

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİYABETİK
SIÇAN MODELİNDE BEYİN SAPI VE SEREBELLUM
BÖLGELERİNİN APOPTOTİK GENLER AÇISINDAN
İNCELENMESİ VE NÖRODEJENERASYONLA
İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

**BURCU AZAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ESER ÖZ OYAR**

**ORTAK DANIŞMAN
PROF. DR NURAN EKERBİÇER**

2016-İZMİR

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİYABETİK
SIÇAN MODELİNDE BEYİN SAPI VE SEREBELLUM
BÖLGELERİNİN APOPTOTİK GENLER AÇISINDAN
İNCELENMESİ VE NÖRODEJENERASYONLA
İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

**BURCU AZAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ESER ÖZ OYAR**

**ORTAK DANIŞMAN
PROF. DR NURAN EKERBİÇER**

Bu tez İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2015-TYL-SABE-0014 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2016-İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 04 / 08 / 2016

Tez Danışmanı :

Prof. Dr. Eser ÖZ OYAK İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Nazan Uysal HARZADIN Dokuz Eylül Üniversitesi

Üye :

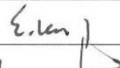

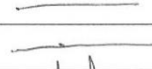



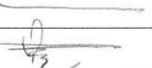
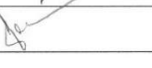
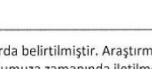



Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK Manisa Celal Bayar Üniversitesi

ONAY : Bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet KOYU
Enstitü Müdürü

ETİK KURUL ONAY RAPORU

T.C.
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	17/03/2015 / 77.637.435 - 25		
ARAŞTIRMANIN ADI	Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde beyin sapı ve serebellum bölgelerinin apoptotik genler açısından incelenmesi ve nörodejenerasyon ile ilişkilendirilmesi		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Eser Öz OYAR - İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Doç. Dr. Dr. Nuran Ekerbiçer,- Yrd. Doç. Dr. Mustafa Soyöz,- Uz. Dr. Fatma Şimşek,- Arş. Gör. Burcu Azak		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/>	Yüksek Lisans/Doktora <input checked="" type="checkbox"/>	Akademik <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	13/03/2015 / 19 - Tarih ve sayılı Araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası görüşülmüş, bilimsel ve etik açıdan oy birliği ile UYGUN bulunmuştur.		
Ünvanı/Adı/Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Necip KUTLU Fizyoloji		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Cüneyt TEMİZ Nöroşirürji		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM Müdürü		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK Tıbbi Mikrobiyoloji		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Fulya OCAK Veteriner Hekim		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Saime ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sivil Üyesi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.			
 Prof. Dr. Emin KURT Başkan			

ÖNSÖZ

Bu çalışmam süresince her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmama ışık tutan, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmemde büyük katkısı olan başta değerli danışman hocam Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR'a ve asistanlık eğitimimdeki katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet KOYU ve Prof. Dr. Sedat AKAR'a; Çalışmamda kullanılmak üzere tasarlanan deney modeli için destek sağlayan ilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen ve sorunlarımı sabırla çözüme ulaştıran Prof. Dr. Nuran EKERBİÇER'e ve Celal Bayar Üniversitesi Fizyoloji Asistanlarına; Tüm deneysel basamaklarda yanımda olarak benden hem fiziksel hem ruhsal desteğini esirgemeyen, iş yükümü hafifleten, deneyimleriyle beni rahatlatan, bilgi birikimlerinden faydalandığım canım arkadaşlarım Cansu BİLİSTER, Ebru KÖKEN, Cem KÖKEN ve Gonca KESELİK'e; Tüm eğitim hayatım boyunca sabır ve sevgisini benden esirgemeyen, anatomi bilgisiyle çalışmalarına ışık tutan ve anlam katan canım dostum Gizem ÇİZMECİ'ye, Tez çalışmalarım sırasında maddi destek sağlayan İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne en içten dileklerle teşekkür ederim...

En telaşlı günlerimde benimle birlikte aynı tempoda yaşayan Annem'e, Babam'a ve biricğim Cansu AZAK'a ve yol arkadaşım Sercan PAZARLAR'a tüm kalbimle sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

Kabul Onay Formu.....	ii
Etik Kurul Onay.....	iii
Önsöz.....	iv
İçindekiler.....	v
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	viii
Şekiller Dizini.....	x
Tablolar Dizini.....	xi
Resimler Dizini.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Diyabetes Mellitus.....	4
2.1.1. Diyabet Tipleri.....	5
2.1.1.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus(IDDM) (T1DM).....	5
2.1.1.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (NIDDM) (T2DM).....	8
2.2. Diyabetik Modellerde Streptozotosin (STZ).....	11
2.2.1. STZ'nin Yapısal Özellikleri.....	12
2.2.2. STZ'nin Çözünürlüğü ve Stabilitesi.....	13
2.2.3. STZ'nin Uygulama Şekli ve Dozajı.....	14
2.2.4. STZ'nin In Vivo Toksisitesi.....	15
2.2.5. STZ Duyarlılığında Cinsiyet Farklılığı.....	15
2.2.6. STZ'nin Diyabetojenik Etkisi.....	16
2.2.6.1. STZ'nin β Hücrelerinin Membranından Seçici Taşınımı.....	16
2.2.7. STZ Toksisitesinin Etki Mekanizması.....	17
2.2.7.1. Hücresel Bileşenlerin Karbamolasyonu ve Alkilasyonu.....	17
2.2.7.2. Nitrik Oksit (NO) Salınımı.....	19
2.2.7.3. Serbest Radikal Üretimi ve Oksidatif Stres.....	19
2.2.7.4. O-GlcNAcaz İnhibisyonu.....	20
2.3. İnsulin Sinyal Transdüksiyon Yolağının Aracıları.....	20
2.3.1. IRS Proteinleri.....	22
2.4. Diyabetik Sıçanlarda İnsulin Sinyal Yolağında Meydana Gelen Bozukluklar.....	23
2.5. Diyabet Sonucu İnsulin Sinyalizasyon Yolaklarında Meydana Gelen Bozuklukların Beynin Nöronal Sağ Kalım ve Apoptosis Süreci Üzerine Etkisi..	24
2.5.1. Nöronlarda İnsulin Bağımlı (PI3K)/Akt Sinyalizasyon Yolakları ve Nöronal Sağ Kalım.....	24
2.5.2. Nöronlarda İnsulin Sinyal Yolağına Bağlı Bcl-2, BİM-Proteinleri aracılı Apoptosis Süreci.....	24
2.6. XIAP (X-Linked Inhibitor of Apoptosis) Geninin mRNA Ekspresyonunun Apoptosis ve Nörodejenerasyondaki Rolü.....	27
2.6.1. XIAP (X-Linked Inhibitor of Apoptosis).....	27

2.6.2. IAP'lerin Yapı ve Fonksiyonları.....	27
2.6.3. XIAP'nin Memeli Hücrelerindeki Hücre Ölümünün Düzenlenmesindeki Fonksiyonel Rolü.....	29
2.6.4. Smac / DIABLO Geninin mRNA Ekspresyonunun Apoptozis ve Nörodejenerasyondaki Rolü.....	32
2.8. Beynin Glukoz Metabolizması: Periferik Hipoglisemi ve Hiperglisemi Arasındaki Dengenin Nöronal Hasara Etkisi.....	33
2.9. Advanced Glikasyon Son Ürünleri (AGEs)	37
2.10. STZ ile İndüklenen Diyabetik Nörodejenerasyonda Mitokondrial Disfonksiyon ve Oksidatif stres Aracılı Apoptozis.....	37
2.11. Diyabetik Sıçanlarda Serebellum ve Beyin Sapı Bölgelerindeki Nöronal Harabiyetin Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi.....	42
2.11.1. Beyin Sapı ve Nörodejeneratif Hastalıklarla ilişkisi	44
2.11.2. Serebellum ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi.....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
3.1. Hayvanların Ön Muayeneden Geçirilip Grupların Oluşturulması.....	46
3.2. Streptozotosin ile İndüklenen Diyabetik Sıçan Modelinin Oluşturulması....	46
3.3. Sıçanlara İnsulin Uygulaması.....	48
3.4. Sıçanlarda Vücut Ağırlığı Takibi.....	49
3.5. Haftalık Açlık Kan Şekeri Ölçümü ve Takibi.....	49
3.6. Genel Anestezi Altında İntrakardiyak Kan Alma ve Deneyin Sonlandırılması.....	50
3.7. Serebellum ve Beyin Sapı Bölgelerinin Çıkarılması.....	53
3.8. Dokulardan Total RNA İzolasyonu.....	55
3.9. RNA'dan Komplementer DNA Sentezlenmesi.....	58
3.10. Hedef Genlere Ait Primer ve Probe'ların Dizaynı ve Sentezi.....	59
3.11. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile mRNA Ekspresyonlarının Ölçülmesi.....	60
3.12. 2 ^{-ΔΔCT} Yöntemi ile Ekspresyon Düzeylerinin Rölatif Hesaplanması.....	61
3.13. İmmunohistokimya Çalışmaları.....	62
3.13.1. Doku Takip İşlemleri.....	62
3.13.2. Dokuların Parafin Bloklara Gömülme İşlemi.....	63
3.13.3. Blokların Kesilmesi.....	63
3.13.4. İmmünohistokimyasal İşlemleri.....	63
3.13.5. Kesitlerden Görüntü Elde Edilmesi.....	65
3.14. İstatistiksel Analiz.....	66
4. BULGULAR.....	67
4.1. Hayvanlarda Vücut Ağırlığı Takibi Sonuçları.....	67
4.2. Açlık Kan Şekeri Düzeylerine Dair Bulgular.....	69
4.3. Organlardaki Morfolojik ve Patolojik Değişimlere Dair Bulgular.....	70
4.4. Serebellum ve Beyin Sapında XIAP ve Smac/DIABLO Geninin mRNA Ekspresyonlarına Dair bulgular.....	72
4.5. Serebellum ve Beyin Sapında Akt, PI3K, Bcl-2 ve BIM1 Proteinlerine Ait İmmunohistokimya Çalışmalarına Dair Bulgular.....	74
5. TARTIŞMA.....	81
ÖZET.....	87

ABSTRACT	88
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	108



Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

ADA: American Diabetes Association
NDDG: National Diabetes Data Group
WHO: (World Health Organisation)
IDDM: Insulin Dependent Diabetes Mellitus
NIDDM: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus
T1DM: Tip 1 Diyabetes Mellitus
T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus
CD4: Cluster of Differentiation 4
CD8: Cluster of Differentiation 8
HLA: Human Leucocytes Antigen
CTLA4: Sitotoksik T Lenfosit Antijeni 4
LYP: Lenfoid Tirozin Fosfataz
ICAM-1: Intraselüler Hücre Adezyon Molekülü-1
GAD: Glutamik Asit Dekarboksilaz
IA-2: Tirozin Fosfataz Benzeri Molekül
TCR: T Hücresi Antijen Reseptörü
STZ: Streptozotosin
NO: Nitrik Oksit
O-GlcNAcaz, OGA: (N-acetyl-D-glucosaminyl)-L-serine/threonine
N-acetylglucosaminyl hydrolase
GLUT: Glukoz Taşıyıcı Protein
NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
HPLC: High Pressure Liquid Chromotography
PARP: Poli-ADP-Riboz Polimeraz
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
ROS: Reaktif Oksijen Türevleri
RNS: Reaktif Nitrojen Türevleri
AGEs: Glikasyon Son Ürünleri (Advanced Glycation End Products)
GSSP: Glutatyon Peroksidaz
SOD: Süperoksid Dismutaz
IRS: İnsulin Reseptör Substratı
PI3K: Fosfoinositid 3 Kinaz
IR: İnsulin Reseptörü
SH2: Src Homoloji 2
MAPK: Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinaz
Akt: Protein Kinaz B; PKB
PDK1: Fosfoinositid Bağımlı Kinaz 1
FOXO: Forkhead Box O Protein
GSK3- β : Glikojen Sentaz Kinaz 3- β
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin
BCL2: B- cell lymphoma 2
BAX: Bcl-2 Associated X protein
BAK1: Bcl-2 Homologus Antagonist/Killer Protein
BIM: Bcl-2 like Protein 11

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini (devam)

AD: Alzheimer Hastalığı
PDH: Pürivat Dehidrogenaz
TCA: Trikarboksilik Asit
RAGEs: AGEs Reseptörü
PUFA: Çoklu-Doymamış Yağ Asiti
COX: Sitokrom C Oksidaz
A β : Amiloid Beta
ABAD: A β -Bağlayan Alkol Dehidrogenaz
TOM: Mitokondriyal Dış Membran Translokaz İmport Mekanizması
NFY: Nörofibriler Yumak
APP: Amiloid Prekürsör Protein
PS: Presenilin
DRP1: Mitokondriyal Fizyon Proteini
XIAP(BIRC4): X-Linked Inhibitor of Apoptosis
IAPs: Inhibitor of Apoptosis Proteins
BIR: Baculovirüs-IAP- Repeat
SMAC/Diablo: Sekond Mitochondria-derived Activator of Caspase (SMAC) /Direct Iap Binding protein with LOw pI (DIABLO)
NAIP/BIRC1: Nöronal IAP
cIAP1/BIRC2: Hücresel IAP 1
cIAP2/BIRC3: Hücresel IAP 2
BRUCE/Apollon/BIRC6: BIR- Containing Ubiquitin-Conjugating Enzyme
ML-IAP/BIRC7: Melanoma IAP
ILP-2/BIRC8: IAP like Protein 2
UBA: Ubiquitin Associated Domain
MOMP: Mitokondriyal Dış Membran Permeabilizasyonu
Apaf-1: Sitosolik Apoptosis İndükleyici Faktör-1
PD: Parkinson Hastalığı
SN: Substantia Nigra
MSA: Multiple Sistem Atrofisi
PSP: Progresif Supranükleer Palsi
MND: Motor Nöron Hastalıkları
İ.P.: İntraperitoneal
İ.V.: İntravenöz
cDNA: Komplementer DNA
ActB: Aktin Beta
R: Reverse Primer
F: Forward Primer
UPL: Universal Probe Library
CT: Cycle Threshold
RT-PCR: Real-Time PCR

Şekiller Dizini

Şekil 1: Antijen Sunan Hücre Üzerindeki MHC Class II Molekülü ile Antijenin CD4 T Hücrelerine Sunulması.....	8
Şekil 2: STZ'nin Kimyasal Yapısı	13
Şekil 3: STZ'nin Pankreatik β Hücrelerine Seçici Taşınımı.....	17
Şekil 4: STZ Aracılı DNA Karbamolasyonu ve Alkilasyonu.....	18
Şekil 5: STZ Toksisitesinin Mekanizması.....	20
Şekil 6: İnsulin /İnsulin Reseptör Kompleksi.....	21
Şekil 7: İnsulin Sinyal Transdüksiyon yolağı.....	22
Şekil 8: İnsulin Sinyalizasyon Kaskadı.....	26
Şekil 9: IAP (Apoptoz İnhibitörleri) Ailesi ve Fonksiyonel Domainleri.....	29
Şekil 10: Hücre Ölüm ve Sağ Kalım Yolaklarının XIAP ile Kontrolü.....	30
Şekil 11: Smac/DIABLO ve Diğer Proteinlerin IAPs Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	33
Şekil 12: Hiperglisemi ve Hipoinsulinemi Sebebiyle AGE Aracılı Nörodejenerasyon.....	37
Şekil 13: Beyinde IR, IRS-1, IRS-2 ve IGF-R Proteinlerinin Bölgesel İfadelerinin Gösterilmesi.....	43
Şekil 14: Trizol Yönteminde Santrifügasyon Sonrası Oluşan 3 Fazın Gösterilmesi.....	56
Şekil 15: MagnaLyser ile Doku Homojenizasyonu Prosedürü.....	57
Şekil 16: Amplifikasyon Eğrilerinde Cycling Threshold (CT) Değerlerinin Gösterilmesi.....	62
Şekil 17: Haftalık Vücut Ağırlığı (gr) Takibinin Sütun Grafiği ile Gösterilmesi.	68
Şekil 18: Haftalık Vücut Ağırlığı (gr) Takibinin Çizgi Grafiği ile Gösterilmesi.	68
Şekil 19: STZ Uygulaması Öncesi ve Sonrası Haftalık Açlık Kan Şekeri Düzeyleri Değişimi	70
Şekil 20: Sıçan Beyni Serebellum Bölgesine Ait XIAP ve Smac/DIABLO mRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	73
Şekil 21: Sıçan Beyni Beyin Sapı Bölgesine Ait XIAP Smac/DIABLO mRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	74
Şekil 22: Sıçan Beyni Serebellum Bölgesindeki Akt, PI3K, BIM1 ve Bcl-2 Proteinlerinin Düzeyleri.....	75
Şekil 23: Sıçan Beyni Beyin Sapı Bölgesindeki Akt, PI3K, BIM1 ve Bcl-2 Proteinlerinin Düzeyleri.....	77
Şekil 24: İnsulin Sinyal Yolağı ile Smac/DIABLO ve XIAP Proteinlerinin Olası Etkileşimine Dair Demonstratif Bir Şema.....	86

Tablolar Dizini

Tablo 1: Oligonükleotid Sentez Raporu.....	59
Tablo 2: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Thermal Cycluser Cihaz Protokolü.....	60
Tablo 3: İmmünohistokimya Protokolü.....	63
Tablo 4: STZ Uygulanan Sıçanlarda Vücut Ağırlığında (g) Gözlenen Değişimler.....	67
Tablo 5: STZ Uygulanan Sıçanlarda Haftalara Ait Açlık Kan Şekerinde (mg/dL) Gözlenen Değişimler.....	69
Tablo 6: Uygulama Yapılan Sıçan Gruplarının Beyin Sapı ve Serebellum Bölgelerine Ait XIAP ve Smac/DIABLO mRNA Ekspresyonları.....	73
Tablo 7: Sıçan Beyni Serebellum Bölgesindeki Akt, PI3K, Bcl-2 ve BIM1 Proteinlerinin Düzeyleri.....	75
Tablo 8: Sıçan Beyni Beyin Sapı Bölgesindeki Akt, PI3K, Bcl-2 ve BIM1 Proteinlerinin Düzeyleri.....	76

Resimler Dizini

Resim 1: İntraperitoneal STZ enjeksiyonu.....	48
Resim 2: Subkutan İnsulin Enjeksiyonu.....	49
Resim 3: Kuyruk Kanatma Yöntemi ile Açlık Kan Şekeri Ölçümü.....	50
Resim 4: Terminal İntrakardiyak Kan Alımı İçin Abdomenin Açılması.....	51
Resim 5: İntrakardiyak Kan Alımı.....	52
Resim 6: Kafa Derisinin Açılması.....	53
Resim7: Kafatasının Açılması ve Beynin çıkarılması.....	54
Resim 8: Beyin Sapı ve Serebellumun Birbirinden Ayrılması.....	55
Resim 9: MagnaLyser Cihazı.....	57
Resim 10: STZ Uygulanan Sıçanların Akciğerlerinde Meydana Gelen Kitle ve Lezyonlar.....	71
Resim 11: STZ Uygulanan Sıçanların Böbreklerinde Gözlenen Kitle ve Lezyonlar.....	72
Resim 12: Serebellumda Akt, PI3K, Bcl-2 ve BIM1 Primer Antikorlarının İmmunohistokimyasal Boyanması (x200)	78
Resim 13: Beyin Sapı Akt, PI3K, Bcl-2 ve BIM1 Primer Antikorlarının İmmunohistokimyasal Boyanması (x200)	79
Resim 14: Serebellum ve Beyin Sapında Akt, PI3K, Bcl-2 ve BIM1 Primer Antikorlarının İmmunohistokimyasal Çalışmalarına Ait Negatif Kontrol.....	80

1. GİRİŞ

Diyabetes mellitus insulinin üretilmediği ya da hücrelerin insulinden faydalanamadığı, kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir. Diyabetin en önemli komplikasyonlarından biri merkezi sinir sisteminde meydana getirdiği bozukluklardır (9, 193).

Hem nörodejenerasyon hem de diyabet mellitus kronik ve yaşa bağlı iki patolojidir. Ayrıca son on yıldır ortaya konulan sonuçlara göre nörodejenerasyonu tetikleyen birçok etmenin çeşitli metabolik hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle tez çalışmamızda prevalansı en yüksek metabolik hastalıklardan biri olan diyabet mellitus'un nörodejenerasyona hangi yollarla katkıda bulunduğuna yeni bir bakış açısı getirilecektir.

Beynin glukoz metabolizması ve glukozdan faydalanabilmesi normal nöronal fonksiyonların gerçekleşmesi için son derece önemlidir. Ayrıca diyabet nöronal hücrelerde insülin sinyalizasyonunun bozulmasına yol açarak birçok sinyal yolağını etkilemektedir. İnsülin, nöronlarda insülin reseptörü (IR)/insülin reseptör substratı (IRS) üzerinden primer olarak mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/Akt sinyalizasyon yollarını (35) etkilemektedir. İnsülinin birçok metabolik ve antiapoptotik etkisi IRS proteinlerinin fosforilasyonunu gerektiren sinyalizasyon yolları ile ortaya çıkmaktadır (43). Bu yolağın tip 1 diyabette olduğu gibi insülin eksikliğinin görüldüğü patolojik durumlarda sekteye uğraması apoptotik yolların kontrol edilememesine sebep olabilir.

Hücre sel sağ kalım sinyalleri oksiradikalleri suprese eder, kalsiyum homeostazisini stabilize eder ve mitokondrial fonksiyonların sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesini sağlar. Apoptozisi indükleyen sinyaller çeşitli trofik faktörlerin eksikliğinden kaynaklanabilir. İnsülin eksikliğinin de hücre içi insülin sinyalizasyonunu bozarak sağ kalım yollarını baskılaması ve apoptozisi teşvik etmesi olasıdır. Bu nedenle çalışmamızda hücre sel sağ kalım için öneme sahip PI3K/Akt yolağı üzerinde etkili insülin sinyalizasyonunun nöronal sağ kalım ve nöronal ölüm arasındaki çizgideki rolü belirlenecektir.

Apoptozis kaspazların aktivasyonu aracılığı ile meydana gelen, çok hücreli organizmalarda homeostazisi sağlayan programlı hücre ölümüdür (99). Apoptozis üst uyaranlara bağlı olarak intrinsek veya ekstrinsek yollar tarafından indüklenebilir. Apoptozis nöronlar içinde merkezi sinir sisteminin gelişimi esnasında nörogenesis açısından önemli bir süreçtir. Ancak zamanından erken gelişen bir apoptozis veya apoptozisin düzenlenmesinde meydana gelen bozukluklar nörodejenerasyonun patogenezesinden sorumludur. Çünkü patolojik koşullarda hücre ölümü nöron kayıplarına sebep olur (194). Nöronal hücre ölümü Alzheimer, Parkinson, Huntington, Strok ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi hemen her nörolojik hastalığın temelinde yatmaktadır. Bu nedenle nöronal apoptozisi hem teşvik eden hem de önleyen mekanizmaların aydınlatılması nörodejeneratif hastalıkların da önlenmesinde yeni yaklaşımların oluşturulması açısından önemlidir. Bu hastalıklardan sorumlu spesifik genetik ve çevresel faktörlerin tanımlanması nöronal apoptozis ile ilişkili çeşitli yollar arasındaki ortak mekanizmaları destekleyecektir.

Nöronlardaki apoptozis programı da temel olarak BCL-2 ailesi üyelerini ve kaspazları içermektedir (216). Proapoptotik olarak bilinen bu aile üyeleri (Bim-1, Bax, Bak) hücre ölüm sinyallerine yanıt verirler. Bu ölüm kaskadları hücreyel sağkalım sinyalleri ile baskılanmaktadır. Daha önce sıkça tetkik edilen moleküllerin dışında henüz diyabet ve nörodejenerasyon arasındaki köprüde rolleri ortaya konulmamış farklı genlerin ve proteinlerin incelenecek olması bu alanda yapılmış çalışmaların devamı niteliğinde olacaktır. Hedef moleküllerimizden XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) apoptoz inhibitörleri arasında hem en güçlü hem de en iyi tanımlanmış anti-apoptotik IAPs ailesi üyesidir. XIAP BIR3 domaini ile Kaspaz-9'a; BIR2 domaini ile Kaspaz-3 ve -7'ye bağlanır ve onları inhibe eder. Bu yoldaki rolünü merak ettiğimiz diğer bir molekül ise XIAP'nin doğal inhibitörü olan Smac/DIABLO'dur. Smac/DIABLO apoptoza giden hücrelerde mitokondriden salınarak XIAP'nin BIR domainlerine bağlı kaspazları açığa çıkarır ve hücre ölümünü tetikler (151).

Çalışmamızda insulin eksikliği yaratmak istediğimizden tip 1 diyabetli sıçan modeli oluşturulmuştur. Bu modeli oluşturmak üzere sıçanlara 45 mg kg⁻¹ STZ intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. STZ insulin üreten pankreatik β hücrelerini yıkarak hipoinsulinemi ve hiperglisemiye sebep olur (117). Sıçanlarda 6 haftalık

süreçte haftalık vücut ağırlığı takibi ve açlık kan şekeri takibi yapılmıştır. Bir gruba sadece STZ uygulanırken diğer gruba 6 haftalık sürecin son iki haftasında subkutan yoldan $5\text{ug}^{-1}\text{gün}^{-1}$ insulin uygulaması yapılarak insulinin serebellum ve beyin sapındaki iyileştirici etkisi de incelenmiştir.

Tez çalışmamızda daha önce beyinde ve nörodejenerasyonda rolleri bilinen ancak henüz insülin sinyalizasyonu ile ilişkilendirilmemiş apoptotik genler ortaya konulmaya çalışılacaktır. Real-Time PCR gibi spesifik bir yöntemle elde ettiğimiz sonuçlarımız immunohistokimya çalışmaları ile desteklenmiştir. Tez çalışmamızdan elde edilen veriler ile hem insülinin beyindeki bilinmeyen rolleri hem de nörodejenerasyona etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bilgiler ışığında yaygın bir metabolik hastalık olan diyabetin; beyinde sadece korteks ve hipokampus gibi popüler bölgelerde değil genel anlamda serebellum ve beyin sapı gibi nörodejeneratif süreçlerde ikinci plana atılan diğer beyin bölgelerindeki nöronlarda, haraplayıcı etkisi yorumlanmış olacaktır. Böylece metabolik hastalıklara bağlı nörodejenerasyonun altında yatan en temel mekanizma olan nöronal ölüm, her bir beyin bölgesindeki nöron için kaçınılmazdır.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Diyabetes Mellitus

Diyabetes mellitus günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır (10). Diyabetes mellitus, mutlak ya da bağıl insülin eksikliği ya da insülin direnci nedeniyle ortaya çıkan ve karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozukluğu ile karakterize, endokrin ve metabolik bir hastalıktır. Diyabetes mellitus yaşam boyu sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini düşüren bir hastalıktır. Hastalığın seyri sırasında hipoglisemi, ketoasidoz, hiperglisemik hiperosmolar nonketotik koma gibi akut ve nefropati, nöropati ateroskleroz gibi kronik komplikasyonlar gelişmekte ve dünyada her yıl binlerce kişi diyabet komplikasyonlarından ölmektedir (9, 193).

Dünya’da 2000 yılında 151 milyon, Türkiye’de Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu’nun (TÜRDEP) yaptığı çalışma ile 2.6 milyon diyabetli olduğu rapor edilmiştir (167).

Diyabetteki kronik hipergliseminin çeşitli organların uzun dönemde hasar görmesi, fonksiyon kaybı ve yetersizlik gelişmesiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (168).

Amerikan Diyabet Derneğine (ADA) göre diyabetes mellitus (DM)’un en basit tanısı açlık glisemisinin venöz plazmada en az iki ardışık ölçümde 126 mg/dl veya daha yüksek olması ile konur (4). Yine günün herhangi bir saatinde açlık ve tokluk durumuna bakılmaksızın venöz plazma glisemisinin 200 mg/dl’in üzerinde olması ve polidipsi, poliüri, polifaji, zayıflama gibi diyabetik semptomlarının oluşu ile de tanı konulabilir (4).

İlk kez 1979 yılında NDDG (54) daha sonra da 1985 yılında WHO (214) tarafından diyabetin geniş bir sınıflaması yapılmıştır. WHO’nun yaptığı sınıflama kliniksel olup aynı zamanda diyabeti terminolojik olarak insüline bağımlı (IDDM veya Tip 1) ve insüline bağımlı olmayan (NIDDM veya Tip 2) olarak da adlandırmıştır (54).

Günümüzde Diyabet sınıflamasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. İnsülin bağımlı diyabetes mellitus (IDDM) ve insülin bağımlı olmayan diyabetes mellitus

(NIDDM) terimlerinin kullanımı artık önerilmemektedir. Bu terimler Tip 1 DM'lu (IDDM) hastalarda mutlak insülin ihtiyacı olması, buna karşılık Tip 2 DM'lularda (NIDDM) buna gerek olmayışı esasına dayanılarak kullanılmakta idi. Ancak birçok DM'lu hastada glisemiyi kontrol altına almak için bir dönemden sonra insülin kullanmak gerektiğinden, insüline bağımlı olmayan kavramı sorun oluşturmaktadır (50).

Daha sonra ADA tarafından 1998 yılında önerilen yeni sınıflama ise etyolojik olup keza insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan diyabet yerine Tip1 ve Tip 2 diyabet terminolojisini önermektedir (50).

2.1.1. Diyabet Tipleri

2.1.1.1 Tip 1 Diyabetes Mellitus

Tip 1 diyabetin kesin sebebi bilinmemektedir. Bilim adamları, tip 1 diyabetli pek çok kişide bağışıklık sisteminin hatalı olarak, pankreas bezinde yer alan ve insülin hormonunu üreten adacıkların beta hücrelerine yöneldiğini ve onları harap ettiğini ortaya çıkarmışlardır. Sebebi ne olursa olsun, adacık hücreleri tahrip edilmeye başladığında, insülin yapımı giderek azalmaya başlar ve nihayetinde hiç insülin yapılamaz. Normalde, insülin hormonu glukozun hücrelerin (Özellikle kas ve yağ dokusu hücreleri) içine girmesini, metabolize edilerek diğer dokulara enerji ulaştırılmasını sağlar. Yemek yenildiğinde pankreas yeteri kadar insülini kan dolaşımına verir böylece yenilen yemeğin sindirimi sonrasında kanda yükselen şekerin hücrelerin içine girmesini sağlar. Glukoz hücre içinde parçalanarak yakılır, bu şekilde bir yandan enerji sağlanırken diğer yandan kandaki şeker seviyesi düşer. Kan şekeri normal seviyeye doğru geriledikçe pankreastan kana verilen insülin miktarı da azalır (95).

Tip 1 diyabette, pankreas adacık hücreleri tahrip oldukları için insülin yapılamaz ve bütün bu fizyolojik olaylar gerçekleşemez. Böylece glukoz, enerji olarak hücrelere ulaştırılacağı yerde, kanda birikmeye başlar ve kanda glukozun aşırı yükselmesi ile diyabet koması (diyabetik ketoasidoz) gibi yaşamı tehdit eden komplikasyonlar ortaya çıkar (95).

Özetlemek gerekirse, tip 1 diyabetin kesin sebebi bilinmemektedir. Fakat çoğu kez genetik yatkınlığı olan bir kişide immun reaksiyonu başlatan bir viral infeksiyon ya da çevresel bir tetikleyici söz konusudur. Vücudun lenfositleri hatalı olarak insülin üretiminden sorumlu pankreas beta hücrelerine yönelip bu hücreleri tahrip etmeye başlar (95).

Tip 1 Diyabet Patogenezi

Tip 1 diyabet pankreastaki insülin üreten β hücrelerinin adacık hücrelerine infiltre olan CD4+, CD8+ T hücreleri ve makrofajlar tarafından otoimmün yıkımı ile karakterizedir (70). Diğer organ spesifik otoimmün hastalıklar gibi tip 1 diyabetin de HLA (Human Leucocytes Antigen) ilişkisi bulunmaktadır. Kromozom 6 üzerindeki HLA lokusu Ailesel Tip 1 Diyabetle ilişkili ilk aday lokus olmuştur (45, 147). DR₄ - DQ8 ve DR₃ -DQ2 olmak üzere iki haplotipin (veya HLA geninin) kombinasyonu tip 1 diyabetli çocukların %90'ında önem göstermektedir. DR₁₅-DQ6 haplotipi ise vakaların %1'inden daha azında görülmektedir (51).

Aday gen çalışmaları kromozom 11 üzerindeki insülin geninin tip 1 diyabete duyarlılıkta ikinci önemli genetik faktör olduğunu tanımlamıştır. İnsülin geninin promoter bölgesindeki rastgele tekrarların kısa formları hastalıkla ilişkili iken uzun formları hastalıktan korunmayla alakalıdır (32, 80).

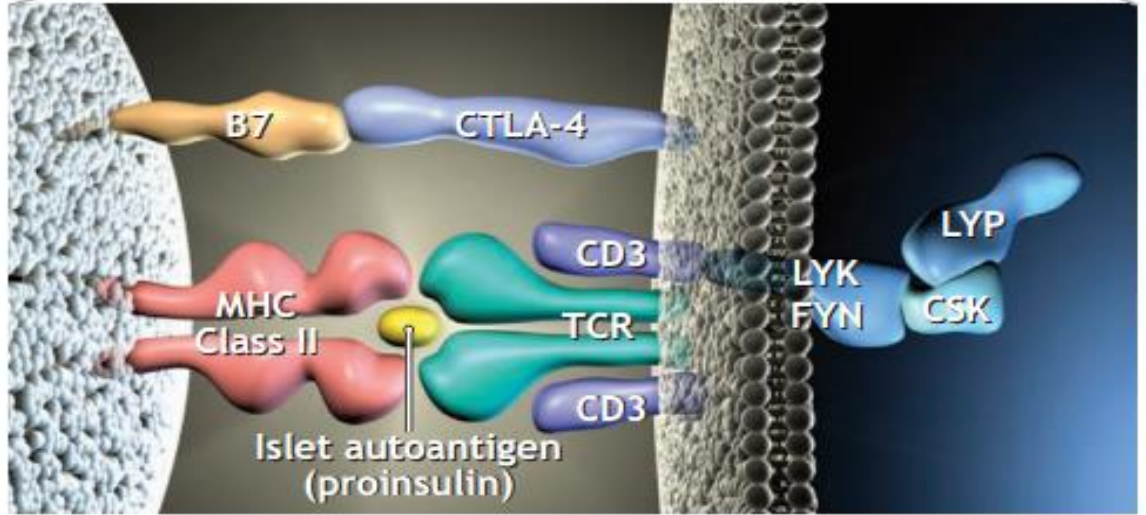
Son on yılda yapılan genom çalışmalarında ise 15 lokusun tip 1 diyabetle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bunların dışında 2 ayrı genin de T hücresi aktivasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (81).

