



**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK
SIÇAN MODELİNDE ALFA LİPOİK ASİDİN BEYİN
DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Kevser TANBEK
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Elif ÖZEROL
Doktora Tezi – 2017**

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE
ALFA LİPOİK ASİDİN BEYİN DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kevser TANBEK

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Elif ÖZEROL**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016/38 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2017**

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Kevser TANBEK'in "Streptozotosin İle İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Modelinde Alfa Lipoik Asidin Beyin Dokusu Üzerine Etkisinin Araştırılması"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 16/03/2017



Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Elif ÖZEROL
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye

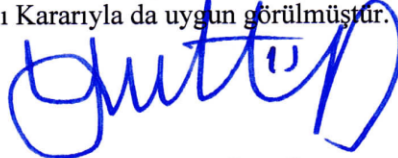
Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR
İnönü Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Nevin İLHAN
Fırat Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Necip İLHAN
Fırat Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2017 tarih ve 2017/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.



Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLOLAR DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes Mellitus.....	3
2.2. Diabetes Mellitusun Tanı ve Sınıflandırma Kriterleri	3
2.2.1. Tip 1 Diyabet.....	4
2.2.2. Tip 2 Diyabet	4
2.2.3. Gestasyonel Diyabet	5
2.2.4. Sekonder Diyabet Hastalıkları	5
2.3. Diyabetik Komplikasyonlar	5
2.3.1. Akut Komplikasyonlar	5
2.3.2. Kronik Komplikasyonlar	6
2.3.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar (Hızlanmış Ateroskleroz)	6
2.3.2.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar (Mikroanjiopatiler)	7
2.3.2.2.1. Diyabetik Retinopati	7
2.3.2.2.2. Diyabetik Nefropati.....	7
2.3.2.2.3. Diyabetik Nöropati	7
2.4. Diabetes Mellitus ve Beyin.....	8
2.4.1. Hipergliseminin Santral Sinir Sisteminde Oluşturduğu Aktif Yanıtlar	10
2.4.1.1. Hipotalamik Nöronlardaki Değişiklikler	10
2.4.1.2. Hipokampal Nöronlardaki Değişiklikler	11
2.4.1.3. Oksipital ve Frontal Kortekste Nöronal ve Glial Hücrelerdeki Değişiklikler ...	11
2.4.2. Hipergliseminin Santral Sinir Sisteminde Oluşturduğu Pasif Yanıtlar	12

2.4.2.1. Glukoz oto-oksidasyonu	13
2.4.2.2. Glikasyon	14
2.4.2.3. Polioliol Yolu	16
2.5. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres	17
2.6. Deneysel Diyabet Modelleri	18
2.6.1. Cerrahi Yöntemlerle Oluşturulan Diyabet Modeli	18
2.6.2. Deneysel Diyabetin Genetik Modelleri	19
2.6.3. Diyabetin Farmakolojik İndüksiyonu	19
2.6.3.1. Streptozotosin	20
2.6.3.2. Streptozotosinle İndüklenen Diyabet Modeli	21
2.6.3.3. Streptozotosinin Etki Mekanizması	22
2.7. Alfa Lipoik Asid	23
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Deney Hayvanlarının Temini	27
3.2. Deney Hayvanlarında Diyabet Oluşturulması	28
3.3. Alfa Lipoik Asidin Uygulanması	29
3.4. Öğrenme Testinin Yapılması	29
3.5. Çalışmanın Sonlandırılması ve Beyin Dokularının Çıkartılması	30
3.6. Beyin Dokusunda Yapılan Analizler	31
3.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Tayini	31
3.6.2. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	32
3.6.3. Malondialdehid (MDA) Tayini	33
3.6.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Tayini	34
3.6.5. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Tayini	35
3.6.6. Protein Karbonil (PC) Tayini	35
3.6.7. Doku Homojenat ve Süpernatant Ekstraktlarında Protein Tayini	36
3.6.8. Beyin Doku Süpernatantından TAS –TOS ve OSI Tayini	37

3.7. Histolojik Analizler.....	38
3.8. İstatistiksel Analizler	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Deney Süresince Sıçanların Vücut Ağırlığı Sonuçları	40
4.2. Deney Süresince Sıçanların Ortalama Kan Glukoz Düzeyleri Sonuçları.....	41
4.3. Morris Water Maze Sonuçları.....	42
4.4. Sıçanların Beyin Dokularında Oksidatif Stres Parametre Bulguları.....	47
4.4.1. Sıçanların Beyin Dokusu TAS –TOS- OSI Seviye Sonuçları	49
4.4.2. Sıçanların Beyin Dokusu GSH Sonuçları.....	51
4.4.3. Sıçanların Beyin Dokusu GSH-Px Sonuçları	51
4.4.4. Sıçanların Beyin Dokusu SOD Sonuçları.....	52
4.4.5. Sıçanların Beyin Dokusu MDA Sonuçları.....	53
4.4.6. Sıçanların Beyin Dokusu CAT Sonuçları.....	54
4.4.7. Sıçanların Beyin Dokusu PC Sonuçları	55
4.5. Sıçanların Beyin Dokusu Histolojik Bulguları	56
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
KAYNAKLAR	80
EKLER.....	80
EK 1: ÖZGEÇMİŞ.....	90
EK 2: ETİK KURUL BELGESİ.....	91

TEŞEKKÜR

Çalıőmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tez danıőmanım Prof. Dr. Elif ÖZEROL'a, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Fizyoloji Anabilimdalı öğretim üyelerine, asistanlarına ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tezimin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan, histolojik değerlendirmeler için Prof. Dr. Mehmet GÜL ve Histoloji Anabilim Dalı asistanlarına, istatistiksel hesaplama ve değerlendirilme aşamasında katkılarından dolayı Doç. Dr. Cemil ÇOLAK'a ve İstatistik Anabilim Dalı asistanlarına teşekkür ederim.

