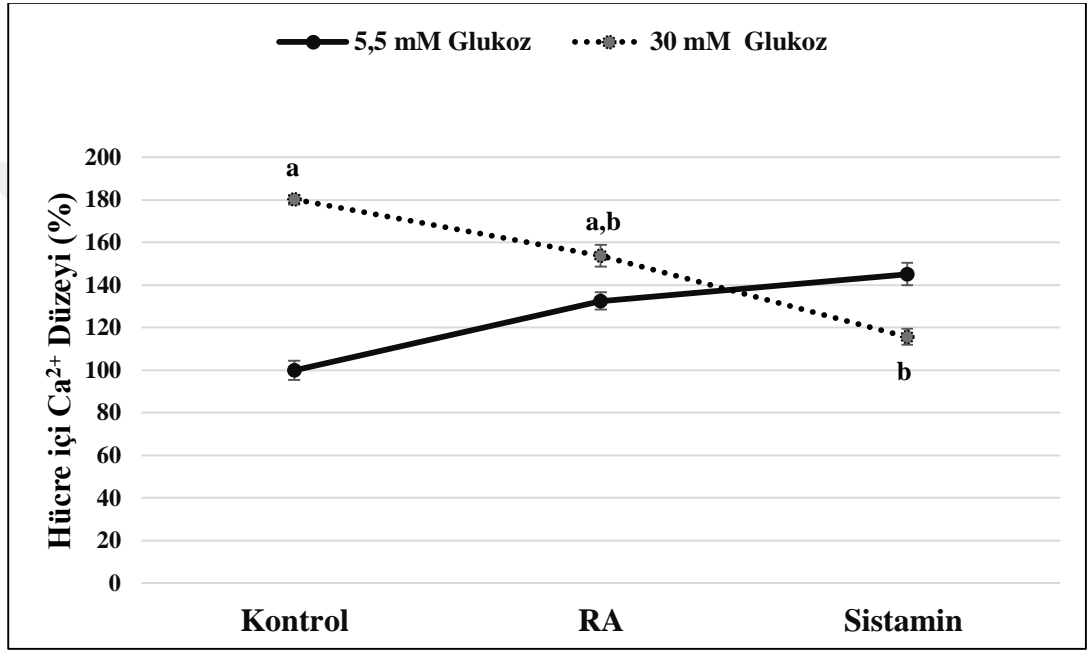


Şekil 21. DN modelinde RA ve sistamin uygulamasının TG2 aktivitesi ve protein ekspresyon düzeyi üzerine etkisini gösteren IB görüntüsü. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz ile inkübe edildikten sonra, RA (5 μ M) ve sistamin (500 μ M) ile 48 saat muamele edildi. Toplam inkübasyon süresi sonunda, IB yöntemi ile hücre içi total biyotinillenmiş pentilamin içeriği ile TG2 aktivitesi, anti-TG2 antikoruna ile TG2 protein ekspresyon düzeyi gösterilmiştir.

IB çalışmalarında elde edilen sonuçlar Şekil 20' de gösterilen *in situ* TG2 aktivitesine ait bulgulara benzer olarak bulunmuştur (Şekil 21, $p < 0,001$). Bunun birlikte, yüksek glukozun HK-2 hücrelerinde TG2' nin aktivitesinin yanı sıra, protein ekspresyon düzeyinde de anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$).

4.3.2 Hücre İçi Ca²⁺ Düzeyindeki Değişikliklerin İncelenmesi

TG2' nin kalsiyum bağımlı bir enzim olması nedeni ile deney koşullarında, hücre içi kalsiyum düzeyi incelenmiştir. Bu amaçla, bölüm 3.4.2.2' de anlatıldığı şekilde hazırlanan hücrelerde bölüm 3.4.7' deki spektrofotometrik yöntem ile hücre içi kalsiyum düzeyi ölçülmüştür. Elde edilen bulgular, kontrol hücrelerine göre % değişim olarak Şekil 22' de sunulmuştur.



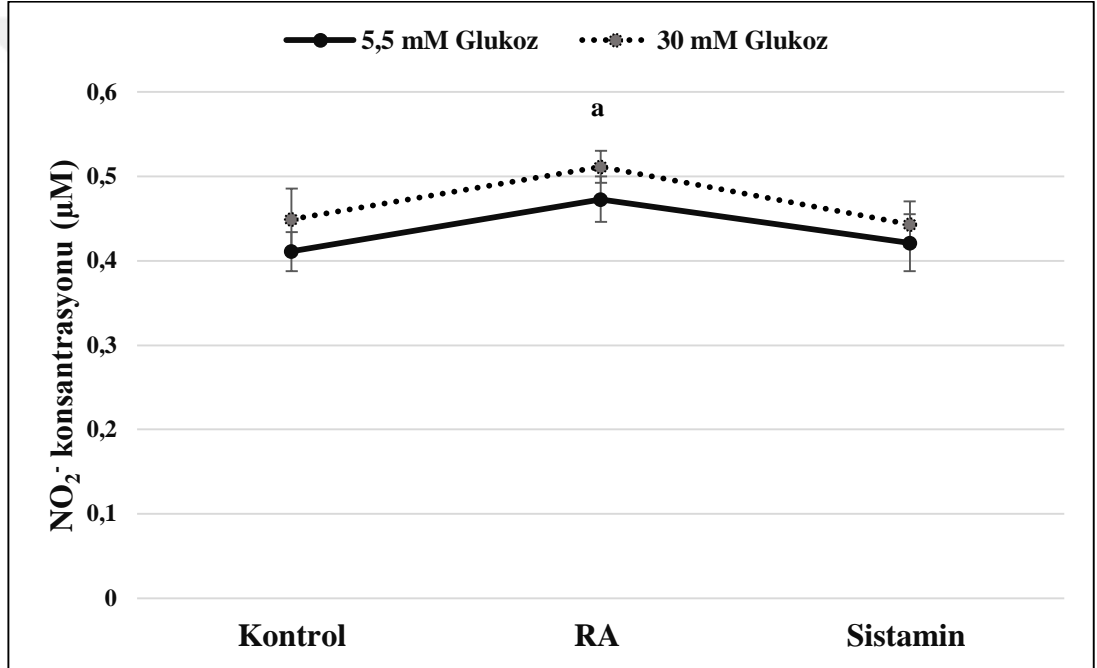
Şekil 22. DN modelinde RA ve sistaminin hücre içi kalsiyum düzeyi üzerine etkisini gösteren grafik. Hücrelerde DN modeli oluşturulduktan sonra RA (5 μ M) ve sistamin (500 μ M) uygulanarak 48 saat süre ile inkübe edilip; spektrofotometrik olarak kalsiyum düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu hücrelerine göre oranlanarak % Ca²⁺ düzeyi (Ort. \pm S.S.) olarak verilmiştir (n=3) (a,b: kontrole göre anlamlı yüksek, p< 0.01).

30 mM' lık glukoz ile inkübasyonun, kontrol hücrelerine göre, hücre içi Ca²⁺ düzeyinde anlamlı artışa yol açtığı belirlenmiştir (p< 0,01). 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelerde; RA uygulamasının hücre içi Ca²⁺ düzeyinde anlamlı azalmaya (p< 0,001) neden olduğu belirlenmekle birlikte, kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek olarak bulunmuştur (p< 0,001).

30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelerde; sistamin uygulamasının hücre içi Ca^{2+} düzeyinde anlamlı azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$).

4.3.3 İnflamasyon (Nitrit) Düzeyindeki Değişikliklerin İncelenmesi

TG2' nin hücrede ilişkili olduğu yollardan birisi de inflamasyon yollarıdır. DN modelinde TG2' nin inflamatuvar yollardaki olası rolünü araştırmak için bölüm 3.4.4' de açıklanan spektrofotometrik bir yöntem olan Griess reaksiyonu ile hücrelerdeki nitrit düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular μM nitrit olarak Şekil 23'de sunulmuştur.



Şekil 23. DN modelinde retinoik asit ve sistaminin nitrit üzerine etkisini gösteren grafik. Hücrelerde DN modeli oluşturulduktan sonra, RA ($5\mu M$) ve sistamin ($500\mu M$) ile 48 saat süre ile inkübe edilip; Griess yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak nitrit miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar; Ort. \pm S.S. olarak sunulmuştur ($n=3$) (a: kontrole göre anlamlı yüksek, $p < 0,01$)

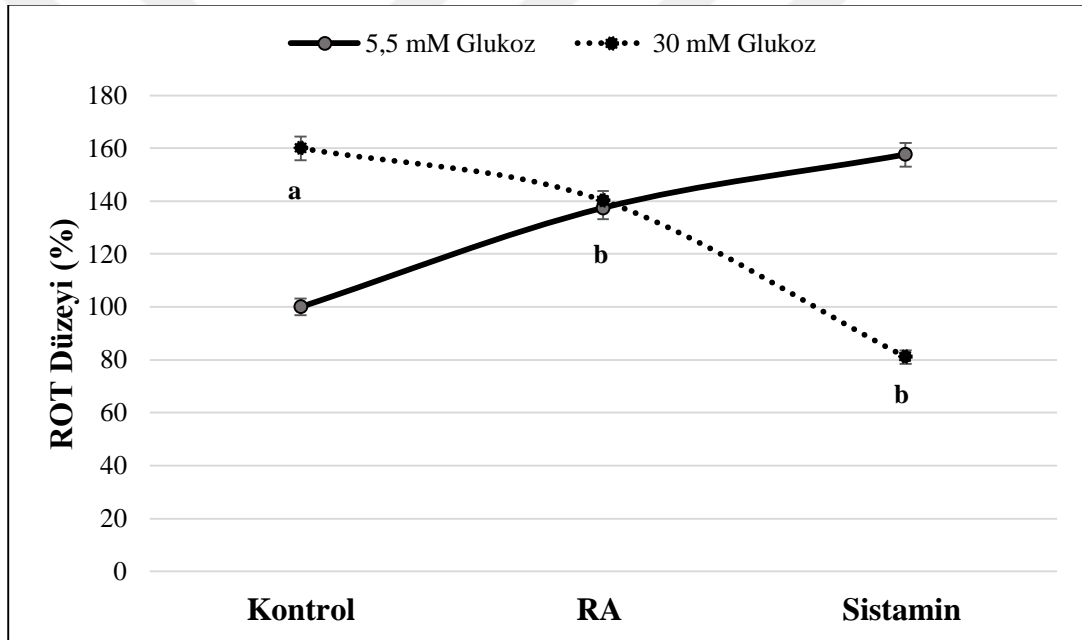
Gerçekleştirilen deney modelinde normal ve yüksek glukoz ile inkübe edilen hücrelerdeki nitrit düzeyleri benzer olarak bulunmuştur ($p: 0,5764$). 30 mM glukoz ile

inkübe edilen hücrelerde RA uygulamasının nitrit düzeyinde kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$).

Hücrelere sistamin uygulaması; 5,5 mM ve 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelere göre nitrit düzeyinde anlamlı değişiklik göstermemiştir ($p > 0.5$).