T hücresi aktivasyonunun negatif regülatörü olan Sitotoksik T Lenfosit Antijeni 4 (CTLA4) geninin alleli 2. Kromozomda bulunur ve tip1 diyabet için üçüncü risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Bu lokus çözünebilen CTLA4 miktarını artırarak T hücresi sayısını artırır. T hücresi aktivasyonunu suprese eden Lenfoid Tirozin Fosfataz (LYP) enzimini kodlayan PTPN22 geninin varyantı ise dördüncü risk faktörüdür (8, 26, 182, 197) (Şekil 1).

Ayrıca interselüler adezyon molekülü (ICAM-1)'nün de tip 1 diyabet riskinin artmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. ICAM-1'in erken otoimmün yanıtlarda ve enfeksiyonlarda mononükleer hücrelerin adacık içerisinde konuşlanmasını ve aktive olmalarını sağladığı düşünülmektedir (81).

Tip 1 diyabette β hücrelerinin yıkımı çok selektiftir. Bu hücreler langerhans adacıklarının endokrin kısmının %60-70'ini oluşturmaktadır. Bu kısım α hücreleri, δ hücreleri ve PP hücreleri ile çevrelenmiştir. 1980'lerin başında tip 1 diyabet patogeneziindeki otoimmünite fikri β hücrelerindeki sadece tek bir otoantijene karşı olduğu üzerineydi. Ancak şimdi biliniyor ki B ve T hücreleri diyabet sürecindeki birçok otoantijeni tanımaktadır ve bu otoantijenlerin çoğu β -hücreleri tarafından üretilmektedir. Otoantijenlerin İntraselüler alanlarda, salgı granüllerinde ve sinaptik vezikül benzeri veziküllerde birikmesi otoimmün reaksiyonlar ve β -hücresi fonksiyonu arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır (68).

Diyabette en çok bulunan 3 major otoantijen Glutamik Asit Dekarboksilaz (GAD), Protein Tirozin Fosfataz Benzeri Molekül IA-2 ve insulindir. Hastaların %90'ında bu üç otoantijenden en az birinin bulunduğu gösterilmiştir. Glim38 ise hastaların %15-20'sinde bulunan ve hem adacık hücreleri hem de nöronlardan oluşan endokrin hücrelerinden eksprese edilen bir otoantijendir (68).



Şekil 1: Antijen Sunan Hücre Üzerindeki MHC Class II Molekülü ile Antijenin (buradaki örnekte antijen olarak proinsülin verilmiştir) CD4 T Hüresine Sunulması. (Bu süreç T hücresi aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu diyagramda tip 1 diyabetle ilişkili 4 temel gen gösterilmektedir. CTLA-4 ve PTPN22 geninden kodlanan LYP, T hücresi aktivasyonunun inhibitörleridir. LYP ile C terminal Src Kinaz (CSK)'ın oluşturduğu kompleks ise T hücresi antijen reseptörünün (TCR) antijenle bağlanması sonrası meydana gelen Lck sinyalizasyonunu bloke eder) (81).

2.1.1.2 Tip 2 Diyabetes Mellitus (NIDDM) (T2DM)

Toplumda en sık görülen diyabetes mellitus tipidir. İnsuline bağımlı olmayan diyabetes mellitus (NIDDM) ya da tip 2 diyabet polidipsi, poliüri, polifaji, pruritus, ağırlık kaybı gibi klasik belirtiler ile ortaya çıksa da çoğu kez uzun sürebilen asemptomatik dönemi mevcuttur. Genellikle 45 yaş üzerinde ilk yakınmalar başlar. Polidipsi, poliüri ve polifaji gibi yakınmalardan ziyade retinopati, nefropati, nöropati ve aterosklerotik kalp hastalığı gibi kronik komplikasyonlarla ilgili yakınmalar hastayı hekime getirebilir (65).

Hiperglisemiye rağmen kan ve idrarda keton cisimleri azdır veya yoktur. İnsulin tedavisi çoğu kez gerekli değildir. Ketoasidoz spontan olarak oluşmaz. Sadece aşırı hiperglisemi ve hiperozmolarite durumlarında nadiren ketoasidoz koması gelişebilir. Diyabetik ketoasidoz koması, şiddetli enfeksiyon veya mezenter arter embolisi gibi acil bir durum olmadıkça gelişmez. Bu hastalarda daha sık görülebilen koma, yeterli sıvı alınmamasına bağlı gelişen hiperglisemik hiperosmolar non-ketotik komadır (65).

Diyabetik hipergliseminin patogenezinde üç önemli faktörün rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar beta hücre insulin salgısının bozulması, insulin direnci ve karaciğerde glukoz üretiminin artışıdır. Hem insulin direnci hem de bozulmuş insulin sekresyonu tip 2 diyabetin patogenezinde genetik olarak kontrol edilen faktörler olup bunlardan hangisinin primer ağırlıkta rol oynadığı henüz açık değildir. Aile öyküsü hemen hepsinde olmasına karşın hastalık henüz tek bir genetik zemine oturtulamamıştır. Yine de tip 2 diyabetin çoğu formları genetik yüklülük ile ilişkilidir (65).

Tip 2 diyabet yaygın olarak obezite ile çok yakın ilişkilidir. Obezite insulin direncini artırarak hiperglisemiye ağırlaştırmasına rağmen obezite olmadan da Tip 2 diyabet gelişir. Bu yüzden obez ve obez olmayan NIDMM ayırımı etiyolojik bir farklılık oluşturur (83). Buna göre obez Tip 2 diyabet’de insulin direnci daha önemli iken, obez olmayan Tip 2 diyabet’de insulin sekresyon bozukluğu ön plana geçer (163).

İnsülin direnci sendromu, diğer adı ile “Sendrom X”, Reaven et al. (163) tarafından yakın zamanda tanımlanmıştır. Bu sendromdaki primer bozukluk, periferik insülin direncidir. Periferik insulin direnci kendini hiperinsulinizm ile gösterir çünkü ortam insulin konsantrasyonu çoktur ancak hücreler tarafından kullanılamamaktadır. Sendrom X’de hiperinsulinizm diğer bulgulardan önce ortaya çıkar. Bunu obezite, aterosklerozis, hiperlipidemi ve hipertansiyon izler. Hiperinsülinizmin özellikle trunkal obezite ile ilişkisi vardır (65). İleri sürülen hipotezde, hiperinsülinizmin bir büyüme faktörü gibi rol oynayıp arteriyal duvardaki proliferasyonu stimüle ederek makrovasküler hastalığı başlatabileceği, sodyumun renal tübüler reabsorbsiyonunu hızlandırarak ve sempatik sinir sistemi aktivitesini arttırarak hipertansiyonun gelişmesine katkıda bulunabileceği ve son olarak

karaciğerden çok düşük dansiteli lipoproteinlerin sentezini hızlandırıp ortamdan uzaklaştırılmalarını yavaşlatabileceği varsayılmaktadır. Arterioskleroz gelişmesi sonucunda koroner arter hastalığı ve serebrovasküler olaylar bu hastalarda sık olarak görülür. Ancak yukarıda sayılan durumların hepsi diyabetes mellituslu hastaların hepsinde sık olarak görülen komplikasyonlar nedeni ile sendrom X'in kesin yöntemlerle ayırıcı tanısının yapılabilmesi bu gün için mümkün değildir (65).

Tip 2 Diyabet Patogenezi

Heterojen bir hastalık olan insüline bağımlı olmayan diyabetin patogenezinin beta hücre fonksiyon bozukluğu, insülin direnci ve hepatik glukoz üretimi artışı gibi üç ana metabolik bozukluk sorumludur (178).

Hepatik glukoz üretimi artışının primer defekt olduğunu gösteren bulgular azdır. İnsülin eksikliği ve/veya insülin direnci ise asıl nedeni oluşturur. Fakat NIDDM'un ortaya çıkışında insülin eksikliği ile seyreden beta hücre fonksiyon bozukluğundan veya insülin direncinden hangisinin primer olarak sorumlu olduğu güncel bir tartışma konusudur. Bunun yanında beta hücre fonksiyon bozukluğu ve insülin direnci arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu ve her ikisinin de patogeneizde birlikte rol aldığı da ileri sürülmektedir.

NIDDM'taki primer patolojinin beta hücre fonksiyon bozukluğu veya insülin direnci olmasında yaşın, etnik farklılıkların, obezitenin ve diyabetin heterojenitesinin kısmen de olsa belirleyici olduğu ileri sürülmektedir (178).

Bu tartışmalardan ayrı olarak son yıllarda NIDDM'in oluşmasında dördüncü bir görüş olarak primer defektin hiperinsülinemi olduğu ve insülin direncinin hiperinsülinemiye bağlı olarak oluştuğu hipotezi ortaya atılmıştır. Bu hipoteze göre merkezi sinir sisteminde ventromedial hipotalamus, median eminence ve henüz tanımlanmayan bazı alanlardaki değişiklikler gıda alımını artırarak ve 21 sempatik sinir sistem aktivitesinin düzenlenmesinde rol alan neuropeptid Y ve/veya diğer nöroregulator peptidlerin üretimini artırarak vagus sinirini uyarmakta ve bu da insülin salgısını uyarmaktadır. Ayrıca normal sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda kronik fizyolojik öglisemik hiperinsülineminin insülin direncine neden olduğu gösterilmiştir. Hiperinsülineminin nonoksidatif glukoz kullanımını veya glikojen sentezini bozarak tıpkı NIDDM'de olduğu gibi insülin direncine yol açabileceği ileri sürülmektedir (178).

Fakat tüm bunlara karşın NIDDM'in oluşmasında en önemli iki patogenetik faktör insülin eksikliği ve insülin direncidir (178).

Pankreatik Beta Hücresi Fonksiyon Bozukluğu

Normal glukoz toleransından bozulmuş glukoz toleransına ve hafif NIDDM'e geçildiğinde hiperinsülinemi oluşur. Açlık glukoz düzeyi 80 mg/dl'den 140 mg/dl'e yükseldiğinde insülin düzeyi normal sağlıklı bireylere göre 2-2,5 kat artar. Açlık glukoz düzeyi 140 mg/dl'i geçtiğinde ise beta hücreleri insülin salgılanması daha fazla artamaz ve açlık hiperglisemisi arttıkça insülin salgılanması da kademeli olarak azalmaya başlar. İnsülin salgısının azalmaya başladığı bu sırada hepatic glukoz üretimi artmaya başlayarak açlık glisemisinin yükselmesine büyük katkıda bulunur. 250-300 mg/dl arasındaki açlık glisemi düzeyinde ise insülin salgılanması ciddi olarak azalır. İnsülin salgısındaki bu değişime Starling eğrisi adı verilmektedir (178).

İnsülin direnci ile birlikte olsun veya olmasın eğer mutlak bir insülin eksikliği varsa NIDDM kaçınılmazdır.

İnsülin salgılanmasında bozukluğa yol açan etyolojik faktörler aşağıda sıralanmıştır (178):

- ✓ İnsülin salgısında kantitatif bozukluklar
- ✓ İnsülin salgısında kalitatif bozukluklar
- ✓ Pulsatil insülin salgılanmasının bozulması
- ✓ Proinsülin salgılanmasında anomaliler
- ✓ Glukoz toksisitesi
- ✓ Amilin (Adacık amiloid polipeptid)
- ✓ İnkretinler (Glucagon likepeptid-1, GIP, Galanin)
- ✓ Lipotoksiste
- ✓ İnsülin salgılanma bozukluğunda genetik nedenler

2.2 Diyabetik Modellerde Streptozotosin (STZ)

Streptozotosin (STZ) anti-neoplastik bir ajandır. STZ glukozamin-nitrozüre bileşenidir ve toprakta yaşayan, gram pozitif bir bakteri olan "*Streptomyces achromogenes*" den elde edilen pankreatik β hücresi karsinomalarının tedavisinde kullanılan kemoteropatik bir ajandır (117).

Anti-tumor ajan sınıfında yer alır ve kanser kemoterapisinde kullanılan diğer nitrozürelere ile benzerdir. STZ'nin Streptozosin, Izostazin ve Zanosar gibi eşdeğerleri bulunmaktadır ve steril toz halinde hazırlanmaktadır. 1 gram streptozotosinin içeriğinde aktif bileşen olarak kimyasal adı 2-Deoksi-2-[[[metilnitrozoamino)-karbonil] amino]-D-glukopiranoz olan madde ve 200 gr sitrik asit bulunur. STZ kuru toz halde, soluk sarı ve steril halde temin edilir. Saf STZ alkaline pH'a sahiptir. Sitrik asitin varlığı sebebiyle distile su içerisinde çözüldüğünde pH 3.5 -4.5 arasında değişir. Işıktan uzak - 20°C'de saklanmalıdır (2).

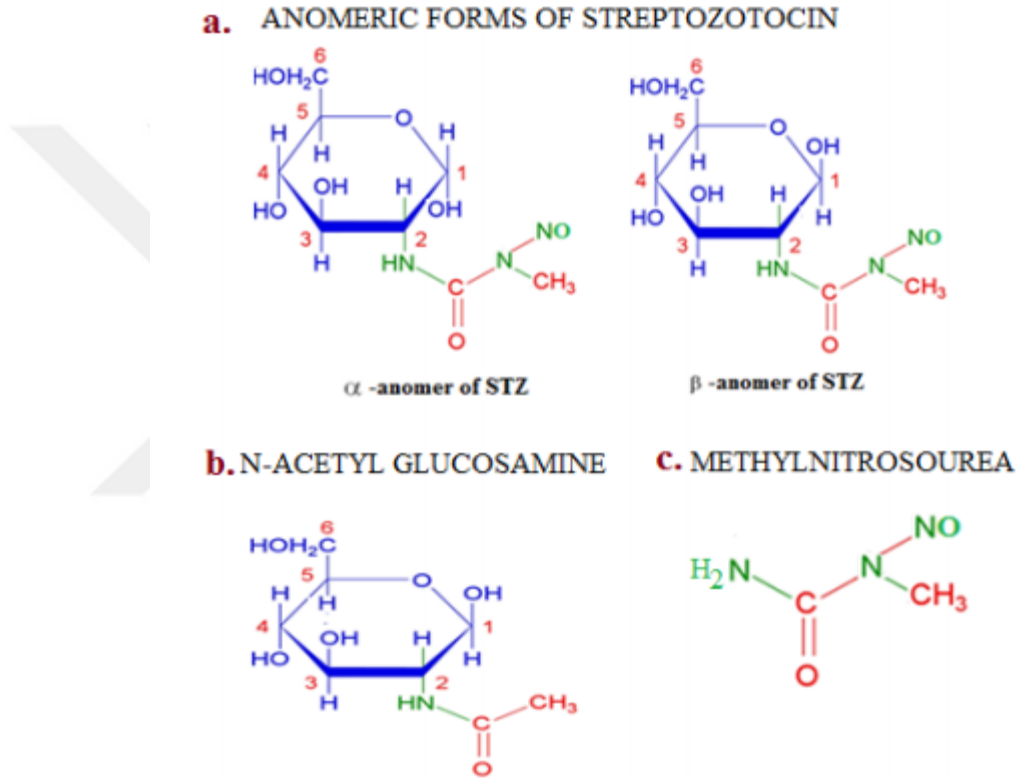
Streptozotosin kalıcı diyabet indükleyen bir ajandır. Geniş spektrumlu antibakteriyal özelliğe sahiptir. Streptozotosin alışılmadık şekilde aminoglikozid içeren nitrozamin grubu bir bileşendir. 1959'da antibiyotik olarak tanımlanmıştır ve şimdilerde piyasada yaygın şekilde kullanılmaktadır. Nitrozamin grubuna sahip olması sebebiyle bu molekül nitrik oksit (NO) donorü gibi davranabilmektedir. NO vücudumuzdaki birçok patolojik ve fizyolojik süreçte önemli bir haberci molekül olarak rol oynamaktadır. STZ genellikle kemirgen modellerde β hücrelerindeki O-GlcNAc'ı inhibe ederek etki eder (128, 203).

STZ β hücrelerine karşı sitotoksik, onkolitik ve onkogenik etkileri sebebiyle 4 önemli biyolojik özelliğe sahiptir (164, 204). Bu madde antineoplastik antibiyotiktir ve malign insulinomalar gibi pankreatik ada hücreleri tümörlerinin tedavisinde kullanılır (128,154). STZ son zamanlarda daha sık olarak β hücrelerine karşı sitotoksik olması özelliği ile diyabetik araştırma modellerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Düşük afiniteli glukoz taşıyıcısı 2 (GLUT2) STZ'yi pankreatik β hücrelerine alarak DNA alkilasyonuna sebep olur ve β hücrelerinin geri dönüşsüz bir şekilde nekroza uğramasına sebep olur (174). STZ'nin etkisiyle memeli ve bakteri hücrelerinde DNA sentezi inhibe edilir (25). Ayrıca in vivo modellerde pankreatik β hücrelerinde Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD) depleksiyonuna sebep olarak da diyabeti indüklediği gösterilmiştir (190).

2.2.1 Streptozotosinin Yapısal Özellikleri

STZ'nin kimyasal formülü 2-deoksi-2-[3-metil-3-nitrozoure] 1-D-glukopiranoz olarak bilinir. α ve β olmak üzere iki anomerik formda bulunur. Bu iki anomerik

form kromatografik yöntemlerle (HPLC, High Pressure Liquid Chromotography) birbirinden ayırt edilir (64). STZ'nin molekül ağırlığı 265 g/mol, molekül formülü ise $C_8H_{15}N_3O_7$ 'dir. STZ'nin moleküler yapısı 2-deoksi-D-glukoza benzer. Bu maddedeki C_2 bölgesi yerine N-metil-N-nitrozoüre grubunun gelmesi ile STZ oluşur. N-metil-N-nitrozoüre grubu STZ'ye sitotoksik özellik kazandırır. STZ bir ucuna metil grubu bağlanmış diğer ucuna ise glukoz molekülü bağlanmış bir glukozamin nitrozoüre bileşenidir (57, 64) (Şekil 2).



Şekil 2: STZ'nin Kimyasal Yapısı. a) STZ'nin α ve β Anomerik Formları b) STZ'nin Yapısal Analogu- N-asetil Glukozamin c) STZ'nin Sitotoksik Kısmı N-metil-N- Nitrozoüre

2.2.2 STZ'nin Çözünürlüğü ve Stabilitesi

STZ; su, keton ve düşük alkol çözeltilerinde yüksek çözünürlüğe, polar organik çözümlerde ise düşük çözünürlüğe sahiptir (85). STZ'nin sıvı solusyonları çok hızlı bir şekilde α ve β anomerik formlarının denge halindeki bir karışımına dönüşür. STZ'nin maksimum stabilizasyonu pH:4-4.5'da sağlanır. Daha düşük ya da daha

yüksek pH'lar stabiliteyi azaltır. STZ kısa süreli stoklamalar için +4°C, uzun süreli stoklar için (en fazla 2 yıl) -20°C'de saklanmalıdır (85).

STZ sitrat ya da asetat solusyonu içerisinde çözülmelidir ve solusyon hazırlandıktan hemen sonra 15-20 dk'yı geçirmeyecek şekilde hızlıca uygulanmalıdır (85). Solusyon karasız olduğundan uygulamadan hemen önce hazırlanmalıdır.

STZ'nin β hücrelerine toksik etkisi doza bağlı olarak uygulamadan sonraki 72 saat içinde ortaya çıkmaya başlar (102).

2.2.3 STZ'nin Uygulama Şekli ve Dozajı

Kemirgen modelleri diyabetteki immunolojik süreçleri ve metabolizma fonksiyonlarını çalışmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Diyabet streptozotosinin çeşitli doz ve uygulama modelleri ile indüklenebilmektedir. STZ daha sıklıkla intraperitoneal ve intravenöz uygulanmasına rağmen birçok çalışmada intramuskuler, intrakardiyak ve subkutan olarak da verilmektedir (131). İntraperitoneal uygulamalar kolay ve hızlıdır özellikle birden fazla yapılacak doz uygulamaları için daha kullanışlıdır. Buna rağmen intraperitoneal enjeksiyon sırasında bağırsağa veya subdermal alana girme olasılığı yüksek olduğundan hem ölüm riskini artırır hem de maddenin diyabetojenik etkisinin azalmasına sebep olur. Diğer birçok çalışmaya göre de intravenöz STZ uygulaması hem STZ'nin daha kararlı kalmasını hem de diyabetin sürekli olmasını sağlar denilmektedir (131).

STZ doza bağlı olarak diyabeti iki yolla tetikleyebilir. Yüksek dozlarda genellikle tek doz halinde uygulanır. Yüksek doz uygulamalarında STZ'nin sitotoksik nitrozüre bileşeni olmasından dolayı ve yüksek alkalan ajan özelliğiyle pankreatik β hücrelerini hedefler (60). Düşük dozlarda ise genellikle çoklu uygulamalar yapılır. Çoklu düşük doz uygulamalarında STZ immun ve inflamatuvar reaksiyonlar meydana getirir. Bu immun reaksiyonlar glutamik asit dekarboksilaz otoantijenlerinin salınımı ile alakalıdır. Bu koşullar altında pankreatik β hücrelerinin yıkımı ve hiperglisemik durumun sağlanması pankreas adacıklarına lenfosit gibi inflamatuvar hücrelerin sızması ile ilişkilidir (156).

Tek doz halinde 40 mg/kg'ın altındaki dozlar etkisiz kalırken 60 mg/kg'ın üzerindeki dozlar ise mortaliteyi artırmaktadır (105). Çalışmamızda bu nedenle 45 mgkg⁻¹ STZ'nin intraperitoneal yoldan uygulanması planlanmıştır.

2.2.4 STZ'nin İn Vivo Toksisitesi

STZ hidrofiliktir ve bu nedenle kan beyin bariyerinden geçemez. Ancak STZ'nin metabolitleri serebrospinal sıvıda bulunur (128). Hücre kültüründe STZ'nin yarı ömrünün yaklaşık 19 dk olduğu gösterilmiştir (100). STZ'nin yıkım ürünlerinin sıçanlarda diyabetojenik olmadığı gösterilmiştir (114). Çalışmalara göre enjekte edilen STZ'nin %77'si yıkılır ve 6 saat içerisinde uzaklaştırılır. Bu miktarın %30'u ilk bir saat içerisinde elimine edilir. Metabolitlerin büyük bir kısmı (%74) idrar ile atılır. Kalan %3'ü ise feçesle uzaklaştırılır. Geri kalan materyalin çoğu karaciğer ve böbrekte birikir. STZ karaciğerde segmentlere parçalanır ve plazmada degrade olur. Kesim ve yıkım ürünleri diyabete sebep olmazken biyolojik olarak aktifler ve hücre membranlarından geçebilirler (114). STZ'nin çok iyi bilinen yan etkileri ise hepatotoksisite ve nefrotoksisitedir (157, 171, 189).

2.2.5 STZ Duyarlılığında Cinsiyet Farklılığı

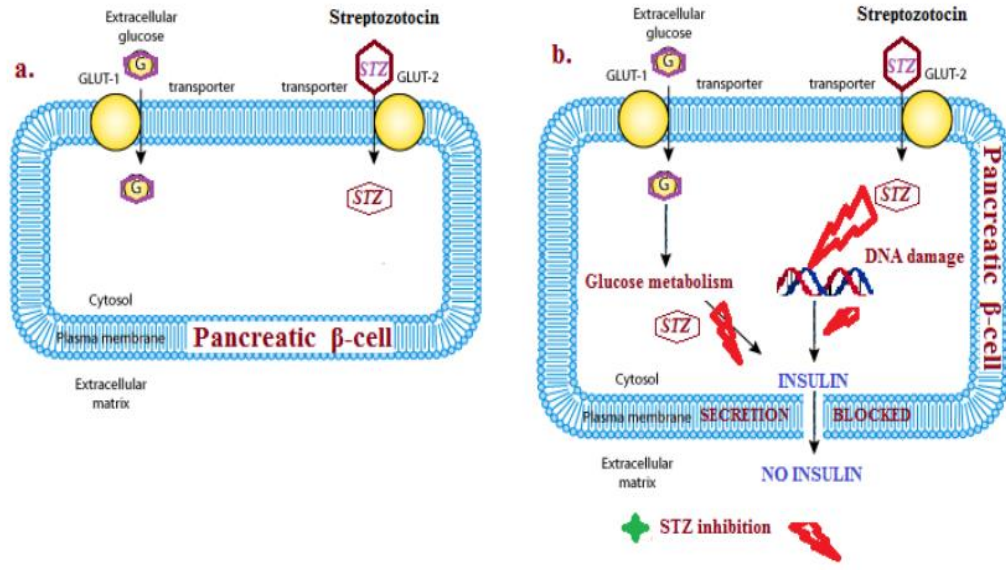
Kemirgenler STZ duyarlılığı açısından cinsiyet farklılıkları gösterir. Bu farklılık aynı dozu alan erkeklerde şiddetli hiperglisemi yaparken, dişilerde az bir yanıt ya da hiç yanıt olmamasına sebep olabilir. Dişi ve erkek sıçanlarda yapılan bir çalışmada Leiter et al. (116), STZ uygulamasından 25 gün sonra ortalama kan glukoz değerlerinin erkeklerde hem 200 mg/dL'den yüksek hem de dişilerdekine göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Dişi sıçanlardaki STZ'ye karşı duyarlılıktaki azalma östradiol'ün pankreatik β hücrelerini oksidatif stres kaynaklı apoptozdan koruyabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda erkek sıçanların seçilmesi uygun görülmüştür (113).

2.2.6 STZ'nin Diyabetojenik Etkisi

2.2.6.1 STZ'nin β Hücrelerinin Membranından Seçici Taşınımı

STZ insulin üreten pankreatik β hücrelerini yıkarak hipoinsulinemi ve hiperglisemiye sebep olur (117). STZ yapısal olarak glukozu çok benzerdir. Glukoz analoğu olarak da bilinen STZ yapısal benzerliği sayesinde bir glukoz taşıyıcısı olan GLUT2'ye bağlanabilir ve spesifik olarak pankreatik β hücrelerine girerek orada birikir. STZ'nin GLUT2 taşıyıcıları ile hücre içerisine alınması glukoz ile kompetitifdir.

Lipofilik özellikteki nitrozüre grubunun diğer üyelerinin aksine STZ hidrofildir çünkü glukoz substitüsyon eki taşır. STZ'nin hidrofilik doğası hücre membranlarının çift katlı fosfolipid tabakasından difüzyon yeteneğini kısıtlar (64). Ancak STZ'deki bu deoksi-glukoz eki sayesinde glukozla yapısal bir analogi gösterir ve GLUT-2 glukoz taşıyıcısına selektif olarak bağlanarak içeri alınır. Hepatositler ve renal tübül hücreler de pankreas gibi GLUT-2 ekspres ettiklerinden STZ bu organlar içerisinde de birikerek hasar meydana getirir (51). STZ diyabetojeniktir çünkü insulin salgılayan β hücrelerini seçici olarak nekroza uğratar ve yıkar. Böylece insulin salınımı engeller. Pankreas adacıklarındaki endokrin β hücreleri dışındaki α ve δ hücreleri ile parankimdeki ekstra pankreatik hücreler STZ'den etkilenmeden kalırlar (64, 217). STZ'nin yüksek miktardaki uygulamaları sonrası böbrek, karaciğer, bağırsak ve pankreastan plazmaya geçen konsantrasyonu artarsa kardiyak ve adipoz doku hasarına sebep olur, oksidatif stresi, inflamasyonu ve endotelial disfonksiyonu artırır (199) (Şekil 3).



Şekil 3: STZ'nin Pankreatik β Hücrelerine Seçici Taşınımı a) STZ'nin ve Glukozun Seçici Taşıyıcılar ile Hücre İçine Alınmasını Gösteren Model b) STZ'nin Pankreatik β Hücrelerinde Glukoz Alımını ve İnsülin Salımını İnhibe Etmesi (85)

2.2.7 STZ Toksisitesinin Etki Mekanizması

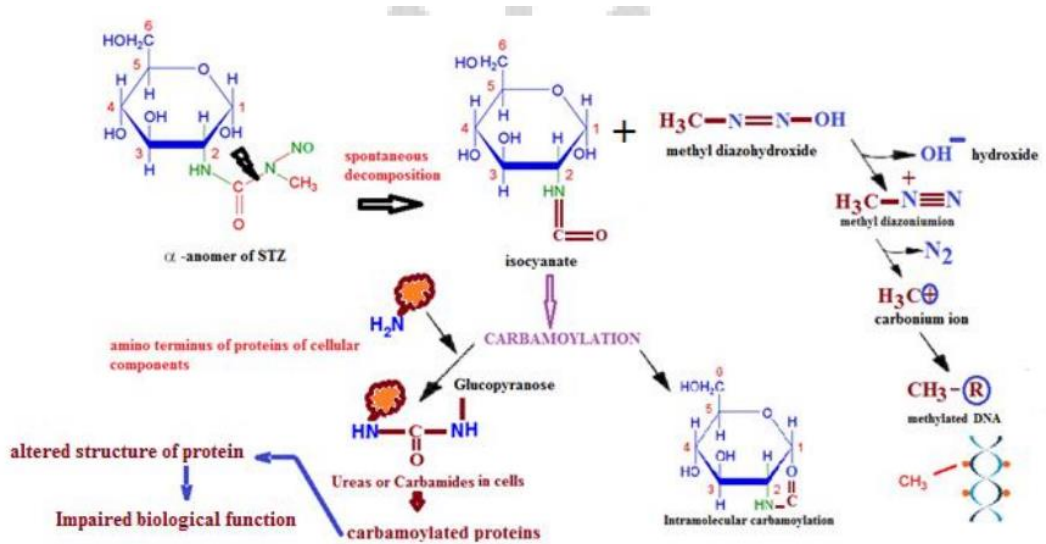
1. Hücrel bileşenlerin karbamolasyonu ve alkilasyonu
2. Nitrik Oksit (NO) salınımı
3. Serbest radikal üretimi ve oksidatif stres
4. O-GlcNAcaz inhibisyonu

2.2.7.1 Hücrel Bileşenlerin Karbamolasyonu ve Alkilasyonu

STZ hücre içersine girdiğinde izosiyanat molekülü ve metildiazohidroksid molekülü oluşturacak şekilde bozular (207, 210). İzosiyanat intramoleküler karbamolasyon geçirir ve proteinler gibi diğer hücrel bileşenleri karbamile eder. Metildiazohidroksid ise yüksek reaktif karbominium iyonu (CH_3^+) oluşturur. Karbominium iyonu DNA zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturarak STZ aracılı DNA alkilasyonunda en önemli rolü oynar.

Karbominium iyonları çok reaktiftir ve DNA nükleofilik merkezindeki nitrojen ve oksijen moleküllerinin eşlenmemiş elektron çiftleri ile reaksiyona girerler (63). Yapısal çalışmalara göre karbaminium kaynaklı DNA alkilasyonunun en baskın bölgesi guaninin O⁶ pozisyonundadır (64, 210). O⁶ noktasından metilasyon hidrojen bağıyla karıştırılır ve guaninin timinle yanlış bağ kurmasına sebep olur. Böylece nokta mutasyonu meydana gelir. Bazların dışında STZ aracılı DNA alkilasyonu fosfotriester oluşumu sebebiyle fosfat iskeleti hedef alarak DNA'da konformasyonel değişikliklere sebep olur. STZ aynı zamanda DNA'nın nitrojen halkası ve bazların ekzosiklik oksijen atomlarına da saldırarak 7-metilguanin ve 3-metiladenin oluşturur. Bu moleküller DNA'da kırıklara sebep olarak Poli-ADP-Riboz Polimeraz (PARP)'ı aktive eder ve böylelikle Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD⁺)'ın deplesyonuna sebep olur (161). Aktifleşen PARP ADP-riboz grubunun diğer nuklear proteinlere kovalan bir şekilde bağlanmasına ve NAD⁺ deplesyonuna sebep olur (Şekil 4).

STZ'nin hayvanlardaki diyabetojenik etkisi pankreatik hücrelerde NAD⁺'ın azalması aracılığıyla meydana gelmektedir. STZ aracılı alkilasyon sonucu oluşan DNA hasarı eksizyon tamir mekanizması ile tamir edilmeye çalışılır. Bu mekanizma ise NAD- bağımlı bir enzim olan PARP'a ihtiyaç duyar. STZ uygulaması ile oluşan DNA hasarı sonucu sürekli uyarılan DNA tamir mekanizması hücrelerdeki NAD⁺ ve ATP depolarını tüketir. Böylelikle beta hücrelerinin ölümü kaçınılmaz olur (161).



Şekil 4: STZ Aracılı DNA Karbamolasyonu ve Alkilasyonu (85)

2.2.7.2 Nitrik Oksit (NO) Salınımı

Diğer nitrozürelere gibi STZ’de NO donörüdür. STZ enjeksiyonundan 2 saat sonra sıçan pankreatik β hücrelerinden NO salınımı gözlenmiştir (205). NO oluşumunun Nitrik Oksit Sintaz (NOS)’a bağlı olmadığını göstermek için ise NOS inhibitörleri kullanılmış ancak bu inhibitörler STZ varlığında NO üretimini bloke edememiştir (110). Pankreatik β hücrelerinde radikal süpürücü enzimler az miktarda bulunduğundan bu durum onları serbest radikallere karşı daha duyarlı yapmaktadır. STZ metabolizması süresince NO radikalleri üretilir ve bu radikaller hücre içindeki molekülleri hedefleyerek hücreyi disfonksiyona ve ölüme götürür. NO radikalleri mitokondriyal aconitaz enzimini inaktive ederek substrat oksidasyonunu ve ATP üretimini bozar (72).

İyonik kanallar ve mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki kompleks 1 ve 2 NO’nun diğer hedefleridir. NO aynı zamanda iki farklı yolla DNA hasarına da yol açar. Bunlardan birincisi nükleik asitlerin nitrasyonu ve pürin ve pirimidinlerin deaminasyonu sonucu oluşan DNA hasarı ikincisi ise süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek oluşturduğu peroksinitritler aracılığıyla meydana getirdiği DNA hasarıdır (183). NO aynı zamanda DNA tamir ve replikasyon enzimlerini inaktive etmektedir. Bu nedenle NO ile indüklenen β hücre hasarı apoptozis ve nekrozis ile sonuçlanmaktadır (72).