Tez çalıőmamda deney hayvanlarının temini ve bakımını sağlayan **İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi**'ne ve çalıőanlarına, laboratuvar olanakları sunan **İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Birimi**'ne, maddi destek sağlayan **İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**' ne teşekkür ederim .

Hayatımın her aşamasında varlıkları ve dualarıyla her zaman yanımda olan, güç veren, destek olan, yol gösteren Anneme, Babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Kevser TANBEK

ÖZET

Streptozotosin ile İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Modelinde Alfa Lipoik Asidin Beyin Dokusu Üzerine Etkisinin Araştırılması

Giriş/Amaç: Diyabetik komplikasyonlara bağlı gelişen nöropati beyin dokusunda yapısal ve fonksiyonel bozulmalara neden olarak bilişsel fonksiyonların bozulmasına yol açmaktadır. Çalışmamızda Streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda nöropatinin mekanizmasını aydınlatmak ve Alfa Lipoik Asit (ALA) kullanımının beyin dokusu üzerindeki etkilerini biyokimyasal histolojik ve fizyolojik açıdan incelemeyi amaçladık.

Materyal/Metod: 40 adet *Wistar albino* erkek sıçan kontrol, STZ, ALA ve STZ+ALA olmak üzere dört gruba ayrıldı. Diyabet oluşturmak için tek dozluk 50 mg/kg STZ intraperiyonal olarak, ALA 100 mg/kg/gün altı hafta boyunca her gün oral uygulandı. Tedavinin son haftasında bilişsel fonksiyonlar MWM ile değerlendirildi. Sakrifiye edilen ratların beyin dokuları histolojik ve oksidan-antioksidan parametrelerin incelenmesi için hipokampus, korteks, hipotalamus ve striatum yapılarına ayrıldı.

Bulgular: MWM ile değerlendirilen bilişsel fonksiyonlardaki değişimler STZ grubunda kontrol ve ALA grubuna göre bozulurken, STZ +ALA grubunda ise sonuçlar STZ grubuna göre düzeldi ($p<0.05$). STZ grubunda kontrol grubuna göre azalmış olan SOD, CAT and GSH-Px aktiviteleri STZ+ALA grubunda STZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttı. STZ grubunda MDA ve PC düzeyi arttı, STZ+ALA grubunda STZ grubuna göre azaldı ($p<0.05$). Histolojik olarak yapılan ışık ve elektron mikroskopik inceleme bulgularımıza göre STZ grubuna ait kesitlerde izlenen ışık mikroskopik ve ultrastrüktürel hasar ve dejenerasyon bulgularının STZ+ALA grubundaki kesitlerde bir kısmının görülmediği bir kısmının ise belirgin şekilde azaldığı tespit edildi.

Sonuç: STZ ile indüklenen diyabet modelinde rat beyin dokusunda bozulan oksidan-antioksidan denge sinir hücrelerinde yapısal bozulmalara neden olarak bilişsel fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır. ALA; antioksidan ve nöroprotektif etkisi ile beyin dokusunda hücre hasarı ve bilişsel fonksiyonların düzeltilmesinde etkili olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Diabetes Mellitus, Streptozotosin, Alfa Lipoik Asit, Nöropati, Beyin

ABSTRACT

Investigation of Effect of Alpha Lipoic Acid on Brain Tissue in Streptozotocin Induced Diabetic Rat Model

Background/Aim: Neuropathy due to diabetic complications causes structural and functional impairments in brain tissue, causing cognitive functions to deteriorate. We aimed to elucidate the mechanism of neuropathy in Streptozotocin (STZ) induced diabetic rats and to investigate the effects of Alpha Lipoic Acid (ALA) administration on brain tissue from biochemical histological and physiological aspects.

Materials and Methods: Forty *Wistar albino* male rats Control, STZ, ALA and STZ+ALA were divided into four groups. Single dose 50 mg/kg STZ ip to create diabetes, ALA was administered orally daily for six weeks at 100 mg/kg/day. Cognitive functions were assessed by MWM during the last week of treatment. Brain tissues of the sacrificed rats were divided into hippocampus, cortex, hypothalamus and striatum regions structures for histological and oxidant-antioxidant parameters.

Results: The changes in cognitive functions assessed by MWM were deteriorated the STZ group in according to the Control and ALA group, whereas the results were improved the STZ+ALA group in according to the STZ group ($p < 0.05$). SOD, CAT and GSH-Px activities decreased in the STZ group compared to the control group were statistically significantly increased in the STZ+ALA group compared to the STZ group. MDA and PC levels increased in the STZ group, and decreased in the STZ + ALA group compared to the STZ group ($p < 0.05$). According to our histological and light microscopic findings, it was determined that some parts of STZ+ALA group of microscopic and ultrastructural damage and degeneration findings in the sections of STZ group diminished considerably.

Conclusions: Distorted balance of oxidant-antioxidant in the rat brain tissue caused structural distortions in nerve cells, resulting in cognitive dysfunctions in the STZ-induced diabetes model. ALA is effective to ameliorate cell damage and cognitive functions in brain tissue by its antioxidant and neuroprotective effect.