4.3.4 Hücre İçi ROT Üretimindeki Değişikliklerin İncelenmesi

DN modelinde hücre hasarından rol oynayan oksidatif stres ile TG2 aktivitesindeki değişikliklerin ilişkisi bölüm 3.4.6' da anlatılan yöntemle hücre içi ROT düzeyi üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, kontrol hücrelerine göre % değişim olarak Şekil 24' de sunulmuştur.

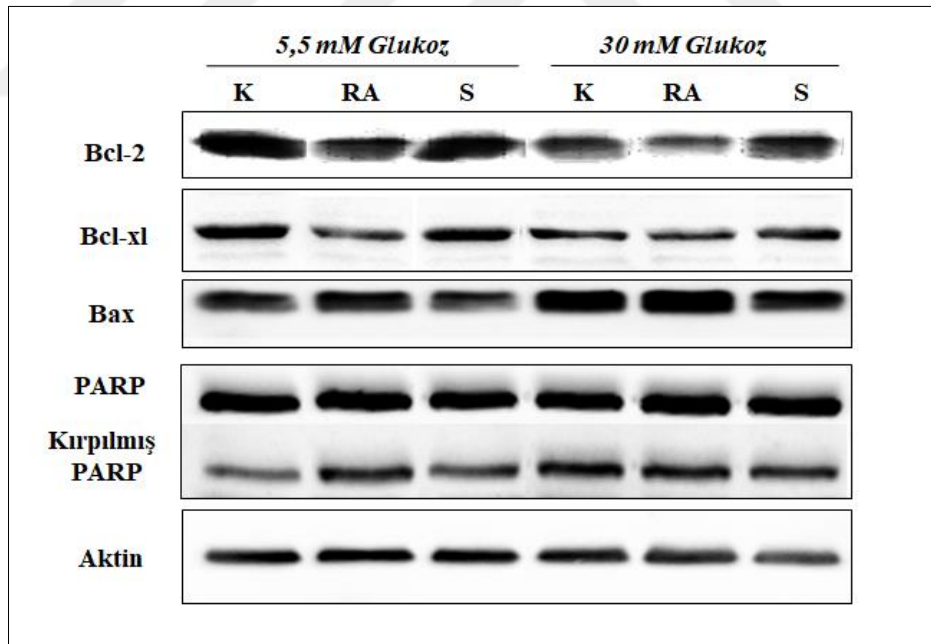


Şekil 24. DN modelinde retinoik asit ve sistaminin hücre içi ROT düzeyi üzerine etkisini gösteren grafik. Hücrelerde DN modeli oluşturulduktan sonra RA ($5\mu M$) ve sistamin ($500\mu M$) uygulanarak 48 saat süre ile inkübe edilip; DCFH-DA yöntemi ile spektrofotometrik olarak ROT düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu hücrelere oranlanarak % ROT düzeyi (Ort. \pm S.S.) olarak verilmiştir ($n=3$)(a,b: $p < 0.001$).

30 mM'lık glukoz ile inkübe edilen hücrelerde ROT düzeyinin kontrol hücrelerine göre, anlamlı arttığı belirlenmiştir ($p < 0,001$). 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelerde; RA uygulamasının hücre içi ROT düzeyinde anlamlı azalmaya ($p < 0,001$) neden olduğu belirlenmekle birlikte, kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0,001$). Sistamin uygulaması yüksek glukoz ile inkübe edilen hücrelerde yüksek glukoz nedeniyle artmış olan ROT düzeyinde, anlamlı azalmaya neden olmuştur ($p < 0,001$).

4.3.5 Hücre İçi Apoptoz Belirteçlerindeki Değişikliklerin İncelenmesi

TG2' nin hücrelerde koşullara bağlı olarak pro- ve anti-apoptotik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda DN modelinde gelişen apoptotik hücre hasarında TG2' nin fonksiyonu hücrel apoptoz belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri üzerinden IB yöntemi ile belirlenmiştir (Bölüm 3.4.3.4). Elde edilen IB görüntüleri Şekil 25' de sunulmuştur.



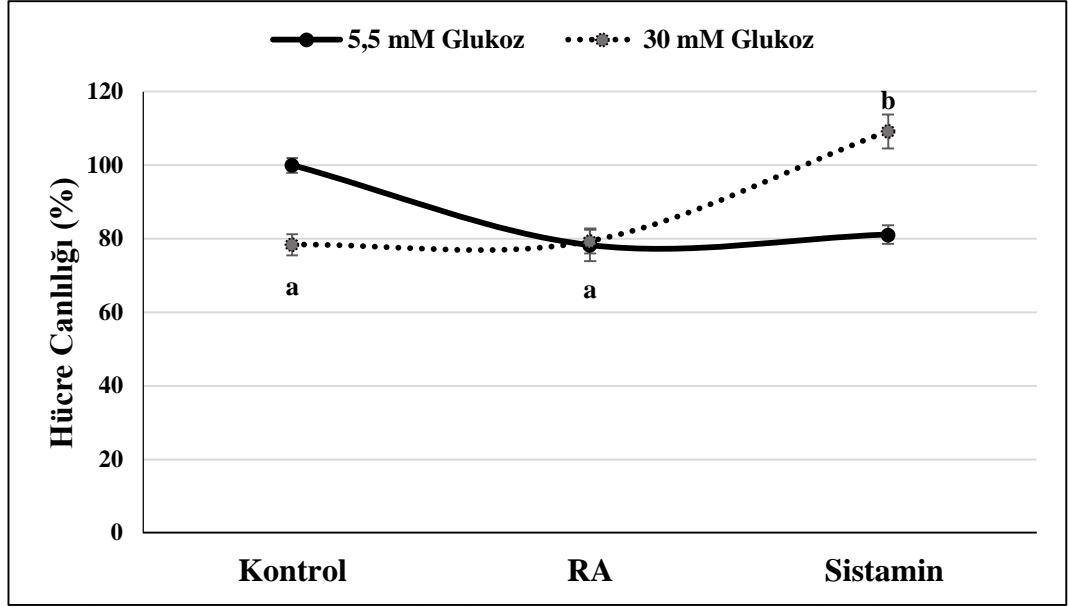
Şekil 25. DN modelinde retinoik asit ve sistaminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini ait IB görüntüleri. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra, RA (5 μ M) ve sistamin (500 μ M) uygulanmıştır (48 saat). Toplam inkübasyon süresi sonunda IB yöntemi ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlarda, 30 mM glukoz ile gerçekleştirilen inkübasyon sonrasında Bcl-2 ve Bcl-xl düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış olduğu, Bax ve kırılmış- PARP düzeylerinin ise kontrole göre anlamlı düzeyde artmış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bununla birlikte, yüksek glukoz ile muamele edilen hücrelerde RA uygulaması sonrasında 30 mM glukoz ile muamele edilen hücrelere göre Bcl-2 ve Bcl-xl düzeylerinin daha düşük olduğu ($p < 0,001$); Bax ve kırılmış- PARP düzeylerinin ise anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$).

Yüksek glukoz ile muamele edilen hücrelerde Sistamin uygulaması sonrasında ise, Bcl-2 ekspresyon düzeyi 30 mM'lık kontrol hücrelerine benzer olarak bulunmuş ancak yüksek glukoz ile azalmış olan Bcl-xl düzeyinin anlamlı düzeyde artmış olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$). Ayrıca 30 mM'lık glukoz uygulaması ile kontrol hücrelerine göre artmış olarak tespit edilen Bax ve kırılmış- PARP düzeylerinin sistamin uygulaması ile anlamlı düzeyde azalmış olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$).

4.3.6 Hücre Canlılığının İncelenmesi

DN modeli oluşturulan hücrelerde TG2 aktivitesinde aktivatör ve inhibitör varlığında gözlenen değişikliklerin hücre canlılığı üzerine etkileri MTT yöntemi (bölüm 3.4.5) ile incelenmiştir. Elde edilen bulgular, kontrol hücrelerine göre % değişim olarak Şekil 26' da sunulmuştur.



Şekil 26. DN modelinde retinoik asit ve sistaminin hücre canlılığı üzerine etkisini gösteren grafik. Hücrelerde DN modeli oluşturulduktan sonra RA (5 μ M) ve sistamin (500 μ M) uygulanarak 48 saat süre ile inkübe edilip; MTT yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak hücre canlılığı düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu hücrelerine göre oranlanarak % hücre canlılığı (Ort. \pm S.S.) olarak sunulmuştur (n=3). (a,b: p<0,001)

30 mM'lık glukoz ile inkübe edilen hücrelerde; hücre canlılığının kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir (p< 0,001). RA uygulamasının; 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelerde, hücre canlılığı üzerinde anlamlı değişiklik oluşturmadığı, ancak kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu bulunmuştur (p< 0,001). Sistamin uygulaması ise yüksek glukoz ile inkübe edilen hücrelerde azalmış olan hücre canlılığı düzeyinde anlamlı artışa neden olmuştur (p< 0,001).

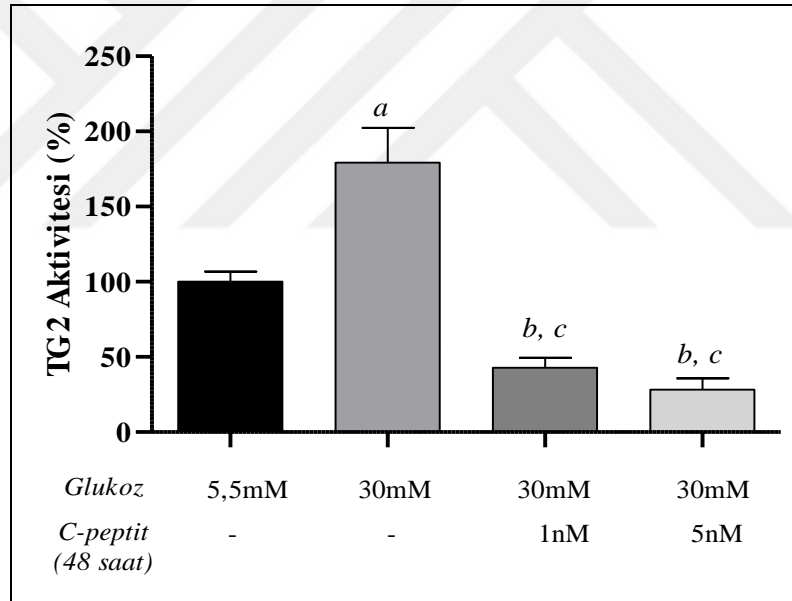
4.4 *In Vitro* Diyabetik Nefropati Modelinde C-peptitin Fonksiyonunun Araştırılması:

Çalışmamızın amaçlarından biri de C-peptit molekülünün; DN' deki etkileri ve TG2 ile olası ilişkilerini ortaya koymaktır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda Şekil 4'de

gösterildiği gibi, HK-2 hücrelerinde DN modeli oluşturulduktan sonra bölüm 3.4.2.3’de belirtilen uygulamalar gerçekleştirildi. C-peptitin fonksiyonları ile ilgili olarak yapılan tayinler aşağıda verilmektedir.