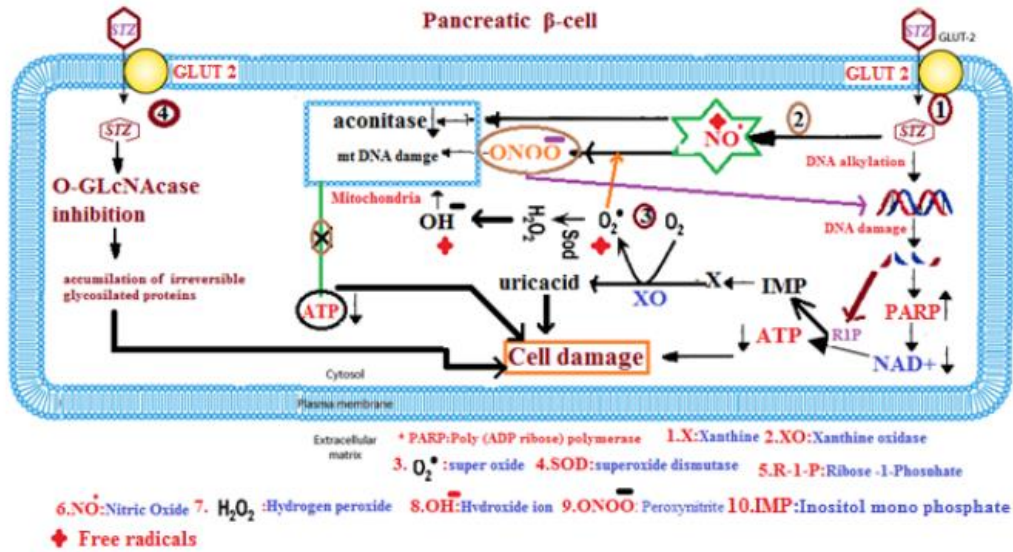
2.2.7.3 Serbest Radikal Üretimi ve Oksidatif Stres

Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçan modelinin erken safhalarında reaktif oksijen ve nitrojen türevleri (ROS ve RNS) kaynaklı oksidatif stres meydana gelmektedir (145). Birçok çalışmaya göre STZ tabanlı diyabette oksidatif stres kaynaklı doku hasarına hiperglisemi sebep olmaktadır (146). STZ ile indüklenen diyabetik modellerde oksidatif stres glukozun otooksidasyonuna, protein glikasyonuna, glikasyon son ürünlerininin (advanced glycation end product, AGE) oluşumuna ve serbest radikal üretimine sebep olan poliol yolağı aracılığıyla meydana gelir (9).

STZ ile indüklenen diyabet modelinde sıçanlarda plazma glukoz, total lipid, trigliserit, kolesterol, lipid peroksit, nitrik oksit, ürik asit miktarı artarken antioksidan seruloplazmin, total albumin ve tiyol miktarı azalmaktadır. Pankreas, karaciğer ve böbrek lizatlarında lipid peoksidasyon miktarı artarken, katalaz, glutatyon peroksidaz (GSSP) ve süperoksit dismutaz (SOD) miktarı azalmaktadır (7).

2.2.7.4. O-GlcNAcaz inhibisyonu

STZ O-GlcNAcaz (OGA)'ı inhibe ederek spesifik olarak adacık hücrelerini öldürür. OGA, β hücrelerinde kaliteli ve doğru protein üretiminin kontrolünde rol alan Beta-O- bağı N-asetil glukozamin (O-GlcNAc) molekülünü yıkan bir glikozid hidrolazdır. OGA'nın STZ ile inhibisyonu hiper-O-GlcNAçilasyonuna sebep olur. Bu da zararlı proteinlerin birikimine sebep olarak stres yolağının tetiklenmesiyle ve apoptozisle sonuçlanır (109).

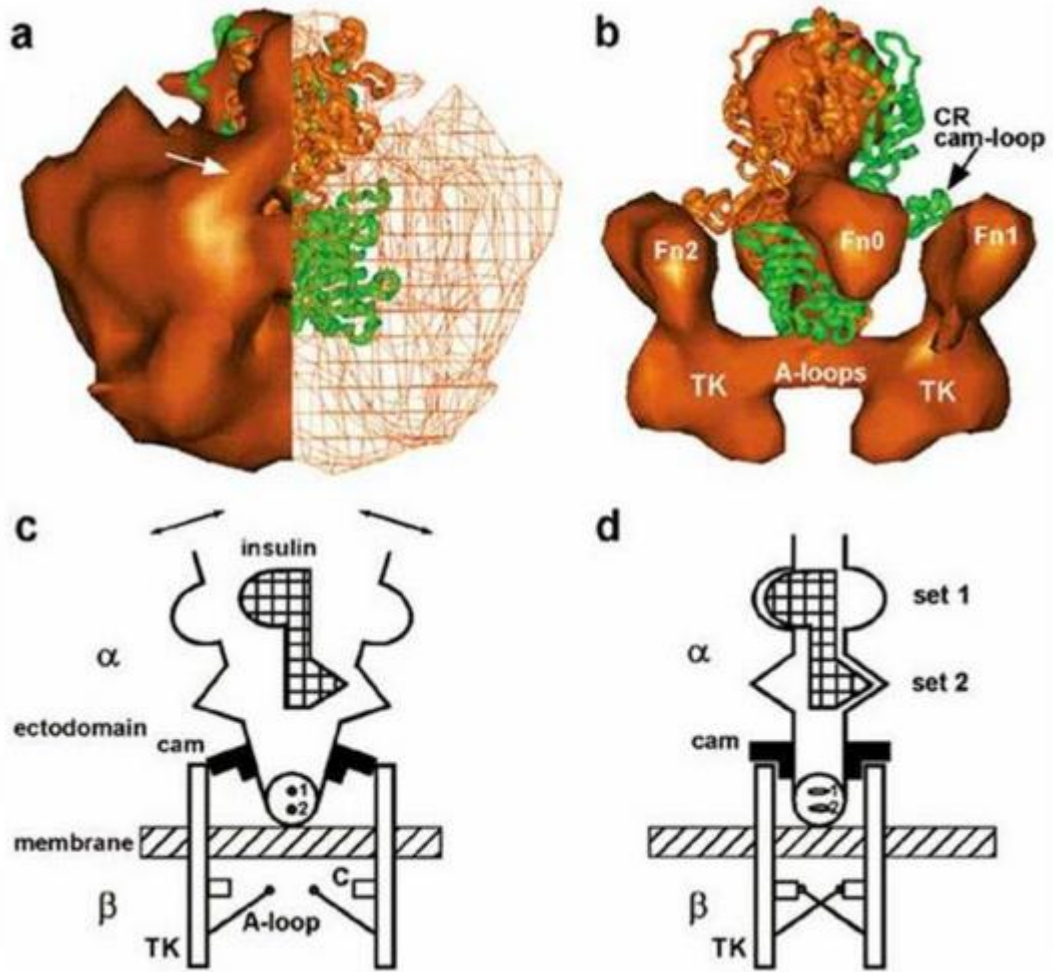


Şekil 5: STZ Toksisitesinin Mekanizması (85)

2.3. İnsulinin Hücresel Sinyal Transdüksiyon Yolağının Aracıları

İnsulin reseptörü 2 ekstraselüler α alt ünitesi ve 2 transmembran β alt ünitesine sahip heterotetramerik bir proteindir. İnsulinin, insulin reseptörünün (IR) α alt ünitesine bağlanması reseptörün β alt ünitesindeki tirozin kinaz aktivitesini uyarır

(Şekil 6). Reseptörün otofosforilasyon ve hücre içi substratlarını fosforile etme yeteneği insulinin hücre içi yollardaki rolü için hayati önem taşımaktadır (104). Yapısal biyoloji çalışmaları 2 α alt ünitesinin insulinin bağlanmasında rol oynadığını, 2 β alt ünitesindeki kinaz domainlerinin ise birbirine çok yakın bir pozisyonda bulunarak tirozin kalıntılarının otofosforilasyonuna izin verdiği görülmektedir. Tirozin kalıntılarının otofosforilasyonu reseptör aktivasyonunun ilk basamağıdır (122). Kinaz domaini otofosforilasyon sonrası konformasyonel değişikliğe uğrayarak kinaz aktivasyonunun temelini oluşturur ve diğer sinyal moleküllerine bağlanır (96).

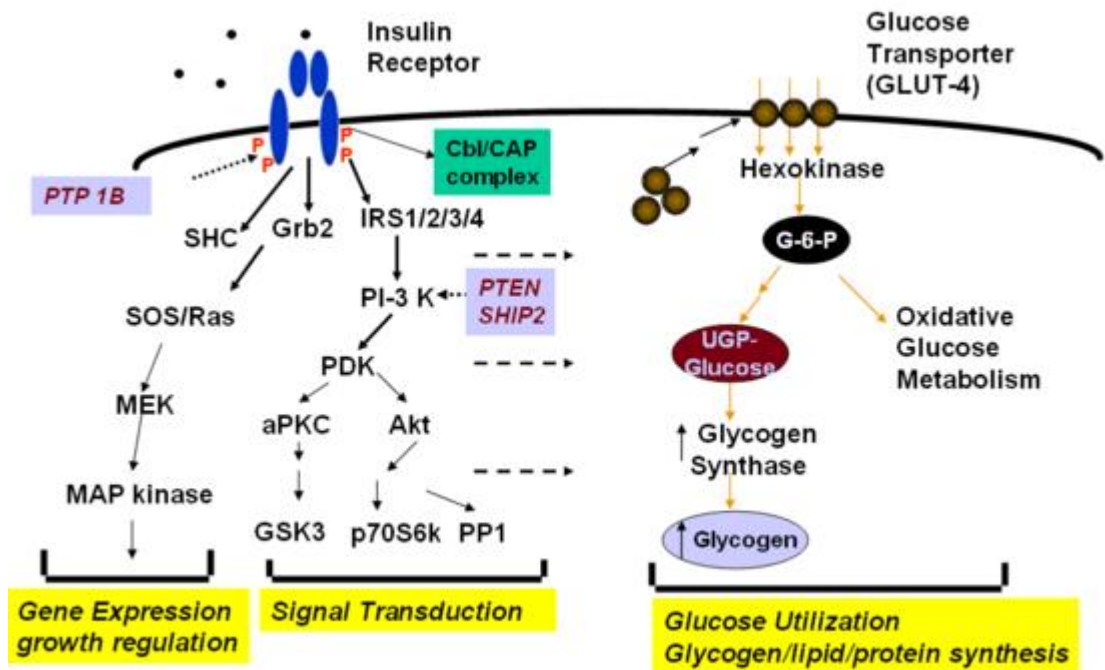


Şekil 6: İnsulin /İnsulin Reseptör Kompleksi a) IR Dimeri ve Yüzey Özellikleri b) 3D Rekonstruksiyon ile CR Domainindeki Cam-Benzeri Bölgenin Okla Gösterilmesi ve İnsulin Reseptör Aktivasyonundaki Yapısal Değişikliğin Gösterilmesi c) İnhibitör Safha d) İnsulinin Bağlı Olduğu Safha (155)

İnsulin reseptörünün iki izoformu bulunur. Bu izoformlar proreseptör transkriptinin 11. ekzonunun alternatif splicingi ile oluşur (134, 177) . A tipi IR' de ekzon 11 yoktur, B tipi IR'de ise ekzon 11 vardır. Bu iki izoform birbirinden α zincirinin C terminalindeki 12 aminoasit ile ayrılır (61,198). İki izoform birbirinden insulin bağlama afinitesi açısından farklılık gösterir.

2.3.1. IRS Proteinleri

İnsulinin insulin reseptörünün α alt ünitesine bağlanması insulinin sadece etki bölgesinde yoğunlaşmasını sağlamaz aynı zamanda reseptörde konformasyonel değişikliğe sebep olur. Böylelikle tirozin kinaz aktivitesi ortaya çıkar ve sinyal kaskadı başlatılır. İnsulin reseptörü bir çok aracı erken molekülü fosforile eder. Bu moleküllerden en bilindik olanlar; IRS1-4, Shc, Gab1, Cbl, APS ve p60dok vb.dir. Bu moleküllerin her biri Src Homoloji 2 (SH2) domaini taşıyan diğer sinyal moleküllerinin iskele yapmasını yani reseptöre yanaşmasını sağlarlar (209). Bu olaylar arasında PI3K'in aktivasyonu en çok bilinenlerden biridir (Şekil 7).



Şekil 7: İnsulin Sinyal Transdüksiyon yolağı (31)

Bugüne kadar 4 farklı IRS (İnsulin Reseptör Substratı) proteini tanımlanmıştır. Bu IRS'ler birbirlerine yüksek homoloji gösterirler ve farklı dokularda dağılırlar (212).

2.4. Diyabetik Sıçanlarda İnsulin Sinyal Yolağında Meydana Gelen Bozukluklar

STZ'nin insulin üreten pankreatik β hücrelerini yıkarak hipoinsulinemi ve hiperglisemiye sebep olduğuna (117) değinmiştik. Periferik olarak meydana gelen hipoinsulinemi tüm organ ve dokuların ihtiyacı olan insulin miktarını karşılamakta yetersiz kalmaktadır. İnsulin, glukoz kullanımını ve glikojen depolanmasını sağladığı gibi trofik bir faktör rolü üstlenerek hücrede hayati sinyal yollarının başlatılmasını sağlayan da bir faktördür (31). Tüm bunların ışığında diyabetik bireylerde ve sıçanlarda bozulan insulin sekresyonlarının insulin aracılı sinyal transdüksiyon yollarını da sekteye uğratacağını düşünmekteyiz.

İnsulin glukoz metabolizmasının sürdürülmesinde, karbohidrat, lipit ve protein metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (166). İnsulin spesifik reseptörlerine bağlanarak farklı biyolojik etkiler meydana getirir (84, 208). İnsulin reseptör geni hedeflenerek bozulan reseptörsüz fareler doğumdan 1 hafta sonra şiddetli diyabet ve ketoasidoz sebebiyle öldüğü gözlenmiştir (1).

İnsuline karşı hücreyel yanıtın azalması ya da insulin sinyalizasyonundaki bozukluklar birçok patolojik durumla ilişkilidir. İnsulin reseptör genindeki mutasyonlar reseptörün sentezinde, yıkımında ve fonksiyonunda değişikliklere sebep olarak insulin direncine yol açar (192). Yapılan çalışmalara göre insulin reseptör sayısındaki azalma tip 2 diyabet kaynaklı dokulardaki hiperinsulinemiye yanıt olarak reseptör downregülasyonu olarak yorumlanmaktadır (153). Tip 2 diyabetli hastalarda insulinle uyarılan reseptör kinaz aktivitesinde, insulin reseptör substratının (IRS) ve Fosfoinositide 3 kinaz (PI3K) fosforilasyonunda daha da ciddi azalmalar görülmüştür (36).

2.5. Diyabet Sonucu İnsulin Sinyalizasyon Yolaklarında Meydana Gelen Bozuklukların Beynin Nöronal Sağ Kalım ve Apoptozis Süreci Üzerine Etkisi

2.5.1. Nöronlarda İnsulin Bağımlı Fosfoinositid 3-Kinaz (PI3K)/Akt Sinyalizasyon Yolakları ve Nöronal Sağ Kalım

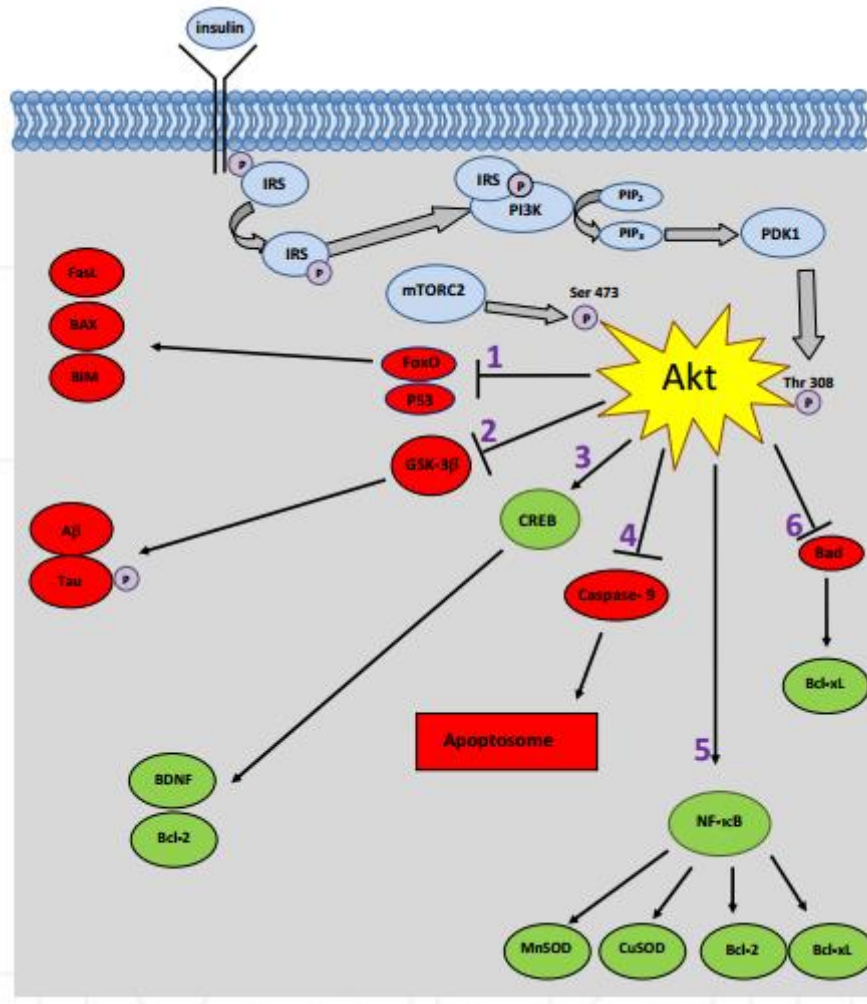
Diyabetes mellitus kronik hiperglisemi ile karakterize kompleks metabolik bir hastalıktır. Beynin glukoz metabolizması ve glukozdan faydalanabilmesi ise normal nöronal fonksiyonların gerçekleşmesi için son derece önemlidir. Ayrıca diyabet nöronal hücrelerde insülin sinyalizasyonunun bozulmasına yol açarak birçok sinyal yolağını etkilemektedir. İnsülin, nöronlarda insülin reseptörü (IR) /insülin reseptör substratı (IRS) üzerinden primer olarak mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) ve fosfoinositid 3 -kinaz (PI3K)/Akt sinyalizasyon yolaklarını (35) etkilemektedir. İnsülinin birçok metabolik ve antiapoptotik etkisi IRS proteinlerinin fosforilasyonunu gerektiren sinyalizasyon yolakları ile ortaya çıkmaktadır. İnsülin reseptörüne ait tirozin kinaz aktivitesi IRS proteinlerini fosforiller ve IRS proteinleri üzerindeki bu fosfotirozin yapıları PI3K için iyi birer hedef haline gelirler. Aktifleşen PI3K, 3'fosfoinositidler üretir. 3'fosfoinositidler, Fosfoinositid Bağımlı Kinaz 1 (PDK1)'i aktifleştirirler. PDK'ların en iyi bilinen substratlarından biri Protein Kinaz B (PKB veya Akt)'dir. PKB'nin hedefleri arasında nöronal sağ kalıma, farklılaşmaya, plastisiteye ve apoptozise aracılık eden birçok sinyal molekülleri bulunmaktadır. Bunlar arasında FOXO, GSK3- β , MAPK, mTOR yer almaktadır (43).

2.5.2. Nöronlarda İnsulin Sinyal Yolağına Bağlı Bcl-2, BİM-1 Proteinleri aracılı Apoptozis Süreci

Apoptozis dokuları şekillendiren ve çok hücreli organizmalarda homeostazisi sağlayan fizyolojik hücre ölümü sürecidir (99) . Apoptozis kaspazların aktivasyonu aracılığı ile meydana gelen programlı bir ölümdür. Apoptozis üst uyaranlara bağlı olarak intrinsek veya ekstrinsek yolaklar tarafından indüklenebilir. İntrinsik yolak mitokondri bağımlıdır ve BCL2 (B- cell lymphoma 2) protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Pro-apoptotik tetiklenmelere yanıt olarak BAX (Bcl-2 associated

X protein) ve BAK1 (Bcl-2 homologus antagonist/killer protein) kaspazları aktive ederek apoptozisi indükler. BH3-only proteinleri ise BCL2 proteinlerine bağlanarak onların yeteneklerini inhibe eder ve BAX ve BAK1'e bağlanarak onları aktive eder ve hücreyi ölüme götürür (123). Bir BH3-only proteini olan BIM (Bcl-2 like Protein 11), BCL2 proteinini inhibe ederken BAX ve BAK1'i ise aktive etmektedir. Sağlıklı hücrelerde BIM, dinein hafif zincir 1 proteini tarafından mikrotübüllere kelepçelenir ve inaktif şekilde kalır. Ölüm uyarılarına yanıt olarak BIM fosforillenir ve dinein hafif zincirinden ayrılarak apoptozisi indükler (123).

Apoptozis nöronlar için de merkezi sinir sisteminin gelişimi esnasında nörogenesis açısından önemli bir süreçtir. Ancak zamanından erken gelişen bir apoptozis veya apoptozisin düzenlenmesinde meydana gelen bozukluklar nörodejenerasyonun patogenezinin sorumludur. Çünkü patolojik koşullarda hücre ölümü nöron kayıplarına sebep olur (194). Nöronlardaki apoptozis programı da temel olarak Bcl-2 ailesi üyelerini ve kaspazları içermektedir (216). Proapoptotik olarak bilinen bu aile üyeleri hücre ölüm sinyallerine yanıt verirler. Bu ölüm sinyalleri DNA hasarı, oksidatif stres ya da çeşitli trofik faktörlerin eksikliği gibi sebepler olabilir. İnsulin eksikliğinin de hücre içi insülin sinyalizasyonunu bozarak sağ kalım yollarını baskılaması ve apoptozisi teşvik etmesi olasıdır (123). STZ ile oluşturulan Tip 1 diyabet modelindeki periferik insülin eksikliğinin de beyin bölgelerindeki insülin sinyalizasyonunu sekteye uğratacağını düşünmekteyiz.



Şekil 8: İnsulin Sinyalizasyon Kaskadı (11)

Yetişkin merkezi sinir sisteminde bulunan insülin pankreatik β hücrelerinden köken almaktadır ve beyne serebrospinal sıvı ile taşınmaktadır (87). Bu insülin kan beyin bariyerinden taşıyıcı aracılı, doyurmalı, düzenlenebilir, ısıya duyarlı aktif bir süreç ile geçer (67). Bu geçiş süreci endotelial hücreler arasındaki sıkı bağlantılar tarafından oluşturulan bir bariyer sistemi tarafından sınırlandırılır (176).

Bu nedenle periferel insülin seviyesindeki akut bir artışın serebrospinal sıvıdaki insülin artışına sebep olması şartırcı değildir (136). Beyinde insülin, insülin reseptörlerine (IR) hızlıca bağlanır (218). Ve insülinin emrinde olan yolları tetikler. Dolayısıyla diyabetik sıçanlarda STZ ile oluşturulan tip 1 diyabet modelinde meydana gelecek hipoinsulinemi nöronların insülin sinyal yollarını bozarak apoptozise sebep olabilir. Ancak insüline bağlı bu yollar arasında henüz

tam anlamıyla aydınlatılamamış diğer down stream moleküller bulunmaktadır. Örneğin Bcl-2 ve BİM-1 proteinleri ile ilişkili yollarda bulunan iki molekül'ün; kaspazları inhibe ettiği bilinen XIAP ve apoptozise sitokrom c gibi aracılık eden Smac/DIABLO; insulin sinyalizasyonundan ne derece etkilendiği henüz tüm yönleriyle aydınlatılamamıştır. Bu neden çalışmamızda XIAP ve Smac/DIABLO genlerinin ekspresyon düzeyleri ve insulin sinyal yolağının temel hatlarındaki PI3K/Akt molekülleri ile bunlara bağlı proteinler BİM1 ve Bcl-2 arasındaki etkileşim ortaya konulacaktır.

2.6. XIAP (X-Linked Inhibitor of Apoptosis) Geninin mRNA Ekspresyonunun Apoptosis ve Nörodejenerasyondaki Rolü

2.6.1. XIAP (X-Linked Inhibitor of Apoptosis)

IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) hücre ölümü regülatörleridir. Bu inhibitör proteinler kaspazlara bağlanarak ölüm reseptörleri ile başlatılan ya da intrinsek olarak başlayan hücre ölümü yolağını bloke eder. Tüm IAPs Baculovirüs-IAP- Repeat (BIR) domaini adı verilen 1 ile 3 arasında ortak yapı taşırlar. Bu domainler IAPs'in kaspazlara ve diğer proteinlere bağlanmasını sağlar. XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) ise apoptoz inhibitörleri arasında hem en güçlü hem de en iyi tanımlanmış anti-apoptotoik IAPs ailesi üyesidir. XIAP BIR3 domaini ile Kaspaz-9'a; BIR2 domaini ile Kaspaz-3 ve -7'ye bağlanır. XIAP'nin doğal inhibitörü Smac/DIABLO'dur. Smac/DIABLO apoptoza giden hücrelerde mitokondriden salınarak XIAP'nin BIR domainlerine bağlı kaspazları açığa çıkarır ve hücre ölümünü tetikler (151).

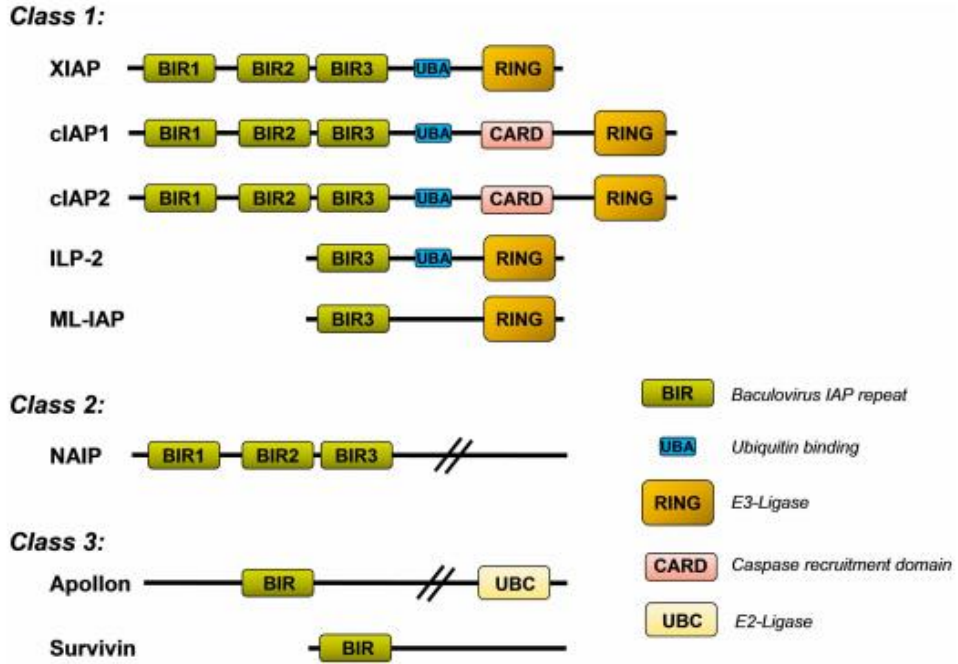
2.6.2. IAP'lerin Yapı ve Fonksiyonları

Memeli IAP ailesi apoptoz inhibitörleri olarak adlandırılan ve bir çoğu kaspazlara bağlanarak onları nötralize eden sekiz farklı proteinden oluşmaktadır. Her biri Baculovirus-IAP-repeat (BIR) domani taşırlar. Nöronal IAP (NAIP/BIRC1), Hücrel IAP 1 (cIAP1/BIRC2), Hücrel IAP 2 (cIAP2/BIRC3), X-kromozomuna

bağlı IAP(XIAP/BIRC4), Survivin/BIRC5, BIR- Containing Ubiquitin-Conjugating Enzyme (BRUCE/Apollon/BIRC6), melanoma IAP (ML-IAP/BIRC7) ve son olarak da IAP like Protein 2 (ILP-2/BIRC8) olmak üzere 8 üyesi vardır. Bunlar arasından XIAP, cIAP1/2, ILP-2 ve ML-IAP IAP sınıf 1'e aittir çünkü her biri karakteristik bir C-terminal RING domainine sahiptirler. Bu domain E3-ubiquitin ligaz görevi yapar (151).

IAP'ler apoptoz dışında invazyon, migrasyon ve metastaz gibi tümörigenik oluşumlarda da önemli roller oynamaktadırlar. IAP ailesi içerisinde XIAP kaspazları direk olarak fiziksel etkileşimle inhibe eden tek üyedir (62). cIAP1 ve cIAP2 kaspaz-3 ve -7'ye bağlanırlar ancak tam anlamıyla fiziksel etkileşimle inhibe etmezler bu proteinler kaspazları proteozomal degradasyona uğramaları için işaretler (42).

XIAP proteinin N terminalinde 3 tane BIR domeni (BIR1-3) taşır. BIR1 domaini NFκB sinyalizasyonunu modüle eden proteinlerle etkileşirken BIR2-3 kaspazlarla etkileşimde önemlidir (120). BIR2 kaspaz-3 ve -7'ile etkileşirken BIR3 kaspaz-9 ile etkileşmektedir. XIAP'nin C terminal kısmı Ubiquitin bağlanması için UBA (Ubiquitin Associated) domaini ve E3-ubiquitin ligaz aktivitesi olan RING domaini taşır. E3-ubiquitin ligaz aktivitesi olan RING domaini XIAP tarafından ubiquitine edilen proteinlerin tanınmasında görev yapmaktadır. Bu RING domaini aynı zamanda XIAP'nin kendi stabilitesini kontrol etmesini sağladığı gibi buraya bağlanan kaspazların ve mitokondrial XIAP inhibitörü olan SMAC/DIABLO'nun proteozomal degradasyonunu da sağlar (124,188) (Şekil 9).

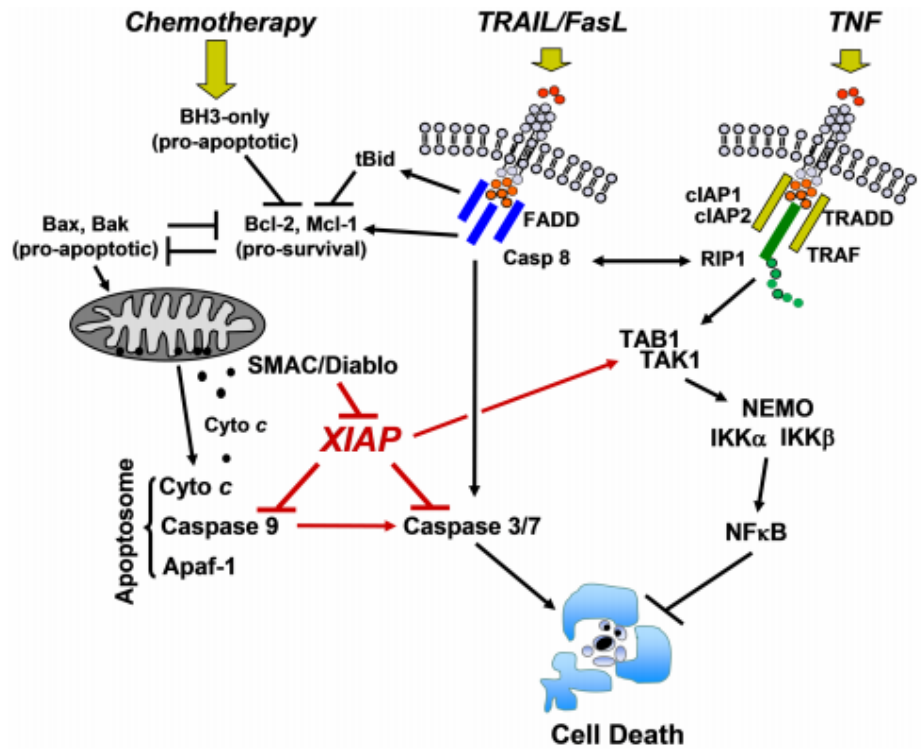


Şekil 9: IAP (Apoptoz İnhibitörleri) Ailesi ve Fonksiyonel Domainleri (151).

2.6.3. XIAP'nin Memeli Hücrelerindeki Hücre Ölümünün Düzenlenmesindeki Fonksiyonel Rolü

Apoptozis hem membrandaki spesifik hücre ölüm reseptörleri ile (ekstresek yolak) hemde mitokondrideki Bcl-2 ailesinin üyeleri ile hücre içinde kontrol edilen yolaklar (intrensek yolak) gibi çok sayıda sinyal ile başlatılabilen bir süreçtir (44). Her iki yolda hücre ölümünün tetikçileri olarak bilinen efektör kaspazlar gibi spesifik proteazlar üzerinde birleşir. Fas Ligandı (FasL) ve TRAIL, TNF ailesinin proapoptotik üyesidir. Bu moleküller; Fas/CD95 ve TRAIL-R1 (DR4) veya TRAIL-R2 (DR5) reseptörlerine bağlanarak ekstrensek ölüm yolağını başlatırlar. Reseptörüne bağlanan bu moleküller DISC ölüm tetikleyici kompleksi (Death Inducing Silencing Complex)'nin oluşumunu indükler. DISC adaptör molekül FADD ve pro-kaspaz-8 içerir. Sonuç olarak pro-kaspaz-8'in otokatalitik kesimi ve sonrasında sinyal kaskadındaki diğer kaspazların da aktifleşmesi gerçekleşir. Bazı hücrelerde kaspaz-8 pro-apoptotik BID'in ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi MCL 1_L'nin kesimini gerçekleştirerek mitokondri ile de etkileşime geçer. Böylelikle ekstrensek yolağı intrensek yolağa bağlamış olur (169).

Kompleks apoptoz sürecinde mitokondri olayların tam merkezinde yer alan ve intrinsek apoptotik sinyallerini bütünleştiren bir rol oynar. İntrensek yolak DNA hasarı, büyüme faktörü kıtlığı gibi sinyallerle tetiklenir. Ve mitokondri düzeyinde pro- ve anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri arasındaki denge ile regüle edilmektedir (BCL-2 reostatı). BCL-2 ailesi proteinleri primer olarak mitokondriyal dış membran permeabilitesini düzenleyerek apoptozisi kontrol eder (47,133). Pro-apoptotik BCL-2 proteinleri olan BAX ve BAD aktivasyonu ile mitokondriyal dış zarı porlar oluşturulur. Por oluşumu sonucunda Sitokrom c ve diğer Smac/DIABLO ve Omi/Htr gibi mitokondriyal proteinler mitokondrinin iç zar bölgesinden salınır. Apaf-1 ile birlikte sitokrom c içerisinde pro-kaspaz-9 bulunan apoptozom kompleksi oluştururlar. Böylelikle prokaspaz-9'un aktive edilmesi sağlanır. Kaspaz-3, -6 ve -7 gibi infazcı kaspazlar ise hücresel proteinlerin çok büyük bir kısmını degrade ederler. Ayrıca kaspazla aktive edilen DNaz'ı da aktive ederek kromatin degradesiyonuna sebep olurlar. Bu durum hücrenin apoptotik cisimciklere fragmente olmasına ve diğer hücreler tarafından geri dönüştürülmesine sebep olur (151).



Şekil 10: Hücre Ölüm ve Sağ Kalım Yolaklarının XIAP ile Kontrolü (151).

XIAP ölüm sürecine son basamaklarda dahil olur. XIAP başlatıcı kaspaz -9'a ve infazcı kaspaz- 3 ve -7'ye BIR3 ve BIR2 domainleri ile bağlanarak sürece katılır. XIAP'nin BIR3 domaini Apaf-1/kaspaz-9 holo enzimi ile etkileşime geçer ve kaspaz-9'un küçük alt ünitesinin N terminalini ayırır. BIR3 ile etkileşen kaspaz-9'un N terminalindeki tetrapeptid yapısı mitokondriyal Smac/DIABLO'nun N terminali ile homoloji gösterir. Bu nedenle kaspaz-9 ve Smac/DIABLO'nun N terminalleri XIAP/BIR3 için yarışmaktadırlar (185). Smac/DIABLO homodimerler oluşturur ve bu homodimerlerin N- terminal uçları XIAP'nin hem BIR2 hem de BIR3 domainlerine bağlanır. BIR2 ve BIR3 domainleri derin yapısal bir çukura sahiptirler. Bu çukurlar Smac/DIABLO molekülünün N terminalindeki alanin-valin-prolin aminoasitlerinin bağlanması içindir. Bu süreçler Smac/DIABLO serbest dolaşan aktif kaspaz-3,-7 ve -9'un miktarını artırır (121, 211) (Şekil 10).