Key words: Diabetes Mellitus, Streptozotocin, Alpha Lipoic Acid, Neuropathy, Brain

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGEs	: İleri Derecede Glikozillenmiş Son Ürünler
ATP	: Adenozin Trifosfat
CAT	: Katalaz
Cu	: Bakır
dk	: Dakika
DKA	: Diyabetik Ketoasidoz
dl	: Desilitre
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	: 5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
Fe	: Demir
g	: Gram
GDM	: Gebelik Diyabeti
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
H&E	: Hematoksilin ve Eosin
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HbA1c	: Glikozillenmiş Hemoglobin,
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HO•	: Hidroksil Radikali
L	: Litre
LP	: Lipid Peroksidasyonu
M	: Molarite
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
MWM	: MorrisWater Maze
n	: Denek Sayısı (Adet)

NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NAD⁺	: Yükseltgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O₂	: Süperoksit Radikali
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Devir/Dakika (Revolution per minute)
SH	: Sülfidril
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STZ	: Streptozotosin
TBA	: Tiyobarbütirik Asit
TCA	: Trikloro Asetik Asit
U	: Ünite
WHO	: (World Health Organization) Dünya Sağlık Örgütü
Zn	: Çinko
µg	: Mikrogram
µmol	: Mikromol
°C	: Santigrad Derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Hipergliseminin santral sinir sistemi'nde oluşturduğu aktif yanıtlar.	10
Şekil 2.2. Hipergliseminin Santral Sinir Sistemi'nde oluşturduğu pasif yanıtlar.....	13
Şekil 2.3. Proteinlerin glikasyonu ve AGE oluşumu.....	15
Şekil 2.4. Poliöl Yolunun DM ile Aktivasyonu.....	17
Şekil 2.5. Streptozotosin'in Kimyasal Yapısı.....	20
Şekil 2.6. STZ enjeksiyonundan sonraki kan glukoz değişimi.....	22
Şekil 2.7. Sıçan pankreas β hücrelerinde STZ toksisitesinin mekanizması.....	23
Şekil 2.8. ALA ve DHLA'nın kimyasal yapısı	24
Şekil 3.1. Çalışmamızda kullanılan Morris Water Maze Testi.....	29
Şekil 4.1. Sıçanların deney süresince vücut ağırlıkları ortalaması	40
Şekil 4.2. Deney gruplarındaki sıçanların deney süresince haftalara göre kan glukoz düzeyleri	41
Şekil 4.3. MWM grupların 4 günlük ortalama platform bulma süre sonuçları	43
Şekil 4.4. MWM platformsuz hafızda 5. gün yüzmeye hızı.....	44
Şekil 4.5. MWM grupların 5. gün platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre ..	45
Şekil 4.6. 5. Gün kuzey doğu yönünde yüzmek için bırakılan sıçanların platformsuz havuzda izledikleri yolun ısı haritası (heat map) görüntüsü.....	46
Şekil 4.7. Beyin dokusunun TAS analiz sonuçları.	49
Şekil 4.8. Beyin dokusunun TOS analiz sonuçları.	50
Şekil 4.9. Beyin dokusunun OSI analiz sonuçları.	50
Şekil 4.10. Beyin dokusunun GSH analiz sonuçları.....	51
Şekil 4.11. Beyin dokusunun GSH-Px analiz sonuçları	52
Şekil 4.12: Beyin dokularında SOD aktivitesinin analiz sonuçları.	53
Şekil 4.13: Beyin dokusunun MDA analiz sonuçları.	54
Şekil 4.14. Beyin dokusunun CAT analiz sonuçları.....	55
Şekil 4.15. Beyin dokusunun PC analiz sonuçları.....	55
Şekil 4.16. Kontrol Grubu Hematoksilin-Eozin Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri.....	56
Şekil 4.17. ALA Grubu Hematoksilin-Eozin Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri.....	57

Şekil 4.18. Kontrol Grubu Toluidine Mavisi ile Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri.....	58
Şekil 4.19. ALA Grubu Toluidine Mavisi ile Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri.....	58
Şekil 4.20. Kontrol Grubu Elektron Mikroskopik Görüntüleri	59
Şekil 4.21. Grubu ALA Elektron Mikroskopik Görüntüleri	60
Şekil 4.22. STZ Grubu Hematoksilen-Eozin Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri.....	61
Şekil 4.23. STZ Grubu Toluidine Mavisi ile Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri	62
Şekil 4.24. STZ Grubu Elektron Mikroskopik Görüntüleri.....	63
Şekil 4.25. STZ+ALA Grubu Hematoksilen-Eozin Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri.....	64
Şekil 4.26. STZ+ALA Grubu Toluidine Mavisi ile Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri.....	65
Şekil 4.27. STZ+ALA Grubu Elektron Mikroskopik Görüntüleri	66

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 4.1. Haftalara göre deney gruplarındaki sıçanların ortalama canlı ağırlıkları ...	41
Tablo 4.2. Gruplara göre sıçanların haftalık ortalama kan glukoz düzeyleri	42
Tablo4.3. MWM grupların 4 günlük ortalama platformu bulma süre sonuçları	43
Tablo 4.6. Sıçanların beyin dokularında oksidatif stres parametrelerine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel ölçütler I.....	47
Tablo 4.7. Sıçanların beyin dokularında oksidatif stres parametrelerine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel ölçütler II	48



1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), pankreasın yeterli insulin üretememesi veya vücudun ürettiği insülini etkili bir şekilde kullanamaması sonucu oluşan ve insülin üreten hücrelerin azalması ile ömür boyu devam eden kronik bir hastalıktır. Hastalığın gelişimi, çeşitli fizyopatolojik süreçlerle ilişkilidir. Bu süreçler, beta hücrelerinin oto immün hasarından, insülin davranışına karşı dirence neden olan çeşitli anormalliklere kadar uzanır.