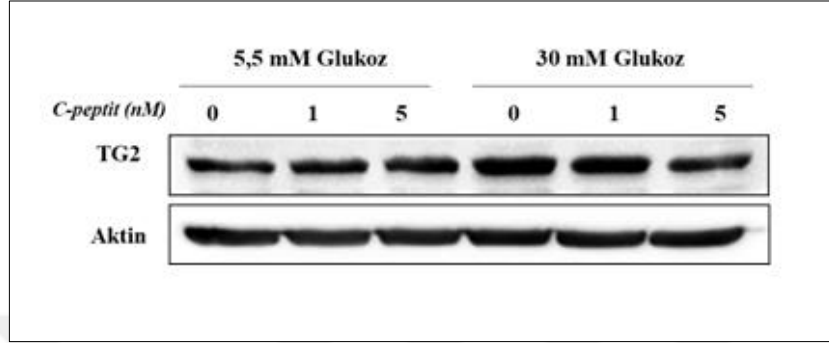
4.4.1 C-peptitin TG2 Aktivitesi ve Ekspresyon Düzeyi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:

Hücrelerde yüksek glukoz ile oluşturulan DN modelinin ardından C-peptit uygulamasının, TG2 aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bölüm 3.4.2.3’ de belirtilen inkübasyonların ardından bölüm 3.4.8’ de açıklanan yöntem kullanılarak TG2 aktivitesi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrole oranlanarak % TG2 aktivitesi olarak Şekil 27’ de sunulmuştur.



Şekil 27. DN modelinde C-peptitin TG2 enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren grafik. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra, 1 ve 5 nM C-peptit uygulanmıştır (48 saat). Toplam inkübasyon süresi sonunda *in situ* transamidasyon yöntemi ile TG2 aktivitesi belirlenmiştir. Sonuçlar 5,5 mM glukoz ile inkübe edilen kontrol hücrelerine göre % TG2 aktivitesi (Ort. \pm S.S.) olarak verilmiştir ($n=3$) (a: kontrole göre anlamlı yüksek, $p < 0.001$; b: kontrole göre anlamlı düşük, $p < 0,001$; c: 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelere göre anlamlı yüksek $p < 0.05$).

30 mM glukoz uygulanan hücrelerde TG2 aktivitesi kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde artmıştır ($p < 0,001$). TG2 aktivitesinde, 1nM ve 5 nM C-peptit uygulaması ile hem kontrole göre, hem de 30 mM glukoz uygulanan hücelere göre anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir ($p < 0,001$).

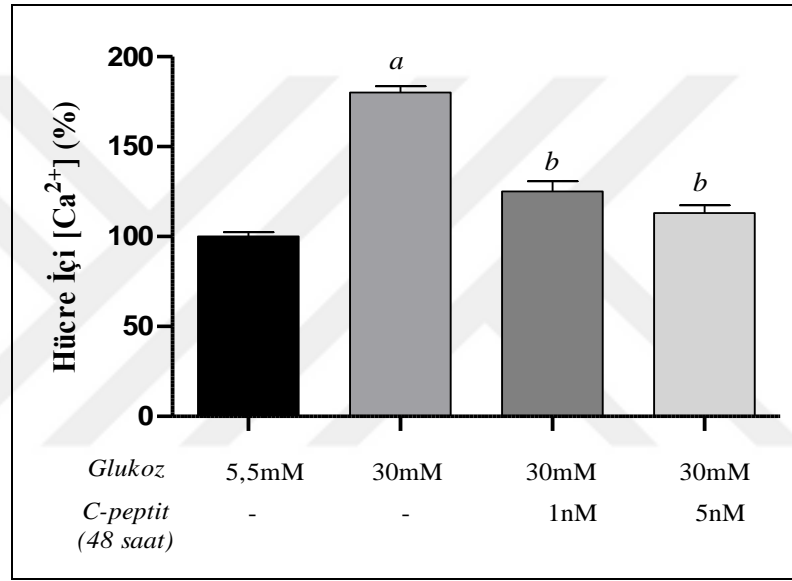


Şekil 28. DN modelinde C-peptitin TG2 protein ekspresyon düzeyi üzerine etkisini gösteren IB görüntüsü. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra, 1 ve 5 nM C-peptit uygulanmıştır (48 saat). Toplam inkübasyon süresi sonunda IB yöntemi ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

TG2 aktivite deneyi sonuçlarına benzer olarak, yüksek glukoz ile arttığı tespit edilen TG2 ekspresyonunun C-peptit uygulaması ile konsantrasyona bağlı olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 28).

4.4.2 C-peptitin Hücre İçi Ca^{2+} Düzeyi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:

DN oluşturulan hücre çalışmamızda; C-peptit uygulaması ile TG2 aktivitesindeki değişikliklerin hücre içi Ca^{2+} düzeyi üzerindeki etkileri incelenmiştir. TG2 aktivite değişkenliğinin ve C-peptitin hücre içi Ca^{2+} düzeyinde meydana getirdiği değişiklikler; bölüm 3.4.2.3' de anlatılan inkübasyonlar gerçekleştirilerek, bölüm 3.4.7' deki yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol hücrelerine göre oranlanarak % değişimi olarak Şekil 29' da sunulmuştur.

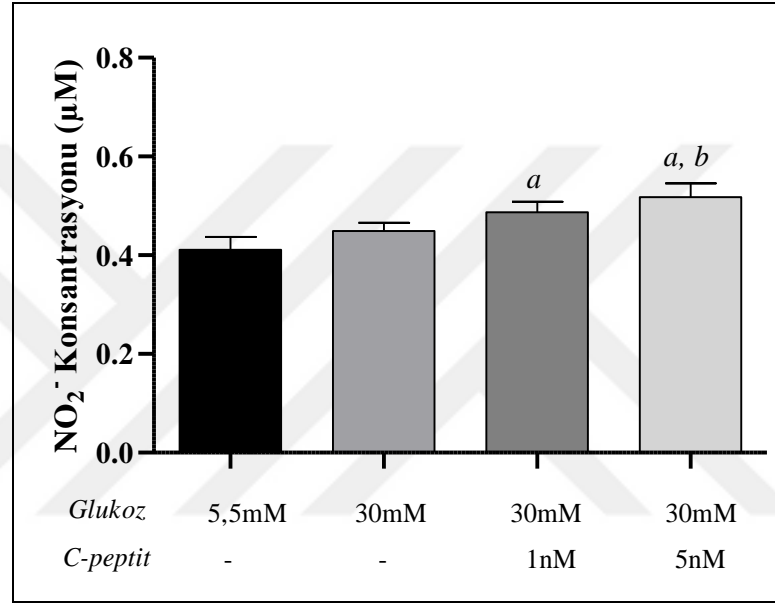


Şekil 29. DN modelinde C-peptitin hücre içi Ca^{2+} düzeyi üzerine etkisini gösteren grafik. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra, 1 ve 5 nM C-peptit uygulanmıştır (48 saat). Toplam inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrik olarak kalsiyum düzeyleri belirlenmiştir. Sonuçlar 5,5 mM glukoz ile inkübe edilen kontrol hücrelerine göre % Ca^{2+} düzeyi (ortalama \pm S.S.) olarak verilmiştir ($n=3$) (a: kontrole göre anlamlı yüksek, $p < 0.001$; b: 0 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelere göre anlamlı düşük, $p < 0.001$).

30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelerde Ca^{2+} düzeyinin kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ($p < 0,001$). Bu artışın, 1nM ve 5 nM C-peptit uygulaması ile anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,001$).

4.4.3 C-peptitin İnflamasyon Üzerine Etkisinin İncelenmesi:

DN modeli oluşturulan hücrelerde; yüksek glukozun indüklediği inflamasyonun belirteçlerinden biri olan nitrit (NO_2^-) düzeyi üzerine C-peptitin olası etkileri incelenmiştir. Bölüm 3.4.2.3' de belirtildiği gibi gerçekleştirilen inkübasyonların ardından bölüm 3.4.4' de açıklanan Griess yöntemi kullanılarak nitrit miktarı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular μM nitrit olarak Şekil 30'da sunulmuştur.

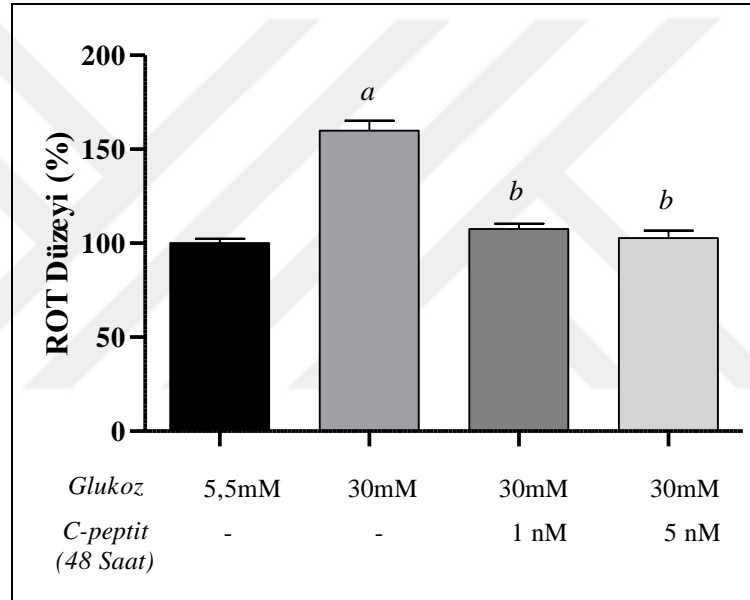


Şekil 30. DN modelinde C-peptitin NO_2^- konsantrasyonu üzerine etkisini gösteren grafik. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra, 1 ve 5 nM C-peptit uygulanmıştır (48 saat). Toplam inkübasyon süresi sonunda Griess yöntemi ile spektrofotometrik olarak NO_2^- konsantrasyonu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Ort. \pm S.S. olarak verilmiştir ($n=3$) (a: kontrole göre anlamlı yüksek, $p < 0.05$; b: 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelere göre anlamlı yüksek, $p < 0.05$).

30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelerdeki NO_2^- miktarının kontrol hücrelerinin düzeyine benzer olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, yüksek glukoz ile indüksiyonun ardından 1 nM ve 5 nM C-peptit uygulaması yapılan hücrelerdeki NO_2^- miktarının kontrol hücrelerine göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

4.4.4 C-peptitin ROT Üretimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi:

Diabetes Mellitus' ta hücrelerde yüksek glukoz konsantrasyonundan kaynaklanan ROT üretimi, mikrovasküler komplikasyonların gelişiminden sorumlu tutulan başlıca etkenlerden biridir. Çalışmamızda, DN modelinde C-peptit molekülünün ROT düzeyi üzerinde etkisini incelemek üzere, bölüm 3.4.2.3' de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen deneyde DCFDA yöntemi kullanılarak (Bölüm 3.4.6) hücrelerdeki ROT düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, kontrol hücrelerine göre oranlanarak % ROT olarak Şekil 31' de sunulmuştur.