XIAP'nin kaspaz inhibisyonundaki diğer bir mekanizması ise RING domainindeki E3 ligaz aktivitesi ile ilişkilidir (172).

cIAP1, cIAP2, ML-IAP ve ILP-2'ye benzer olarak XIAP'nin RING domaini hedef proteinlere farklı tiplerde ubiquitin zincirleri takma yeteneğindedir (48, 150). Protein ubiquitilasyonunun farklı fizyolojik sonuçları vardır. Bu sonuçlar substrata eklenen ubiquitin sayısına göre değişmektedir. 8 farklı ubiquitin polimeri oluşturulabilir. Her bir ubiquitin bağlantısı farklı bir 3D yapıya sebep olur ve yine her biri UBA (Ubiquitin Associated Domain) domaini ile tanındıklarında farklı fonksiyonlar meydana getirirler. Lys-48 dallı ubiquitin zincirleri proteinleri proteozomal degradasyon için işaretlerken Lys 63 ve Lys 11 lineer zincirleri sinyal transdüksiyonu, endositoz ve DNA tamirinde görev görür (56). cIAP1, cIAP2 ve ILP-2'ye benzer olarak XIAP UBA domaini içerir böylelikle sadece ubiquitin polimerlerini eklemeyen aynı zamanda yüksek polimerize ubiquitin zincirlerinin tanınmasını ve ubiquitin reseptörü gibi davranır (88). Bu da XIAP'lerin çok kompleks rollerinin olduğunu sadece basitçe hücre ölümünü engelleyen ve kaspazları inhibe eden moleküller olmadığını göstermektedir.

2.7. Smac/DIABLO Geninin mRNA Ekspresyonunun Apoptozis ve Nörodejenerasyondaki Rolü

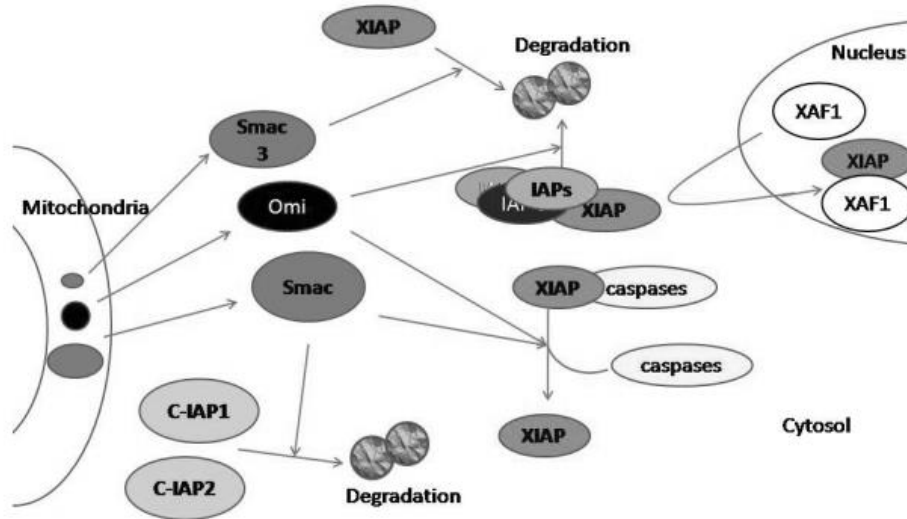
Vergahen et al., etiketlenmiş XIAP ile immunoprecipitasyon yaparak 24kD boyutunda bir protein izole etmişlerdir. Bu protein düşük pI'a sahip IAP'ye bağlanan (Direct IAP Binding protein with Low pI /DIABLO) bir proteindir. Mitokondri kaynaklı apoptoz tetikleyicisi olan Sitokrom c'nin tanımlanmasını yapan ilk ekip (58) ise aynı proteini izole edip mitokondri kaynaklı ikinci kaspaz aktivatörü olarak tanımladıkları bu proteine Smac (Sekond Mitochondria-derived Activator of Caspase) adı vermiştir. Diğer proteinlerle sekans benzerliği göstermeyen kendi kendine birleşebilen, N terminalindeki sinyal dizisi sayesinde mitokondride lokalize olabilen bir proteindir (125) .

Apoptozisin intrinsek yolağı antineoplastik ajanlar, hipoksi, irradasyon, büyüme faktörü kıtlığı ve sıcaklık şoku gibi farklı uyarıcılar tarafından indüklenir. Bu uyarıcılar mitokondrial dış membran permeabilizasyonuna (MOMP) ve sitokrom-c, Smac/DIABLO, Om/HtrA2 ve AIF gibi proteinlerin mitokondrinin içsel alanından salınımına neden olur (201). Bu salınım bir multiprotein kompleksi olan sitokrom-c, prokaspaz-9, dATP, ve Sitosolik Apoptozis İndükleyici Faktör-1 (Apaf-1) içeren apoptozoma olarak sağlar (220) . Apoptozom kaspaz-9' u aktive eder kaspaz-9 ise efektör kaspaz-3, -6 ve -7'nin aktivasyonunu uyarır. Efektör kaspazlar hücrel spesifik substratlarını degrade ederek apoptozisin tipik morfolojisini oluştururlar (111).

Olgun kaspazların aktivitesi apoptozis proteinlerinin inhibitörleri ile interaksiyona girerek negatif düzenlenirler (52, 112). Bu protein ailesi X bağımlı apoptozis inhibitörü (XIAP), hücrel IAP-1 (c-IAP1) hücrel IAP-2 (c-IAP2), testis spesifik IAP (Ts-IAP), survivin, livin ve BRUCE/Apollon' dan oluşmaktadır (97).

DIABLO (Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOW P_i) olarak da bilinen Smac proteini (Second mitochondria-derived activator of caspase) bir nükleer gen tarafından kodlanmaktadır. Proteinleri mitokondri hedefleyen sinyaller olarak hizmet veren NH₂ uçlara sahiptir. Smac/DIABLO'nun aktifleşmesi bu sinyallerin kesilmesiyle meydana gelmektedir. Apoptotik uyarıcıların varlığında olgun Smac/DIABLO sitozole salınır (58). Sitozolda Smac/DIABLO, IAP'ler ile etkileşime girerek IAP'lerden kaspazların salınmasına sebep olarak pro-apoptotik bir

etkiye aracılık eder (39). Yapısal veriler Smac/DIABLO'nun, IAP'ler ile interaksyona girebilmeleri için homodimerler oluşturmaları gerektirdiğini göstermektedir. Ala-Val-Pro-Ile aminoasitlerinden oluşan spesifik bir NH2 uçlu motif IAP'ler ile interaksyondan sorumludur (39, 215). Smac/DIABLO'nun BIR2 ve BIR3 ile interaksyona girerek sırasıyla kaspas-3 ve kaspas-9 salınımı sağladığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (185). Kaspas-9 NH2 ucunda benzer tetrapeptit bir motife sahiptir. Bu nedenle her ikisi de XIAP'nin BIR3 domaini için rekabet ederler (215). Kaspas- 3, XIAP'nin BIR2 domaini ve Smac/DIABLO'nun NH2 ucu arasındaki interaksyon aracılığı ile salınır (75) (Şekil 11) .



Şekil 11: Smac/DIABLO ve Diğer Proteinlerin IAPs Ekspresyonu Üzerine Etkisi (129)

2.8. Beynin Glukoz Metabolizması: Periferik Hipoglisemi ve Hiperglisemi Arasındaki Dengenin Nöronal Hasara Etkisi

Beyin insan vücudunda enerji metabolizması en yüksek organdır. Yetişkin bir bireyde beyin total vücut kütlelerinin sadece %2'sidir. Ancak kardiyak çıktının %15'ini alır, total vücut oksijen tüketiminin %20'sini ve total vücut glukozunun %25'ini kullanır (126). Fizyolojik koşullarda karbohidratlar beynin oksidatif

metabolizması için birincil enerji substratlarıdır (27). Keton cisimcikleri, glikojen ve aminoasitler gibi alternatif substratlar da kullanılsa da glukoz özellikle dominant kaynaktır. Alternatif substratların sınırlı havuz kaynakları ve kompartmantasyonları serebral enerji ihtiyacı için bunların yetersiz olmasına sebep olmaktadır (92). Serebral glukoz metabolizması iki temel süreci içerir: Glukoz transportu ve İntraselüler oksidatif metabolizma. Normal koşullarda fizyolojik glukoz transportu önemli derecede kan beyin bariyerinin yapısına katılan astrositlerin fonksiyonuna ve glukoz taşıyıcılara bağlıdır (135). Astrositler glukoz transportunun düzenlenmesinde ve beyin enerji metabolizmasının sağlanmasında önemli rol oynarlar. Glukozu kandan hazır bir şekilde endotelial hücreler üzerinden alırlar ve enerjik metabolik substratları kan ve nöronlar arasında iletirler (67) Astrositler ayrıca yüksek miktarda glikojen granülü içerirler ve daha yoğun sinaps içeren bölgelerde astrositlerde de daha yoğun granüller bulunur (160). Hipoglisemi durumunda nöronal metabolizmada kullanılmak üzere laktat elde etmek için glikojenin de kullanıldığı görülmüştür (159). Bu durumda astrositler hem normal glukoz metabolizmasında hem de hipoglisemik koşullarda görev almaktadır. Glukozun kandan nöronlara taşınmasında çeşitli tiplerde glukoz taşıyıcıları (GLUT) yer almaktadır (59). Bunlar arasında GLUT-1 ve -3'ün beyin glukoz transportunda ve Alzheimer Hastalığı (AD) patogenezisinde temel rol aldığı düşünülmektedir (59).

İntraselüler oksidatif katabolizma sitoplazmada glikolizis ve pentoz fosfat yolağını mitokondride ise krebs döngüsü ve oksidatif metabolizma gibi karmaşık yollardan oluşmaktadır. Hem glukoz transportundaki anormallikler hem de intraselüler oksidatif katabolizmadaki bozulmalar serebral glukoz metabolizmasını etkiler ve nörodejenerasyondaki metabolik bozukluklara sebep olmaktadır. AD (Alzheimer Disease) hastalarında insülin direncine bağlı glukoz transportunda bozukluklar ve mitokondriyal disfonksiyona bağlı intraselüler metabolik değişiklikler gözlenmiştir.

Beynin glukoz metabolizması ve glukozdan faydalanabilmesi normal nöronal fonksiyonların gerçekleşmesi için son derece önemlidir. Nöronlar glukozu sentezleyemezler ve depolayamazlar bu bağlamda kan beyin bariyerinden glukoz taşıyıcıları (GLUT) ile glukoz transportuna bağımlıdır (170). GLUT-1 ve -3 beyinde ağırlıklı olarak bulunan GLUT izoformlarıdır. GLUT1 nöronlarda,

serebrovasküler endotelial hücreler, astrositler ve oligodendrositlerde bulunurken GLUT-3 spesifik olarak nöronlarda eksprese edilmektedir (202). Diyabete bağlı anormal glukoz metabolizması ve hafıza/sinaptik fonksiyon bozuklukları arasında bir ilişki vardır (219). Bu durum glukoz kaynaklarının, transportunun ve kullanımının bozulmasının bilişsel fonksiyonları etkilediği fikrini beslemektedir. Azalan serebral glukoz metabolizması ve insülin direnci prediyabetik ve T2DM'li bireylerde hafıza bozukluklarına eşlik etmektedir (13).

Pozitron emisyon tomografisi (PET) çalışmalarına göre AD patolojisinde beyin glukoz metabolizması şiddetli bir şekilde bozulmaktadır. Bu da hipometabolik durumun bilişsel semptomlardan önce yer aldığını gösterir (142). Hipometabolizma durumu erken safhalarda posterior singulat ve paryeto-temporal bölge gibi hafıza ile ilişkili bölgelerde daha önce çıkar ancak hastalık ilerledikçe prefrontal kortekse yayılır (219). AD'nin erken safhalarında glukoz kullanımı %45 azalır ve serebral kan akımı %20 azalır. Ancak hastalığın daha geç safhalarında metabolik ve fizyolojik anomaliler ağırlaşır, serebral kan akımında %55-65 düşüşler gözlenir. (94). AD'li hastaların beyin dokularından ve fibroblastlarından elde edilen verilere göre serebral glukoz metabolizmasındaki azalma mitokondrial enerji ile ilişkili proteinlerin aktivitesinde azalma ve ekspresyonlarında değişim ile koreledir. Mitokondrial enerji ile ilişkili bu proteinler pürivat dehidrogenaz (PDH), izositratdehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenazdır Bu enzimlerin oksidatif modifikasyona oldukça duyarlı oldukları bilinmektedir ve pro-oksidanlara maruz kalmaları ile değişirler (196). Trikarboksilik asit döngüsü (TCA döngüsü)'nün enzimatik aktivitelerindeki tüm değişiklikler (özellikle de PDH kompleksindekiler) AD'nin derecesi ile ilişkilidir. Bu da mitokondrial değişikliklerin önemini göstermektedir. Değişen beyin glukoz metabolizmasının diğer bir patofizyolojik sonucu glukozdan ATP üretiminde sporadik AD'nin başlangıcında yaklaşık %50'lik bir düşüş olduğudur. Normal hücre fonksiyonunun sürdürülmesi için ATP-bağımlı süreçler düşünüldüğünde bu oldukça ürkütücü bir yüzdendir (139). AD'de glukoz dağılımının ve kullanımının bozulduğuna dair veriler hipokampal atrofiye uğramış yaşlı bireylerde ve AD transgenik farelerde GLUT-1 seviyesinin düştüğünü gösteren deneylerle de desteklenmektedir (93). AD beyinlerinde GLUT-1 ve -3 seviyelerindeki düşüşler tau proteininin

hiperfosforilasyonunda, O-GlcNAçilasyonunda (N-asetil glikozilasyonunda) ve Nörofibriller Yumak (NFY) yoğunluğunda azalma ile ilişkilidir (118).

Glukozun medial septum, hipokampus, striatum ve amygdala gibi beyin bölgelerine mikroenjeksiyonu sonrası hafıza sürecinin hızlandığı görülmüştür (175). Bu bulgulara göre yaşlanan bir birey uzun süreli bilişsel görevler yaparken glukoz kıtlığına girme riskindedir. Tekrarlayan hipoglisemik vakalar yaşlı bireylerde demans riskini artırmaktadır (148).

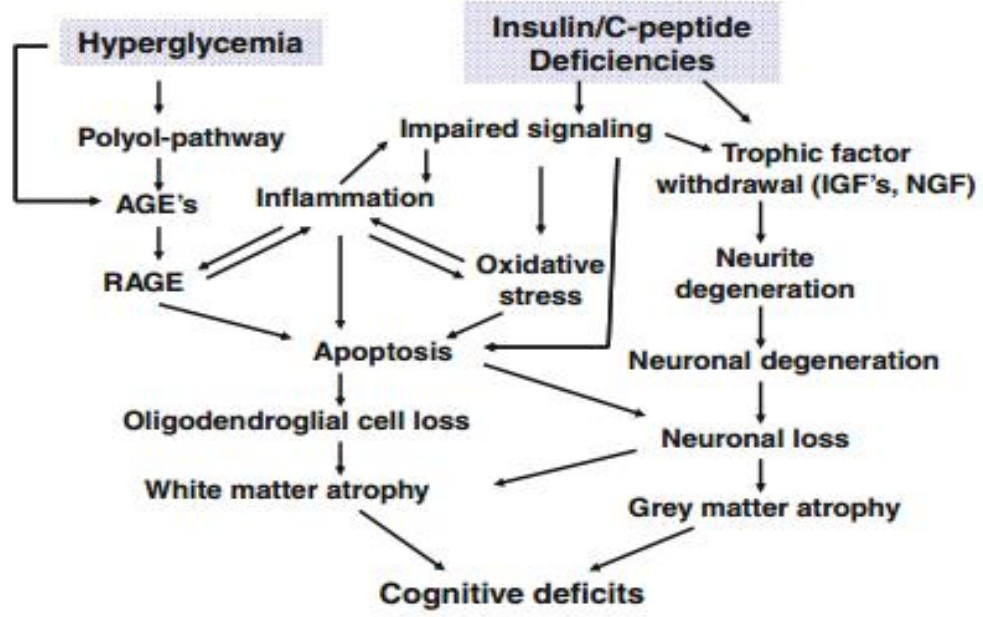
Glukoz metabolizmasının bozulması sonucu AGEs (advanced glycation end products, glikasyon son ürünü) oluşumu da AD patogeneziinde yer almaktadır. Hipergliseminin AGEs oluşumunu artırdığı bilinmektedir. AGEs glukoz ve fruktozun oto-oksidasyonu sonucu ortaya çıkan yaşlanan protein türevleridir (30). Normal yaşlanma sürecinde çeşitli dokularda AGEs oluşumu ve birikimi gözlenir ancak bu süreç diyabetes mellitus ile hızlandırılır (82). AGEs damar duvarlarında, lipoproteinlerde ve lipid bileşenlerde bulunurlar; makro ve mikroanjyopati ile amiloidogeneze sebep olurlar (78).

AD şiddetli hipometabolik durumla alakalıdır. Bu hipometabolik durum ise insüline fazlaca duyarlı bölgelerde serebral glukoz ve enerji metabolizmasında azalma ile karakterizedir bu durum hastalığın patogeneziinde insülin direncinin merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. Serebral glukoz metabolizmasındaki bu bozulma AGEs oluşumunu tetikler ve sonucunda A β birikimi, tau hiperfosforilasyonu ve oksidatif stres meydana gelir. Yani anormal sistemik glukoz ve insülin metabolizması serebral insülin transportunu ve fonksiyonunu bozmaktadır. Serebral glukoz alımı ve metabolizmasında eksiklik nöronların enerji krizine ve disfonksiyonuna sebep olur. Diyabete bağlı AGEs oluşumu beynin oksidatif stresini artırır ve AD ilişkili nöropatolojik işaretlerin oluşumuna katkıda bulunur.

Özet olarak serebral glukoz metabolizmasındaki bozukluk ister hipoglisemi ister hiperglisemi yönünde olsun diyabetes mellitus ve nörodejenerasyon arasındaki mekanistik bir bağlantı oluşturur.

2.9. Advanced Glikasyon Son Ürünleri (AGEs)

Oksidatif stres ile kombine bir şekilde kronik hipergliseminin advanced glikasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir. AGE'nin oluşumu glukoz gibi şekerlerin, protein, lipid ve nükleik asitlerdeki amino gruplarının indirgenmesi sırasında enzimatik olmayan bir reaksiyonla başlatılır (30). Hem AGE hem de oksidatif stres tek başına patolojik değişikliklere sebep olabildiği halde iki faktör sinerjistik olarak hareket ederek protein hasarına sebep olabilir (143). AGE oluşumu ve birikimi normal yaşlanma sürecinde de varken diyabetli insanlarda bu süreç hızlanır ve diyabetik komplikasyonların ilerlemesine sebep olur (82) (Şekil 12).



Şekil 12: Hiperglisemi ve Hipoinsulinemi Sebebiyle AGE Aracılı Nörodejenerasyon

2.10. STZ ile İndüklenen Diyabetik Nörodejenerasyonda Mitokondrial Disfonksiyon ve Oksidatif Stres Aracılı Apoptozis

Mitokondriler ökaryotik organizmalarda birçok hayati hücrel süreçte ev sahipliği yapan ubikütöz ve dinamik organellerdir. Bu dinamik organeller enerji

metabolizmasının baş koordinatörüdürler ve TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyon ile hücrel ATP'nin %90'undan fazlasının üretimini yaparlar (18). Aynı zamanda mitokondriler reaktif oksijen türlerinin (ROS) temel kaynağıdır bu nedenle de oksidatif hasara çok hassastır. Nöronlar mitokondrial yapıdaki, yerleşimlerdeki ve fonksiyonlarındaki değişikliklere çok duyarlıdır çünkü nöronların çok sınırlı glikolitik kapasitesi vardır ve bu durum onları mitokondrial enerji kaynaklarına bağımlı kılmaktadır. Üstelik nöronlar metabolik olarak çok aktif hücreler olduklarından; sinaptik transmisyon, aksonal/dendritik transport, iyon kanalları ve iyon pompası aktivitesi gibi gerçekten çok fazla miktarda enerji gerektiren hücrelerdir (103, 136). Mitokondrinin nöronun sorunsuz bir şekilde fonksiyon görmesi için gereken bölünme, kaynaşma, motilite ve turnover gibi dinamik özelliklerindeki bozulmalar nöronlarda farklı defektler yaratarak nörodejenerasyonda yer almaktadır (40). Ek olarak beyin yüksek çoklu-doymamış yağ asidi (PUFA) seviyeleri, yüksek oksijen tüketimi, yüksek geçiş metali içeriği ve zayıf antioksidan savunma sonucu oluşan oksidatif hasara karşı çok savunmasızdır (149).

Nörodejenerasyon ve diyabette mitokondrinin ortak bir pozisyonda yer aldığına dair önemli veriler bulunmaktadır. Biriken verilere göre her iki patoloji de birbirine bağlı olan iki mitokondrial durum ile ilişkilidir: mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif hasar. Mitokondrial elektron transport zincirindeki bozulma, özellikle de bu durum Sitokrom C Oksidaz (COX) aktivitesinde azalma ile karakterizedir, AD hastalarının platelet, lenfosit ve beyin dokularında bu azalma rapor edilmiştir (200). Hatta AD patolojisinden etkilenen nöronlarda oksidatif streste artış, mitokondri miktarında azalma, sitoplazmik mtDNA miktarında artış ve mitokondrial otofajide artış (lipofuskin içeren vakuollerde COX artışı ile belirlenir) gözlenmiştir (139).

AD hastaları ile aynı yaşta normal bireyler karşılaştırıldığında AD fibroblastlarında oksidatif stres ve apoptotik markerlar daha yüksek seviyede bulunmaktadır. De la Monte and Wands (49), 2005'te şiddetleri farklı seviyelerde olan AD hastalarında postmortem beyin dokularını incelemişler ve AD şiddetinin mitokondrial gen ekspresyonundaki bozukluklarla ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Bu genler özellikle kompleks IV'in oluşumunda yer alan genler, p53'ün yüksek seviyeleri, NOS ve NADPH gibi oksidatif stresin moleküler göstergeleridir.

Mitokondriyal malfonksiyon oksidatif stresi artırdığından AD'de nöronlarda lipid, protein ve nükleik asit oksidasyon seviyesi de artar (38, 187).

AD'de mitokondriyal değişikliklerin sebebi hala açıklanamasa da mitokondriyal disfonksiyonun altında yatan çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. İn vitro çalışmalar sonucu kültür hücrelerine A β uygulanmasının mitokondriyal süperoksid anyon (O $_2^-$) üretimini artırdığı, ATP üretimini azalttığı, mitokondri içine Ca $^{+2}$ alınmasını artırdığını buna bağlı olarak mitokondriyal permeabilite transisyon porunun (mPTP) açılmasını sağlayarak apoptozise sebep olduğu görülmüştür (91). A β aynı zamanda membran lipi peroksidasyonunun meydana gelmesini ve 4-hidroksinonenal üretimini de indüklemektedir (29). Ek olarak A β membran sfingomyelin yapısının sfingomyelinazlar ile hidrolizini artırarak, seramid üretimi artırır (46), sonuç olarak Akt, BAD ve GSK-3 β 'nin fosforilasyonunu içeren mitokondri aracılı nöronal hücre ölümüne sebep olur (186).

A β 'nin direk olarak mitokondri üzerine etki ettiğini gösteren diğer bir nokta mitokondriyal bir protein olan A β -Bağlayan Alkol Dehidrogenaz (ABAD) ile etkileşimidir (127). ABAD ile A β etkileşimi mitokondriyal membran permeabilitesini artırarak ve mitokondriyal respirasyonda yer alan enzimlerin aktivitesini azaltarak mitokondriyal yetmezliğe sebep olur. A β peptidinin mitokondri içerisine bir dış membran translokaz ihraç mekanizması (TOM) ile import edildiği ve mitokondriyal kristaya yerleştiği bulunmuştur (90). A β türevlerinin mitokondri içerisine taşınması mitokondriyal disfonksiyona, oksidatif hasara ve nöronların yapısal ve fonksiyonel bozulmasına sebep olmaktadır (127). AD'de mitokondriyal disfonksiyon, mitokondriyal import kanallarında tam-boy ve karboksi terminali kesilmiş APP'nin birikmesi ile de bağdaştırılmıştır (53). Anandatheerthavarada et al. (5), 2003'de yaptığı çalışmaya göre mitokondriyal kompartmanlarda transmembran olarak tutulmuş tam-boy APP birikimi mitokondri fonksiyonlarını ve enerji metabolizmasını bozmaktadır.

A β sitokrom c oksidaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz gibi önemli mitokondriyal enzimleri de inhibe etmektedir (127).

AD'de mitokondriyal disfonksiyonun bir sonucu olarak Ca $^{+2}$ homeostazisinde anomaliler gösterilmiştir. AD hastalarının beyin dokuları Ca $^{+2}$ konsantrasyonunda artış göstermişlerdir ve intraselüler Ca $^{+2}$ seviyesi NFY içeren nöronlarda sağlıklı

bireylerdeki nöronlardakine göre daha yüksek seviyededir (144). Post mortem çalışmalara göre Ca^{+2} ile aktifleşen bir enzim olan transglutaminaz tau moleküllerinin çapraz bağlanmalarını indüklemektedir ve AD hastaların prefrontal korteksinde artmaktadır (101). İn vitro çalışmalara göre Ca^{+2} iyonoforları ile indüklenen hücre içi Ca^{+2} seviyesi artışı APP (Amiloid Prekürsör Protein) maturasyonunu ve proteolitik kesimini teşvik ederek amiloidojenik A β peptidi oluşumunu ve salınımını artırır (162). Aynı zamanda Presenilin (PS) mutasyonları da endoplazmik retikulumda Ca^{+2} tutulumunu bozarak sinaptik mitokondriyaların aşırı derecede Ca^{+2} ile yüklenmesine ve apoptozise sebep olur. Yabancıl tip PS1 endoplazmik retikulumda Ca^{+2} sızıntı kanalı olarak görev yapar ve bu PS1'deki AD'ye sebep olan mutasyonlar PS1'in Ca^{+2} 'u regüle eden fonksiyonunu bozarlar (22).

T1D ve T2D de mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres artışı ile ilişkilidir. Şu anda kabul edilene göre mitokondriyal DNA'daki kalıtsal defektler T1D'e benzeyen diyabetin insülin eksikliği ile ilişkili bir formuna sebep olmaktadır (181). Mitokondrinin T2D'de yer aldığı, insanlarda mitokondriyal mutasyonlar, hayvan modellerinde ise mitokondriyal genlerde pankreatik β hücresine spesifik delesyonlar ve oksidatif fosforilasyon kapasitesinin azalması ile gösterilmiştir (180). T2D hastalarının pankreatik β hücrelerinde anormal mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon anomalileri gözlenmiştir (6). Diyabetin her iki tipinde de nöronlar mitokondriyal fonksiyonlardan etkilenmekte ve mitokondriyal oksidatif stres artarak nörodejenerasyona sebep olmaktadır. T1D ve T2D hayvan modellerinde ROS üretiminde, lipid peroksidasyonunda, protein nitrozilasyonunda artış; glutatyon ve askorbat seviyelerinde ise azalma gözlenmiştir (69). STZ diyabetik sıçanların (T1D modeli) beyninden izole edilen mitokondrilerde KoenzimQ9'in seviyelerinin düşük olduğu görülmüştür bu da diyabetik deney hayvanında antioksidan sisteminin bozulduğunun işaretidir (140). Diyabetik STZ'li sıçanların beyninden elde edilen mitokondrilerde respiratuar zincirin bozulduğu oksidatif ve nitrosatif stresin arttığı ve nöronal hasara sebep olduğu görülmüştür (130). Hiperglisemiye bağlı oksidatif ve nitrosatif stres solunum zincirinin III, IV ve V komplekslerinin aktivitesini ve ATP sentezini azaltarak mitokondriyal disfonksiyona sebep olmaktadır (130). STZ ile indüklenen diyabetik 12 haftalık sıçanların beyninden elde edilen mitokondrilerin

ATP içeriği düşük ve Ca^{+2} biriktirme eğilimleri yüksektir (137). Goto-Kaziaki (GK) (T2D modeli) sıçanlarının beyninden izole edilen mitokondrielerde solunum zinciri etkinliğinin yaşa bağlı azaldığı ve oksidatif fosforilasyon sistemi ile birbirinden ayrıldığı gözlenmiştir (138). Uzun süreli STZ diyabetik sıçanların dorsal kök gangliyonlarında yapısal mitokondriyal anomaliler gözlenmiştir (173). Bu çalışmaya göre kültüre edilmiş dorsal kök gangliyon nöronlarının yüksek glukoz seviyelerine maruz bırakılması mitokondrieleri fragmentasyonuna ve fizyonuna sebep olmuştur. Bu çalışmaya göre mitokondriyal fizyon proteini DRP1'in up regülasyonunun başlangıç fazı protektif bir fizyon ile sonuçlanır ancak daha ileriki safhalardaki etkisi Bim ve Bax'ın aktivasyonu ile apoptozisin gerçekleşmesidir (115). Diyabetik farelerin dorsal kök gangliyonu nöronlarının non diyabetik farelerle karşılaştırıldıklarında çok fazla mitokondriyal biogenezis gösterdikleri bulunmuştur (63). Mitokondri sayısındaki hızlı artış mitokondriyal fizyon sonucu meydana gelmektedir. Yani hiperglisemi küçük, fragmente olmuş mitokondrielerin üretilmesine sebep olmaktadır (63). Buna göre in vitro deneyler kısa süreli hiperglisemiye maruz kalmak DRP1 protein seviyesini artırmaktadır. DRP1 ile indüklenen fragmentasyonun inhibe edilmesi nöroprotektif bir etkiye sahiptir ve hiperglisemik hasara karşı nöronların hassaslığını azaltmaktadır (63).

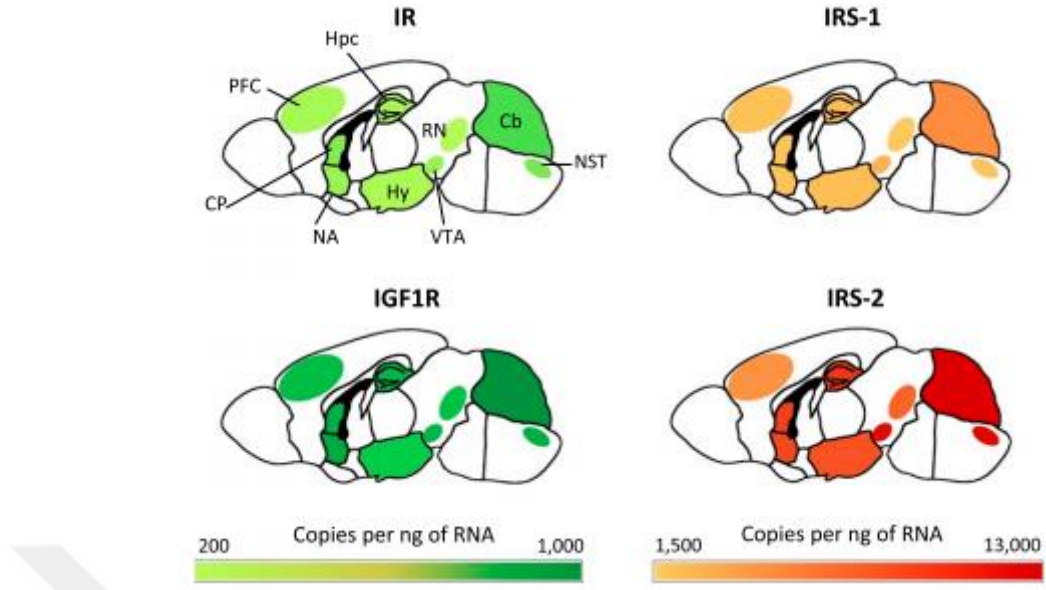
T1D hastalarında bilişsel bozukluktan hem tekrarlayan hipoglisemi hem kronik hiperglisemi vakaları sorumludur. STZ ile indüklenen diyabetin ya da insülin ile indüklenen hipogliseminin hipokampal ve kortikal biyoenerjetik ve oksidatif duruma etkisi incelenmiştir (34). İnsülinle indüklenen hipoglisemi ve hipergliseminin ROS seviyesini artırdığını buna bağlı olarak da kortikal ve hipokampal mitokondrielerde antioksidan savunma sistemini azalttığını bulmuşlardır. İnsülin ile indüklenen hipogliseminin akut vakaları kortikal mitokondrielerdeki biyoenerjetik ve oksidatif durumun yıkıcı etkilerini artırarak STZ ile indüklenen diyabetin etkisini artırmaktadır (34). Beyinde mitokondriyal fonksiyon transmitter sentezi ve yıkımı ile de yakından ilişkilidir. Mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve eksitator nörotransmitter salınımı birbiri ile bağlantılıdır ve insülin terapisi gören T1D'li hastaların bilişsel bozukluğunun sebebi olabilir (34). Hem STZ ile indüklenmiş diyabetik hem de insülin ile indüklenmiş hipoglisemik kortikal sinaptozomlarda eksitator aminoasit glutamatın Ca^{+2} 'dan bağımsız bir şekilde daha fazla salındığı gözlenmiştir. Eksitator

sitoplazmik aminoasitlerin salgılanma kapasitesindeki artış sıçanlarda hipoglisemik ve hiperglisemik durumlarda nöronal hasara katkıda bulunmaktadır (34).

Mitokondri enerji metabolizmasının baş koordinatörü ve ROS'un hem kaynağı hem de hedefi olduğundan mitokondriyal disfonksiyon diyabetes mellitus ve beynin AD-ilişkili anormal insülin ve glukoz metabolizmasının altındaki mekanizma olabilir. Defektif insülin sinyalizasyonu nöronları enerji yoksunu ve oksidize edici ajanlara karşı hassas hale getirir bu da mitokondride fonksiyonel ve yapısal değişikliklere sebep olur. A β ve hiperfosforile tau sinerjistik olarak mitokondriyal biyoenerjiti bozar ve oksidatif stresin etkisini artırır bu da nörodejeneratif mekanizmaları hızlandırır. Merkezi insülin direnci, bozulmuş serebral glukoz metabolizması ve mitokondriyal yetmezlik AD patolojisindeki tehlikeli üçlüyü temsil etmektedir.