DM zamanla ilişkili olarak çeşitli doku ve organlarda yapısal hasara ve fonksiyonel bozukluklara neden olduğu bilinmektedir. Özellikle merkezi sinir sistemi (MSS)'nde yaptığı hasar nedeniyle bilişsel fonksiyonlarda da bozulmalara neden olduğu bildirilmiştir.

Genetik yatkınlık, sinir hipoksi/iskemisi, oksidatif stres, poliol yolunun aşırı aktivitesi, artmış ileri glikasyon son ürünleri, protein kinaz c artışı, büyüme faktörü eksikliği, linolenik asit eksikliği diyabetik komplikasyonların etiolojisinde önemli rol oynar.

DM, nöropatinin en sık rastlanan nedenidir. Yapılan çalışmalar nüfus tipine göre değişkenlik göstermekle beraber diyabetik bireylerde %14 ile % 63 arasında değişen nöropati prevalansı bildirilmiştir. Olguların çoğunda duyu sorunlar baskın olup el ve ayaklarda duyu kaybı vardır. Şeker alkollerinin fazla miktarda birikmesinin sinir zedelenmesini meydana getirdiği kabul edilmektedir. Sinir doku miyoinozitolünün azalması ve hücre membranının bozulmuş enerji metabolizması ile doğrudan bağlantılıdır. Hipergliseminin derecesi ile nöropatinin şiddeti ve prevalansları arasında paralel bir ilişki vardır.

DM'nin hipokampusdaki nöronal yapılarda nörotransmitter salgılanması ve nörotransmitterlerin reseptörlerle kombinasyonu düzeyinde kimyasal, yapısal ve fonksiyonel çeşitli bozulmalara ve nöronal apoptozise neden olarak bilişsel fonksiyonları bozduğu bildirilmiştir.

Tip 1 diyabetin yetişkinler üzerindeki bilişsel etkisi özellikle anlama, dikkat, fizikomotor aktivite hızı, algılamadaki esneklik ve görsel algılama alanlarındadır. Bu yüzden Tip 1 diyabette bilişsel fonksiyon kaybı hastalığın erken evrelerinde ortaya çıkmaktadır. Yaş önemli değişkendir ve diyabetin çocuklarda beyinde bıraktığı hasar yetişkinlerden daha fazladır. Bunun sebebinin glisemik kontrolün çocuklarda

yetişkinlere göre daha zor olmasından kaynaklanabileceği ve yedi yaşından önce diyabet gelişen bireylerin ileri yaştakilere göre daha büyük risk altında olduğu çalışmalarda rapor edilmiştir.

Yapılan son çalışmalar DM sonucu ortaya çıkan oksidatif hasarın etkilerini azaltmada antioksidanların tedavi sürecine ek olarak uygulanmasının faydalı olabileceği yönündedir.

Alfa lipoik asid fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktivitesi olan önemli bir moleküldür. Alfa lipoik asid insan diyetinde yeterli miktarda bulunmasına rağmen, de novo olarak mitokondride lipoik asid sentaz tarafından sentezlenmektedir. Hem lipid hem de sulu ortamda çözünür, kolayca emilir ve hücrelere taşınarak, DHLA'ya indirgenir. Alfa lipoik asid barsaktan emildikten sonra, çeşitli dokularda metabolik değişikliğe uğradıktan sonra salgılanır.

DM araştırmalarında Streptozotosin (STZ) en uygun diabetojenik ajandır. STZ antimikrobiyal, aynı zamanda kemoterapötik alkilleyici ajan olarak da kullanılmaktadır. İlk defa 1963'te Rakieta STZ'nin diyabetojenik olduğunu bildirmiştir. STZ'nin neden olduğu insülinopenya (hipoinsülinizm) sendromuna STZ diyabeti adı verilmektedir. STZ'nin pankreas β hücrelerinde spesifik olarak nekroza neden olduğu ve hayvanlarda diyabet indüklemesinde tercih edildiği bildirilmiştir. STZ diyabetinde nöropatinin daha şiddetli olması ve STZ'nin oksidan özelliğinin olması bizim çalışmamıza model olarak daha uygundur.

Özetle diyabet dünya çapında prevalansı her geçen gün artan, yaşam boyu devam eden kronik bir hastalıktır. Nöropatik komplikasyonlar ve sonucu olarak gelişen bilişsel fonksiyon kayıpları yaşam kalitesini düşürmektedir. Diyabetin sekonder komplikasyonlarında önemli rol alan oksidatif stres STZ ile oluşturulan diyabetik rat modelinde komplikasyonların incelenmesi yönünde iyi bir kimyasaldır.

Yapılan çalışmalar ışığında biz de bu çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, alfa lipoik asidin diyabetik nöropati ve beyin dokusu üzerine etkisini fizyolojik, histopatolojik ve biyokimyasal açıdan araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), pankreas beta hücrelerinin insülin üretimindeki bozukluklar veya salgılanan insülinin dokular tarafından etkin bir şekilde kullanılmamasından kaynaklanan kronik metabolik bir hastalıktır. Bu durumda kan glukoz düzeyi normal fizyolojik koşulların üzerinde olmasına rağmen glukozu insülin uyarısıyla hücre içerisine alan dokularda ciddi hipoglisemi vardır.