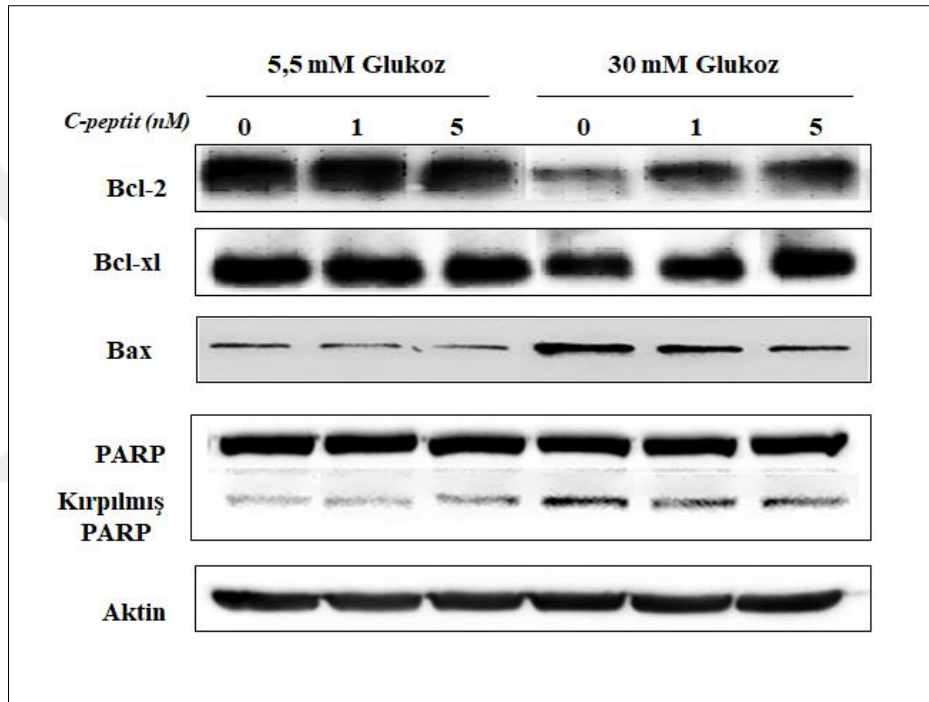
Şekil 31. DN modelinde C-peptitin ROT üretimi üzerine etkisini gösteren grafik. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra, 1 ve 5 nM C-peptit uygulanmıştır (48 saat). Toplam inkübasyon süresi sonunda DCF-DA yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak ROT düzeyi belirlenmiştir. Sonuçlar 5,5 mM glukoz ile inkübe edilen kontrol hücrelerine göre % ROT düzeyi (Ort. \pm S.S.) olarak verilmiştir ($n=3$) (a: kontrole göre anlamlı yüksek, $p < 0.001$; b: 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelere göre anlamlı düşük, $p < 0.001$).

30 mM glukoz ile inkübe edilen hücrelerde ROT düzeyi kontrole göre artmıştır ($p < 0,001$). Yüksek glukoz ile muamelenin ardından C-peptit uygulanan hücrelerde ROT

düzeyi; C-peptit uygulanmayan sadece yüksek glukoz uygulanan hücrelere göre anlamlı oranda azalmıştır ($p < 0,001$).

4.4.5 C-peptitin Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi:

Diyabetik nefropatide gelişen hücre hasarında C-peptit uygulamasının apoptotik hücre ölümü üzerine olası etkileri, IB yöntemi ile incelenmiştir (Bölüm 3.4.3.4). Elde edilen sonuçlara ait IB görüntüleri Şekil 32' de sunulmuştur.



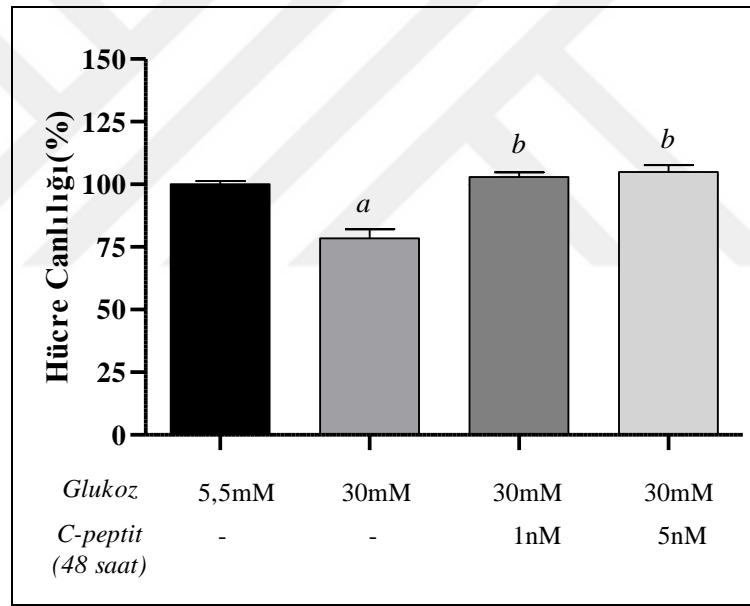
Şekil 32. DN modelinde C-peptitin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini gösteren IB görüntüleri. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra, 1 ve 5 nM C-peptit uygulanmıştır (48 saat). Toplam inkübasyon süresi sonunda IB yöntemi ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

HK-2 hücrelerinde, 30 mM glukoz inkübasyonu sonucunda Bcl-2 ve Bcl-xl düzeylerinin kontrole göre anlamlı düzeyde azalmış olduğu ($p < 0,01$), Bax ve kırılmış- PARP düzeylerinin ise kontrole göre anlamlı düzeyde artmış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,01$).

Aynı koşullarda C-peptit uygulamasının, azalmış olan Bcl-2 ve Bcl-xl düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$). Bununla birlikte, C-peptitin artmış olan Bax ve kırılmış- PARP düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,01$).

4.4.6 Hücre Canlılığının Tayini:

Diyabetik nefropatide gelişen hücre hasarında C-peptit uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla Bölüm 3.4.2.3' de belirtildiği şekilde oluşturulan deney modelinde, MTT yöntemi ile hücre canlılık düzeyleri belirlenmiştir (Bölüm 3.4.5). Elde edilen bulgular kontrole göre % hücre canlılığı olarak Şekil 33' de sunulmuştur.



Şekil 33. DN modelinde C-peptitin hücre canlılığı üzerine etkisini gösteren grafik. Hücreler 48 saat süre ile belirtilen konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra, 1 ve 5 nM C-peptit uygulanmıştır (48 saat). MTT yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak hücre canlılığı düzeyleri belirlenmiştir. Sonuçlar 5,5 mM glukoz ile inkübe edilen kontrol hücrelerine göre % hücre canlılığı (Ort. \pm S.S.) olarak sunulmuştur ($n=3$) (a: kontrole göre anlamlı düşük, $p < 0.01$; b: 30 mM glukoz ile inkübe edilen hücreler göre anlamlı derecede yüksek^b $p < 0.001$).

Elde edilen deney sonuçlarında, 30 mM glukozun hücre canlılığında kontrole göre anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$). Yüksek glukoz ile inkübasyonun ardından 1 ve 5 nM C-peptit uygulanan hücrelerde hücre canlılığı; C-peptit uygulanmayan sadece yüksek glukoz ile muamele edilen hücrelere göre anlamlı düzeyde artmıştır ($p < 0,001$).



5 Tartışma

Diyabet dünya genelinde oldukça yaygın görülen metabolik bir hastalıktır. DN ise diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından biri olup; tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarının yaklaşık % 45' inde görülmektedir (Sagoo & Gnudi, 2018). Hiperglisemi ile birlikte hücre içi sinyal moleküllerinin aktivasyonu, oksidatif stres gelişimi, büyüme faktörleri, sitokinler ve renin anjiyotensin sistemi nefropati oluşumunda rol oynamaktadır (Gross et al., 2005). Daha önce yapılan çalışmalarda yüksek glukozun, renal hücrelerden ATP salınımını uyardığı belirtilmektedir. Artmış hücre dışı ATP miktarı, immün hücrelere ait reseptörleri aktive eder ve immün reaksiyonu başlatır. Aktive olan reseptörler ROT' un, kemokinlerin ve inflamasyon belirteçlerinin üretimini arttırarak; inflamasyona neden olmaktadır (K. Chen et al., 2013). Yüksek glukoz kaynaklı ROT artışının PKC ve NADPH oksidaz aktivasyonu üzerinden gerçekleştiği bildirilmektedir (Bhatt et al., 2013).

DN gelişiminde; yüksek glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak böbreklerde özellikle proksimal tübüler epitel hücrelerinde hasar gelişmektedir (Jiao et al., 2016). Yüksek glukoz hücrelerde, ROT üretimini arttırarak oksidatif stresi arttırır, hücre ölüm proteazı kaspaz-3'ü aktive etmek suretiyle apoptotik hücre hasarına yol açmaktadır (Cifarelli et al., 2011). Bu nedenle çalışmamızda DN' deki hücresel değişiklikleri incelemek için insan böbrek proksimal tübüler epitel hücre hattı olan HK-2 hücreleri kullanıldı.

Hücrelerde *in vitro* diyabetik nefropati modeli oluşturmak için çeşitli optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Standart hücre kültürü çalışmalarında hücreler 5,5 mM glukoz içeren besiyeri içerisinde büyütülürler. *In vitro* DN modeli oluşturmak üzere kullanılan besiyerleri ise genellikle 30 mM glukoz içermektedir (K. Chen et al., 2013; Gu, Gao, Ni, Wang, & Shen, 2013; Han et al., 2006; He et al., 2014; W. L. Jiang, Xu, Zhang, Hou, & Zhu, 2012; W. L. Jiang, Zhang, Hou, & Zhu, 2012). Çalışmamızda, hücrelerde *in vitro* DN modeli oluşturulması için çeşitli glukoz konsantrasyonları içeren besiyeri ile farklı sürelerde inkübasyonlar yapılarak en uygun konsantrasyon ve süre belirlendi. HK-2 hücrelerinde yüksek glukozla bağlı olarak gelişen apoptozun ozmotik basınç kaynaklı olup olmadığını gözlemlemek için mannitol içeren besiyeri kontrol olarak kullanıldı (Şekil 12). Bu amaçla 30, 50 ve 75 mM glukoz içeren besiyeri ile inkübe edilen

hücrelerde; kontrole göre apoptoz parametrelerinde anlamlı bir artış görüldü (Şekil 12). 30 mM mannitol ile inkübe edilen hücrelerde; kontrole göre apoptoz belirteçlerinde bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 12). Ancak 50 ve 75 mM mannitol ile inkübe edilen hücrelerde Bax ve Bcl-2 protein ekspresyonlarında; değişiklik gerçekleştiği belirlendi (Şekil 12). Ardından süre ile ilgili deneylerde; 30 mM glukoz inkübasyonu ile hücrelerde; 24 saatlik inkübasyonda Bax ekspresyonunda anlamlı bir artış görüldü ancak Bcl-2 ve Bcl-xl ekspresyonlarında 48 saatlik inkübasyonda anlamlı azalma gözlemlendi (Şekil 13). Sonuçlardan yola çıkarak hücrelerde 30 mM glukoz ile 48 saatlik inkübasyonun uygun *in vitro* DN modeli oluşturacağına karar verildi.