2.11. Diyabetik Sıçanlarda Serebellum ve Beyin Sapı Bölgelerindeki Nöronal Harabiyetin Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi

İnsülin reseptörlerinin merkezi sinir sistemi boyunca bazı bölgelerde daha yoğun dağıldığı görülmüştür. Bu bölgeler arasında özellikle hipotalamus, olfaktör bulbus, serebral korteks, serebellum, hipokampus ve striatum bulunmaktadır (165). İnsülin ve insülin reseptörlerinin beyindeki bu dağılım modeli farklı kaynaklardan periferik ya da lokal) gelen insülinin bu bölgeler arasında nöronal sinyal iletimine katkı sağladığı düşünülmektedir (218). IR'leri intraselüler olarak çoğunlukla hücre gövdelerinde ve sinapslarda yüksek protein ekspresyonuyla lokalize olmaktadır ve glialarda daha az yoğunluktadırlar Benzer olarak nöronlarda ve glialarda özellikle hipokampus, amigdala, parahipokampal girus, serebellum, serebral kortekste IGF-1R'leri de bulunmuştur (76) (Şekil 13).



Şekil 13: Beyinde IR, IRS-1, IRS-2 ve IGF-R Proteinlerinin Bölgesel İfadelerinin Gösterilmesi (108)

Kardiyak çıktının %15'ini alan beyin gibi fizyolojik ihtiyacı büyük olan bir organ periferik hipoinsulinemi ve hiperglisemiden ve bu koşulların çıktılardan en çok etkilenecek organdır. Şekilde görüldüğü üzere beynin çok çeşitli bölgelerinde insulin reseptörlerinin var olduğu gösterilmektedir. Bu da göstermektedir ki bu bölgelerde de insulin aracılı sinyal transdüksiyon yolları bazı önemli mekanizmaların yürütülmesinde rol oynamaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar İnsulin Reseptörlerinin daha yoğun bulunduğu ve AD ve PD gibi popüler nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde anahtar rol oynadığı kanıtlanmış Korteks, Hipokampus, Striatum gibi bölgeler üzerinde yürütülmektedir. Biz ise çalışmamızda yine IR bakımından zengin ve son zamanlarda nörodejeneratif hastalıklarda daha etkin rollerinin olduğu açığa çıkmaya başlayan serebellum ve beyin sapı gibi yapıların incelenmesini uygun görmekteyiz.

Eğer hipoinsulinemi sonucu bu bölgelerde insulin ve insulin reseptörü etkileşimi gerçekleşmiyorsa insulin aracılı sinyal yolları başlatılamaz ve bilinen en önemli PI3K/Akt yolağı sekteye uğrayarak hücre sağ kalım moleküllerinin oluşumu engellenir. Ayrıca hiperglisemi sonucu nöronal çevrede meydana gelen

stres hücreleri apoptoza sürükleyebilir. Ve bu bölgelerde tetiklenen apoptozis bu bölgelerle ilişki nörodejeneratif olgulara katkıda bulunabilir.

2.11.1. Beyin Sapı ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi

Parkinson Hastalığı (PD) AD'den sonra en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalıktır. 60 yaş üstü bireylerin %1'inde görülmektedir. PD 150 yıldır motor hareket hastalığı olarak bilinmektedir. PD'nin özelliği beyin sapına ait orta beyin kısmındaki pigmentli nöronların dejenerasyonudur. Substantia nigra (SN)'daki pigmentli nöronlar basal gangliyonlara dopamin sağlamaktadır. Bu nöronların %30-70 kaybı klinikte basal gangliyon devrelerindeki dopamin depleksiyonuyla ilişkili bulunmuştur (41). Substantia nigra beyin sapında bulunmasına rağmen hastalığın ilerlemesi supratentorial bozukluklarla ilişkilidir. Braak et al. (28), 2003'de yaptıkları çalışmalardan sonra elde edilen verilere göre PD'de biriken lewy cisimciklerinin substantia nigradan önce başka beyin sapı çekirdeklerinde de biriktiği gösterilmiştir (28). Bu nedenle motor dışı harabiyetler, spesifik olmayan semptomlar, otonomik disfonksiyon, depresyon ve uyku bozuklukları gibi semptomlar ile beyin sapında meydana gelen dejeneratif olgular arasında korelasyon aramak gerekmektedir (86).

PD gibi AD'de progresiftir ve tedavi edilemeyen bir demans türüdür. Tüm demans vakalarının %50-70'inden sorumludur (1). PD'deki Lewy cisimcikleri gibi AD'de de NFY denilen hatalı protein birikimleri meydana gelmektedir ve bu birikimlerin anatomik lokalizasyonları önem arz etmektedir. Braak et al. (28) yaptıkları çalışmaya göre AD'de NFY birimikleri hastalığın safhalarına göre rastgele olmayan bir düzende anatomik bir dağılım göstermektedir. Braak et al. (28)'un hastalığı derecelendirme sistemine göre NFY'nin birikimi 6 safhaya ayrılmaktadır. NFY'ler Evre I'de transentorhinal bölgedeyken evre VI'da primer neokortikal alanlara yayılmaktadır. AD'de beyin sapında hatalı protein birikimleri olmadığından supratentorial bir hastalık olarak düşünülmektedir. Ancak AD'de beyin sapında çeşitli patolojik değişiklikler olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Nörodejeneratif olgularda Lokus coeruleus, ve substantia nigrada hücre kayıpları gözlenmişti (20,79).

2.11.2. Serebellum ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi

Multiple sistem atrofisi (MSA, progresif supranükleer palsi (PSP), Serebellar ataksiler, PD ve motor nöron hastalıkları (MND) gibi subkortikal nörodejeneratif hastalıklardan ayrı olarak kognitif bozuklukların da serebellar dejenerasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (12, 19, 98, 132, 158). Ayrıca AD'de ve Lewy cisimciği ilişkili demans türlerinde, Frontotemporal lob demanslarında serebellar dejenerasyonun yer aldığı gösterilmiştir (33, 141, 206). AD'de serebellar dejenerasyon posterior serebellar lobların atrofisi ile karakterizedir. Ve bu atrofi kognitif bozukluklarla koreledir (195). Nörodejeneratif olgulardaki serebellar dejenerasyonun temel histopatolojik özellikleri arasında purkinje hücre popülasyonunda azalma, moleküler ve granüler hücre tabakalarında atrofi ve korteks tabakasında amiloidozis ve gliosis yer almaktadır (21, 73). Bunun yanı sıra serebellumda senil plak ubiquitasyonunda artış, nörit dejenerasyonu, dendritik spine yoğunluğunda anormallikler (55), vestibuloserebellar ve visual yollardaki sinaptik yapılarda anormallikler görülmüştür (14, 15).

Ek olarak diyabetes mellitus, obezite ve kronik alkolizm gibi sistemik hastalıklar serebellar dejenerasyonu etkilemektedir (37).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hayvanların Ön Muayeneden Geçirilip Grupların Oluşturulması

Söz konusu çalışma için Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurul'unun 17.03.2015 tarih ve 77/637/435-25 sayılı kararı çerçevesinde Etik Kurul Onay'ı alınmıştır. Deneysel hayvanlarda 250-350 g ağırlığında ve erkek Wistar cins sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Celal Bayar Üniversitesi DEHAM'inden elde edilmiş ve rastgele gruplandırılarak her bir kafeste 4 hayvan olacak şekilde kafeslenmişlerdir. Tüm hayvanlar 12 saat gece ve 12 saat gündüz döngüsü olacak şekilde deney gününe kadar bekletilmiştir ve handling uygulanmıştır. Hayvanlar ~24°C'de sıcaklığın kontrol edildiği bir odada; suya ve gıdaya ad-libitum erişebilecekleri şekilde tutulmuşlardır. Sıçanların 6 haftalık deneysel süreç boyunca birebir takip edilmeleri için her biri kuyruklarından işaretlenerek kimliklendirilmiştir. Deneysel süreç öncesinde kilo ölçümleri yapıp kaydedilmiştir. Tüm uygulamalar Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAM)'nde gerçekleştirilmiştir.

Deneysel grupları şu şekilde dizayn edilmiştir:

Kontrol (n=7): Kontrol (Sham grubu; İntraperitoneal (i.p) 0.1 M sodyum sitrat çözeltisi uygulanmıştır)

STZ (n=7): Diyabetik (Tek doz i.p. 45 mgkg⁻¹ Streptozotosin (STZ) uygulanmıştır)

STZ+INS (n=7): İnsulin tedavisi alan (Tek doz i.p. 45 mg kg⁻¹ STZ + Subkutanöz 5u kg⁻¹ gün⁻¹ glargine (uzun etkili) tip insulin uygulanmıştır).

3.2 Streptozotosin ile İndüklenen Diyabetik Sıçan Modelinin Oluşturulması

Kontrol grubundaki sıçanlara, bir gece öncesinden aç bırakılarak, sabah saatlerinde intraperitoneal yoldan 0.2 ml 0.1 M sodyum sitrat çözeltisi (pH 4.0-4.5) uygulanmıştır.

Diyabet grubundaki hayvanların oluşturulması için STZ kullanılmıştır. STZ bir glukoz analogudur. STZ pankreasın β hücrelerini içerisine GLUT-2 glukoz transporterları aracılığıyla girer ve insulin salgılayan β hücrelerini parçalayarak insulin salınımını engeller (174). Bu nedenle intraperitoneal veya intravenöz STZ enjeksiyonu Tip I Diyabet modeli oluşturmada en sık kullanılan yöntemdir. Sistemik dolaşımdaki STZ ile glukoz, pankreas hücrelerine GLUT-2'lerce alınmak üzere yarışacağından STZ uygulamasından önce sıçanlar 12-16 saat (gece boyu) aç bırakılmıştır (3) . Böylece STZ'nin etkisi artırılmıştır. STZ uygulaması öncesi açlık kan şekeri ölçümü yapılmıştır. STZ'nin α ve β olmak üzere iki anomerik formu bulunmaktadır. Bunlardan sadece α anomeri GLUT-2 ile β hücrelerine alınır . STZ ışığa ve sıcaklığa duyarlı olduğundan yarılanma ömrü solusyon hazırlandıktan sonra ortalama 19 dk'dır. Satın alınan STZ preperatının $>75\%$ 'i α anomeri formundadır. Ancak bu orandan ısı ve ışığa maruz kaldıkça β anomer formuna dönüşmektedir (STZ, Sigma, St. Louis).

STZ 0.1 M sodyum sitrat pH:4.0-4.5 çözeltisinde çözülerek 45 mgkg^{-1} olacak şekilde intraperitoneal yoldan uygulanmıştır (74, 191). STZ her bir sıçana 0.2 ml hacimde verilmiştir. STZ'nin yarılanma ömrü çok kısadır ve bu süre ışığa ve sıcaklığa çok duyarlı olduğundan işlem mümkün olduğunca hızlı ve karanlıkta yapılmaya çalışılmıştır. Hazırlanan sodyum sitrat çözeltisinin taze ve soğuk olmasına dikkat edilmiştir.

STZ uygulanması akut olarak pankreatik β hücrelerini yıkacağından bir anda çok sayıda β hücrelerinin yıkımı periferik dolaşıma kontrolsüz bir insülin salınımına sebep olabilir ve buna bağlı ani hipoglisemik şok gelişen hayvanlarda hızlı kayıplar görülebilir. Bunun önlenmesi adına STZ uygulamasından 4 saat sonra sıçanların tercihinde bırakılacak şekilde içmeye suyunun yanında 5% 'lik dekstroz solusyonu da verilmiştir (179). Ve aynı şekilde STZ'nin etkisini artırmak amacıyla uygulamadan 4 saat sonra yeme ulaşım serbest bırakılmıştır (16).

STZ uygulamasından 72 saat sonra açlık kan şekeri ölçülerek açlık kan şekeri değeri 250 mg/dL 'nin üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edilip çalışmaya bu hayvanlarla devam edilmiştir (66).

Sıçanlar 6 hafta boyunca takip edilerek hiperglisemik koşulu 6 hafta boyunca sürdürenler deney sonunda analize alınmıştır.



Resim 1: İntraperitoneal STZ enjeksiyonu

3.3 Sıçanlara İnsulin Uygulaması

İnsulin replasmanı tip 1 diyabetteki hipergliseminin kontrol altına alınması için tek etkili tedavi yoludur (152). Bu nedenle çalışmamızda STZ uygulaması ile oluşturulan insulin hormon eksikliğinin beyinde oluşturduğu 4 haftalık kronik etki üzerine 2 hafta boyunca uygulanan insulin tedavisinin iyileştirici etkisi araştırılacaktır. Ancak bu aşamada insulinin dozunun belirlenmesi oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalara göre yoğun insulin uygulamaları insulin direncine yol açarken çok düşük insulin uygulamaları ise glisemik kontrolü sağlayamamaktadır (152). Yine bir çalışmada insulin sıçanlara günlük olarak 1.5, 3, 6, ve 9 U olacak şekilde 7 gün boyunca uygulanmış 6U/gün ve 9U /gün uygulanan sıçanlarda glisemik kontrol sağlanırken insulin direnci oluşmuş; 1.5-3U/gün uygulanan sıçanlarda ise insulin direnci gelişmemiş ancak glisemik kontrol sağlanamamıştır (152).

Çalışmamızda nörodejeneratif olgular üzerine eğileceğimizden insulin direncinin inceleyeceğimiz nörodejeneratif olgulara etkisini ekarte etmek için insulin direncinin oluşmayacağını ön gördüğümüz 1.5-3U gün⁻¹ aralığında olan 5Ukg⁻¹gün⁻¹ (yaklaşık 1.75-2U gün⁻¹ e tekabül etmektedir) dozu seçilmiştir. Ayrıca seçilen bu doz nörodejeneratif olgular üzerine insulinin etkisinin araştırıldığı diğer çalışmalarda kullanılmış olup iyileştirici etkisi gözlenmiştir (23, 24, 107).

Yalnızca 3. gruptaki sıçanlara hipergliseminin ve hipoinsülineminin kronik etkisi meydana geldikten sonra 6 haftalık toplam deney süreci içerisinde son 2 haftalık periyoda günlük insülin uygulaması yapılmıştır. İnsulin uygulamaları her

gün aynı saate (10:00) subkutan yoldan $5\text{ukg}^{-1}\text{gün}^{-1}$ olacak şekilde verilmiştir (23, 106, 107).

Uygulanan insulin uzun süre etkili, Glargine cinsinden (Lantus SoloStar marka) olup gün boyu tek doz uygulama sayesinde bazal insülin seviyesinin korunmasına yardımcı olmaktadır (77).



Resim 2: Subkutan İnsulin Enjeksiyonu

3.4 Sıçanlarda Vücut Ağırlığı Takibi

Tip I diyabetin en önemli bulgularından biri kilo kaybıdır. Bu nedenle 6 hafta boyunca açlık kan şekeri ölçümü öncesi sıçanlar tartılarak vücut ağırlığı değişiklikleri kaydedilmiştir.

3.5 Haftalık Açlık Kan Şekeri Ölçümü ve Takibi

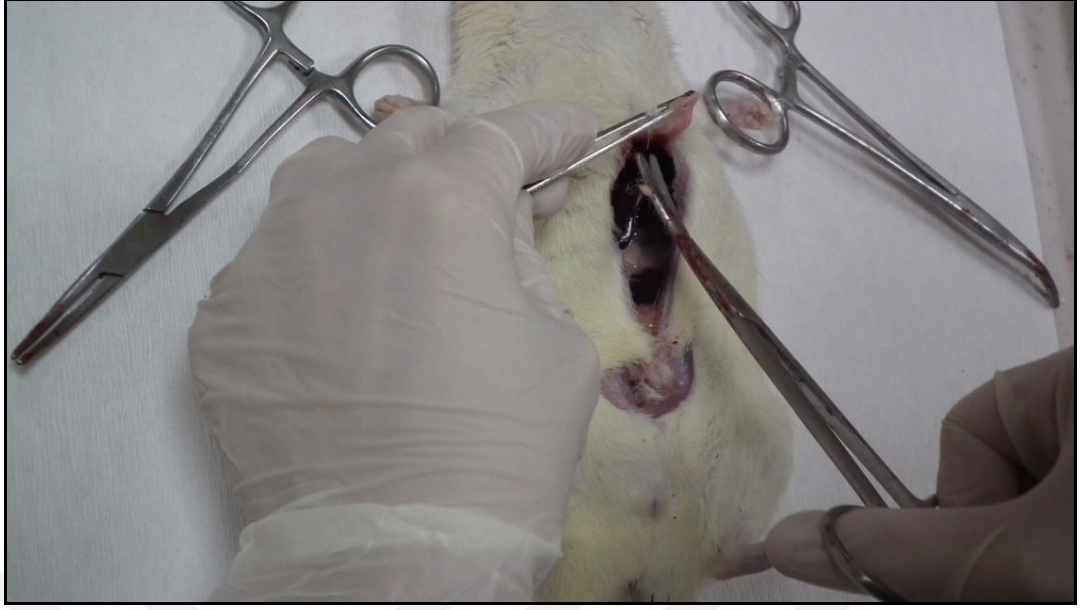
Sıçanlar bir gece öncesinden 12 saat aç bırakılmıştır. Kan şekeri ölçümü kuyruktan enjektör ile delme yöntemi ile bir damla kan alınarak Roche Accu-Check Performa Nano marka glukometre cihazı ve stripleri aracılığıyla ölçülmüştür (71).



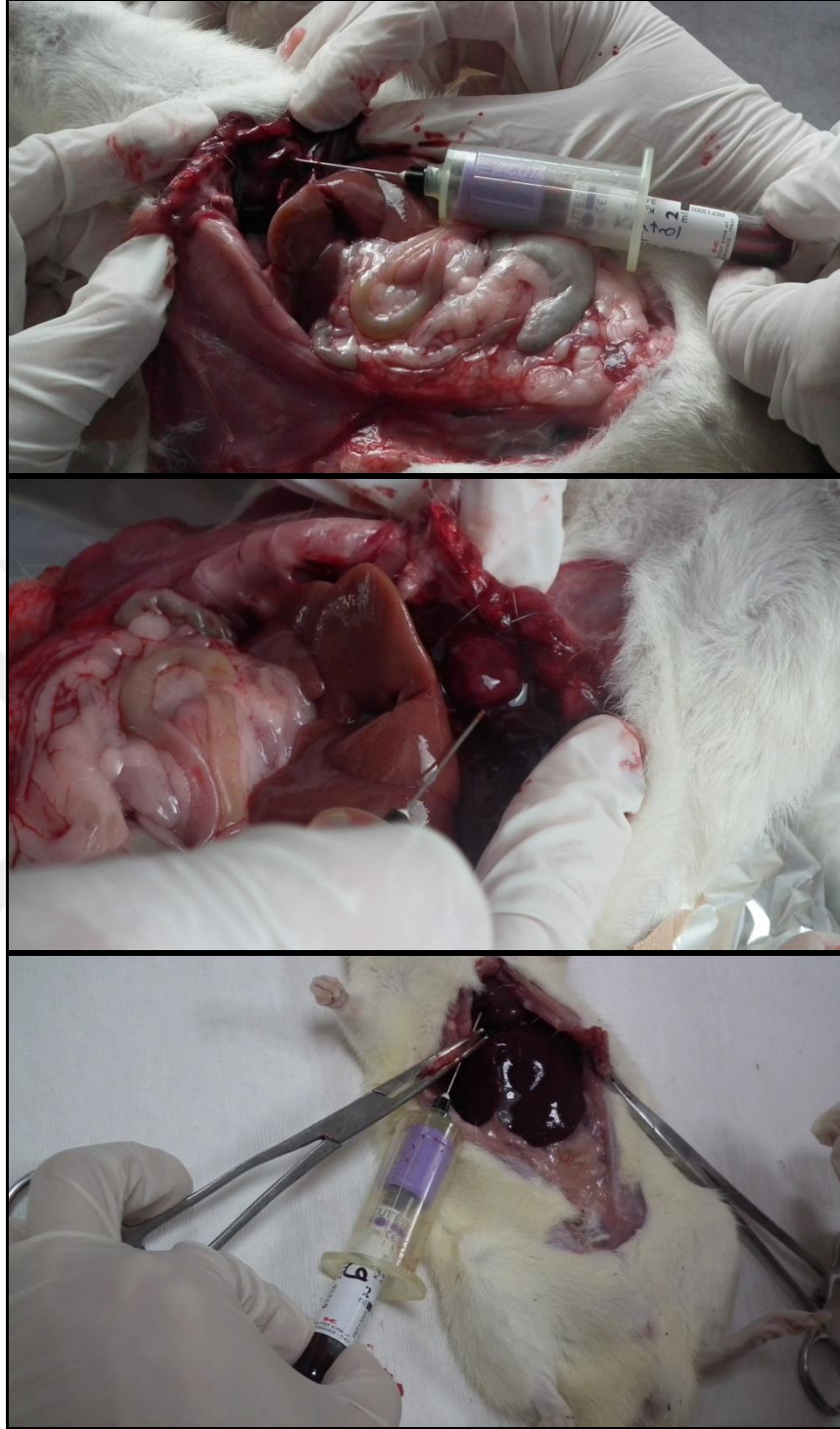
Resim 3: Kuyruk Kanatma Yöntemi ile Açlık Kan Şekeri Ölçümü

3.6 Genel Anestezi Altında İtrakardiyak Kan Alma ve Deneyin Sonlandırılması

Deneyin sonlandırılacağı gün biyokimyasal analizlerde kullanmak üzere kalbin ponksiyonu ile intrakardiyak kan alımı yapılmıştır. İntraperitoneal sodyum pentobarbitone (40 mg kg^{-1}) uygulaması ile anestezi uygulanmıştır (17). Tırnakla kısırtma yoluyla ekstremitelerden geri çekilme refleksi kontrol edilerek hayvanların anesteziye girip girmediği belirlenmiştir. Genel anestezi altındaki sıçanlar sırt üstü yatırılarak tezgaha sabitlenmiştir. Abdomen bölgesinden açılarak kalp görünür hale getirilmiştir (Resim 4). Enjektör ile ventriküle girilerek vacutainer yardımıyla kan EDTA'lı tüplere alınmıştır (Resim 5). Bu yöntemle deney sonlandırılmış ve sıçanlar dekapite edilmiştir. Alınan kan örnekleri çalışmanın devamında yapılacak biyokimyasal ve genetik analizlerde kullanılmak üzere -80° C 'de saklanmaktadır.



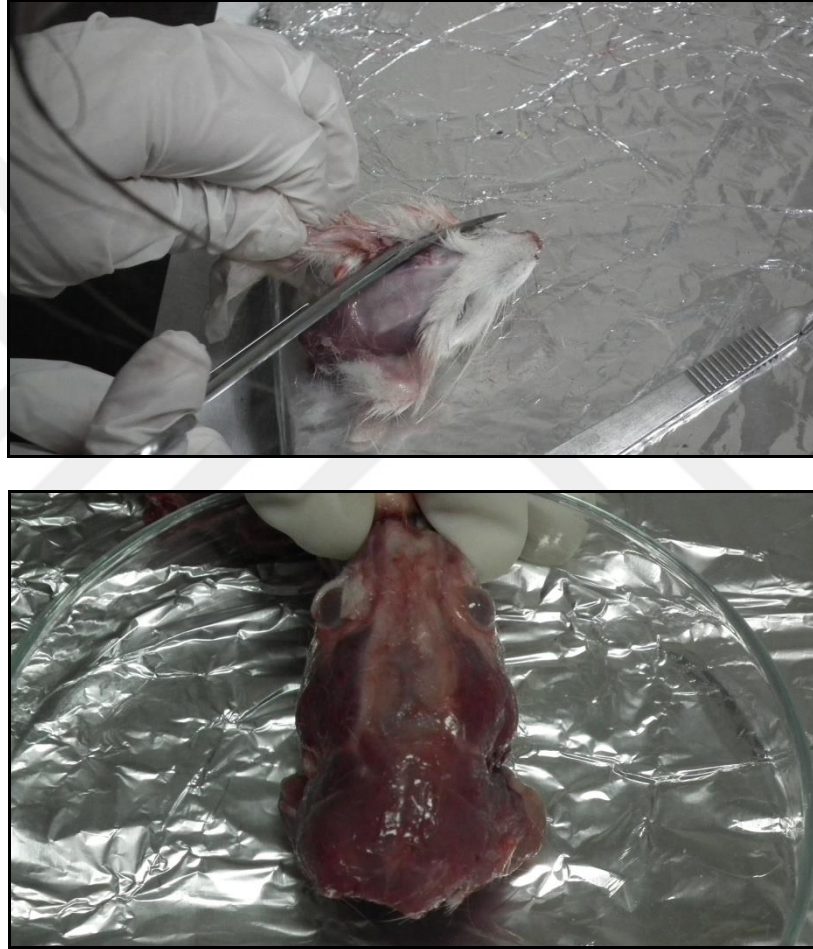
Resim 4: Terminal İtrakardiyak Kan Alımı İçin Abdomenin Açılması



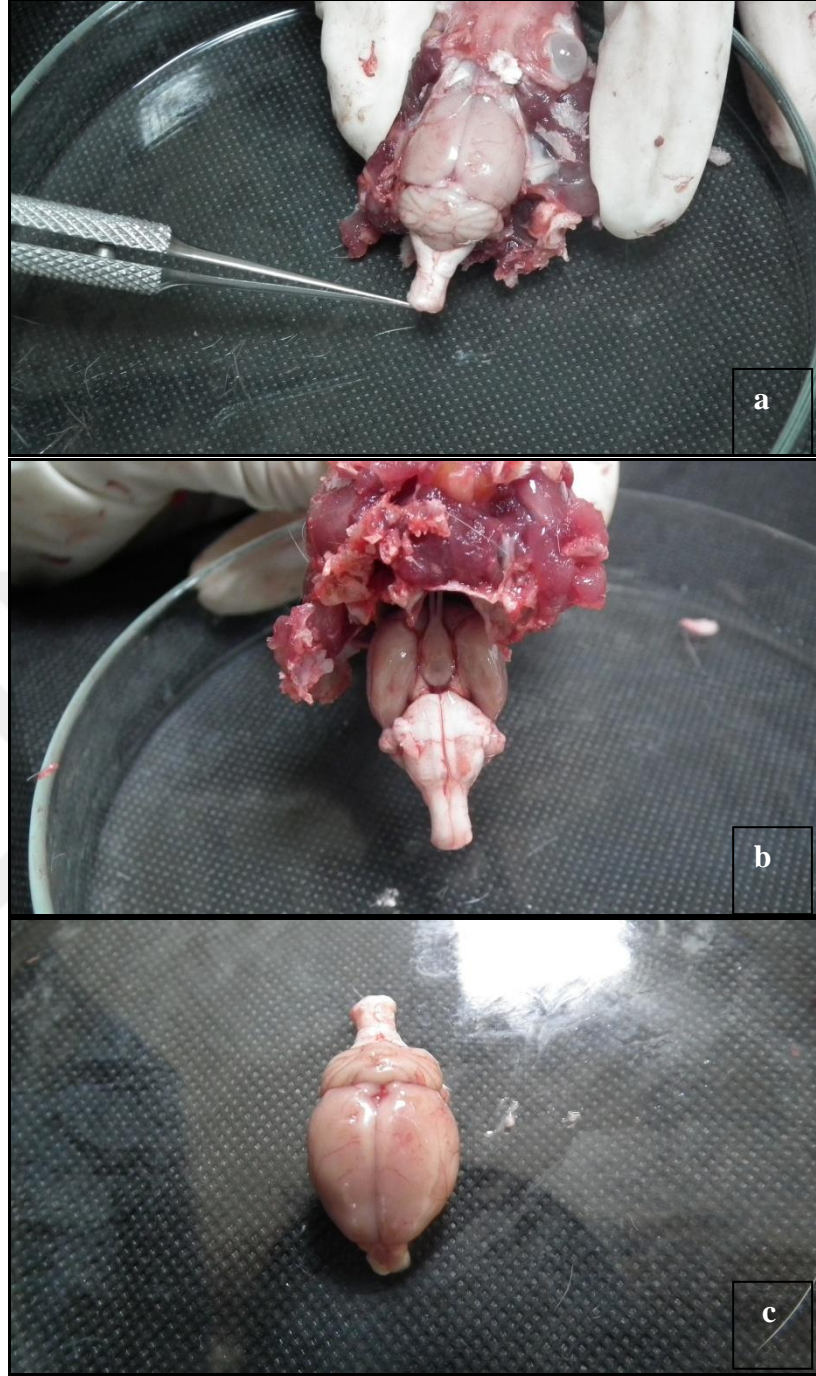
Resim 5: İntrakardiyak Kan Alımı

3.7 Serebellum ve Beyin Sapı BÖlgelerinin Çıkarılması

Buz üzerinde kafatası açılarak beyin çıkarılmış ve daha sonra ilgilenilen hedef bölgeler (serebellum ve beyin sapı) zarar verilmeden çıkartılmıştır (184). Her bir hayvana ait dissekte edilen dokuların sağ tarafları gen ekspresyonu çalışmasında kullanılmak üzere -80°C 'de depolanırken, sol tarafları immunohistokimya çalışmalarında kullanılmak üzere 50 ml'lik idrar kaplarında %10'luk formaldehit çözeltisine konulmuştur (Resim 6, 7 ve 8).



Resim 6: Kafa Derisinin Açılması



Resim7: Kafatasının Açılması ve Beynin çıkarılması a) Foramen Magnum'dan Girilerek Kafatasının Açılması b) Optik Kiazma ve Kranial Sinirler Kesilerek Beynin Kafatası Tabanından Ayrılması c) Beynin Bütün Halde Çıkarılması



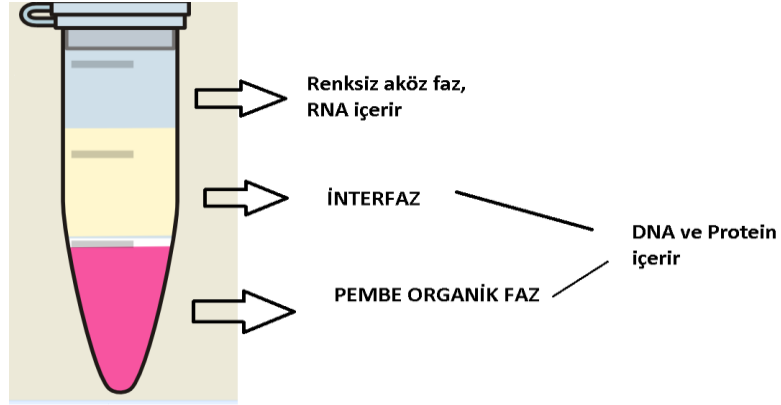
Resim 8: Beyin Sapı ve Serebellumun Birbirinden Ayrılması

3.8 Dokulardan Total RNA İzolasyonu

Tüm doku örneklerinden 50 mg alınarak (pirinç büyüklüğünde) ezilerek ve homojenizatör kullanılarak parçalanıp 2ml ependorf tüplere aktarıldı ve aşağıdaki süreç izlendi:

- Tüplere 1 ml tripure eklenir ve tüpler 45 saniye vortekslenir. Böylece tüpteki hücreler homojen bir görünüm alarak parçalanır ve tripure reagent etkisiyle de pembe bir renk görünümünü alır.
- Vortekslenen tüpler buza alınır ve 2 dakika bekletilir. Vortekste o hızın ve sürenin etkisiyle ısınan tüpleri soğutmak için bu işleme başvurulur.
- 5 dakika oda ısısında bekletilir.
- Tüplere 200 ul kloroform eklenir ve 5 dak beklenir.
 - ❖ Kloroform; homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlar. Böylece RNA, DNA ve protein elde edilir.
- 12.000 rpm' de 4 C ' de 20 dakika santrifüj yapılır.
- Santrifüj sonunda 3 faz oluşur.
 - ❖ 1.FAZ (Sulu faz): RNA içerir. (Renksizdir.)

- ❖ 2.FAZ: DNA içerir. (beyaz renklidir.)
- ❖ 3.FAZ (Organik faz): Protein içerir. (Şekil 14)

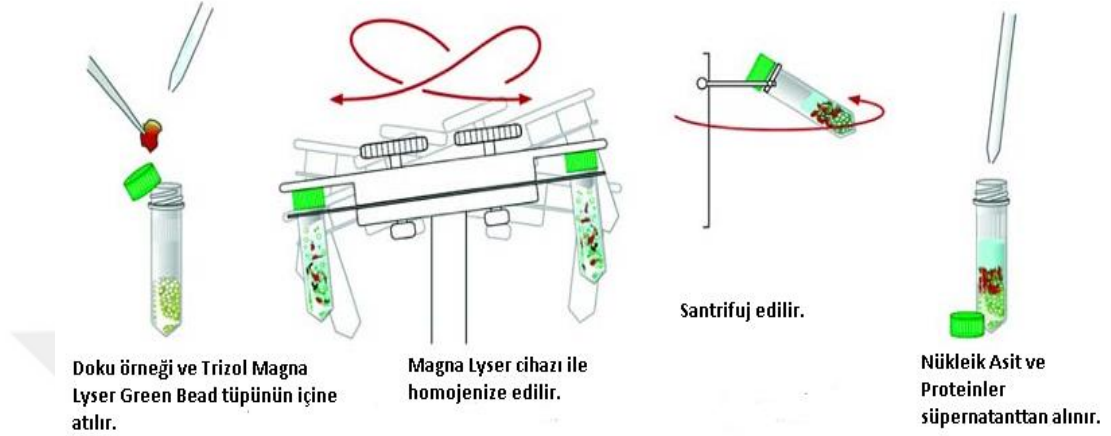


Şekil 14: Trizol Yönteminde Santrifügasyon Sonrası Oluşan 3 Fazın Gösterilmesi

- RNA izolasyonu için renksiz olan 1. faz yeni tüpe aktarılır
- Yeni tüpe 500 ul izopropanol eklenir. Oda ısısında 10 dakika inkube edilir.
- İzopropanol RNA' yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanılır.
- 12.000 rpm' de 4 C' de 10 dak santrifüjlenir. Süpernatant atılır.
- Oluşan çökelek üzerine 1 ml %75 EtOH eklenir.
- 7.500 x g' de 4 C' de 5 dak santrifüjlenir.
- Santrifüj sonunda süpernatant atılır.
- 57 C' de EtOH uçurulur.
- Kalan çökeleğe 50-100 ul RNase free su eklenerek pipetaj yapılır.

RNase-free su kullanılır. İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçülür. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlenir. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edilip, ideal saflıktaki kaliteli RNA'nın A260/A280 absorbans oranının 1,8-2,0 olması beklenmektedir. Spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA degradasyonunun kontrolü agaroz jel elektroforeziyle gerçekleştirilebilir. Genel olarak reaksiyon başına 5ng total RNA'nın ortalama düzeyde ifade edilen mRNA tespitinde yeterli olacağı düşünülmektedir. Buna bağlı

olarak gen ifadesi bakılacak materyalin özelliğine bağlı olarak RNA miktarı reaksiyon başına 5ng ile 5 µg arasında alınmalıdır. Bu aşamada elde ettiğimiz mRNAların degrade olmasını engellemek için, örnekler -80 derecede saklandı.