DM tüm dünyada görülen bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde diyabet hastası bireylerin oranı daha yüksektir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün, 2000 yılındaki verilerine göre toplam dünya nüfusunun %2,8'i yani en az 171 milyon kişinin diyabet hastası olduğu bildirilmiştir. Diyabetin görülme sıklığı tüm dünyada her geçen gün hızla artmaktadır ve WHO verilerine göre 2030 yılında yaklaşık 366 milyon kişinin (toplam dünya nüfusunun % 4.4'ü) diyabet hastası olacağı tahmin edilmektedir (1, 2).

Kan glukoz düzeyinin normal fizyolojik değerler aralığında olmaması durumunda hiperglisemi kadar hipoglisemi zamanla tüm dokulara ciddi zararlar vermektedir. Bu durumdan özellikle de sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem etkilenir. Polidipsi, poliüri, polifaji, kilo kaybı, bulanık görme, vulvovajinit, idrar yolu enfeksiyonları, mantar enfeksiyonları, kaşıntı, ciltte kuruma, yorgunluk, ayaklarda uyuşma diyabetli hastalarda görülen klinik belirtilerdir (3).

2.2. Diabetes Mellitusun Tanı ve Sınıflandırma Kriterleri

Amerikan Diyabet Birliği (ADA) tarafından 1997 yılında diyabet hastalığının tanı ve sınıflandırmasında yeni kriterler yayımlanmıştır (4). Daha sonra 1997 yılında yapılan sınıflandırma üzerinde 2003 yılında bazı düzeltmeler yapılmıştır (5). Bu kriterlere göre ;

- ✓ HbA1C \geq % 6,5 yada
 - ✓ Açlık kan glukozu \geq 126 mg/dl (7.0 mmol/L) yada
 - ✓ Oral glukoz tolerans testinin (OGTT) 2.saat kan glukozu \geq 200mg/dl (11,1mmol/L) yada
 - ✓ Klasik diyabet belirtileri+rastlantısal kan glukozu \geq 200 mg/dl(11,1mmol/L)
- Bulgularından en az birinin bulunduğu kişiler DM hastası olarak kabul edilir.

Yapılan alışmalar sonucunda DM hastalığının görülme yaşı, seyri ve uygulanan tedavi bakımından başlıca dört tipi vardır (6, 7).

2.2.1. Tip 1 Diyabet

Tip 1 diyabet, insüline bağımlı olarak gelişen, genellikle ocuk yaşlarda görülen, tüm diyabet vakalarının yaklaşık %10'unu teşkil eden DM hastalığının bir tipidir. Bu tip diyabette Langerhans Adacıklarındaki β -hücrelerinin miktar ve fonksiyon kaybına bağlı olarak, insülin sentez ve salınımı azalır veya tamamen durur. β -hücrelerinin hasarından genetik yatkınlık, otoimmünite ve çevresel faktörler birbiriyle ilişkili bir şekilde sorumludur. Tip 1 diyabet tedavisinde, hastaya belirli zamanlarda kan glukoz miktarındaki ykseklie göre dışardan insülin verilmektedir. İnsülin enjeksiyonu dışında herhangi bir tedavi edici ilaç henüz geliştirilememiştir (7).

2.2.2. Tip 2 Diyabet

İleri yaştaki bireylerde görülen Tip 2 diyabet insülinden bağımsız gelişir. Pankreas beta hücrelerinin sayısı, insülin sentezi, salınımı ve depo edilmesi normaldir. Bazı vakalarda kandaki insülin düzeyi normalin altında, normal ya da yüksek olabilir. Hastalığın altındaki esas neden, hedef hücrelerde insülin reseptör sayısının azalması veya hücre içi post reseptör düzeyde insülin etkinliğinin azalması sonucunda insülin direncinin gelişmesidir (7). Hücre reseptör defektine bağlı olarak üretilen insülinin kullanımında ortaya çıkan sorunlar nedeniyle glukoz hücre içine absorbe edilip enerji üretiminde kullanılamaz. Kan glukoz düzeyi yüksek olmasına karşın (hiperglisemi) hücre içi hipoglisemiktir. Perifer dokularda özellikle kas, karaciğer ve yağ dokusunda insülin etkisi yeterli olmadığı için glukoz tutulumu azalmıştır. İnsülin etkinliğindeki bu bozulmaların altında kalıtsal nedenler olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (8). Ayrıca evresel etmenler, obezite ve sedanter yaşam tarzı olan bireylerde görülme sıklığı daha yüksektir.

Tip 2 diyabet, diyabet vakalarının yaklaşık %90-95'ini oluşturur ve tip 2 diyabet iki farklı gruba ayrılmaktadır. Birinci grup obez bireylerde görülen diyabet şeklidir. Bu grupta aşırı beslenmeden kaynaklanan kanda artmış olan besin maddelerinin hücrelere geçişi ve bu dokularda depolanması azalır. Buna bağlı olarak, beta hücrelerinin stimülasyonu ve sonunda insülin miktarında artış olur. Sonuçta insülin duyarlılığı olan hedef hücrelerde reseptör sıklığı azalır. Postreseptör direnç

artar. Uygun diyet tedavisi ve vücut kitle indeksinin azaltılması birçok semptomu ortadan kaldırır.

Tip 2 diyabet sadece obez bireylerde görülmez, şişman olmayan (non-obez) bireylerde de görülür. Bu grup diyabetli hastalarda ise asıl nedenin β -hücrelerindeki fonksiyon bozukluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu tip diyabetin kontrol altında tutulması ve tedavisinde oral antidiyabetikler etkilidir (9).