Diyabette hücre içi ROT üretiminin artışı nedeniyle antioksidan mekanizmalar yetersiz kalmakta ve oksidatif stres gelişmektedir (K. Chen et al., 2013; Jiao et al., 2016; Liu et al., 2015). Temel oksidatif stres kaynakları; NADPH oksidaz, mitokondriyal oksidatif stres, ksantin oksidaz aktivasyonu, COX ve eNOS ayrışması olarak belirlenmiştir (Sagoo & Gnudi, 2018). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak yüksek glukoz maruziyetinde hücre içi ROT' un anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi (Şekil 24). Yüksek glukozun indüklediği ROT üretimi ile başlayan sürecin apoptoz ile devam ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Wang & Guo, 2019). Bu nedenle hücre içi apoptoz biyobelirteçleri olan Bax ve kırılmış-PARP; anti-apoptotik biyobelirteçleri olan Bcl-2 ve Bcl-xl düzeyleri incelendi. Bizim bulgularımızda literatürle uyumlu olarak apoptoz parametrelerinde artış gözlemlendi. Yüksek glukoz ile indüklenen DN' de; Bax ve kırılmış- PARP ekspresyonunda anlamlı artış gözlenirken, Bcl-2 ve Bcl-xl ekspresyonlarında anlamlı azalma gözlemlendi (Şekil 25). DN' de apoptozla ilişkili incelenen parametrelerden elde edilen bulgular yüksek glukozun apoptozu indüklediğini gösterdi. Bu veriler, hücre canlılığı üzerinden de doğrulandı. Yüksek glukoz varlığında, hücre canlılığında azalma gerçekleştiği tespit edildi (Şekil 26).

İnflamasyonla bozulan hücre içi denge bir takım iyonların ve moleküllerin hücre içinde artmasına neden olur. Bunlardan biri de Ca^{2+} dur. Sağlıklı hücrelerde; hücre dışı Ca^{2+} konsantrasyonu, hücre içine göre 10^4 kat daha fazladır (Levy, 1999). Bu oran; Ca^{2+} -ATPaz, Na^+/K^+ -ATPaz enzimleri ve Na^+/H^+ , Na^+/Ca^{2+} değiştirici sistemler ile korunur (Levy, 1999). Bu mekanizmalardan herhangi birinin değişikliğe uğraması sonucu hücre içi Ca^{2+} düzeyinde azalma veya artış gerçekleşir. Diyabetik nefropatide hiperglisemi nedeniyle enzimatik mekanizmaların bozulmasına bağlı olarak hücre içi

Ca²⁺ düzeyi artar (K. Chen et al., 2013; Kashihara et al., 2010; Levy, 1999; Pan et al., 2018). *In vitro* DN modeli oluşturduğumuz hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunun artması literatürde yer alan çalışmaları desteklemektedir (Şekil 22).

Diyabetik nefropatide rol oynayan hücresel mekanizmalardan biri de inflamasyondur. Bu kapsamda yüksek glukoz ile artan oksidatif stres endotel disfonksiyonuna neden olarak eNOS' un çalışma mekanizmasını bozmaktadır (Kashihara et al., 2010). NOS izoenzimleri; L-argininden sitrüllin oluşumunu katalizlerken, bu reaksiyon sırasında nitrik oksit ara ürününü oluşturmaktadır. Literatürde yer alan çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda hiperglisemi ile NO üretimi arasındaki ilişkiye yönelik farklı sonuçlar sunulmuştur. Bu çalışmaların bazılarında hiperglisemi ile NO artışı meydana geldiği, bazılarında ise NO üretiminde azalma olduğu bildirilmiştir (Adela et al., 2015; Amin, Ahmed, & Hozayen, 2018; K. Chen et al., 2013; Kashihara et al., 2010; Patel, Desai, Shah, & Thaker, 2014). Bizim çalışmamızda ise yüksek glukoz uygulanan HK-2 hücrelerinde nitrit konsantrasyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Şekil 23).

Yukarıda açıklandığı üzere elde edilen bulgular tez çalışmamızda yüksek glukoz ile muamele edilen HK-2 hücrelerinde DN modelinin başarı ile oluşturulduğunu kanıtlar niteliktedir.

5.1 *In Vitro* Diyabetik Nefropatide TG2' nin Olası Rolü

Çalışmanın ana hedeflerinden biri olarak TG2 enziminin *in vitro* diyabetik nefropatideki değişimi incelenmiştir. TG2; proteinlerde transamidasyon reaksiyonu ile molekül içi veya moleküllerarası çapraz-bağ oluşumunu katalizleyen, Ca²⁺-bağımlı, multifonksiyonel bir enzimdir (Fésüs & Szondy, 2005). TG2' nin hücre çoğalması, hücre adezyonu ve farklılaşması, sinyal iletimi, ekstrasellüler matriksin korunması ve apoptoz gibi bir çok hücresel proses ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Cho et al., 2012; Fésüs & Szondy, 2005; Gundemir, Colak, Feola, Blouin, & Johnson, 2013; Tatsukawa et al., 2016).

TG2' nin pankreas β hücrelerinden glukoz ile uyarılan insülin salınımı için gerekli olan membran aracılı mekanizmada yer aldığı belirtilmektedir (Tatsukawa et al., 2016). Ancak diyabetik nefropatideki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda *in vitro* diyabetik nefropati modelinde TG2 aktivatörü ve inhibitörü

varlığında hücrelerdeki TG2 transamidasyon aktivitesi ve ekspresyon düzeyi incelendi.

Oluşturulan DN modelinde yüksek glukoz uygulamasının TG2 aktivitesini arttırdığı gözlemlendi (Şekil 20). Bunun yanı sıra TG2 protein ekspresyonunun da yüksek glukoz indüksiyonu ile arttığı gözlemlendi (Şekil 21). Bu sonuç, TG2' nin DN gelişiminde fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir.

TG2 transamidasyon aktivitesi için çeşitli hücre hatlarında farklı aktivatör moleküller tanımlanmıştır (Tatsukawa et al., 2016). Bunlar arasında en çok çalışılanlardan biri retinoik asittir. Bu nedenle çalışmamızda TG2 aktivatörü olarak retinoik asit kullanılmasına karar verildi. Bu amaçla kullanılan retinoik asit konsantrasyonu 5 μM olarak belirlenmiş olup, aktivasyon için 48 saatlik sürenin uygun olduğuna işaret edilmiştir (Antonyak et al., 2001; Singh & Cerione, 1996). TG2 aktivitesinin indüksiyonu için, *in situ* transamidasyon, IB ve hücre canlılığı deneyleriyle farklı konsantrasyon ve süreler üzerinde çalışmalar yapıldı. *In situ* transamidasyon çalışmasında; 24 saatlik inkübasyonda 5 ve 10 μM RA ile, 48 saatlik inkübasyonda ise 1 μM RA konsantrasyonundan itibaren TG2 aktivitesinde anlamlı bir artış gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 14). Eş zamanlı yapılan IB yöntemiyle 5 μM RA inkübasyonunun hücre içi BPA düzeyinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 15). Diğer taraftan kullanılan RA' nın HK-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelendi. Kullanılan en yüksek RA konsantrasyonunda (20 μM) ve en uzun sürede (48 saat) dahi hücre canlılığı yüksek oranda bulundu (Şekil 16). Sonuçlarımız doğrultusunda çalışmada uygulanacak uygun RA dozu 5 μM , uygun süre 48 saat olarak belirlendi.

TG2 transamidasyon aktivitesini inhibe eden çeşitli moleküller tanımlanmıştır (Jeitner, Delikatny, Ahlqvist, Capper, & Cooper, 2005). Bunlar arasında üzerinde en çok çalışılanlardan biri de sistamindir (Davies et al., 2010). Bu nedenle çalışmamızda TG2 aktivitesinin inhibisyonu için sistamin molekülünün kullanılmasına karar verildi. Bunun için çeşitli sistamin konsantrasyonları ile farklı sürelerde inkübasyon çalışmaları; *in situ* transamidasyon, IB ve hücre canlılığı deneyleriyle incelendi. *In situ* transamidasyon çalışmasında; 24 saatlik inkübasyonda 500 ve 750 μM sistamin ile, 48 saatlik inkübasyonda ise 250 μM sistamin konsantrasyonundan itibaren TG2 aktivitesinde anlamlı bir inhibisyon gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 17). Eş zamanlı yapılan IB yöntemiyle 500 μM sistamin inkübasyonunun hücre içi BPA düzeyinde

anlamli azalmaya neden olduğu belirlendi (Şekil 18). Ayrıca kullanılan sistamin konsantrasyonlarının HK-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi de incelendi. Kullanılan en yüksek sistamin konsantrasyonunda (1000 µM) ve en uzun sürede (48 saat) dahi hücre canlılığı yüksek oranda bulundu (Şekil 19). Sonuçlarımız doğrultusunda çalışmada uygulanacak uygun sistamin dozunun 500 µM, inkübasyon süresinin ise 48 saat olmasına karar verildi.

Diyabetik nefropati oluşturulmuş hücrelerde tıpkı sağlıklı hücrelerdeki gibi TG2' nin; RA uygulaması ile hem ekspresyonu hem de aktivitesi artmaktadır (Şekil 20). Diğer taraftan sistamin uygulaması ile TG2' nin hem ekspresyonu azalmakta hemde aktivitesi inhibe edilmektedir (Şekil 20).

TG2 enziminin aktivitesinin ve ekspresyonunun, HK-2 hücrelerinde yüksek glukoz ile indüklendiği tespit edildikten sonra, enzimin inhibitörü ve aktivatörü varlığında hücre içi kalsiyum, ROT, NO düzeyleri ve apoptoz parametreleri ile ilişkisi incelendi.

DN' de arttığını gözlemlediğimiz hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunun; TG2 aktivitesinin inhibisyonu ile azaldığı, hatta kontrol hücrelerdeki Ca²⁺ konsantrasyonuyla neredeyse aynı seviyelerde olduğu tespit edildi (Şekil 22).

DN' de artan ROT düzeyi üzerine yapılan çalışmalarda; TG2 aktivitesinin inhibe edilmesi ile ROT düzeyinde % 50 gibi anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 24).

ROT düzeyinin ardından apoptoz biyobelirteçleri değerlendirildi. Yüksek glukoz ile indüklenen hücrelerde TG2 aktivitesinin aktivatör ile artırılması; apoptoz belirteçleri olan Bax ve kırılmış- PARP proteinlerinin ekspresyonlarında artışa neden oldu (Şekil 25). Aynı zamanda DN' de TG2 aktivitesinin indüksiyonu ile anti-apoptotik biyobelirteçler olan Bcl-2 ve Bcl-xl proteinlerinin ekspresyonlarının da düştüğü gözlemlendi (Şekil 25). Aynı koşullarda DN' de TG2 aktivitesinin inhibe edilmesi durumunda apoptotik proteinlerin (Bax ve kırılmış- PARP) ekspresyonlarında anlamlı azalmalar; anti-apoptotik protein olan Bcl-xl'nin ekspresyonunda ise anlamlı artma belirlendi (Şekil 25). TG2 aktivitesinin artması ile DN hücrelerinde yüksek glukoz nedeniyle başlamış olan apoptozun ilerlediği, fakat TG2 aktivitesinin inhibe edilmesi ile apoptozun gerilediği düşünülmektedir. Bu bağlamda TG2' nin hücre canlılığına olan etkisi araştırıldı. TG2' nin inhibe edilmesi durumunda yüksek glukoz ile azalmış olan hücre canlılığında anlamlı bir artış tespit edildi (Şekil 26).