Şekil 15: MagnaLyser ile Doku Homojenizasyonu Prosedürü



Resim 9: MagnaLyser Cihazı

3.9 RNA'dan Komplementer DNA Sentezlenmesi

cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (roche; 04379012001) kullanılmıştır. Her örnek için RNA+H₂O'dan 11 konur ve 2 µl Random hexamer primer (vial 6) eklenir.

Tek Reaksiyon için

Reaction Buffer (vial 2)	4 µl
Protector RNase Inhibitor (vial 3)	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix (vial 4)	2 µl
<u>Transcriptor Reverse Transcriptase (vial 1)</u>	<u>0,5 µl RNA örneği</u>
	11 µl
<u>Random hexamer primer (vial 6)</u>	<u>2 µ</u>
Toplam	13 µl

Tüpler thermalcycler cihazına yerleştirilir.65 °C' de 10 dk RNA lar denatüre edilir.

Bu arada mastermix hazırlanır.(Bu miktarlar örnek sayıyla çarpılarak hazırlandı)

Toplam **7 µl**

Thermalcycler'dan alınan örnekler soğutma kabına yerleştirilir.

Her tüpe 7 µl hazırlanan karışımdan dağıtılır ve pipetle 3-4 kez karıştırılır.

Tüpler thermal cycler'a yerleştirilir ve aşağıdaki hazırlanmış program çalıştırılır.

- ✓ 25 °C 'de 10 dk
- ✓ 50 °C'de 60 dk
- ✓ 85 °C'de 5 dk
- ✓ °C'de bekleme

3.10 Hedef Genlere Ait Primer ve Probe'ların Dizaynı ve Sentezi

Primer dizaynı için hedef genler ve housekeeping gen olarak ActB (Aktin Beta) gen bölgeleri NCBI ve ensemble gen bankaları kullanılarak belirlendi. Bu iki fragmentin cDNA sekansları aynı zamanda normal bölgeleri kullanarak da primer ve probe dizaynı edildi. Primer probe dizaynı clustal W aling programı ve oligo7 software kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen primer ve probe'lar blast programı ile spesifikliğı kontrol edilmiştir.

Tablo 1: Oligonükleotid Sentez Raporu

Oligo adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz Sayısı	Safılık	MA (g/mol)	Tm (°C)	GC (%)	OD 260 nm	Nmol
XIAP F	TATACTCATTA CAAGGAGC	21	STD	6438	54.0	38.1	12.63	51.4
XIAP R	TGGCTTCCAATC CGTGAG	18	STD	5491	56.0	55.6	9.65	51.2
DIABLO F	TCGAAGCCATC ACCGAGTAT	20	STD	6086	57.3	50.0	11.21	50.8
DIABLO R	ATCACCTGC CACACCTCA TC	20	STD	5942	59.4	55.0	11.61	58.2
ACTN F	CCCAGATCATGT TTGAGACCT	21	STD	6381	57.9	47.6	10.75	48.0
ACTN R	AGGCATACAGG GACACACA	20	STD	6153	57.3	50.0	13.51	55.6

3.11 Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile mRNA Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Elde edilen cDNA'lar, yukarıda belirtilen primerler, probelar ve katalog numaraları kullanılarak aşağıdaki karışımlar, cihaz protokolleri ve Light Cycler 480II cihazı ile çalışılmıştır.

Tablo 2: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Thermal Cycler Cihaz Protokolü

Program	Denaturasyon	Amplifikasyon			Cooling
Parametre					
Analiz modu	Yok	Kuantifikasyon modu			Yok
Döngü	1	50			1
Hedef [°C]	95	95	40	72	40
Süre	10 dk	10 dk	30 sn	1 sn	30 sn
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20	20
Acquisition Mode	Yok	Yok	Yok	Tek	Yok

Hedef Genlere Ait Karışımın Hazırlanışı:

Tek Reaksiyon için

Nükleaz Free su	6.8 µl
Forward Primer(20uM)	0,5 µl
Reverse Primer(20uM)	0,5 µl
Taqman Probe-UPL probe (10uM)	0,2 µl
Enzim ve dNTP karışımı	10 µl

Toplam	18 µl
---------------	--------------

ACTB Karışımının Hazırlanışı;

Tek Reaksiyon için

Nükleaz Free su	7.0 µl
-----------------	--------

Primer-Probe Karışımı	1.0 µl
-----------------------	--------

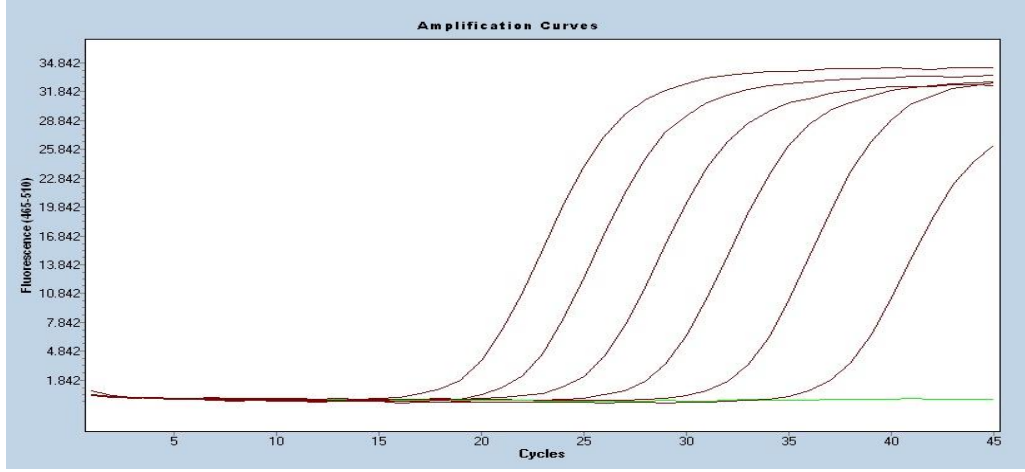
Enzim ve dNTP Karışımı	10 µl
------------------------	-------

Toplam	18 µl
---------------	--------------

- ✓ Reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden eklenir ve reaksiyon sayısı kadar konulup, reaksiyon karışımı hazırlanır.
- ✓ Karışım spin ettirilir ve kapilerlere yada plate'lere her bir reaksiyon için 18 µl reaksiyon karışımından transfer edilir.
- ✓ 2 ul örnek veya kontrol her bir kapilere son reaksiyon hacmi 20 ul olacak şekilde ilave edilir.
- ✓ Hazırlanan kapilerler (karışım ilave edildikten sonra) soğuk bloktaki adaptörleri ile birlikte 2000 rpm' de 15 saniye santrifüjlenir.

3.12 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Yöntemi ile Ekspresyon Düzeylerinin Rölatif Hesaplanması

Elde edilen sonuçlar relatif kantitasyon yapılabilmek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılır. Bu metod ile hedef gen CT değerleri ACTB ile normalize edilir (bu değer ΔCt olarak geçer) ve gruplar arasında oranlanarak elde edilen sonuç $\Delta\Delta Ct$ 'yi verir (119).



Şekil 16: Amplifikasyon Eğrilerinde Cycling Threshold (CT) Değerlerinin Gösterilmesi

3.13 İmmunohistokimya Çalışmaları

3.13.1. Doku Takip İşlemleri

Alınan doku örnekleri % 4'lük formaldehit içeren şişelere konularak aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu.

Akarsuda yıkama (24 saat)

Dehidratasyon işlemi:

- ✓ %70'lik Alkolde 24 saat,
- ✓ %80'lik Alkolde 1 saat,
- ✓ %96'lık Alkolde 1 saat,
- ✓ %100'lük Alkolde 1 saat bekletildi.

Şeffaflştırma işlemi:

- ✓ Ksilende 10 dakika,
- ✓ Ksilende 10 dakika bekletildi.

İnfiltrasyon işlemi:

- ✓ Ksilin + paraplast karışımında 60°C'lik etüvde 1 saat,
- ✓ Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 1 saat,
- ✓ Paraplast içerisinde 60°C'lik etüvde 2 saat bekletildi.

3.13.2 Dokuların Parafin Bloklara Gömülme İşlemi:

Dokular paraplast bloklara gömülerek kesit alınması işlemine hazır hale getirildi.

3.13.3 Blokların Kesilmesi:

Paraplast bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT, Nussloch; Germany) ile kesilen 5 µm'lik kesitler cam lamlar üzerine alındı.

3.13.4 İmmünohistokimyasal İşlemler:

İmmünohistokimyasal değerlendirme için yukarıda belirtilen yöntemler ile hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler Avidin-Biotin (ABC) metodu kullanılarak Anti-HMGB1 (Abcam®, Rabbit polyclonal antibody, 1/50 dilüsyon) antikoruna ile boyandı. Boyama işlemleri aşağıda özetlendiği gibi yapıldı.

Tablo 3: İmmünohistokimya Protokolü

1.	Ksilen	2 x 30 dk
2.	%100 Alkol	2 dk
3.	%96 Alkol	2 dk
4.	%80 Alkol	2 dk
5.	Distile Su	2 x 3 dk
6.	% 10 H ₂ O ₂ (in dH ₂ O) *Endojen Peroksidaz aktivitesini durdurmak için uygulandı	15 dk
7.	PBS ile Yıkama	2 x 5 dk

8.	Tripsin	15 dk
9.	Antikor Dilüsyonu * Anti PI3K, anti Akt, anti Bcl-2, anti BIM1 antikorunu, antibody dilüent (SC 1618, SC 48644, SC 492, SC 8267) ile 1/100 oranında seyreltildi.	2 saat
10.	Primer antikor ile İnkübasyon * Preparatlar nemli ortamı sağlayan bir kap içerisine yerleştirilerek +4°C'de bekletildi ve primer antikorun bağlanması sağlandı. (SC 1618, SC 48644, SC 492, SC 8267)	1 gece
11.	PBS ile Yıkama	3 x 5 dk
12.	Sekonder Antikor * Preparatlar biotinlenmiş sekonder antikor ile oda sıcaklığında inkübe edildi.	30 dk
13.	PBS ile Yıkama	3 x 5 dk
14.	Streptavidin Peroxidase *Streptavidin-HRP ile preparatlar oda sıcaklığında inkübe edildi.	20 dk
15.	PBS ile Yıkama	4 x 1 dk
16.	Substrat-Kromojen (DAB) *Preparatlar DAB substrat-kromojen solüsyonunda kahverengi renk alınca kadar tutuldu	30 dk
17.	PBS ile Yıkama	3x5 dk
18.	Zıt boyama * Boyama öncesinde preparatlar distile su içinde 5 dakika tutuldu. Daha sonra Mayer-Hemotoksilen ile 30	

	saniye zıt boyama yapıldı. (Bu işlem süresince dokular mikroskopta incelendi, eğer çekirdekler yeteri kadar mavileşmemiş ise tekrar hematoksilene alındı ya da amonyaklı suya batırılarak fazla boyanmış çekirdeklerin boyası solduruldu).	
19.	PBS ile yıkama	3 x 5 dk
20.	Alkol Serilerinden Geçirilmesi	
	%70 Alkol	2 dk
	%80 Alkol	2 dk
	% 96 Alkol	2 dk
	%100 Alkol	2 dk
21.	Havada kurut	15-20 sn
22.	Ksilen * Kapatma medyumundan 1 damla damlatılarak lamel ile kapama yapılır.	2 - 30 dk

3.13. 5 Kesitlerden Görüntü Elde Edilmesi:

İncelemeye hazır hale gelen kesitler Olympus BX 43 (Olympus, Tokyo; Japan) marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi.

Alınan dokular ayrıca, anti-PI3K, anti-Akt, anti- Bcl-2 ve anti- BIM1 primer antikoları için indirekt immünohistokimyasal yöntemle boyandı. İmmünoreaktivite şiddeti; hafif (+), orta (++), şiddetli (+++) ve çok şiddetli (++++) olarak skorlandı.

3.14 İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama \pm standart hata olarak belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri ANOVA testi ile belirlendi. $p < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1 Hayvanlarda Vücut Ağırlığı Takibi Sonuçları

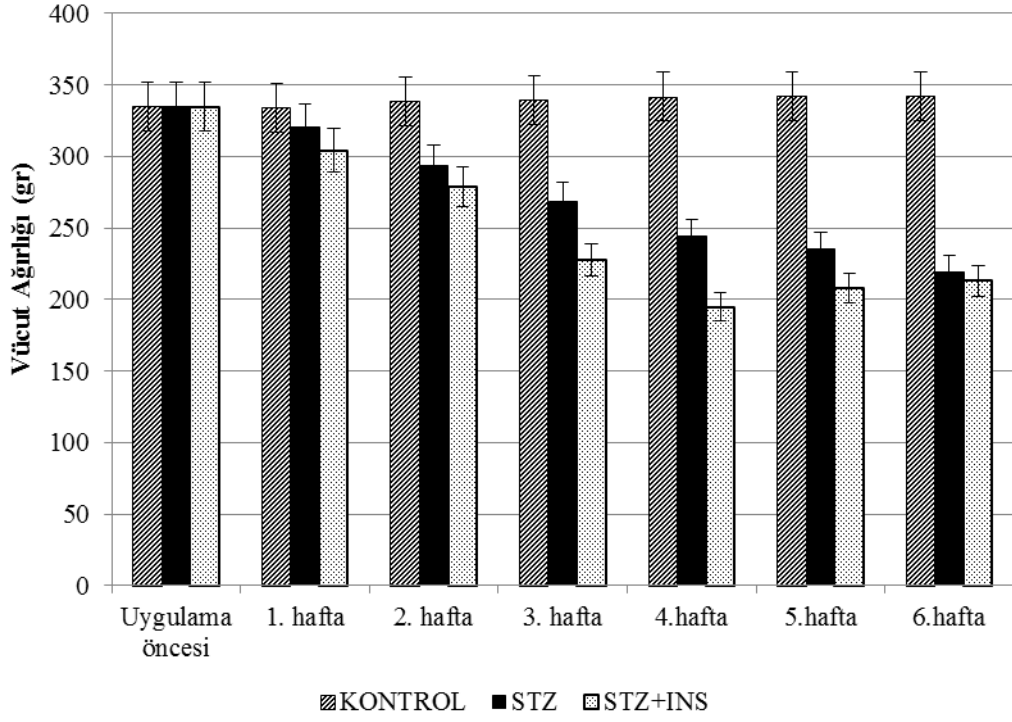
Tek doz intraperitoneal 45 mg kg⁻¹ STZ uygulaması yapılan sıçanlarda 6 hafta boyunca kilo kaybı gözlenmiştir. STZ uygulanan sıçanlar her hafta bir önceki haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kilo kaybetmişlerdir. 4. ve 5. haftada insulin uygulanan sıçanlarda ise kilo kaybının durduğu ancak kilo artışının gözlenmediği görülmektedir. İnsulin uygulamasından önceki haftalara göre insulin uygulanan haftalardaki vücut ağırlığı istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (Tablo 4 ve Şekil 17,18).

Tablo 4: STZ Uygulanan Sıçanlarda Vücut Ağırlığında (g) Gözlenen Değişimler

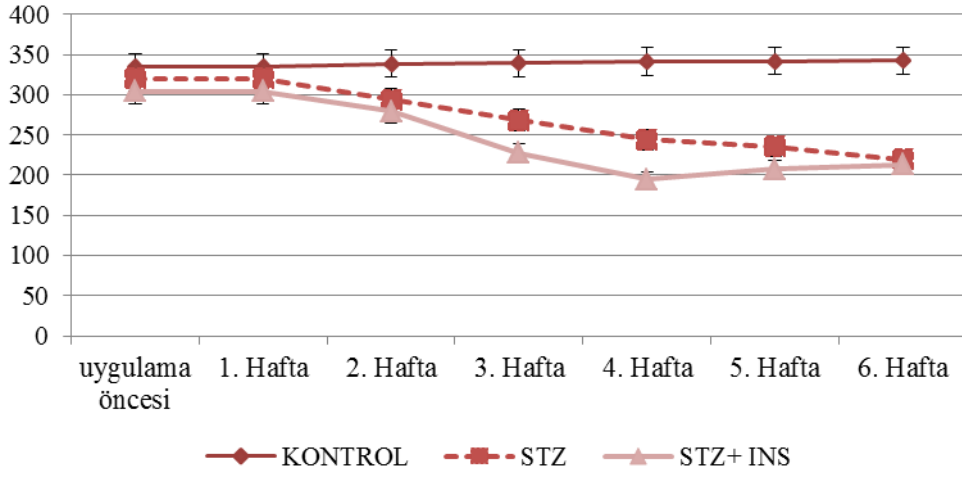
	KONTROL n=7	STZ n=7	STZ+INS n=7
STZ Uygulaması Öncesi	334,83± 28,82	320,57 ±13,71	304 ± 15,57
1. Hafta	334,83 ± 28,82	320,57 ±13,71	304 ±15,57
2. Hafta	338,67±23,59	293,57± 20,59ab	279,46 ±44,7ab
3. Hafta	339,66 ±26,77	268,57 ± 34ab	227,8 ±27,62ab
4. Hafta	341,6 ±28,91	244 ±34,5b	194,8 ± 29,14ab
5. Hafta	341,83 ± 29,19	235,28 ±34,23ab	207,6 ± 24,5ab
6. Hafta	342,33 ±28,64	219,57 ±29,33ab	213,2 ±16,9ab

a: Kontrole göre p<0,05

b: STZ Uygulaması öncesine göre p<0.05



Şekil 17: Haftalık Vücut Ağırlığı (gr) Takibinin Sütun Grafiği ile Gösterilmesi



Şekil 18: Haftalık Vücut Ağırlığı (gr) Takibinin Çizgi Grafiği ile Gösterilmesi

4.2. Açlık Kan Şekeri Düzeylerine Dair Bulgular

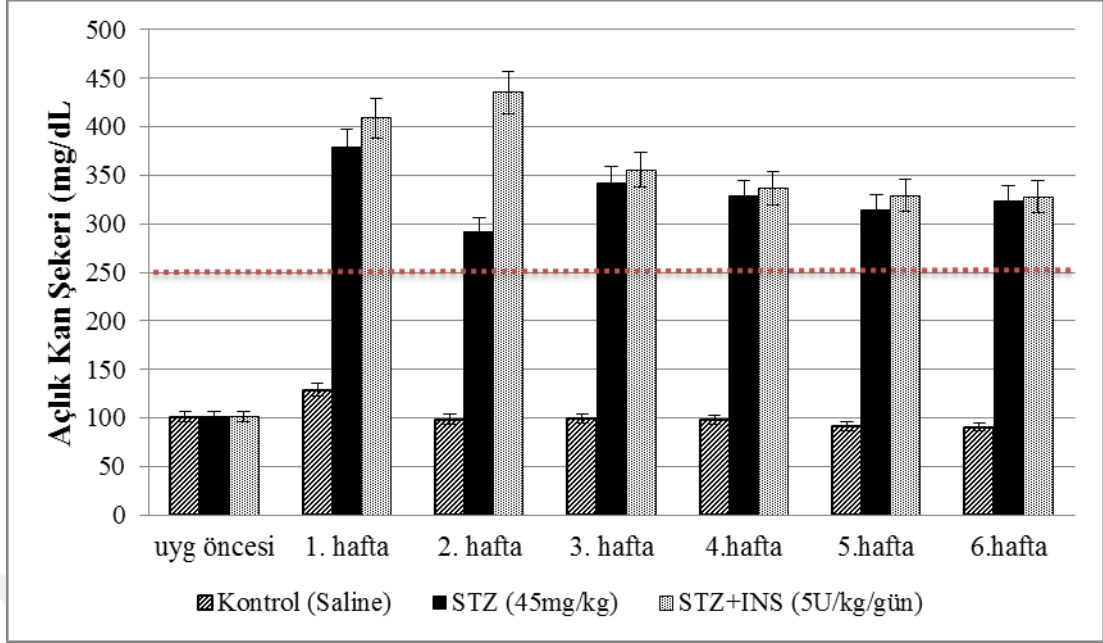
Tek doz intraperitoneal 45 mg kg⁻¹ STZ uygulaması yapılan sıçanlarda 72 saat sonra açlık kan şekeri düzeylerinin 250 mg/dL'nin üzerine çıktığı gözlenmiştir. 6 hafta boyunca sıçanların bu hiperglisemik durumu koruduğu gözlenmiştir. 5U kg⁻¹ gün⁻¹ subkutan insulin uygulaması yapılan son iki hafta boyunca açlık kan şekeri düzeyi ilk 4 haftaya göre düşmüş ancak yine de hiperglisemik koşul bozulmayacak şekilde 250 mg/dL'nin altına düşmemiştir. STZ uygulanan hayvanlarda açlık kan şekeri düzeyleri kontrole ve STZ uygulaması öncesi değerlere göre anlamlı bir artış gözlenirken; İnsulin uygulanan hayvanlarda açlık kan şekeri düzeyi daha ılımlı seviyelere inmiştir (Tablo 5, Şekil 19).

Tablo 5: STZ Uygulanan Sıçanlarda Haftalara Ait Açlık Kan Şekerinde (mg/dL) Gözlenen Değişimler

	KONTROL n=7	STZ n=7	STZ+INS n=7
STZ Uygulaması Öncesi	101,02 ±15	101,02±15	101,02±15
1. Hafta	128,8±28,4	378,57±70,8a,b	408,8±35,38a,b
2. Hafta	98,3±18,7	291,4 ±69,3a,b	435,6 ±71,6a,b
3. Hafta	99,3±11,9	342,28±74a,b	355,8±106,75a,b
4. Hafta	97,8±12,92	328,4±80,30a,b	336,8±74,39a,b
5. Hafta	91,1±6,11	314,3±60,55a,b	329,4±69,75a,b
6. Hafta	90,6±7,5	322,9±45,11a,b	327,8±51,85a,b

a: Kontrole göre p<0,05

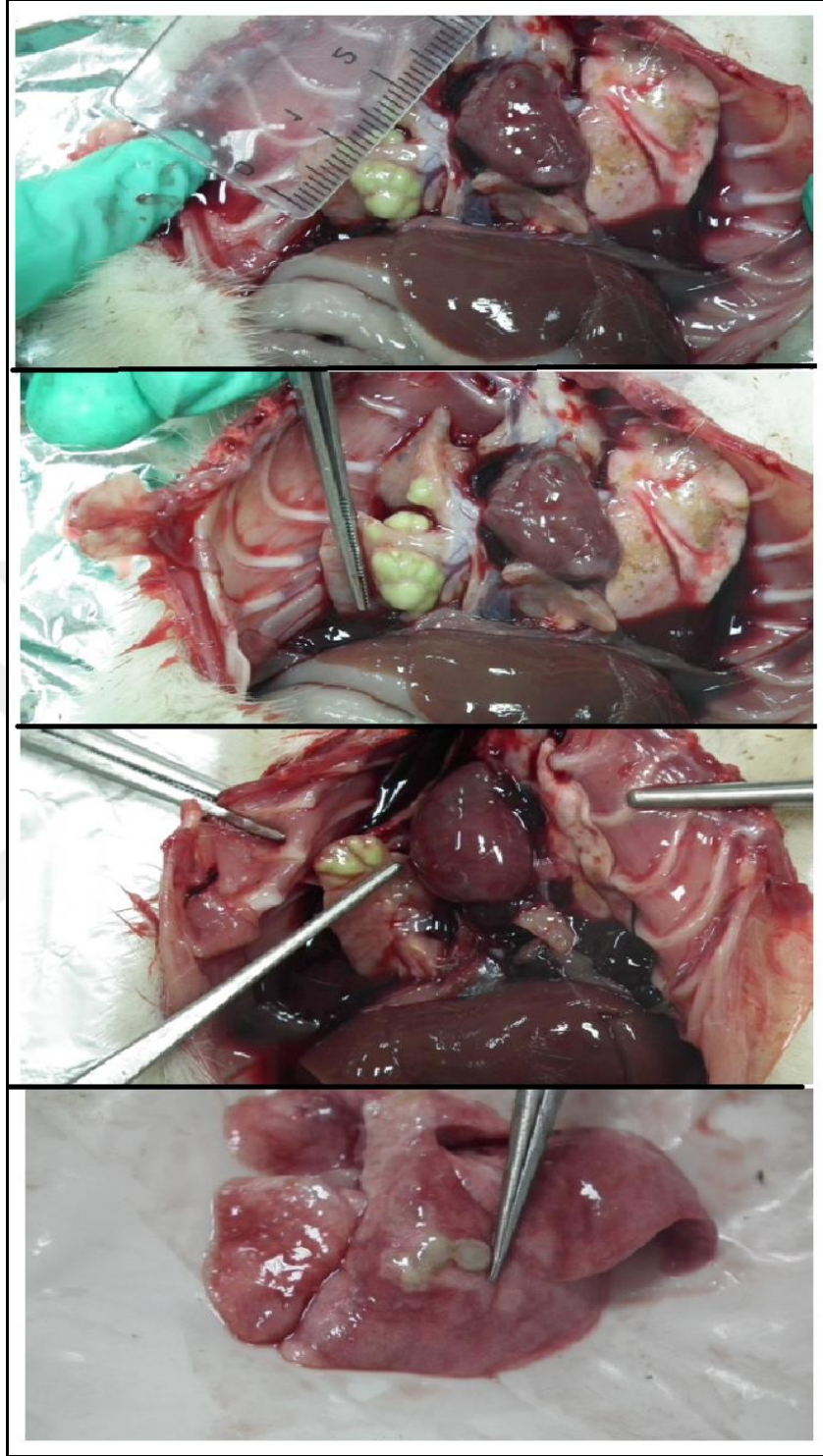
b: STZ Uygulaması öncesine göre p<0.05



Şekil 19: STZ Uygulaması Öncesi ve Sonrası Haftalık Açlık Kan Şekeri Düzeyleri Değişimi

4.3 Organlardaki Gözlenen Morfolojik ve Patolojik Değişimlere Dair Bulgular

6 haftalık deney süreci sonlandırıldığında STZ uygulanan hayvanların organlarında patolojik değişiklikler gözlenmiştir. Resim10 ve 11’de gösterildiği gibi özellikle akciğer ve böbrekte gözle görülür kitle ve lezyonlar saptanmıştır. Buradan STZ’nin 6 haftalık kronik etkisinin organlar üzerinde hasar oluşturduğu görülmektedir. Bu doku ve organlar patolojik incelemeler için depolanmıştır.



Resim 10: STZ Uygulanan Sıçanların Akciğerlerinde Meydana Gelen Kitle ve Lezyonlar



Resim 11: STZ Uygulanan Sıçanların Böbreklerinde Gözlenen Kitle ve Lezyonlar

4.4 Serebellum ve Beyin Sapında XIAP ve Smac/DİABLO Geninin mRNA Ekspresyonlarına Dair Bulgular

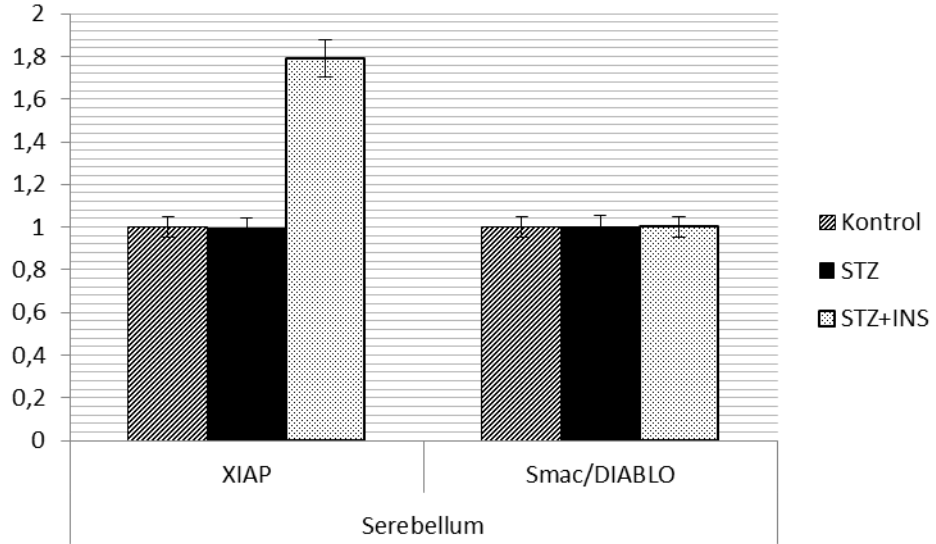
Yapılan gen ekspresyonu çalışmalarında Real-Time PCR yöntemi kullanılmış ve hedef genlerin ekspresyonları kontrol grubuna göre ve internal kontrol gene (β -Aktin) göre relatif olarak hesaplanmıştır. Şekil 20 ve Tablo 6'da görüldüğü üzere XIAP mRNA ekspresyonu serebellum ve beyin sapı bölgelerinde STZ uygulanan grupta değişmezken; insulin uygulanan grupta anlamlı şekilde artmıştır. İnsulin antiapoptotik bir molekül olan XIAP'nin mRNA ekspresyonunu pozitif yönde etkilemektedir. Apoptozisi teşvik eden Smac/DIABLO proteininin mRNA düzeyi ise serebellumda STZ uygulaması ya da Insulin uygulamasından etkilenmezken; Beyin sapında STZ uygulaması sonrası apoptotik Smac/DIABLO gen ekspresyonu anlamlı bir artış göstermiş ve uyumlu olarak insulin uygulaması ise bu genin ekspresyonunu anlamlı düzeyde azaltmıştır (Şekil 21 ve Tablo 6).

Tablo 6: Uygulama Yapılan Sıçan Gruplarının Beyin Sapı ve Serebellum Bölgelerine Ait XIAP ve Smac/DIABLO mRNA ekspresyonlarının gösterilmesi

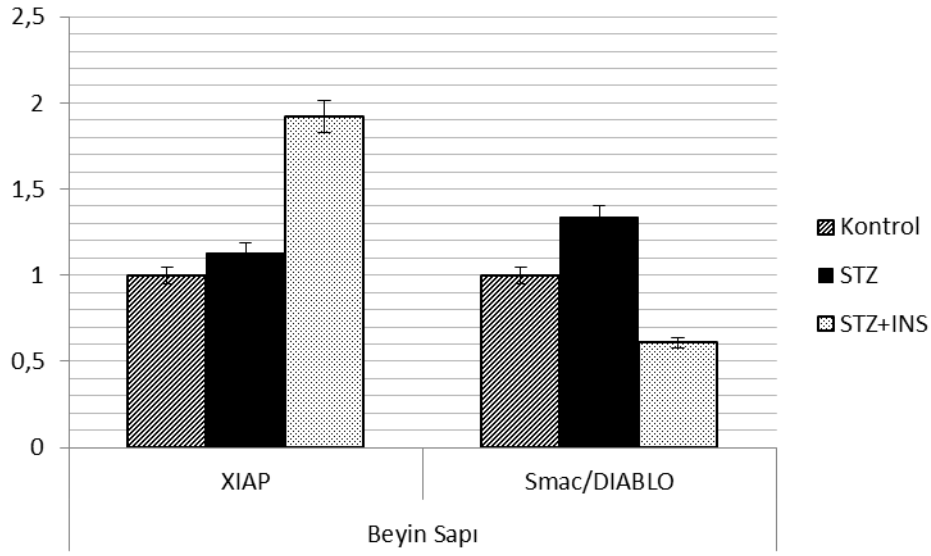
	XIAP		Smac/DIABLO	
	Serebellum	Beyin Sapı	Serebellum	Beyin Sapı
Kontrol	1,000	1,000	1,000	1,000
STZ	0,992±0,23	1,130±0,40	1,002±0,21	1,335±0,17a
STZ+INS	1,791±0,48a,b	1,921±0,57a,b	1,001±0,13	0,608±0,34a,b

a: Kontrole göre $p<0,05$

b: STZ'ye göre $p<0,05$



Şekil 20: Sıçan Beyni Serebellum Bölgesine Ait XIAP ve Smac/DIABLO mRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta\Delta CT}$)



Şekil 21: Sıçan Beyni Beyin Sapı Bölgesine Ait XIAP Smac/DIABLO mRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

4.6 Serebellum ve Beyin Sapında Akt, PI3K, Bcl-2 ve BIM1 Proteinlerine Ait İmmunohistokimya Çalışmalarına Dair Elde Edilen Bulgular

Şekil 22 ve Tablo 7’de görüldüğü üzere serebellumda hücre sağ kalım yolağına ait markerlardan Akt immunoreaktivitesi STZ uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. STZ+INS uygulanan grupta ise STZ uygulanan grupla karşılaştırıldığında bir değişiklik gözlenmemiştir. STZ uygulaması serebellumda Akt ekspresyon düzeyini azaltırken insulinin bu durumu iyileştirici yönde bir etkisi saptanmamıştır.

Yine serebellumda PI3K immunoreaktivitesi Akt’ye benzer şekilde STZ grubunda kontrole göre anlamlı düzeyde azalmıştır. İnsulin uygulanan (STZ+INS) grupta PI3K kontrole göre azalırken, STZ+INS grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. STZ uygulaması PI3K’yı azaltırken, insulin uygulaması bu durumu iyileştirici bir etki göstermemiştir.

Antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 düzeyi ise serebellumda STZ uygulanan grupta kontrole karşılaştırıldığında azalmış, STZ+INS uygulanan grupta ise STZ

grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bcl-2'nin ekspresyon düzeyi üzerine STZ'nin negatif etkisi varken insulinin bu doz itibarıyla etkisi olmamıştır.

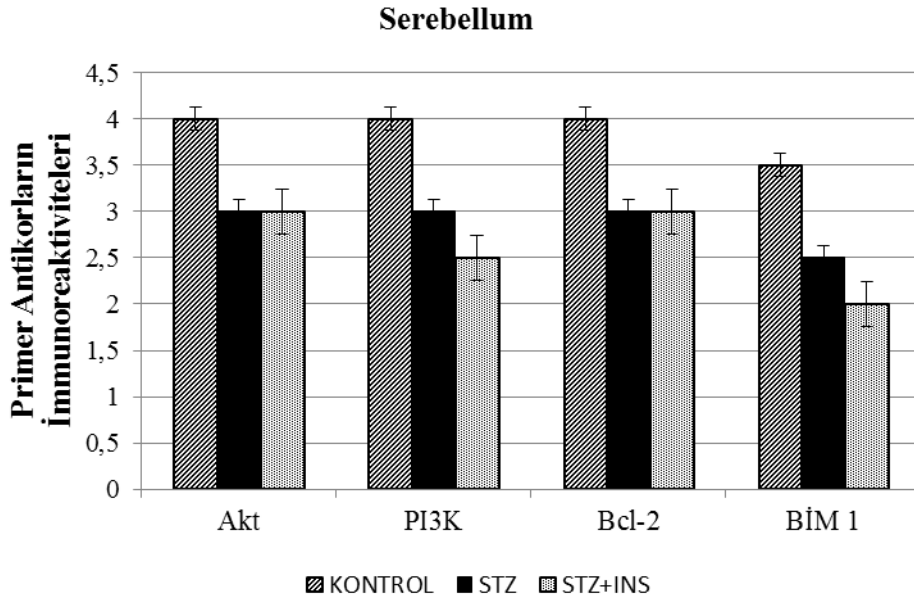
Apoptotik bir protein olan BİM-1 ise STZ uygulaması sonrası kontrole karşılaştırıldığında azalırken, STZ+INS uygulanan grupta hem kontrole hem de STZ grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. İnsulin uygulamasının apoptotik BİM-1 proteininin ekspresyonunu azalttığı görülmektedir (Resim 12).