2.2.3. Gestasyonel Diyabet

Gebelik Diyabeti olarak da bilinen gestasyonel diyabet hiçbir diyabet belirtisi olmayan normalde sağlıklı kişilerde gebelik sırasında glukozu karşı toleransın azaldığı geçici bir diyabet durumudur. Gebelik öncesi yeterli insülin salgılayabilen pankreas hücreleri gebeliğin ilerleyen sürecinde yeterli insülin salgılayamaz ve daha önce diyabet belirtisi olmadığı halde gebelik boyunca kan şekeri yükselebilir. Gebelikten sonra semptomların devam etmesi ile kronikleşebilir (4). Bebeğin beyin gelişimini etkileyebileceğinden dolayı kontrol altına alınması gerekir. Ailede DM öyküsü olan, fazla kilolu ve 30 yaş üzeri gebelerde tarama amaçlı gebeliğin 24-28 haftalarında OGTT yapılır. Yapılan OGTT testinde anneye 50g glukoz verilir ve bir saat sonra kan glukoz düzeyine bakılır. Kan glukoz düzeyi 140mg/dl altında ise normal, üzerinde ise OGTT testi yapılarak değerlendirilir.

2.2.4. Sekonder Diyabet Hastalıkları

Pankreas hastalıklarında Monogenik Diyabet Sendromu (MODY), pankreatit, kistik fibrozis, diyabetojenik etkili ilaç tedavisi veya prolaktin, glukagon, büyüme hormonu gibi diyabetojenik hormonların aşırı salgılanması durumunda ortaya çıkan diyabet komplikasyonlarının görüldüğü durumlardır (7).

2.3. Diyabetik Komplikasyonlar

2.3.1. Akut Komplikasyonlar

DM hastalarında düşük insülin seviyesinin sebep olduğu hiperglisemi durumunda karaciğer hücreleri ihtiyacı olan glukozu yeterince kullanamaz ve enerji kaynağı olarak yağ asitlerini kullanmaya başlar. Diyabetik ketoasidozda, yağ asitlerinin oksidasyonundan dolayı, kanda keton cisimciklerinin miktarı artar

(ketonemi) ve diyabetik asidozun en önemli göstergesi olan kanın pH'sı düşer. Diyabetin önemli göstergelerinden birisi hasta nefesinde aseton kokusunun sebebi de budur. Genellikle Tip 1 diyabetlilerde görülen bir komplikasyon olmakla beraber nadiren de olsa Tip 2 diyabet hastalarında da görülebilir. Diyabetik ketoasidoz düşük kan pH neden olduğundan her zaman acil tıbbi müdahale gerektiren akut ve tehlikeli bir komplikasyondur (10).

Hiperozmolar hiperglisemik sendrom ise belirgin ketoasidoz durumu olmaksızın, aşırı hiperglisemi, su kaybı (dehidratasyon) ve plazma hiperozmolaritesi ile karakterizedir. Kan glukoz düzeyi 300 mg/dl (16 mmol/l) ve üzeri değerleri değerlere yükseldiğinde, kanın ozmotik basıncı yükselir. Bu yüksek ozmatik basınç hücre içindeki su moleküllerinin kana geçişine neden olur. Sonuç olarak hiperglisemi böbreklerden suyun emilimini engeller ve idrar miktarını da artırır. Bu durumda hücrelerin sürekli su kaybetmeleri ve aşırı idrar ile kaybedilen sıvı miktarı ağızdan ya da damar yoluyla vücuda geri alınmaz ise, hastaların aşırı sıvı kaybetmelerine (dehidrasyon) neden olur. Tip 2 diyabet hastalarında daha sık olarak görülen, diyabetik ketoasidozda olduğu gibi acil tıbbi müdahale edilerek kaybedilen sıvının vücuda geri verilmesi gerekli olan bir durumdur (11).

Hipoglisemi; anormal derecede düşük kan glukoz düzeyi, diyabet tedavisinde kullanılan birçok tedavinin akut bir komplikasyonudur. Özellikle insülin tedavisi uygulanan Tip 1 ve Tip 2 diyabet hastaları, bazı oral antidiyabetik ilaç kullananlar, yaşlı ve böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda görülür. Hipoglisemi komanın en önemli sebebidir (11). Diyabet hastalarında görülen bu duruma aşırı ve yanlış zamanda yapılan egzersiz, zamanlaması yanlış ve aşırı insülin kullanımı, yeterli besin alınmaması ya da bir öğünün kaçırılması neden olabilir. Çoğunlukla hipoglisemi durumunun giderilmesinde şekerli gıdaların alınımı yeterli olurken, ciddi vakalarda tedavi için glukagon enjeksiyonu ya da intravenöz %5'lik dekstroz infüzyonu yapılır.

2.3.2. Kronik Komplikasyonlar

2.3.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar (Hızlanmış Ateroskleroz)

Diyabetli hastalarda sık karşılaşılan, kardiovasküler hastalıkların en önemli morbidite ve mortalite nedeni olan bu komplikasyonlarda periferik damar hastalığı, koroner kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalıklar görülür. Diyabetin makrovasküler

komplasyonları ateroskleroza, kardiovasküler komplasyonlara ve bacaklarda ateroskleroza bağlı tromboz semptomlarına sebep olurken, beyin arterlerinde meydana gelen değişiklikler ve bunlara bağlı gelişen hemoraji ve trombozlar beyin fonksiyonlarında bozulmalara neden olur. Kangren eğiliminin artması gibi makrovasküler bozuklukların diyabetli kişilerde görülme oranı diyabet olmayan kişilere göre 2-4 kat daha fazladır (3, 12).