DN oluşturulmuş HK-2 hücreleri ile TG2 aktivitesi arasında bulunan bu sonuçlar ışığında; TG2 aktivitesinin inhibe edilmesi durumunda hücre içi Ca²⁺

konsantrasyonunda, ROT düzeyinde ve apoptotik biyobelirteçlerde anlamlı azalmalar gözlemlendi. Ayrıca anti-apoptotik biyobelirteçlerde ve hücre canlılığında önemli artışlar belirlendi. Bu bulgular hücre tipine, stres kaynağına, stres süresine ve şiddetine bağlı olarak farklı rollere sahip olduğu bilinen TG2' nin; DN modeli oluşturulmuş HK-2 hücrelerinde anti-apoptotik etkiden ziyade, pro-apoptotik rol oynadığına işaret etmektedir.

TG2' nin DN koşullarında, HK-2 hücrelerinde pro-apoptotik etkili olabileceği ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

5.2 *In Vitro* Diyabetik Nefropatide C-peptitin Olası Fonksiyonları

C-peptit; pankreas *Langerhans* adacıklarında β - hücrelerinden insülin biyosentezi sırasında üretilen bir peptittir (Luppi & Drain, 2016; John Wahren et al., 2000). Uzun yıllar C-peptit; biyolojik olarak inert bir molekül olarak değerlendirilmiştir. Ancak son yıllarda yeni gelişmelerle birlikte β hücre fonksiyonlarının iyi bir biyobelirteçi olmasının yanı sıra, çeşitli periferik hücreler üzerinde fizyolojik etkileri olan biyoaktif bir molekül olduğu belirlenmiştir (Brunskill, 2017; Luppi & Drain, 2016). İnsan C-peptitinin yapısı aydınlatıldıktan sonra diyabet hastalarının klinik yönetiminde kan ve idrar C-peptit seviyelerini tespit edebilmek için immünojenik testler geliştirilmiştir. Tip 2 diyabetin erken evrelerinde insülinle birlikte fizyolojik konsantrasyonun üzerinde salgılandığı keşfedilmiştir (Bhatt et al., 2014). Yapılan çalışmalarda tek başına insülin tedavisi uygulanmasının diyabetli hastalarda gerçekleşen mikrovasküler hasar üzerine başarısız olduğu görülmüş, ancak C-peptit ve insülinin kombine tedavisinde; insülinin anti- hiperglisemik etkisine ilave olarak, C-peptitin mikrovasküler hasarlar üzerine olumlu etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Bhatt et al., 2014; John Wahren et al., 2012). Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları üzerine replasman tedavilerinde olumlu etkiler göstermesinin ardından, araştırmacılar C-peptitin hücre içi sinyal mekanizmaları ve hücre içi moleküller üzerine olası etkilerini araştırmaya yönelmiştir. Yapılan çalışmalar genel olarak C-peptitin oksidatif stres ile indüklenen hücresel hasar üzerindeki etkileri ile ilgilidir. Hücrelerde ROT artışının bazal seviyelere çekilebilmesi için birincil hücresel savunma; antioksidan enzimlerin (SOD, katalaz, GSH-Px, vb.) süperoksit radikallerini H_2O_2 ' ye dönüştürerek detoksifiye etmesidir (Luppi & Drain, 2016). Ancak hücre adaptif mekanizmalar yetersiz kalırsa, aşırı ROT artışı oksidatif stresin ardından apoptoz gelişimi ile

sonuçlanır. İlk kez 2007 yılında, Bugliani ve ark. (Bugliani et al., 2007) C-peptitin anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2' yi indükleyerek *Langerhans* adacıklarının β - hücrelerinde apoptozu azalttığını göstermişler ve böylece C-peptitin biyoaktif bir madde olduğunu kanıtlamışlardır. Pankreasın β hücrelerinde antioksidan enzimlerin bazal ekspresyonu düşük düzeyde olduğu için, bu hücreler oksidatif strese çok duyarlıdır (Brunskill, 2017; Luppi & Drain, 2016). C-peptitin; diyabetin ilk evrelerinde β - hücrelerinde apoptozun başlangıcı sayılan ROT artışını önemli oranda baskıladığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Luppi & Drain, 2016). Bu önemli gelişmenin ardından C-peptit molekülünün antioksidan özellik gösterebileceği düşünülmüş, endotel hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Luppi & Drain, 2016). Varılan sonuçlar umut verici olmakla beraber, farklı hedeflerde C-peptitin anti-inflamatuar etkisinin altında yatan sinyal yolları tam açıklanamasa da endotel hücrelerinde, NADPH oksidazı inhibe ederek, protein kinaz a aktivitesi ile ROT artışına bağlı olarak gelişen oksidatif stresi baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca C-peptitin stres altında olmayan veya düşük stres altındaki hücrelerde aktif olmadığı ancak stresin çok arttığı hücrelerde devreye girdiği bildirilmektedir (Luppi & Drain, 2016). C-peptitin, endotel hücrelerinde nitrik oksit salınımını konsantrasyon ve zamana bağlı olarak arttırdığı, hızlı başlayan bu etkinin kalsiyum içermeyen ortamda gerçekleşmediği gözlenmiştir (John Wahren & Larsson, 2015). Ayrıca akciğer ve aort endotel hücrelerinin C-peptide uygulaması ile eNOS mRNA ve eNOS protein ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. Endotel hücrelerinde de β hücrelerinde gösterildiği şekilde; C-peptit varlığında Bcl-2 ekspresyonunun arttığı, kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı ve apoptozun baskılandığı gösterilmiştir (John Wahren & Larsson, 2015). Önceleri C-peptitin insülin ile bazı ortak sinyal yollarını kullandığı düşünülmüştür ancak bulunan kanıtlar C-peptitin belirli bir GPCR yoluyla kendi sinyal yolağını kullandığını göstermiştir (Hills & Brunskill, 2009). Sağlıklı hücrelerde C-peptit molekülü hücre zarında G-proteine bağlanarak kalsiyum kanallarının açılmasına ve hücre içine kalsiyum girişine neden olmaktadır (John Wahren et al., 2000). Na^+/K^+ ATPaz enzimini aktifler ve hücre içi eNOS' u uyararak nitrik oksit düzeyinde artışa neden olur (Hills & Brunskill, 2009; John Wahren, 2004). Ayrıca eNOS düzeyini yükselterek ROT artışını bir miktar uyardığı gösterilmektedir (Johansson et al., 2002; John Wahren et al., 2000). $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ ' ın fonksiyonu bir hücrede hücre zarı boyunca sodyum-potasyum transportunu sağlamaktır. Sağlıklı bir böbrekte; böbrek

tübüler sisteminde çözünen maddelerin ve çözücülerin taşınması için gerekli itici gücü sağlamaktadır. Ancak diyabet hastalarında $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ aktivitesi azalmaktadır (Gross et al., 2005; Sima, 2003). İzole böbrek tübüllerinde C-peptit tedavisi $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ aktivitesini stimüle etmiştir, ayrıca hasta çalışmalarında C-peptit replasmanı ile azalan hiperfiltrasyon ve mikroalbuminüri gözlemlenmiştir (Sima, 2003; John Wahren et al., 2000). Brunskill; böbrek glomerüler hücrelerinde NOS ekspresyonu üzerinde C-peptitin olumlu etkilerini göstermiştir (Brunskill, 2017). Şimdiye kadar incelenen bir çok hücre türü arasından böbrek tübüler epitel hücrelerinin en fazla sayıda C-peptit bağlanma bölgesi içerdiği belirlenmiştir (Hills & Brunskill, 2009). Bu nedenle C-peptit molekülünün HK-2 hücreleri üzerinde oldukça fazla etkisi olduğu düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında diyabetik nefropati oluşturulmuş böbrek proksimal tübüler epitel hücrelerinde C-peptit molekülünün etkisini değerlendirdik. C-peptitin uygulanan 1 nM konsantrasyonu; fizyolojik plazma konsantrasyonuna (0,9 nM/L) yakın olduğu için tercih edildi. 5 nM konsantrasyon kullanılarak yapılan çalışmalarda amacımız fizyolojik konsantrasyonun üzerindeki etkisini incelemektir. Ancak elde edilen sonuçlar C-peptitin 1 ve 5 nM konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdi. Bu durum, C-peptitin reseptörle ilgili doygunluk konsantrasyonuna sahip olmasıyla ilişkili olabilir (Luppi & Drain, 2016; John Wahren et al., 2012).

Diyabetik nefropati hücrelerinde belirlediğimiz hücre içi Ca^{2+} düzeyindeki artışın; literatürle uyumlu olduğu görüldü (K. Chen et al., 2013; Kashihara et al., 2010; Levy, 1999). DN oluşturulmuş HK-2 hücrelerinde C-peptit uygulaması ile hücre içi Ca^{2+} düzeyinin düştüğü tespit edildi (Şekil 29). Yüksek glukozla nitritin azaldığını veya arttığını tespit eden çalışmaların (Adela et al., 2015; Amin et al., 2018; Kashihara et al., 2010; Patel et al., 2014) aksine çalışmamızda nitrit miktarı ile yüksek glukoz arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Şekil 23,30). C-peptit uygulaması ile nitrit miktarının arttığı gözlemlendi (Şekil 30). Mekanizması bilinmemekle birlikte, farklı bir hücre hattında yapılan çalışmada C-peptitin nitrit miktarında artışa neden olduğu belirtilmektedir (Lee et al., 2010).

C-peptit uygulaması ile ROT düzeylerinde azalma tespit edildi. Yüksek glukozun hücrelerde arttırdığı ROT düzeylerinin; C-peptit uygulaması ile azaldığı ve neredeyse kontrol hücrelerdeki seviyelere gerilediği gösterildi (Şekil 31). Bu önemli bulgu, apoptoz belirteçleri ile desteklendi. Yüksek glukozla indüklenen DN oluşturulmuş

HK-2 hücrelerinde; C-peptit uygulaması ile apoptotik proteinlerin (Bax ve kırılmış-PARP) baskılandığı tespit edildi (Şekil 32). Aynı zamanda anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2 ve Bcl-xl) ekspresyonunun C-peptit uygulaması ile artmakta olduğu görüldü (Şekil 32). Bu önemli bulgu Bugliani' nin 2007' de β hücreleri üzerine yapmış olduğu araştırmasında C-peptit için tespit ettiği anti-apoptotik etkiyi destekler niteliktedir.

Yüksek glukozla bağı olarak gelişen apoptoz üzerine C-peptitin olumlu etkileri hücre canlılığı deneyleri ile doğrulandı. C-peptit uygulamasının yüksek glukoz nedeniyle azalmış olan hücre canlılığını arttırdığı ve kontrol seviyesine çıkardığı tespit edildi (Şekil 33).

Çalışmamızda, C-peptitin fizyolojik konsantrasyonlarda yukarıdaki etkileri göstermiş olması, biyoaktif bir peptit olduğu bulgusunu desteklemektedir.