Tablo 7: Sıçan Beyni Serebellum Bölgesindeki Akt, PI3K, Bcl-2 ve BIM1 Proteinlerinin Düzeyleri

Serebellum (n=7)	Akt	PI3K	Bcl-2	BIM-1
KONTROL	++++	++++	++++	+++ /++++
STZ	+++ a	+++ a	+++a	++ /+++ a
STZ +İNS	+++ a	++ /+++ a	+++ a	++ a,b

a: Kontrole göre $p < 0,05$

b: STZ'ye göre $p < 0,05$



Şekil 22: Sıçan Beyni Serebellum Bölgesindeki Akt, PI3K, BIM1 ve Bcl-2 Proteinlerinin Düzeyleri

Tablo 8: Sıçan Beyni Beyin Sapı Bölgesindeki Akt, PI3K, BIM1 ve Bcl-2 Proteinlerinin Düzeyleri

Beyin Sapı (n=7)	Akt	PI3K	Bcl-2	BIM-1
KONTROL	++++	++++	+++	+++ /++++
STZ	++ a	++ a	++ a	++ /+++ a
STZ +İNS	+++ a,b	++ /+++ a	+ /+++ a	++ a

a: Kontrole göre $p < 0,05$

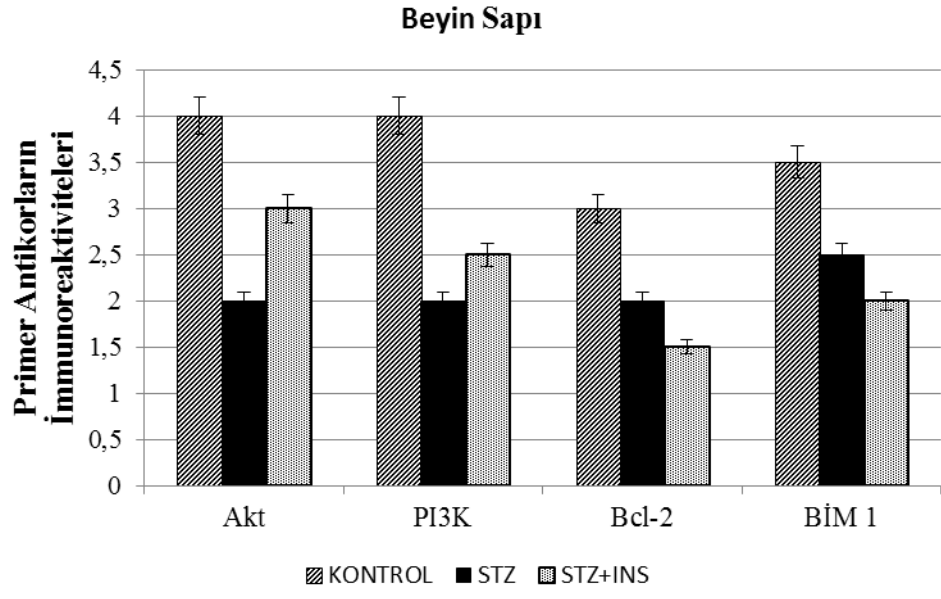
b: STZ'ye göre $p < 0,05$

Şekil 23 ve Tablo 8'de gösterildiği gibi beyin sapında Akt düzeyi STZ uygulanan grupta kontrole göre anlamlı düzeyde azalmıştır. STZ+İNS uygulanan grupta ise Akt düzeyi STZ uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde artmıştır.

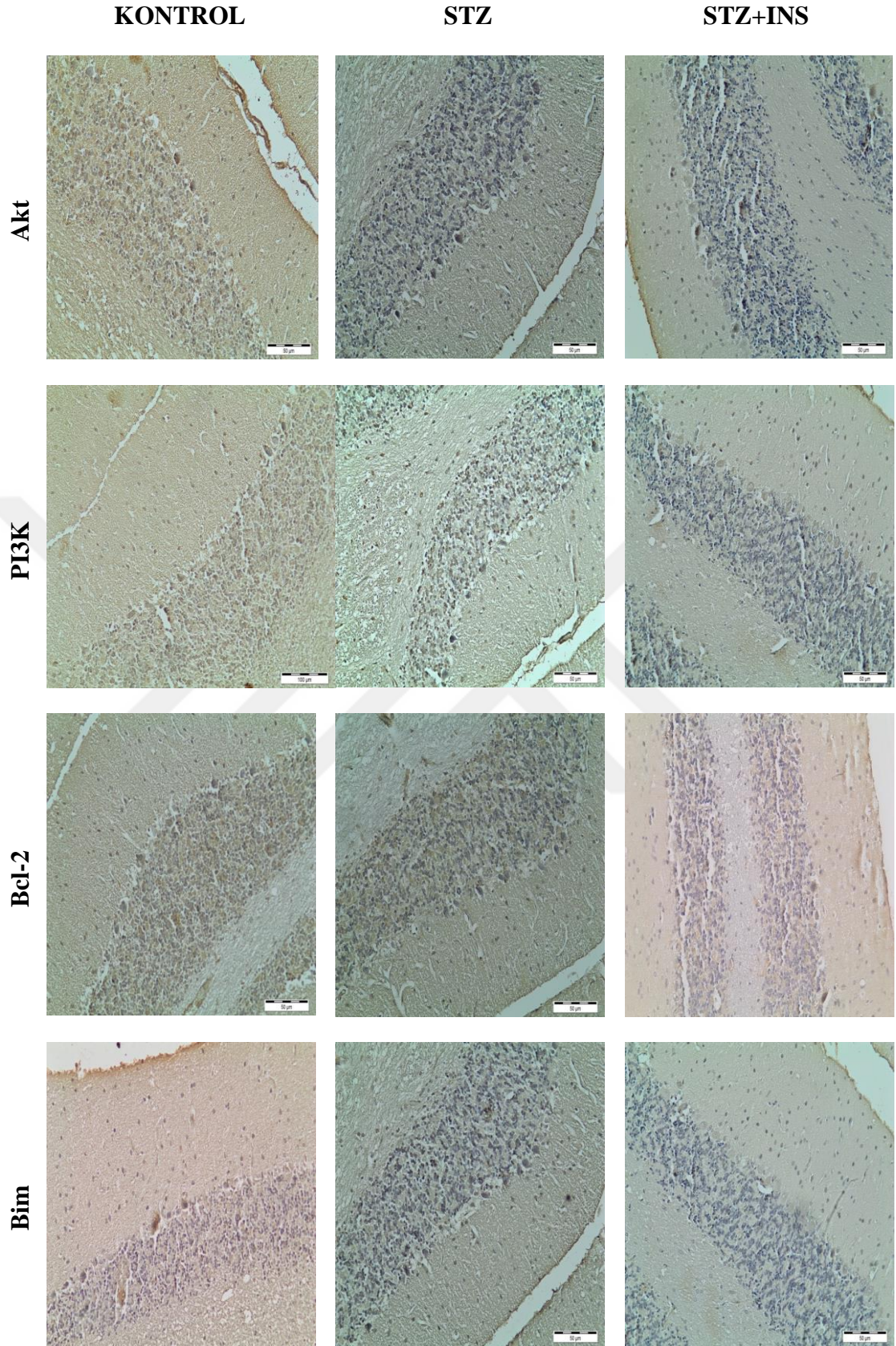
Yine beyin sapında insulin sinyal yolağının diğer bir bileşeni olan PI3K düzeyi STZ uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış, STZ+İNS uygulanan grupta STZ uygulanan gruba göre artmış ancak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 düzeyi ise beyin sapında STZ uygulanan grupta kontrole karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azalmış, STZ+İNS uygulanan grupta ise STZ grubuyla karşılaştırıldığında azalmış ancak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

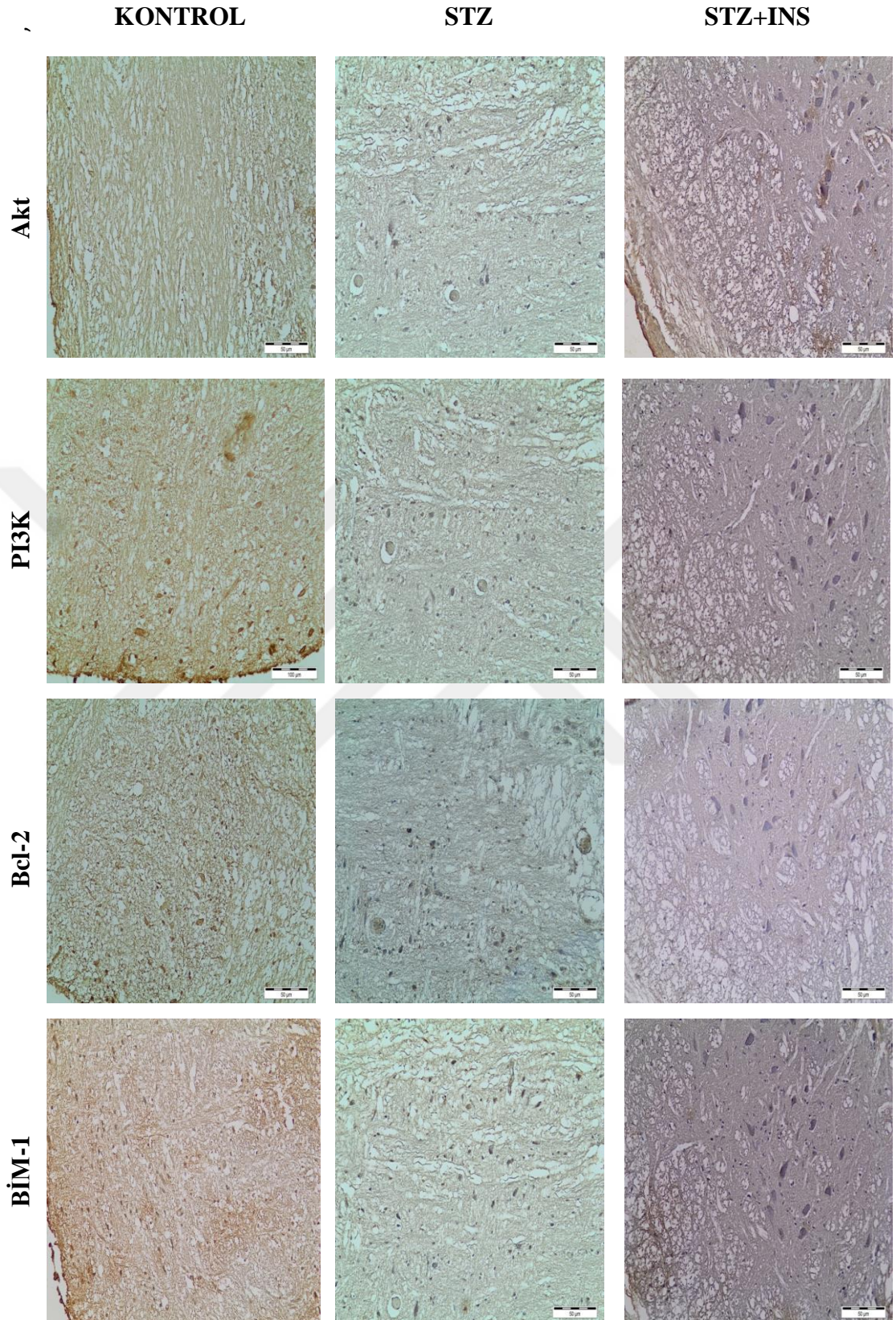
Apoptotik bir protein olan BIM-1'in beyin sapındaki düzeyi ise STZ uygulaması sonrası kontrole karşılaştırıldığında azalırken, STZ+İNS uygulanan grupta kontrole ve STZ grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Insulin uygulamasının BIM1 protein ekspresyonu üzerinde negatif etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Resim 13).



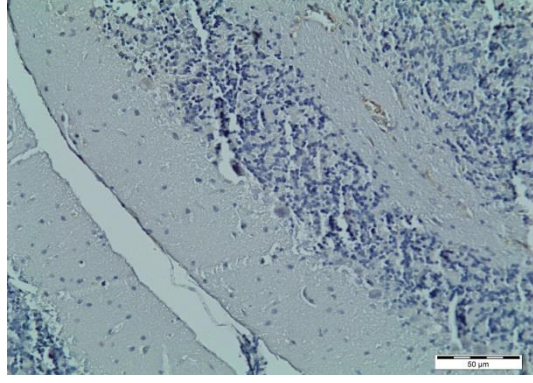
Şekil 23: Sıçan Beyni Beyin Sapı Bölgesindeki Akt, PI3K, BIM1 ve Bcl-2 Proteinlerinin Düzeyleri



Resim 12: Serebellumda Akt, PI3K, Bcl-2 ve BİM-1 Primer Antikorlarının İmmunohistokimyasal Boyanması (x200).



Resim 13: Beyin Sapında Akt, PI3K, Bcl-2 ve BİM-1 Primer Antikorlarının İmmunohistokimyasal Boyanması (x200).



Resim 14: Serebellum ve Beyin Sapında Akt, PI3K, Bcl-2 ve BİM-1 Primer Antikorlarının İmmunohistokimyasal Çalışmalarına Ait Negatif Kontrol



5.TARTIŞMA

Diyabetes mellitus pankreasın yeterli düzeyde insülin üretilmediği ya da hücrelerin vücudun ürettiği insülini kullanmadığı zaman meydana gelen metabolik bir hastalıktır. Dünya çapında 2014 yılında 422 milyon diyabet hastası olduğu raporlanmıştır. 2012 yılında sadece diyabet sebepli ölümlerin sayısı 1.5 milyondur (213). Diyabetin en önemli etkilerinden biri hiperglisemidir ve başlıca dolaşım ve sinir sistemi olmak üzere tüm organ sistemlerini zamanla harap etmektedir (213). Ayrıca yapılan çalışmalara göre nörodejenerasyonu tetikleyen birçok etmenin çeşitli metabolik hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (34). Bu nedenle tez çalışmamızda prevalansı en yüksek metabolik hastalıklardan biri olan diyabet mellitus'un nörodejenerasyonun temelinde yatan apoptozise hangi yollarla katkıda bulunduğu incelenmiştir.

Bu amaçla diyabetik sıçan modeli oluşturulup bazı beyin bölgelerinde şimdiye kadar diyabetle ilişkisi kurulmamış apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar insülin reseptörlerinin daha yoğun bulunduğu ve Alzheimer ve Parkinson gibi popüler nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde anahtar rol oynadığı kanıtlanmış Korteks, Hipokampus, Striatum gibi bölgeler üzerinde yürütülmekteydi. Bizim çalışmamızda ise yine IR bakımından zengin ve son zamanlarda nörodejeneratif hastalıklarda daha etkin rollerinin olduğu açığa çıkmaya başlayan serebellum ve beyin sapı gibi beyin bölgeleri bu genler açısından ele alınmıştır. Çalışmamız oluşturulan diyabet modelinde incelenen bölgeler ve genler açısından ilk olma özelliği taşımaktadır.

Kemirgen modelleri diyabetteki immunolojik süreçleri ve metabolizma fonksiyonlarını çalışmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda wistar cins sıçan kullanılmıştır. Son zamanlarda daha sık olarak β hücrelerine karşı sitotoksik olması özelliği ile, diyabetik araştırma modellerinin oluşturulmasında STZ kullanılmaktadır (117). Biz de çalışmamızda deney modelimizi oluşturmak üzere STZ kullanmayı uygun gördük. STZ kalıcı diyabet indükleyen anti-neoplastik bir ajandır. STZ glukozamin-nitrozüre bileşenidir ve klinikte pankreatik β hücresi karsinomalarının tedavisinde kullanılır (117). Düşük

afiniteli Glukoz taşıyıcısı 2 (GLUT2) STZ'yi pankreatik β hücresine alarak DNA alkilasyonuna sebep olur ve β hücrelerinin geri dönüşümsüz bir şekilde nekroza uğramasına sebep olur (174). STZ ile oluşturulan tip 1 diyabet modelinde insulin üreten pankreatik β hücreleri yıkılarak hipoinsulinemi ve hiperglisemi meydana gelir (117).

Kemirgenler STZ duyarlılığı açısından cinsiyet farklılıkları gösterir. Bu farklılık aynı dozu alan erkeklerde şiddetli hiperglisemi yaparken, dişilerde az bir yanıt ya da hiç yanıt olmamasına sebep olabilir. Bu nedenle çalışmamızda erkek wistar cins sıçan kullanılması uygun görülmüştür. STZ daha sıklıkla intraperitoneal ve intravenöz uygulanmaktadır (131). İntraperitoneal uygulamalar kolay ve hızlıdır. Diğer yandan STZ'nin β hücrelerine toksik etkisi doza bağlı olarak uygulamadan sonraki 72 saat içinde ortaya çıkmaya başlar (102). Tek doz halinde 40 mg/kg'ın altındaki dozlar etkisiz kalırken, 60 mg/kg'ın üzerindeki dozlar ise mortaliteyi artırmaktadır (105). Çalışmamızda bu nedenle intraperitoneal yoldan 45 mgkg⁻¹ STZ'nin uygulanması yapılmış ve 72 saat sonra açlık kan şekerleri ölçülerek 250 mg/dL üzerinde olanlar diyabetik kabul edilmiştir ve çalışmaya bu şartı sağlayan sıçanlarla devam edilmiştir. STZ uyguladığımız ve insulin eksikliği oluşturduğumuz grupta insulin eksikliğinin apoptozis ve sağ kalım üzerine etkisi araştırılırken yanı sıra başka bir gruba da 6 haftalık sürecin son iki haftasında 5ukg⁻¹ gün⁻¹ subkutan yoldan insulin uygulanarak insulinin iyileştirici etkisi de incelenmiştir. Seçilen bu insulin dozu glisemik kontrolün sağlanmasına yardımcı doz değil sadece nöronlarda insulin yolağının tetiklenmesi için uygulanan dozdur (23, 24, 107).

STZ uygulaması ile periferik olarak meydana gelen hipoinsulinemi tüm organ ve dokuların ihtiyacı olan insulin miktarını karşılamakta yetersiz kalmaktadır. İnsulin, glukoz kullanımını ve glikojen depolanmasını sağladığı gibi trofik bir faktör rolü üstlenerek hücrede hayati sinyal yollarının başlatılmasını sağlayan da bir faktördür (31). İnsülinin birçok metabolik ve antiapoptotik etkisi IRS proteinlerinin fosforilasyonunu gerektiren sinyalizasyon yolları ile ortaya çıkmaktadır. İnsülin, nöronlarda insülin reseptörü (IR) /insülin reseptör substratı (IRS) üzerinden primer olarak mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) ve fosfoinositid 3 - kinaz (PI3K)/Akt sinyalizasyon yollarını (35) etkilemektedir. İnsulin sinyal yolağının hücre proliferasyonu ve sağkalımı ile direkt bağlantısı bulunmaktadır.

Diyabetli hastalarda insülinle uyarılan reseptör kinaz aktivitesinde, insülin reseptör substratının (IRS) ve Fosfoinositide 3 kinaz (PI3K) fosforilasyonunda daha ciddi azalmalar görülmüştür (36).

Tüm bunların ışığında diyabetik bireylerde ve sıçanlarda bozulan insülin sekresyonlarının insülin aracılı sinyal transdüksiyon yollarının da sekteye uğradığı ve apoptozisi kontrol eden mekanizmaların bozulduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (123). Ancak temelde yatan mekanizmaların daha derin araştırılması gerekmektedir. İnsüline bağlı bu yollar arasında henüz tam anlamıyla aydınlatılmamış diğer down stream moleküller bulunmaktadır. İnsülin yolağıyla ilişkisi olduğu bilinen proapoptotik Bim-1 ve antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin yanı sıra daha önce nöronlarda diyabet modelinde bu yolla ilişki tespit edilmemiş iki hedef gen üzerine yoğunlaşmıştır. Bunlardan biri kaspazları inhibe ettiği bilinen XIAP ve mitokondriden salınarak apoptozisi teşvik eden Smac/DİABLO'dur. Bu moleküllerin insülin sinyalizasyonundan ne derece etkilendiği henüz tüm yönleriyle aydınlatılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda insülin eksikliğinde ve varlığında XIAP ve Smac/DİABLO genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçülerek ve insülin sinyal yolağının temel hatlarındaki PI3K/Akt molekülleri ile bunlara bağlı olarak çalıştığı zaten bilinen diğer proteinler (BİM-1 ve Bcl-2) arasındaki etkileşim incelenmiştir.

Eğer oluşturulan bu diyabet modelinde hipoinsülinemi sonucu beyin sapı ve serebellumda insülin ve insülin reseptörü etkileşimi gerçekleşmiyorsa insülin aracılı sinyal yolları başlatılamaz ve bilinen en önemli PI3K/Akt yolağı sekteye uğrayarak hücre sağ kalım moleküllerinin oluşumu engellenir. Ayrıca hiperglisemi sonucu nöronal çevrede meydana gelen stres hücreleri apoptoza sürükleyebilir ve bu bölgelerde tetiklenen apoptozis aynı bölgelerle ilişki nörodejeneratif olgulara katkıda bulunabilir.

Çalışmanın sonunda elde edilen verilere göre sıçanlara STZ uygulandıktan sonra sıçanlarda 6 haftalık deney süresi boyunca ciddi bir kilo kaybı gözlenmiştir. Bu durum tip 1 diyabetin vücudun glukozu kullanamaması sebebiyle protein ve yağların yakılmasında artışla birlikte gelişen en belirgin semptomlarından biridir (50). STZ+INS grubuna son iki hafta uygulanan insülin ise bu gruptaki sıçanlardaki kilo kaybını durdurmuş ancak kilo artışına sebep olmamıştır.

Sıçanlara STZ uyguladıktan 72 saat sonra açlık kan şekeri ölçülmüş ve açlık kan şekeri düzeylerinin >250 mg/dL olduğu saptanan sıçanlar diyabetik kabul edilmişlerdir (66). Sıçanlar 6 hafta boyunca hiperglisemik koşulu korumuştur bu da göstermektedir ki uygulanan STZ dozu ile kalıcı bir diyabet geliştirildiği söylenebilir. İnsulin uygulanan grupta ise hipergliseminin kontrolü sağlanamamış, açlık kan şekeri düzeyleri insulin uygulamasına rağmen >250 mg/dL üzerinde seyretmiştir. Çünkü uygulanan doz glisemik kontrolün sağlanması için etkin olan doz değil nöronal sinyal yollarının tetiklenmesi için uygun görülen dozdur (23, 106, 107, 152).

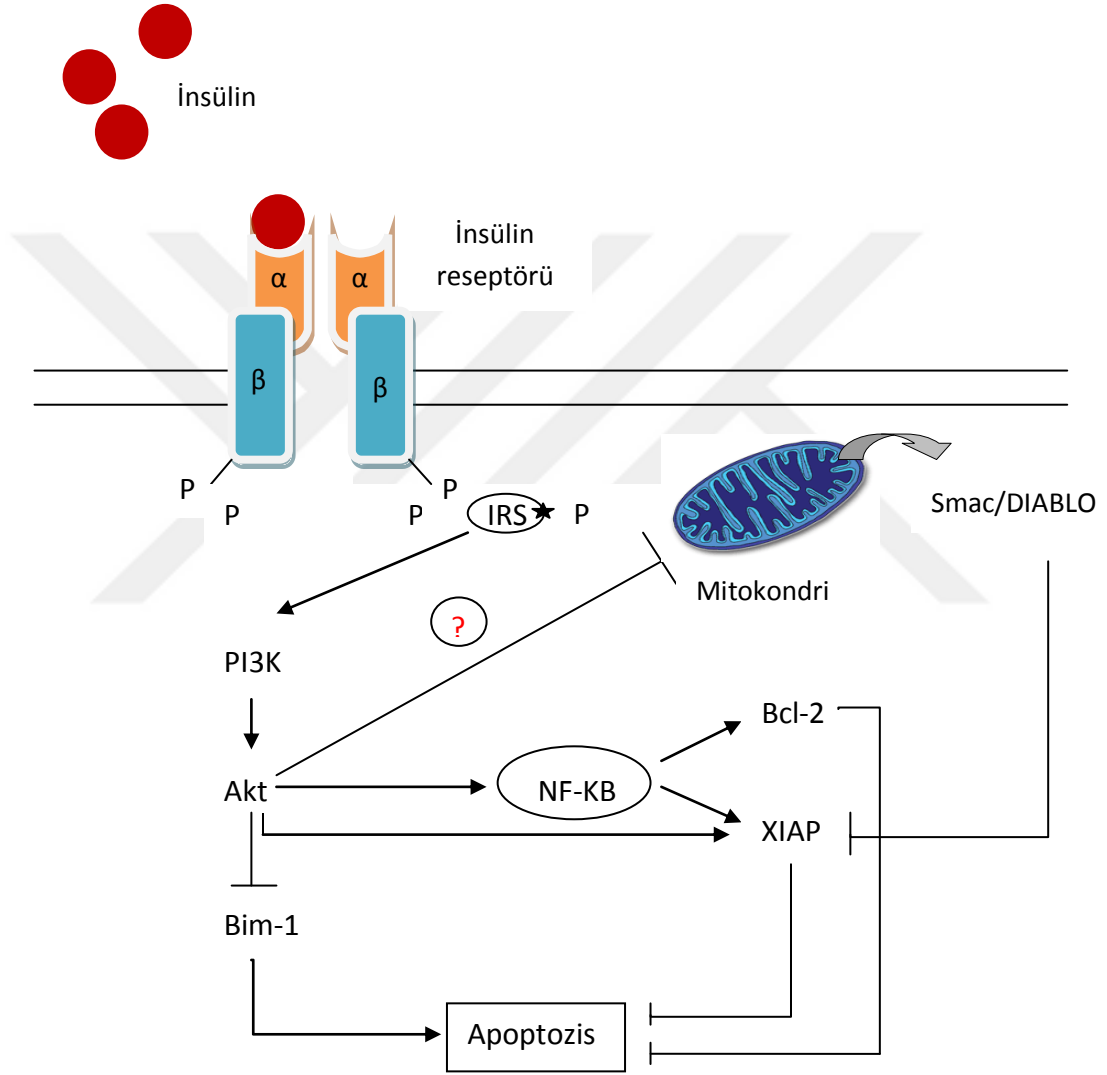
Yapılan gen ekspresyonu çalışmalarında Real-Time PCR yöntemi kullanılmış ve hedef genlerin ekspresyonları kontrol grubuna göre ve internal kontrol gene (β -Aktin) göre relatif olarak hesaplanmıştır. Verilere göre STZ uygulanan grupta serebellum ve beyin sapında apoptozu baskılayan XIAP geninde bir değişiklik gözlenmezken insulin uygulanan grupta serebellum ve beyin sapında XIAP gen düzeyinde artış gözlenmiştir. İnsulin uygulaması her iki bölgede de hücre sel sağ kalımı tetikleyecek şekilde XIAP geninin ekspresyonunu artırmıştır. Bunun yanı sıra Smac/DIABLO ise XIAP'nin kaspazlar üzerine etkisini ortadan kaldırarak apoptozise sebep olan bir moleküldür. Beyin sapında STZ uygulaması ile Smac/DIABLO düzeyinde artış meydana gelmiş insulin uygulaması ise Smac/DIABLO düzeyini azaltarak apoptozisin tetiklenmesini engelleyen bir etki göstermiştir. Serebellumda STZ ve insulin uygulamasının Smac/DIABLO üzerinde bir etkisine rastlanmamıştır. Serebellum ve beyin sapı bölgesinde incelenen bu genlere ait veriler ilk defa incelenmiştir. Smac/DIABLO'nun bu tablodaki yerini daha net belirlenmesi için hem ekstrinsek hem intrinsek yolak birlikte incelenmelidir.

XIAP ve Smac/DIABLO'nun insulin sinyalizasyon yolağıyla etkileşimin ortaya konulması için ise Akt, PI3K, Bcl-2 ve BIM-1 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri serebellum ve beyin sapında immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre hem serebellum hem de beyin sapında STZ uygulanan grupta insulin yolağının bozulduğu gözlenmektedir çünkü insulinin primer yolağı olan PI3K ve Akt immunoreaktivitelerinde azalmalar meydana gelmiştir. Bu bilgiler daha önceki çalışmalarla örtüşmektedir (43). İnsulin uygulamasının ise PI3K ve Akt

düzeylerini beyin sapında artırdığı ancak serebellumda etkili olmadığı görülmüştür. Yine antiapoptotik bir rol üstlenen Bcl-2 düzeyi hem serebellum hem de beyin sapında STZ uygulaması ile oluşturulan hipoglisemide azalırken, insulin uygulamasının iyileştirici etkisi göstermemektedir. Apoptozu tetikleyen diğer bir protein BİM-1 ise STZ uygulamasından etkilenmezken insulin uygulaması BİM-1 düzeyini azaltarak apoptozu engelleyebilir. Serebellum ve beyin sapı arasında saptanan farklılıklar bulunmaktadır ve beyin sapı genel olarak insulin eksikliğinden daha fazla etkilenmiştir. Beyin bölgeleri arasındaki bu farklılık beyin sapının fizyolojik olarak daha sık aktive olması ile bağdaştırılabilir.

Tüm bunların ışığında hedef genlerimiz ve PI3K/Akt yolağı arasında öngördüğümüz etkileşim Şekil 24'de özetlenmiştir. Bu çalışmada özellikle hipoinsulineminin apoptoz üzerine etkisine değinilmiş olsa da hiperglisemik koşulun ve hiperglisemi sebebiyle oluşan ROS ve AGE ürünlerinin bu moleküller üzerine etkisi in vitro ortamlarda incelenerek aydınlatılmalıdır. Bu nedenle bir sonraki hedefimiz bu yöndeki çalışmalara eğilmek olacaktır.

Sonuç olarak diyabetle meydana gelen hipoinsulinemi durumu nöronlarda insulin sinyalizasyonunu bozarak dengeyi apoptoz yönüne çevirebilir. Bu bağlamda nöronal apoptoz katkıda bulunan en ufak bir değişiklik nörodejenerasyona katkıda bulunarak var olan bir patolojiyi kötüleştirir ya da uzun dönemde oluşması için bir risk faktörü olabilir. Sonuç olarak diyabet hücresel sağ kalım yollarını sekteye uğrattığından diyabetli bireyler ileriki yaşlarda nörodejeneratif hastalıklar açısından risk taşırlar ya da diyabet zaten var olan bir patolojinin daha da kötüleşmesine katkıda bulunabilir.



Şekil 24: İnsulin Sinyal Yolağı ile Smac/DIABLO ve XIAP Proteinlerinin Olası Etkileşimine Dair Demonstratif Bir Şema

ÖZET

STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE BEYİN SAPI VE SEREBELLUM BÖLGELERİNİN APOPTOTİK GENLER AÇISINDAN İNCELENMESİ VE NÖRODEJENERASYONLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Giriş-Amaç: Diyabet insülin salımında bir eksiklik ya da insülinin dokularda etkili kullanılmaması ile karakterize endokrin bir hastalıktır. Diyabet hipoinsülinemi sebebiyle PI3K/Akt sinyalizasyonunda ve nöronal sağ kalım yollarında bozulmalara sebep olur. Nörodejenerasyonun en önemli sebeplerinden biri spesifik beyin bölgelerinde meydana gelen kontrolsüz hücre ölümleridir. Bu çalışmanın amacı serebellum ve beyin sapında nöronal apoptozis süreçlerinin altında yatan mekanizmalarda yer alan XIAP ve Smac/DIABLO gibi moleküllerin insülin sinyalizasyonu ile arasındaki etkileşimi incelemektir.

Materyal-Metod: Bu amaçla 21 adet erkek wistar cins sıçan 3 gruba ayrılmıştır. Birinci gruba kontrol grubu oluşturmak üzere intraperitoneal (i.p.) olarak sodyum sitrat uygulanmıştır. İkinci gruba diyabeti indüklemek için $45\text{mg}^{-1}\text{kg}^{-1}$ STZ (i.p.) uygulanmıştır. Deney 6 hafta sürdürülmüştür. Üçüncü gruba STZ uygulamasından 4 hafta sonra 15 gün boyunca subkutan yoldan $5\text{U kg}^{-1}\text{gün}^{-1}$ insülin uygulanmıştır. XIAP ve Smac/DIABLO gen ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile saptanırken, PI3K, Akt, Bcl-2 ve BİM-1 proteinlerine ait immunohistokimya çalışmaları yürütülmüştür.

Sonuç: STZ ile indüklenen diyabet sonucunda PI3K/Akt seviyeleri her iki bölgede de azalmıştır. İnsülin uygulaması serebellum ve beyin sapında XIAP ekspresyonunu artırarak nöronal sağ kalımı teşvik etmektedir. İnsülin uygulaması ayrıca proapoptotik BİM-1 protein ekspresyonunu da azaltmaktadır. Ancak beyin sapında STZ ile indüklenen diyabet Smac/DIABLO gen ekspresyonunu artırarak apoptozisi tetiklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Diyabet, İnsülin, Nörodejenerasyon, STZ

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF APOPTOTIC PROTEINS IN THE BRAIN STEM AND CEREBELLUM OF STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RATS AND ITS ASSOCIATION WITH NEURODEGENERATION.

Introduction-Aim: Diabetes is an endocrine disorder resulting from inadequate insulin release or ineffective use of insulin in tissues. Diabetes can cause perturbations in PI3K/Akt signalling and neuronal survival cascades as a result of hypoinsulinemia. One of the most important cause of the neurodegeneration is the unrestrained cell death in specific brain regions. It is the aim of the study to investigate if there is an interaction between insulin signalling and XIAP, Smac/DIABLO molecules in mechanisms that underlying the neuronal apoptosis process in cerebellum and brain stem.

Materials and methods: For this purpose 21 male wistar rats were divided into three groups. First group has given sodium citrate solution intraperitoneally as control. Second group (STZ) has given $45\text{mg}^{-1}\text{kg}^{-1}$ STZ intraperitoneally to induce diabetes. The experiment was conducted for 6 weeks. And the last group has given insulin 4 week after STZ injection. Insulin treatment was made $5\text{Ukg}^{-1}\text{day}^{-1}$ subcutaneously for 15 days. And we examined XIAP and Smac/DIABLO gene expressions by quantitative RT-PCR and PI3K, Akt, B \bar{I} M-1, Bcl-2 protein expressions by immunocytochemistry.

Conclusions: As a result of STZ induced diabetes PI3K/Akt expression levels are decrease. Insulin treatment promotes neuronal survival by increasing the XIAP gene expression in cerebellum and brain stem. Insulin treatment decreases proapoptotic B \bar{I} M-1 protein immunoreactivity. But STZ induced diabetes encourages apoptosis through increasing the Smac/DIABLO gene expression in brain stem.