2.3.2.2. Mikrovasküler Komplasyonlar (Mikroanjiopatiler)

Diyabet hastalarında mikrovasküler komplasyonlar olarak retinopati, nefropati ve nöropati görülür.

2.3.2.2.1. Diyabetik Retinopati

Erişkin yaştaki diyabetli hastalarda görme kaybının insidansı ve prevalansı yüksektir. Diyabetik retinopati, gözün arka kısmındaki retinayı besleyen damarlarda diyabete bağlı gelişen mikrovasküler bir hastalıktır. Hastaların retinasında kanamalar, sert eksüdalara, venöz ve kapiller değişiklikler ile mikroanevrizmalar görülür (1).

2.3.2.2.2. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropatinin patogeneğinde hemodinamik mekanizmanın erken patolojik bulguları olan bowman kapsülünde, glomerüler bazal membranda ve tübüler bazal membranda kalınlaşmalar olur. Bu yapıların oluşumunda anormal lipid profili glukotoksisite ve gibi çeşitli mekanizmalar söz konusudur. Bir başka mekanizmada ise glukotoksisite ve hemodinamik stresin hücresel fonksiyonu değiştirmesidir. Böbreklerde diffüz glomerüloskleroz, nodüler glomeruloskleroz ve eksüdatif lezyonlar, pyelonefritis, tübüler hücrelerde glukoz birikmesi gibi lezyonlar görülebilir (13).

2.3.2.2.3. Diyabetik Nöropati

Nöropatiler, diyabet hastalarının yaklaşık %50'sini etkileyen ve diyabetin uzun sürede en sık görülen geç komplasyonlarından biridir (14). Hastaların çoğunda el ve özellikle alt ekstremitelerde duyu kaybı vardır. Duyu kaybının asıl nedeni sinir hücrelerinde şeker alkollerinin fazla miktarda birikmesinin neden olduğu harabiyettir. Sinir doku miyoinozitolünün azalması, hücre membranının yapısal bozulmasına ve

enerji metabolizmasındaki aksaklıklara neden olur. Hipergliseminin derecesi ile nöropatinin şiddeti ve prevalansları arasında doğrusal bir ilişki vardır. Diyabetik nöropati; simetrik duysal nöropati, asimetrik duysal nöropati (diyabetik amiyotropi) ve karışık duysal ve motor polinöropati (organ nöropatisi) olarak karşımıza çıkar (15).

Diyabetik nöropati; diyabetli hastada, tutulumu açıklayabilecek başka neden saptanamayan, periferik sinir disfonksiyonuna ait yakınma veya bulgular olarak tanımlanmıştır. Periferik sinir sisteminin somatik ve otonom kısımlarına ait bulguları içerir. Nöropatinin oluşum etyopatogenezinde hiperglisemi, diyabetin süresi, ileri yaş, hipertansiyon, hipoinsülinemi ve hiperinsülinemi sorumludur. Bunların dışında; sigara ve alkol kullanımı, uzun boylu olmak, albuminüri, vücut kitle indeksi, trigliserit, kolesterol ve genetik faktörlerde bağımsız risk faktörleri arasındadır. Erkeklerde, kadınlara oranla diyabete bağlı nöropati gelişmesi daha yüksektir (24).

Diyabetik nöropati tanısı için periferik sinir disfonksiyonuna ait yakınma, bulgu, patolojik kantitatif sensöryel test veya patolojik kantitatif otonomik testlerden en az ikisi bulunmalı, araştırmalar için elektrofizyolojik olarak bu iki testten biri veya kantitatif testlerden biri olmalıdır.

2.4. Diabetes Mellitus ve Beyin

DM, periferik ve merkezi sinir sistemi üzerinde olumsuz etkileri hastalığın süresi ve hipogliseminin derecesine bağlı olarak artmaktadır. Yapılan çalışmalarla bu etkilerin her geçen gün sinir sistemi hastalıklarına neden olduğu gösterilmektedir. Periferik sinir sisteminde etkisini sıklıkla aksonal dejenerasyon ve demiyelinizasyon ile seyreden saf duysal ya da duysal motor polinöropati sendromu ile gösterir. Otonom sinir liflerinin etkilenmesi ile özellikle kardiyovasküler ve gastrointestinal sistemi etkileyerek tüm organizmada rahatsızlıklara neden olur. Diyabetin merkezi sinir sistemindeki etkileri ise, diyabetin ateroskleroza hızlandırıcı etkisi ile açıklanabilir. Özellikle uzun sürede beyin kan dolaşımının bozulması geri dönüşümü olmayan fonksiyon kayıplarına neden olur.