5.3 *In Vitro* Diyabetik Nefropatide C-peptit ile TG2 Arasındaki Olası ilişki

Endotel hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda; hiperglisemide sitozolik ve mitokondriyal ROT artışı, hücre içi Ca^{2+} artışı ve NADPH oksidaz aktivasyonu ile hücre ölümü, çoğalma, farklılaşma ve göç gibi çeşitli hücrel olaylarda rolü bulunan TG2 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Bhatt et al., 2013). Çalışmamızda yüksek glukoz varlığında proksimal tübüler epitel hücrelerde de beraber sonuçlar elde edildi. TG2' nin çeşitli hücre tiplerinde apoptozu kolaylaştırdığı veya sağ kalımı desteklediği bilinmektedir. Ancak endotel hücrelerinde, TG2' nin hücre içi Ca^{2+} ve ROT artışı tarafından aktive edildiği ve apoptozu neden olduğu bildirilmektedir (Bhatt et al., 2013). Ayrıca yüksek glukozla bağı gerçekleşen ROT artışının; PKC ve NADPH oksidazın aktivasyonu üzerinden gerçekleştiği belirlenmiştir (Bhatt et al., 2013; Sagoo & Gnudi, 2018). C-peptitin Ca^{2+} dan bağımsız olarak PKC ve NADPH oksidaz aktivitesini inhibe ederek ROT artışını baskılamasıyla yüksek glukoz kaynaklı TG2 aktivitesini düşürdüğü dolayısıyla hücreyi apoptozdan koruduğu gösterilmiştir (Bhatt et al., 2013). Bu gelişmeler ışığında, çalışmamızda diyabetik nefropati modellemesi ile böbrek proksimal tübüler epitel hücrelerinde C-peptit ve TG2 arasındaki ilişki incelendi. Literatür araştırmasında yüksek glukoz varlığında HK-2 hücrelerinde C-peptitin; TG2 aktivitesi üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda, DN oluşturulmuş HK-2 hücrelerinde yukarıda belirtildiği şekilde TG2 aktivitesi artmaktadır (Şekil 20,21). Ancak C-peptit uygulamasının; TG2 aktivitesinde

azalmaya neden olduğu tespit edildi (Şekil 27). Aynı koşullarda C-peptidin; TG2' nin ekspresyonunda da azalmaya neden olduğu gösterildi (Şekil 28).

C-peptit ile TG2 aktivitesinin inhibe edilmesinin yanı sıra apoptoz parametrelerinin, ROT' un ve hücre içi Ca^{2+} düzeyinin azaldığı; anti-apoptotik proteinlerin ve hücre canlılığının arttığı belirlendi. Bu veriler bize C-peptidin; hem DN' ye bağlı gelişen proksimal tübüler hücresel hasarı üzerine olumlu etkileri olduğunu, hem de TG2 aktivitesini ve ekspresyonunu inhibe ederek hücreyi apoptozdan koruma eğiliminde olduğunu düşündürmektedir.



6 Sonuç ve Öneriler

- DN oluşturulan HK-2 hücrelerinde; TG2' nin hem transamidasyon aktivitesi hem de ekspresyonu artmaktadır.
- DN oluşturulan HK-2 hücrelerinde; TG2 aktivitesinin ve ekspresyonunun inhibe edilmesi (sistamin uygulaması ile); apoptotik proteinlerin ekspresyonlarında, hücre içi kalsiyum ve ROT düzeyinde azalmayla sonuçlanmaktadır. Ayrıca anti-apoptotik protein (Bcl-xl) ekspresyonunda ve hücre canlılığında artış görülmektedir.
- DN' de C-peptit uygulaması TG2' nin hem aktivitesinin hem de ekspresyonunun azalmasına yol açmaktadır.
- DN oluşturulan HK-2 hücrelerinde; C-peptit uygulaması hücre içi Ca^{2+} düzeyinde, ROT düzeyinde ve apoptoz parametrelerinde azalmayla sonuçlanmaktadır.
- DN oluşturulan HK-2 hücrelerinde; C-peptit uygulaması ile anti-apoptotik parametrelerde ve hücre canlılığında artış gerçekleşmektedir.

Bu sonuçlar DN'de TG2 enziminin önemli bir terapötik hedef olabileceği ve C-peptitin koruyucu etkisinin TG2 ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekir. İnsülin ile birlikte salınan C-peptitin biyoaktif bir peptit olabileceğini gösteren bulgularımız, diyabete bağlı olarak gelişen komplikasyonların tedavisinde klinik kullanım için uygun bir molekül olabileceğine işaret etmektedir.

7 Kaynaklar

- Adela, R., Nethi, S. K., Bagul, P. K., Barui, A. K., Mattapally, S., Kuncha, M., ... Banerjee, S. K. (2015). Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: A study from South Indian patients. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125270>
- Agnihotri, N., & Mehta, K. (2016). Transglutaminase-2: evolution from pedestrian protein to a promising therapeutic target. *Amino Acids*, *49*(3), 425–439. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2320-2>
- Akinlade, A. T., Ogbera, A. O., Fasanmade, O. A., & Olamoyegun, M. A. (2014). Serum C-peptide assay of patients with hyperglycemic emergencies at the Lagos State University Teaching Hospital (LASUTH), Ikeja. *International Archives of Medicine*, *7*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/1755-7682-7-50>
- Ali, M. K., Narayan, K. M. V., & Tandon, N. (2010). Diabetes & coronary heart disease: Current perspectives. *Indian Journal of Medical Research*, *132*(11), 584–597. <https://doi.org/10.20959/wjpr20175-8370>
- Amin, K. A., Ahmed, R. R., & Hozayen, W. G. (2018). Renoprotective effect of grape seed extract in diabetic nephropathy by attenuating hyperglycemia-facilitated oxidative stress. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *11*(11), 12285–12293.
- Antonyak, M. A., Singh, U. S., Lee, D. A., Boehm, J. E., Combs, C., Zgola, M. M., ... Cerione, R. A. (2001). Effects of Tissue Transglutaminase on Retinoic Acid-induced Cellular Differentiation and Protection against Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(36), 33582–33587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105318200>
- Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *24*(5), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>
- Baldeweg, S. E., & Yudkin, J. S. (2003). Implications of the United Kingdom prospective diabetes study. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, *26*(4), 809–827. [https://doi.org/10.1016/S0095-4543\(05\)70132-9](https://doi.org/10.1016/S0095-4543(05)70132-9)
- Balducci, Stefano, Sacchetti, Massimo, Haxhi, Jonida, Orlando, Giorgio, D'Errico, Valeria, Fallucca, Sara, Menini, Stefano, Pugliese, G. (2008). Proinsulin C-

- peptide abrogates type-1 diabetes-induced increase of renal endothelial nitric oxide synthase in rats. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(30), 13–23. <https://doi.org/10.1002/dmrr>
- Beninati, S., Piacentini, M., & Bergamini, C. M. (2017). Transglutaminase 2, a double face enzyme. *Amino Acids*, 49(3), 415–423. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2394-5>
- Bhatt, M. P., Lee, Y. J., Jung, S. H., Kim, Y. H., Hwang, J. Y., Han, E. T., ... Ha, K. S. (2016). C-peptide protects against hyperglycemic memory and vascular endothelial cell apoptosis. *Journal of Endocrinology*, 231(1), 97–108. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0349>
- Bhatt, M. P., Lim, Y. C., & Ha, K. S. (2014). C-peptide replacement therapy as an emerging strategy for preventing diabetic vasculopathy. *Cardiovascular Research*, 104(2), 234–244. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu211>
- Bhatt, M. P., Lim, Y. C., Hwang, J. Y., Na, S. H., Kim, Y. M., & Ha, K. S. (2013). C-peptide prevents hyperglycemia-induced endothelial apoptosis through inhibition of reactive oxygen species-mediated transglutaminase 2 activation. *Diabetes*, 62(1), 243–253. <https://doi.org/10.2337/db12-0293>
- Blass, B. E. (2015). *Basic Principles of Drug Discovery and Development In vitro Screening Systems (Chapter 4)*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411508-8.00004-9>
- Brunskill, N. J. (2017). C-peptide and diabetic kidney disease. *Journal of Internal Medicine*, 281(1), 41–51. <https://doi.org/10.1111/joim.12548>
- Bugliani, M., Torri, S., Lupi, R., Guerra, S. ., Grupillo, M., Mosca, F., ... Marchetti, P. (2007). Effects of C-peptide on isolated human pancreatic islet cells. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(30), 13–23. <https://doi.org/10.1002/dmrr>
- Chen, K., Zhang, J., Zhang, W., Zhang, J., Yang, J., Li, K., & He, Y. (2013). ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: A novel pathway of diabetic nephropathy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(5), 932–943. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.009>
- Chen, N. X., O'Neill, K., Chen, X., Kiattisunthorn, K., Gattone, V. H., & Moe, S. M. (2013). Transglutaminase 2 accelerates vascular calcification in chronic kidney disease. *American Journal of Nephrology*, 37(3), 191–198.

<https://doi.org/10.1159/000347031>

- Cho, S. Y., Jeong, E. M., Lee, J. H., Kim, H. J., Lim, J., Kim, C. W., ... Kim, I. G. (2012). Doxorubicin induces the persistent activation of intracellular transglutaminase 2 that protects from cell death. *Molecules and Cells*, 33(3), 235–241. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-2201-9>
- Cifarelli, V., Geng, X., Styche, A., Lakomy, R., Trucco, M., & Luppi, P. (2011). C-peptide reduces high-glucose-induced apoptosis of endothelial cells and decreases NAD(P)H-oxidase reactive oxygen species generation in human aortic endothelial cells. *Diabetologia*, 54(10), 2702–2712. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2251-0>
- Davies, J. E., Rose, C., Sarkar, S., & Rubinsztein, D. C. (2010). Cystamine suppresses polyalanine toxicity in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Science Translational Medicine*, 2(34), 1–9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000723>
- Fésüs, L., & Szondy, Z. (2005). Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Letters*, 579(15), 3297–3302. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.063>
- Gill, P.S. Wilson, C. S. (2006). *NADPH Oxidases in Kidney*. 8(2).
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Gross, J. L., De Azevedo, M. J., Silveiro, S. P., Canani, L. H., Caramori, M. L., & Zelmanovitz, T. (2005). Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*, 28(1), 164–176. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.1.164>
- Gu, L., Gao, Q., Ni, L., Wang, M., & Shen, F. (2013). Fasudil inhibits epithelial-myofibroblast transdifferentiation of human renal tubular epithelial HK-2 cells induced by high glucose. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61(7), 688–694. <https://doi.org/10.1248/cpb.c13-00066>
- Gundemir, S., Colak, G., Feola, J., Blouin, R., & Johnson, G. V. . (2013). Transglutaminase 2 facilitates or ameliorates HIF signaling and ischemic cell death depending on its conformation and localization. *Bone*, 23(1), 1–7.