Keywords: Apoptosis, Diabetes, Insulin, Neurodegeneration, STZ

KAYNAKLAR

1. Accili D, Drago J, Lee EJ, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 1996; 12: 106-109.
2. Akbarzadeh A, Norouziyan D, Mehrabi MR. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2007; 22 (2):60-64.
3. Albee RR, Mattsson JL, Yano BL, Chang LW. Neurobehavioral effects of dietary restriction in rats. *Neurotoxicol Teratol* 1987; 9: (3): 203-211.
4. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2016. *Diabetes Care*. 2016;39 (suppl 1):S1-S106.
5. Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J. Cell Biol.* 2003; 161: (1): 41-54.
6. Anello M, Lupi R, Spampinato D, et al. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2005; 48: (2): 282-289.
7. Anwar MM, Meki AR. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 135(4):539-47.
8. Atabani SF, Thio CL, Divanovic S, et al. Association of CTLA4 polymorphism with regulatory T cell frequency. *Eur J Immunol* 2005;35:2157-62.
9. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *Journal of Sports Science and Medicine* 2002; 1:1-14.
10. Atlan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31 (2):51-6.
11. Aulston BD, Odero GL, Aboud Z, Glazner GW. Alzheimer's disease and diabetes. doi: 10.5772-54913 cdn.intechopen.com 2013.
12. Averbach P, Crocker P. Regular involvement of Clarke's nucleus in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 1982; 39: (3): 155-156.

13. Baker LD, Cross DJ, Minoshima S, et al. Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Arch Neurol.* 2011; 68: (1): 51-57.
14. Baloyannis SJ, Manolidis SL, Manolidis LS. Synaptic alterations in the vestibulocerebellar system in Alzheimer's disease—a Golgi and electron microscope study. *Acta Otolaryngol* 2000; 120: (2): 247-250.
15. Baloyannis SJ. Dendritic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2009; 283: (1-2): 153-157.
16. Bates SH, Jones RB, Bailey CJ. Insulin-like effect of pinitol. *Br J Pharmacol* 2000; 130: (8): 1944-1948.
17. Bayram H, Deveci F, Dikensoy Ö, Kara V. Göğüs Hastalıklarında İn Vivo Ve İn Vitro Araştırma Yöntemleri, Toraks Kitapları, 2011; 12: 132.
18. Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 2005; 58: (4): 495-505.
19. Berciano J. Olivopontocerebellar atrophy. A review of 117 cases. *J Neurol Sci* 1982; 53: (2): 253-272.
20. Berg L, Mckeel DW, Miller JP, et al. Clinicopathologic studies in cognitively healthy aging and Alzheimer's disease: relation of histologic markers to dementia severity, age, sex, and apolipoprotein E. *Arch Neurol.* 1998; 55: (3): 326-335.
21. Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, et al. Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type. *Anal Quant Cytol Histol* 1996;18: (3): 209-213.
22. Bezprozvanny I, Mattson MP. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2008; 31: (9): 454-463.
23. Biessels GJ, Cristino NA, Rutten GJ, et al. Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Course of development and effects of insulin treatment. *Brain.* 1999;122: (4): 757-768.
24. Biessels GJ, Kamal A, Urban IJ, et al. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res.* 1998; 800: (1): 125-35.
25. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutat Res* 2002, 512:121-134.

26. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004;36:337-8.
27. Bouzier-Sore A, Voisin P, Bouchaud V, et al. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both 36 Z. Chen, C. Zhong / *Progress in Neurobiology* 108 (2013) 21–43 neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 24: (6): 1687-1694.
28. Braak H, Del Tredici K, Rub U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 2003; 24: (2): 197-211.
29. Bruce-Keller AJ, Li YJ, Lovell MA, et al. 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, damages cholinergic neurons and impairs visuospatial memory in rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998; 57: (3): 257-267.
30. Bucala R, Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv. Pharmacol.* 1992; 23: 1-34.
31. Cai Li, Bei B Zhang, Insulin signaling and action: glucose, lipids, protein. [www. Endotext.org](http://www.Endotext.org) 2007.
32. Caillat-Zucman S, Garchon HJ, Timsit J, et al. Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;90:2242-50.
33. Cairns NJ, Grossman M, Arnold SE, et al. Clinical and neuropathologic variation in neuronal intermediate filament inclusion disease. *Neurology* 2004; 26: (63): 1376-1384.
34. Cardoso S, Carvalho C, Santos R, et al. Impact of STZ-induced hyperglycemia and insulin-induced hypoglycemia in plasma amino acids and cortical synaptosomal neurotransmitters. *Synapse* 2010; 65: (6): 457-466.
35. Cardoso S, Correia S, Santos RX, et al. Insulin is a two-edged knife on the brain. *J. Alzheimers Dis.* 2009; 18: (3): 483-507.
36. Caro JF, Sinha MK, Raju SM, et al. Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 1987; 79(5): 1330-1337.
37. Carson MJ, Slager UT, Steinberg RM. Simultaneous occurrence of diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy in a brother and sister. *Am J Dis Child* 1977; 131: (12): 1382-1385.

38. Castellani RJ, Harris PL, Sayre LM, et al. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: (2): 175-180.
39. Chai J, Du C, Wu JW, et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 406: (6798): 855-862.
40. Chen H, Chan DC. Mitochondrial Dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18: (2): 169-176.
41. Cheng HC, Ulane CM, Burke RE. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann. Neurol.* 2010; 67: (6): 715-725.
42. Choi YE, Butterworth M, Malladi S, et al. The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J Biol Chem* 2009; 284:12772–82.
43. Cole AR, Astell A, Green C, Sutherland C. Molecular connexions between dementia and diabetes. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31(7):1046-63.
44. Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 115–23.
45. Cudworth AG, Woodrow JC. HLA system and diabetes mellitus. *Diabetes* 1975; 24: 345-9.
46. Cutler RG, Kelly J, Storie K, et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101: (7): 2070-2075.
47. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 49–63.
48. Damgaard RB, Nachbur U, Yabal M, et al. The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity. *Mol Cell* 2012; 46: 746-58.
49. De la Monte, SM, Wands, JR. Alzheimer's disease is type 3 Diabetes-Evidence Reviewed. *J Diabetes Sci Technol* 2008; (6):1101-1113.

50. Demirel M. İnsülin tedavis başlanan diabet hastalarında kilo değişimi ve bunu etkileyen parametrelerin irdelenmesi, Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Şefliği, İstanbul 2008:79
51. Devendra D, Eisenbarth GS. Immunologic endocrine disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S624-36.
52. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: (6639): 300-304.
53. Devi L, Prabhu BM, Galati DF, et al. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 2006; 26: (35): 9057-9068.
54. Diabetes Data Group. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
55. Dickson DW, Wertkin A, Mattiace LA, et al. Ubiquitin immunoelectron microscopy of dystrophic neurites in cerebellar senile plaques of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1990; 79: (5): 486-493.
56. Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ. Ubiquitin-binding domains – from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: (10): 659-671.
57. Dolan ME: Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA active agents. *Adv Drug Del Rev* 1997, 26:105–118.
58. Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000, 102: (1): 33-42.
59. Duelli R, Kuschinsky W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol. Sci.* 2001; 16: 71-76.
60. Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, et al. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs, primates): role of GLUT2 transporter and β -cell plasticity. *Transplantation* 2006; 81:36–45.
61. Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, et al. The human insulin receptor c-DNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signaling. *Cell* 1985; 40: 747-758.

62. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 2006; 7(10): 988–94.
63. Edwards JL, Quattrini A, Lentz SI, et al. Diabetes regulates mitochondrial biogenesis and fission in mouse neurons. *Diabetologia* 2010; 53: (1): 160-169.
64. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2013, 12:60.
65. Elikara Y. Birinci derece yakınlarında diabetes mellitus bulunan ve bulunmayan sağlıklı bireylerde insülin direncinin değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul 2006: 88
66. Erbas O, Pala HG, Pala EE, et al. Ovarian failure in diabetic rat model: Nuclear factor-kappaB, oxidative stress, and pentraxin-3. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 2014; 53: (4): 498-503.
67. Erol A. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2008; 13: (3): 241-253.
68. Faideau B, Larger E, Lepault F, Carel JC, Boitard C. Role of β -Cells in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Diabetes* 2005 Dec; 54(suppl 2): S87-S96.
69. Fernyhough P, Roy Chowdhury SK, Schmidt RE. Mitochondrial stress and the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 2010; 5: (3): 39-49.
70. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man — macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* 1991; 165: 97-103.
71. Freckmann G, Schmid C, Baumstark A, et al. System Accuracy Evaluation of 43 Blood Glucose Monitoring Systems for Self-Monitoring of Blood Glucose according to DIN EN ISO 15197. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2012; 6: (5): 1061-1075.
72. Friederich M, Hansell P, Palm F. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. *Curr Diabetes Rev* 2009; 5:120–144.

73. Fukutani Y, Cairns NJ, Rossor MN, Lantos PL. Cerebellar pathology in sporadic and familial Alzheimer's disease including APP 717 (Val→Ile) mutation cases: a morphometric investigation. *J Neurol Sci* 1997; 149: (2): 177-184.
74. Gajdošík A, Gajdošíková M, Štefek J, et al. Streptozotocin Induced Experimental Diabetes in Male Wistar Rats. *Gen Physiol Biophys* 1999; 18: 54-62
75. Gao Z, Tian Y, Wang J, et al. A dimeric Smac/DIABLO peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 2007; 282: (42): 30718-30727.
76. Garcia-Segura LM, Sanz A, Mendez P. Cross-talk between IGF-I and estradiol in the brain: focus on neuroprotection. *Neuroendocrinology*. 2006; 84: (4): 275-279.
77. Garg S, Moser E, Dain MP, Rodionova A.. Clinical Experience with Insulin Glargine in Type 1 Diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2010; 12: (11): 835-846.
78. Gasser AI, Forbes JM. Advanced glycation: implications in tissue damage and disease. *Protein Pept Lett*. 2008; 15: (4): 385-91.
79. Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, et al. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 2003; 60: (9): 1495-1500.
80. Gillespie KM, Gale EAM, Bingley PJ. High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 210-4.
81. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention, *CMAJ* 2006; 175 (2): 165-170
82. Goh SY, Cooper ME. Clinical review: the role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: (4): 1143-1152.
83. Golay A, Felber JP, Jequier E, De Fronzo RA, Ferrannini E. Metabolic basis of obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diab Metab Rev* 1988; 4: 1-50.
84. Goldfine ID. The Insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. *Endocr Rev* 1987; 8, 235-255.

85. Goud BJ, Dwarakanath.V, Chikka BK. Streptozotocin - A Diabetogenic Agent in Animal Models. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 2015; Vol. 3 (1): 253-269.
86. Grinberg LT, Rueb U, Alho AT, Heinsen, H. Brainstem pathology and non-motor symptoms in PD. *J. Neurol. Sci.* 2010; 289: (1-2): 81-88.
87. Grunblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J. Neurochem* 2007; 101: 757–770.
88. Gyrd-Hansen M, Darding M, Miasari M, et al. IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 2008; 10: (11): 1309-1317.
89. Han J, Goldstein LA, Gastman BR, Rabinowich H. Interrelated roles for Mcl-1 and BIM in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 10153–63.
90. Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, et al. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008; 105: (35): 13145-13150.
91. Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med.* 2003; 4: (1-2): 21-36.
92. Henderson, S.T., Vogel, J.L., Barr, L.J., Garvin, F., Jones, J.J., Costantini, L.C., 2009. Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Nutr. Metab. (Lond.)* 6, 31 (PubMed: 19664276).
93. Hooijmans CR, Graven C, Dederen PJ, et al. Amyloid beta deposition is related to decreased glucose transporter-1 levels and hippocampal atrophy in brains of aged APP/PS1 mice. *Brain Res.* 2007;1181: 93-103.
94. Hoyer S, Nitsch R. Cerebral excess release of neurotransmitter aminoacids subsequent to reduced cerebral glucose metabolism in early onset dementia of Alzheimer type. *J Neural Transm* 1989; 75: (3): 227-232.
95. http://www.turkendokrin.org/files/pdf/03_Tip_1_Diyabet.pdf

96. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Nature* 1994; 372: 746-754.
97. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007; 12: (9): 1543-1568.
98. Ibarretxe-Bilbao N, Ramirez-Ruiz B, Junque C, et al. Differential progression of brain atrophy in Parkinson disease with and without visual hallucinations. *J NeurolNeurosurg Psychiatry* 2010; 81: (6): 650-657.
99. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 7;88(3): 347-54.
100. Jensen EM, Lapolla RJ, Kirby RJ, Hawort SR. *J Natl Cancer Inst* 1977, 59, 941-944.
101. Johnson GV, Cox TM, Lockhart JP, et al. Transglutaminase activity is increased in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 1997; 751: (2): 323-329.
102. Junod A, Lambert AE, Orci L, et al. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 126:201–205.
103. Kann O, Kovacs R. Mitochondria and neuronal activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292: (2): 641-657.
104. Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000 Dalton subunit of its own receptor. *Science* 1982; 215:185-187.
105. Katsumata K, Katsumata K Jr, Katsumata Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. *HormMetab Res* 1992; 24: 508-510.
106. Kergoat M, Bailbe D, Portha B. Insulin Treatment Improves Glucose-Induced Insulin Release in Rats With NIDDM Induced by Streptozocin. *Diabetes* 1987; 36:(8): 971-977.
107. Kim EM, Grace MK, Welch CC, et al. STZ-induced diabetes decreases and insulin normalizes POMC mRNA in arcuate nucleus and pituitary in rats. *Am J Physiol.* 1999; 276: (2): 1320-1326.
108. Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, et al. Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *Diabetes* 2014; 63: (7): 2232-2243.
109. Konrad RJ, Mikolaenko I, Tolar JF, Liu K, Kudlow JE. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic

- beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase. *Biochem J* 2001; 356:31–41.
110. Kronche KD, Fehsel K, Sommer A, Rodrigues ML, Kolb-Bachofen V. Nitric-oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozocin contributes to islet cell DNA damage. *BiolChem Hoppe Seyler* 1995; 376:179-185.
111. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998; 94: (3): 325-337.
112. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: (25): 3247-3259.
113. Le May C, Chu K, Hu M, et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; Jun 13;103(24):9232–7.
114. Lee J, Kim M, Moon C, Chang J. Degradation Products of Streptozotocin Do Not Induce Hyperglycemia in Rats. *Biochemical Pharmacology* 1993; Volume 46. No 11.
115. Leininger GM, Backus C, Sastry AM, et al. Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol. Dis.* 2006; 23: (1): 11-22.
116. Leiter EH. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982; Jan;79(2):630–4.
117. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51:216–226.
118. Liu Y, Liu F, Iqbal K et al. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett.* 2008; 582: (2): 359–364.

119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 22DDCT Method. *Methods* 2001; 25: (4): 402–408.
120. Lu M, Lin SC, Huang Y, et al. XIAP induces NFkappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *MolCell* 2007; 26:689–702.
121. Lukacs C, Belunis C, Crowther R, et al. The structure of XIAP BIR2: understanding the selectivity of the BIR domains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2013; 69: 1717-25.
122. Luo RZ, Beniac DR, Fernandes A, Yip CC, Ottensmeyer FP. Quaternary structure of the insulin-receptor complex. *Science* 1999; 285(5430):1077-1080.
123. Luo S, Rubinsztein DC. BCL2L1/BIM: a novel molecular link between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 2013; 9(1):104-5.
124. MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem* 2002; 277: 36611-6.
125. MacKenzie A, LaCasse E. Inhibition of IAP's protection by Diablo/Smac: new therapeutic opportunities. *Cell Death and Differentiation* 2000; 7: (10): 866-867.
126. Magistretti PJ, Pellerin L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996; 777: 380–387.
127. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, et al. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 2006; 15: (9): 1437-1449.
128. Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 29th ed., Pharmaceutical Press, 1989: 649.
129. Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, et al. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008; 27: (48): 7-9.
130. Mastrocola R, Restivo F, Vercellinato I, et al. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J. Endocrinol.* 2005; 187: (1): 37-44.
131. McNeill JH. Experimental models of diabetes. Boca Raton, Fla: CRC Press LLC; 1999:8493 1667-7.

132. Mizutani T. Neuropathological background of spinocerebellar degeneration— with special reference to autonomic nervous system lesions in olivopontocerebellar atrophy, Shy-Drager syndrome and multiple system atrophy. *No To Shinkei* 1985; 37: (7): 675-685.
133. Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, Green DR. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci* 2014; 39: 101–11.
134. Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNA's in man. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 1263-1269.
135. Molofsky AV, Krencik R, Ullian EM, et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 2012; 26: (3): 891-907.
136. Moreira PI, Duarte AI, Santos MS, et al. An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2009; 16: (4): 741-761.
137. Moreira PI, Rolo AP, Sena C, et al. Insulin attenuates diabetes-related mitochondrial alterations: a comparative study. *Med. Chem.* 2006; 2: (3): 299-308.
138. Moreira PI, Santos MS, Moreno AM, et al. Increased vulnerability of brain mitochondria in diabetic (Goto–Kakizaki) rats with aging and amyloid-beta exposure. *Diabetes* 2003; 52: (6): 1449-1456.
139. Moreira PI, Santos MS, Seiça R, Oliveira CR. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J Neurol Sci.* 2007; 257: (1-2): 206-214.
140. Moreira PI, Santos MS, Sena C, et al. Insulin protects against amyloid beta-peptide toxicity in brain mitochondria of diabetic rats. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18: (3): 628–637.
141. Mori F, Piao YS, Hayashi S, et al. Alpha-synuclein accumulates in Purkinje cells in Lewy body disease but not in multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: (8): 812-819.
142. Mosconi L, Tsui WH, De Santi S, et al. Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD: automated FDG-PET image analysis. *Neurology* 2005; 64: (11): 1860-1867.

143. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173: (3): 932-939.
144. Murray FE, Landsberg JP, Williams RJ, et al. Elemental analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease using proton-induced X-ray analysis. *Ciba Found Symp.* 1992; 169: 201-210
145. Nakatsuka M, Sakurai H, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Enhancement by streptozocin of O₂[•]-radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic β-cells. *FEBS Lett* 1998; 239:295-298.
146. Nakhaee A, Bokaeian M, Saravani M, Farhangi A, Akbarzadeh A. Attenuation of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by eucalyptus globulus. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2009; 24 (4) 419-425.
147. Nerup J, Platz P, Andersen OO, et al. HLA antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 1974; 2: 864-6.
148. Niswender KD. Basal insulin: physiology, pharmacology, and clinical implications. *Postgrad Med.* 2011;1123: (4): 17-26.
149. Nunomura A, Honda K, Takeda A, et al. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006; 2006: 1-6.
150. Oberoi TK, Dogan T, Hocking JC, et al. IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation. *EMBO J.* 2012; 31: (1): 14-28.
151. Obexer P, Ausserlechner MJ. X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Front Oncol* 2014; 28;4:197.
152. Okamoto MM, Anhê GF, Sabino-Silva R, et al. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. *J Endocrinol.* 2011; 211: (1): 55-64. doi: 10.1530/JOE-11-0105. Epub 2011 Jul 11.
153. Olefsky JM. Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes from obese subjects. *J Clin Invest* 1976; (57): 1165-1172.
154. Oles PJ. High pressure liquid chromatographic separation and determination of anomeric forms of streptozotocin in a powder formulation. *J. Pharmaceutical Sci* 1978; 67 (9), 1300-1302.

155. Ottensmeyer FP, Beniac DR, Luo RZ, Yip CC. Mechanism of Transmembrane Signaling: Insulin Binding and the Insulin Receptor. *American Chemical Society Biochemistry* 2000; 39: (40): 12103-12112.
156. Paik SG, Fleischer N, Shin SI. Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:6129–6133.
157. Palm F, Ortsäter H, Hansell P, Liss P, Carlsson PO. Differentiating between effects of streptozotocin per se and subsequent hyperglycemia on renal function and metabolism in the streptozotocin-diabetic rat model. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20:452–459.
158. Paviour DC, Price SL, Stevens JM, et al. Quantitative MRI measurement of superior cerebellar peduncle in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2005; 64: (4): 675-679.
159. Pellerin L, Bouzier-Sore, AK, Aubert A, et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 2007; 55: (12): 1251-1262.
160. Phelps CH, Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res.* 1972; 39: (1): 225-234.
161. Piepper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADP -ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends PharmacolSci* 1999; 20:171–181.
162. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362: (4): 329-344.
163. Reaven GM, Hollonbeck CB, Chen Y-DI. Relationship between glucose tolerance insulin secretion and insulin action in non obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia* 1989; 32; 52-9.
164. Rerup, C. C: Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol.Rev* 1970; 22:485 -518.
165. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007; 72: 217-233.
166. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414(6865), 799-806.

167. Satman I, Yilmaz T, Sengül A et al. Populationbased study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002; 25(9):1551-6.
168. Sayılan G. Streptozotosin ile diyabet geliştirilmişşiçanlarda l-karnitinin protein oksidasyonu üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne 2008: 78
169. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17: 1675–87.
170. Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2004; 28: (5): 364-371.
171. Schein PS, Loftus S. Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res* 1968; 28:1501–1506.
172. Schile AJ, Garcia-Fernandez M, Steller H. Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev* 2008; 22: 2256–2266.
173. Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2003; 52: (1): 165-171.
174. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 1994; 43:1326–1333.
175. Schroeder JP, Packard MG. Systemic or intra-amygdala injections of glucose facilitate memory consolidation for extinction of drug-induced conditioned reward. *Eur J Neurosci* 2003; 17: (7): 1482-1488.
176. Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24(8): 855-72.
177. Seino S, Bell GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159: 312-316.
178. Serin Yalçın G. Yeni tespit tip 2 diabetes mellituslu hastalarda pankreas beta hücre rezervinin değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul 2004: 66

179. Shivananjappa MM, Muralidhara A. Abrogation of maternal and fetal oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic rat by dietary supplements of *Tinospora cordifolia*. *Nutrition*. 2012; 28: (5): 581-587.
180. Silva JP, Kohler M, Graff C, et al. Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat. Genet.* 2000; 26: (3): 336-340.
181. Sims-Robinson C, Kim B, Rosko A, Feldman EL. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology. *Nat. Rev. Neurol.* 2010; 6: (10): 551-559.
182. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004;53:3020-3.
183. Šoltésová D, Herichová I. On the mechanisms of diabetogenic effects of alloxan and streptozotocin. *Diabetologie - Metabolismus - Endokrinologie – Výživa* 2011; 130-138.
184. Spijker S. Dissection of Rodent Brain Regions. *Neuroproteomics, Neuromethods*, Springer Science Business Media 2011; 57: 13-26.
185. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001; 410: 112–116.
186. Stoica BA, Movsesyan VA, Lea PM, Faden AI. Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* 2003; 22: (3): 365-382.
187. Straface E, Matarrese P, Gambardella L, et al. Oxidative imbalance and cathepsin D changes as peripheral blood biomarkers of Alzheimer disease: a pilot study. *FEBS Lett.* 2005; 579: (13): 2759-2766.
188. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of Xlinked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:8662–7.
189. Szerlip HM. 2009. Metabolic acidosis, p 78. In: Greenberg A, Cheung AK, editors. *Primer on kidney diseases*. Philadelphia (PA): Saunders

190. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res* 2001; 50: 536-546.
191. Tancredi G, Rousseau-Mignerot S, Nadeau A. Long-term changes in the diabetic state induced by different doses of streptozotocin in rats. *Br J Exp Pathol.* 1983; 64: (2): 117-123
192. Taylor SI. Lilly lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes* 1992; (41): 1473-1490
193. Tekkeş Y. Streptozotocin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitamini dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kahramanmaraş 2006: 81
194. Tendi EA, Cunsolo R, Bellia D, et al. Drug target identification for neuronal apoptosis through a genome scale screening. *Curr. Med. Chem.* 2010; 17: (26): 2906-2920
195. Thomann PA, Schlafer C, Seidl U, et al. The cerebellum in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease – a structural MRI study. *J Psychiatr Res* 2008; 42: (14): 1198-1202.
196. Tretter L, Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci.* 2004;24: (36): 7771-7778.
197. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506-11.
198. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985; 313: 756-761.
199. Valentovic MA, Alejandro N, Betts CA, Brown PI, Ramos K. Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(alpha)pyrene induced renal injury in Sprague Dawley rats. *ToxicolLett* 2006; 164:214-220.
200. Valla J, Schneider L, Niedzielko T, et al. Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Mitochondrion* 2006; 6: (6): 323-330.

201. Van Loo G, Saelens X, Van Gurp M, et al. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 2002; 9: (10): 1031-1042.
202. Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*. 1997; 21: (1): 2-21.
203. Vivek KS. Streptozotocin: an experimental tool in diabetes and Alzheimer's disease. *Int J Pharma Res Dev* 2010; 2(1):1-7.
204. Volk BW, Wellman KF, Brancato P. Fine structure of rat islet cell tumors induced by streptozotocin and nicotinamide. *Diabetologia* 1973; 70:37-44.
205. Wada R, Yagihashi S. Nitric oxide generation and poly (ADP ribose) polymerase activation precede beta -cell death in rats with a single high-dose injection of streptozotocin. *Virchows Arch* 2004; Apr; 444(4):375-82.
206. Wegiel J, Wisniewski HM, Dziewiatkowski J, et al. Cerebellar atrophy in Alzheimer's disease-clinicopathological correlations. *Brain Res*. 1999; 818: (1): 41-50.
207. Weiss RB. Streptozocin: A review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep* 1982; 3:427-435.
208. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994; 7: 269(1): 1-4
209. White MF, Yenush L. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 228: 179-208.
210. Wilson GL, Leiter EH. Streptozotocin interactions with pancreatic β cells and the induction of insulin dependent diabetes. *Curr Topics Micro Immunol* 1990; 156:27-54.
211. Wist AD, Gu L, Riedl SJ, et al. Structure-activity based study of the Smac-binding pocket within the BIR3 domain of XIAP. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 2935-2943.
212. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391(6670): 900-904.
213. World Health Organization, "Global report on diabetes", WHO WK 810 Geneva, 2016: 7-9

214. World Health Organization. WHO Study Group. Diabetes Mellitus. Geneva. Tech Rep Ser 1985; 727: 100-113.
215. Wu G, Chai J, Suber TL, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 408: (6815): 1008-1012.
216. Yakovlev AG, Ota K, Wang G, et al. Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 2001; 21: (19): 7439-7446.
217. Zhang Y , Zhang Y , Bone RN, et al. Regeneration of Pancreatic Non- β Endocrine Cells in Adult Mice following a Single Diabetes-Inducing Dose of Streptozotocin. *PLoS ONE* 2015; 7(5): e36675.
218. Zhao WQ, Alkon DL. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 177: 125–134.
219. Zhao WQ, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792: (5): 482-496.
220. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1. cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: (17): 11549-11556.

ÖZGEÇMİŞ- BURCU AZAK

KİŞİSEL BİLGİLER:

Uyruğu :	T.C
Doğum Yeri:	KONAK/İZMİR
Doğum Tarihi:	13/6/1990
Medeni Durum:	Bekar
Telefon:	0553 542 69 70
Adres:	Ufuk Mah. 1005 sok. No:30/B İşçievleri/Buca/İZMİR
E-mail:	burcuazak@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

2004-2008	Orta öğrenim	Buca Fatma Saygın Yabancı Dil Ağırlıklı Lise
2008-2012	Lisans	Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Opsiyonu
2010-2012		Ege Üniversitesi Eğitim Bilimleri Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifika Programı
2012-2014	Yüksek lisans	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
2013-Halen	Yüksek lisans	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

AKADEMİK GÖREVLER:

2013-Halen	Araştırma Görevlisi	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı
------------	---------------------	--

STAJ:

2009- (27 Temmuz-26 Ağustos)	Gönüllü Staj	-Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı
2010- (23 Ağustos- 24 Eylül)	Gönüllü Staj	-Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
2011- (15 Ağustos- 15 Eylül)	Zorunlu staj	-Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
2012- (Şubat)	Gönüllü staj	- Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı
2012	Pedagojik Formasyon Zorunlu Stajı	Mustafa Kemal Anadolu Lisesi/ İzmir

BİLİMSEL POSTER :

17-18 Aralık 2011	Boğaziçi Üniversitesi 3.Evrin, Bilim ve Eğitim Sempozyumu/ Poster sunumu “ Prion Gen Ailesinin Evrimi ”
21-23 Şubat 2012	İstanbul Üniversitesi İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu/ Poster sunumu “ Gen Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar : Örümcek İpeğinin Gen Aktarımında Vektör Olarak Kullanılması ”
16-17 Şubat 2013	1. ODTÜ Sinirbilim Günleri Poster Katılımı / Alzheimer Hastalığında Genetik Alt Yapının Etkisi
16-17 Şubat 2013	1. ODTÜ Sinirbilim Günleri Poster Katılımı / Opioid Nosiseptin Sistemin Epileptik Olgularla İlişkisi
26-29 Ağustos 2015	Litvanya- The Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Baltic Physiological Societies Poster Katılımı/ Effect of γ-Glutamyl Cysteinyl Ethyl Ester on Apoptotic miRNA Expressions in Kainic Acid-Induced Excitotoxicity
26-29 Ağustos 2015	Litvanya- The Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Baltic Physiological Societies Poster Katılımı/ The Effect of γ-Glutamyl Cysteinyl Ethyl Ester on Mitochondrial DNA Damage in Excitotoxicity Model

PROJE:

BAP:

2012-2014(EGE BAP)- Araştırmacı	“Eksitotoksik Koşullarda Spesifik Beyin Bölgelerinde Apoptozis ile İlişkili Bazı microRNA’ların Ekspresyon Paternindeki Değişimler ve Gama Glutamil Sistein Etil Ester’in Düzenleyici Etkisinin Araştırılması” adlı
2014- Halen (İKÇÜ BAP)	Streptozotosin İle İndüklenen Diyabetik Sıçan Modelinde Beyin Sapı Ve Serebellum Bölgelerinin Apoptotik Genler Açısından İncelenmesi Ve Nörodejenerasyon İle İlişkilendirilmesi
2014- Halen (İKÇÜ ÖNAP)	Streptozotosin İle İndüklenen Diyabetik Sıçan Modelinde Hipokampus ve Korteks Bölgelerinde Farklı Sinyal Yolaklarına Ait Genlerin İncelenmesi ve Nörodejenerasyonla İlişkilendirilmesi

KATILMIŞ OLDUĞUM BİLİMSEL AKTİVİTELER:

- ✓ 27-30 Ağustos 2009 -Ege Üniversitesi Uluslararası Katılımlı 3.Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma İle Uygulama Platformu/ Katılımcı

- ✓ 23 Mart 2010- Ege Üniversitesi EBİLTET 2. Kök Hücre Sempozyumu/Katılımcı
- ✓ 27-30 Ağustos 2010 - Ege Üniversitesi Uluslararası Katılımlı 4.Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma İle Uygulama Platformu/Katılımcı
- ✓ 06 Ocak 2010- Ege Üniversitesi BEST(Board of European Students of Technology) Öğrenci Topluluğu/GDO (Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar) Sempozyumu/Katılımcı
- ✓ 30 Nisan 2011- Ege Üniversitesi EBİLTET Geleneksel 3.Kök Hücre Sempozyumu/Katılımcı
- ✓ 04-06 Mart 2011-İstanbul Üniversitesi İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış okulu/Katılımcı
- ✓ 24-25 Haziran 2011- TÜBA 2.Kök Hücre Kursu ve 7. Kök Hücre Sempozyumu/Katılımcı
- ✓ 17-18 Aralık 2011- Boğaziçi Üniversitesi 3.Evrin, Bilim ve Eğitim Sempozyumu/Katılımcı
- ✓ 26-27 Kasım 2011- Ege Üniversitesi/EBİLTEM-Discussion Meeting on Sialoglycobiology/ Katılımcı
- ✓ 21-23 Şubat 2012-İstanbul Üniversitesi İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu/Katılımcı
- ✓ 27 Kasım 2012- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı- Discrimination Between Self and Nonself by The Complement system / Prof. Dr. Seppo K. MERI
- ✓ 26 Aralık 2012- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı- Barsak Bakterileri, Enerji metabolizması üzerine Etkileri ve Obesite / Prof. Dr. Nur ARSLAN
- ✓ 22 Ocak 2013- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı- Hastalıkta ve Sağlıkta Hücre İçi Protein Kalite
- ✓ Kontrolü ve Yıkım Yolakları / Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK
- ✓ 16-17 Şubat 2013- 1. ODTÜ Sinirbilim Günleri
- ✓ 2 Nisan 2013- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı-Hemoglobinopatiler ve Hemoglobin İzmir / Yrd. Doç. Dr Aydan ÇELEBİLER
- ✓ 16 Nisan 2013- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı- Hepatoselüler Karsinoma Modelinde Oksidatif Stres İle Uyarılan Sinyal İleti Yolaklarının İncelenmesi / Prof. Dr. Neşe ATABEY
- ✓ 28 Nisan- 1 Mayıs 2013- 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi
- ✓ 28 Nisan- 1 Mayıs 2013- 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi Çalıştayı- Kadavradan Moleküle Temel Nöroanatomi: Multimediyatik Nöromorfoloji Turu
- ✓ 23-28 Ekim 2014-FEBS *Advanced Lecture Course: 360° Degree Lysosome*
- ✓ 30 Nisan 2015- Sıçan Beyni Anatomisi, Beyin Bölgelerinin Disseksiyonu ve Hipokampusün Çıkarılması
- ✓ 30 Nisan-3 Mayıs 2015 - TÜBAS 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi , Konya
- ✓ 26-29 Ağustos 2015- FEPS 2015 The Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Baltic Physiological Societies in Kaunas, Lithuania
- ✓ 09-13 Eylül 2015- 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Çanakkale
- ✓ 10 Mayıs 2016- İBG Metabolism And Cancer Symposium, İzmir

- ✓ 26 Mayıs 2016- Sıçan Beyninde Stereotaksik Girişim ve Tanımlayıcı Diseksiyon Kursu
- ✓ 26-29 Mayıs 2016- TÜBAS 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Ankara
- ✓ 29 Haziran-1 Temmuz 2016- FEPS Congress 2016/Paris/France
- ✓ 2-6 Temmuz 2016- 10th FENS Forum of Neuroscience /Copenhagen/Denmark

BURS/ÖDÜL:

23-28 Ekim 2014- *FEBS Advanced Lecture Course: 360° Degree Lysosome/ Tubitak Bursu (2229 Graduate Summer School and Other Activities Supporting Program)*

BİLİMSEL İLGİ VE ÇALIŞMA ALANI:

Hücrel sinyal yolları Apoptoz Nörodejenerasyon Eksitotoksisite Oksidatif stres	Metabolik sistemik hastalıklar / Diyabet Gen ekspresyonu Micro RNA Silencing RNA Rekombinant DNA teknolojileri
--	--

DERNEKLER

2012- Halen TÜRK BİYOKİMYA DERNEĞİ (TBD)
2014- Halen TÜRK FİZYOLOJİK BİLİMLER DERNEĞİ (TFBD)
2016-Halen TÜRKİYE BEYİN ARAŞTIRMALARI VE SİNİRBİLİMLERİ DERNEĞİ (TÜBAS)

YABANCI DİL:

İngilizce- Advanced

BİLGİSAYAR DENEYİMİ:

Word 2007-2010
Excel 2007-2010
PowerPoint 2007-2010
SPSS