<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, *142*(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Han, S. Y., Jee, Y. H., Han, K. H., Kang, Y. S., Kim, H. K., Han, J. Y., ... Cha, D. R. (2006). An imbalance between matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *21*(9), 2406–2416. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl238>
- He, F., Peng, F., Xia, X., Zhao, C., Luo, Q., Guan, W., ... Huang, F. (2014). MiR-135a promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by regulating TRPC1. *Diabetologia*, *57*(8), 1726–1736. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3282-0>
- Hills, C. E., & Brunskill, N. J. (2009). C-peptide and its intracellular signaling. *Review of Diabetic Studies*, *6*(3), 138–147. <https://doi.org/10.1900/RDS.2009.6.138>
- Hinokio, Y., Suzuki, S., Hirai, M., Chiba, M., Hirai, A., & Toyota, T. (1999). Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: Its association with diabetic complications. *Diabetologia*, *42*(8), 995–998. <https://doi.org/10.1007/s001250051258>
- IIDF. (2015). IDF Diabetes Atlas 2015. In *International Diabetes Federation*. Retrieved from <http://www.idf.org/about-diabetes/facts-figures>
- Jeitner, T. M., Delikatny, E. J., Ahlqvist, J., Capper, H., & Cooper, A. J. L. (2005). Mechanism for the inhibition of transglutaminase 2 by cystamine. *Biochemical Pharmacology*, *69*(6), 961–970. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.12.011>
- Jiang, M., Zhang, H., Zhai, L., Ye, B., Cheng, Y., & Zhai, C. (2017). ALA/LA ameliorates glucose toxicity on HK-2 cells by attenuating oxidative stress and apoptosis through the ROS/p38/TGF- β 1 pathway. *Lipids in Health and Disease*, *16*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0611-6>
- Jiang, W. L., Xu, Y., Zhang, S. P., Hou, J., & Zhu, H. B. (2012). Effect of Rosmarinic Acid on Experimental Diabetic Nephropathy. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, *110*(4), 390–395. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00828.x>
- Jiang, W. L., Zhang, S. P., Hou, J., & Zhu, H. B. (2012). Effect of loganin on

- experimental diabetic nephropathy. *Phytomedicine*, 19(3–4), 217–222.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.08.064>
- Jiao, X., Li, Y., Zhang, T., Liu, M., & Chi, Y. (2016). Role of Sirtuin3 in high glucose-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 480(3), 387–393.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.060>
- Johansson, J., Ekberg, K., Shafqat, J., Henriksson, M., Chibalin, A., Wahren, J., & Jörnvall, H. (2002). Molecular effects of proinsulin C-peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(5), 1035–1040.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00721-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00721-0)
- Kashihara, N., Haruna, Y., K. Kondeti, V., & S. Kanwar, Y. (2010). Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Current Medicinal Chemistry*, 17(34), 4256–4269.
<https://doi.org/10.2174/092986710793348581>
- Kiritoshi, S., Nishikawa, T., Sonoda, K., Kukidome, D., Senokuchi, T., Matsuo, T., ... Araki, E. (2003). Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: Potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 52(10), 2570–2577.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.52.10.2570>
- Krupa, A., Jenkins, R., DongLuo, D., Lewis, A., Phillips, A., & Fraser, D. (2010). Loss of microRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(3), 438–447.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2009050530>
- Kumar, S., Donti, T. R., Agnihotri, N., & Mehta, K. (2014). Transglutaminase 2 reprogramming of glucose metabolism in mammary epithelial cells via activation of inflammatory signaling pathways. *International Journal of Cancer*, 134(12), 2798–2807. <https://doi.org/10.1002/ijc.28623>
- Kupcsik, L. (2011). Estimation of Cell Number Based on Metabolic Activity: The MTT Reduction Assay. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 740, 1–253. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
- Lai, T. S., Lin, C. J., & Greenberg, C. S. (2017). Role of tissue transglutaminase-2 (TG2)-mediated aminylation in biological processes. *Amino Acids*, 49(3), 501–515. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2270-8>
- Landreh, M., Johansson, J., Wahren, J., & Jörnvall, H. (2014). The structure, molecular

- interactions and bioactivities of proinsulin C-peptide correlate with a tripartite molecule. *Biomolecular Concepts*, 5(2), 109–118. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0005>
- Landreh, M., & Jörnvall, H. (2015). C-peptide evolution: Generation from few structural restrictions of bioactivities not necessarily functional. *FEBS Letters*, 589(4), 415–418. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.01.006>
- Lee, S. K., Lee, J. O., Kim, J. H., Jung, J. H., You, G. Y., Park, S. H., & Kim, H. S. (2010). C-peptide stimulates nitrites generation via the calcium-JAK2/STAT1 pathway in murine macrophage Raw264.7 cells. *Life Sciences*, 86(23–24), 863–868. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.03.022>
- Levy, J. (1999). Abnormal cell calcium homeostasis in type 2 diabetes mellitus: A new look on old disease. *Endocrine*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1385/ENDO:10:1:1>
- Liu, J., Wang, C., Liu, F., Lu, Y., & Cheng, J. (2015). Metabonomics revealed xanthine oxidase-induced oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(9), 2569–2579. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8481-0>
- Lowry, H. O., Randall, R. J., & Lewis, A. (1951). *Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent*.
- Luppi, P., & Drain, P. (2016). C-peptide antioxidant adaptive pathways in β cells and diabetes. *Journal of Internal Medicine*, 281(1), 7–24. <https://doi.org/10.1111/joim.12522>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Nordquist, L., Brown, R., Fasching, A., Persson, P., & Palm, F. (2009). Proinsulin C-peptide reduces diabetes-induced glomerular hyperfiltration via efferent arteriole dilation and inhibition of tubular sodium reabsorption. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 297(5), 1265–1273. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00228.2009>
- Onyekachi, O. (2014). History and Biology of Transglutaminase 2: A Synopsis. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 4(1), 43–65. <https://doi.org/10.9734/ijbcrr/2014/6363>
- Pan, M., Han, Y., Basu, A., Dai, A., Si, R., Willson, C., ... Makino, A. (2018).

- Overexpression of hexokinase 2 reduces mitochondrial calcium overload in coronary endothelial cells of type 2 diabetic mice. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 314(6), C732–C740. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00350.2017>
- Patel, L., Desai, P., Shah, K., & Thaker, A. (2014). Spectrofluorimetric measurement of nitric oxide in mice plasma, urine and kidney homogenate in diabetic nephropathy. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 471–476.
- Rodrigues, B., Cam, M. C., & McNeill, J. H. (1998). Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 180(1–2), 53–57. <https://doi.org/10.1023/A:1006882805197>
- Ryan, M. J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S. M., Zager, R. A., & Torok-Storb, B. (1994). HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International*, 45(1), 48–57. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.6>
- Sagoo, M. K., & Gnudi, L. (2018). Diabetic nephropathy: Is there a role for oxidative stress? *Free Radical Biology and Medicine*, 116(November 2017), 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.040>
- Sima, A. A. F. (2003). C-peptide and diabetic neuropathy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12(9), 1471–1488. <https://doi.org/10.1517/13543784.12.9.1471>
- Singh, U. S., & Cerione, R. A. (1996). Biochemical effects of retinoic acid on GTP-binding protein/transglutaminases in HeLa cells: Stimulation of GTP-binding and transglutaminase activity, membrane association, and phosphatidylinositol lipid turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27292–27298. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27292>
- Steiner, D. F., Cunningham, D., Spigelman, L., & Aten, B. (1967). Insulin biosynthesis: Evidence for a precursor. *Science*, 157(3789), 697–700. <https://doi.org/10.1126/science.157.3789.697>
- Szondy, Z., Korponay-Szabó, I., Király, R., Sarang, Z., & Tsay, G. J. (2017). Transglutaminase 2 in human diseases. *BioMedicine (France)*, 7(3), 1–13. <https://doi.org/10.1051/bmdcn/2017070315>
- Taslipinar, A., Corakci, A., Kaya, A., & Uysal, A. R. (2017). *TURKDIAB Diyabet*

- Tani ve Tedavi Rehberi 2017*. Retrieved from http://www.turkdiab.org/admin/PICS/webfiles/Diyabet_tani_ve_tedavi__kitabi.pdf
- Tatsukawa, H., Furutani, Y., Hitomi, K., & Kojima, S. (2016). Transglutaminase 2 has opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death. *Cell Death and Disease*, 7(6), e2244-12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.150>
- Tolosa, L., Donato, M. ., & Lechon, M. J. . (2015). General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, 1250, 1–390. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7>
- U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information. (n.d.). Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Proinsulin-C-peptide>
- Wahren, J. (2017). C-peptide and the pathophysiology of microvascular complications of diabetes. *Journal of Internal Medicine*, 281(1), 3–6. <https://doi.org/10.1111/joim.12541>
- Wahren, John. (2004). C-peptide: New findings and therapeutic implications in diabetes. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 24(4), 180–189. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.2004.00558.x>
- Wahren, John, Ekberg, K., Johansson, J., Henriksson, M., Pramanik, A., Johansson, B. L., ... Jörnvall, H. (2000). Role of C-peptide in human physiology. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 278(5 41-5). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.278.5.e759>
- Wahren, John, Kallas, Å., & Sima, A. A. F. (2012). The clinical potential of C-peptide replacement in type 1 diabetes. *Diabetes*, 61(4), 761–772. <https://doi.org/10.2337/db11-1423>
- Wahren, John, & Larsson, C. (2015). C-peptide: New findings and therapeutic possibilities. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 107(3), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.01.016>
- Wang, J., & Guo, H. (2019). Astragaloside IV ameliorates high glucose-induced HK-2 cell apoptosis and oxidative stress by regulating the Nrf2/ARE signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4409–4416. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7495>

Zhang, J., Lesort, M., Guttman, R. P., & Johnson, G. V. W. (1998). Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2288–2295.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2288>



8 Teşekkür

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi birikimini benimle paylaşan, beni yetiştiren ve destekleyen değerli danışman hocam; E.Ü. Eczacılık Fakültesi Temel Bilimler Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. N. Aysun Pabuççuoğlu'na,
Çalışmalarında bana özveriyle destek olan, sevgili ablam Dr. Öğretim Üyesi Fadime Aydın Köse'ye,
Tezimde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Varol Pabuççuoğlu'na,

Yüksek lisans eğitimimde desteklerini esirgemeyen saygıdeğer Biyokimya ABD Öğretim Üyelerine,

Bana her zaman destek olan ve hep yanımda olduklarını hissettiğim değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Recep İlhan'a, Arş. Gör. Sinem Yılmaz'a,

Çalışmamın deneysel aşamalarında sıkça kullandığım E.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL)' ında emeği geçen herkese,

Tez çalışmalarımında TGA-2019-20038 nolu proje ile maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Şube Müdürlüğüne,

Bu zor ve anlamlı süreçte her türlü fedakarlığı gösteren, en büyük destekçilerim olan canım aileme; eşim Mehmet Sercan Candan'a, babam Mustafa Cansu'ya, annem Zehra Cansu'ya, kardeşim Beyza Cansu'ya,

Hep yanımda olan canım dostlarım; Buşra Öztürk İlhan'a, Gamze Doğan'a, ve Gökçe Türkmen Üstek'e,

Fedakar ve candan çalışma arkadaşlarım; Nuri Karakaya'ya, Sezer Aka'ya ve Suna Çiftçi'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında aramızdan ayrılan sevgili anneannem Sefire Albayrak'a beni bugünlere getirdiği için sonsuz şükranlarımı sunarım.

İzmir, 18.02.2020

Ecz. Kübra CANSU CANDAN

9  zgemiŐ

2009 yılında baŐladıđım Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesindeki lisans eğitimimden 2015 yılında mezun oldum. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında 2016 yılında bir dönem özel  ğrenci olduktan sonra 2017 yılında yüksek lisans eğitimime baŐladım.

kubra.cnsu@gmail.com

[0546 418 87 98](tel:05464188798)