Metabolik olarak çok aktif bir organ olan beyin; vücut ağırlığının sadece %2'sine sahip iken vücut oksijen tüketiminin %20 beyinde gerçekleşir ve total vücut glukozunun %25'ini kullanır. Beyin metabolizma hızı tüm vücudun metabolizma hızının ortalama 7,5 katı kadardır. Sinir hücreleri sinaptik ileti, iyon konsantrasyonunu düzenleme, elektriksel potansiyellerin oluşumu, eksitatör nörotransmitterlerin sentez ve

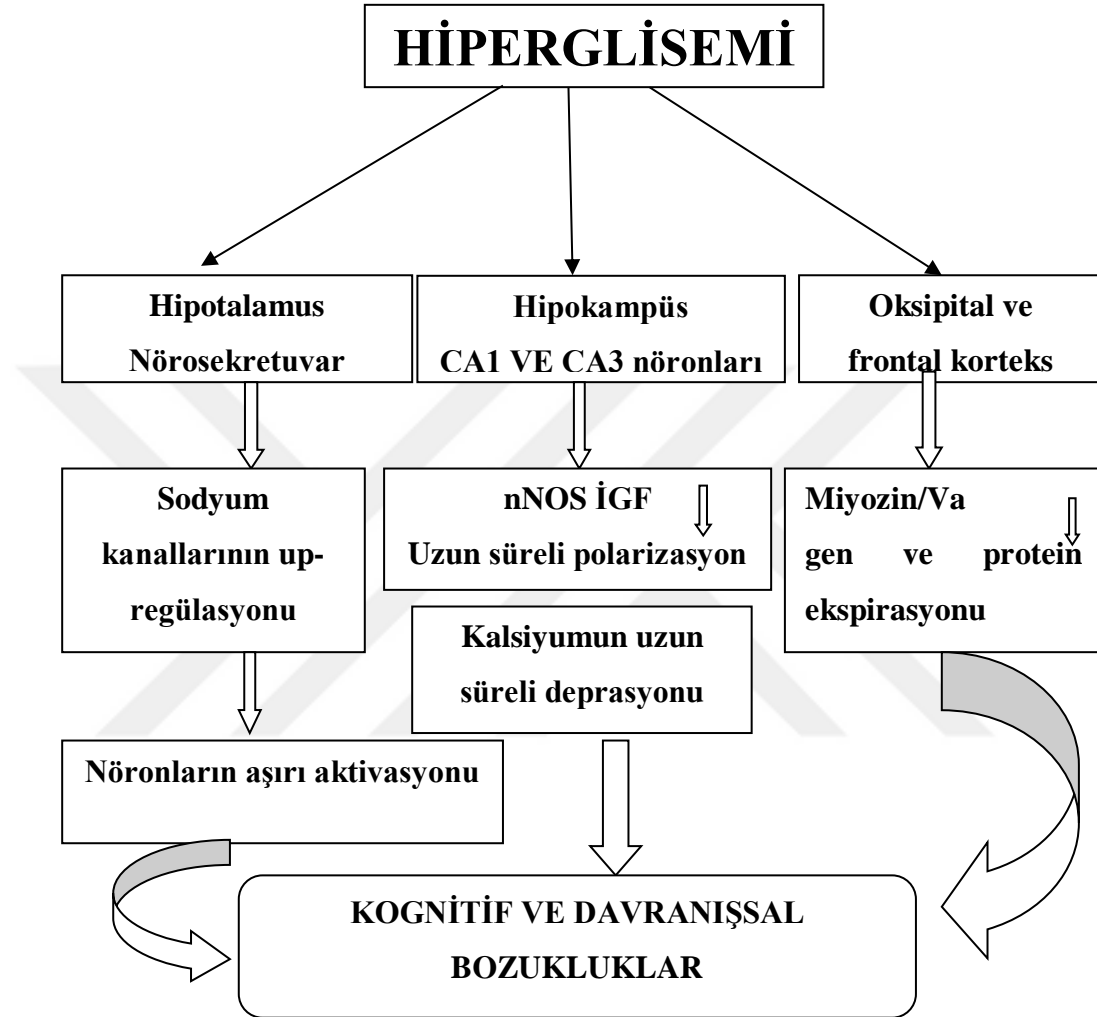
salınımı gibi fizyolojik olaylar için önemli ölçüde enerji kullanılır. Beyin normal fizyolojik koşullarda ihtiyacı olan bu enerjiyi tek ve zorunlu enerji kaynağı olan glukozdan sağlar (16). Beynin glukoz kullanımı $31\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{dk}$ iken bununun $26,6\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{dk}$ kadarı karbondioksit ve suya okside olur. Glukozun tamamı karbondioksit ve suya tam oksidasyonu her zaman gerçekleşmez. İhtiyaç durumunda glukoz beyinde GABA, glutamat veya diğer metabolik yollarla kullanılır. Geriye kalan $4,4\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{dk}$ glukoz lipid, amino asitlere glikojene dönüşerek astrosit hücrelerinde depolanır (17). Beyindeki glikojen seviyesi kas ve karaciğerdeki miktarın yaklaşık olarak onda biri kadardır ($3,3\mu\text{mol}/\text{g}$). Beyindeki glikojenin çoğunun biyolojik olarak kullanılabilir olduğu glukoz, fosfata ve laktata yıkılabileceği gösterilmiştir (18). Bu az miktardaki glikojen beyin enerji ihtiyacını karşılamaya yeterli değildir. Açlık, diyabet ve bebeklik döneminde artan asetoaseton ve 3-hidroksibütirat gibi keton cisimleri kan-beyin bariyerini geçer ve glukoz yerine beyinde enerji kaynağı olarak kullanılabilirler.

Beyin dokusuna glukoz alınışı insülininden bağımsız gerçekleşir. Kan-beyin bariyerinde yüksek molekül ağırlıklı sodyumdan bağımsız olan glukoz taşıyıcı protein (glucose transporter 1 (GLUT1)) aracılığı ile gerçekleşir. Diğer taşıyıcı proteinler beyinde farklı hücre tiplerinin membranlarında mevcuttur. Beyin glikojen deposu olan astrositler GLUT1 reseptörlerince zengindir. GLUT-1 ve GLUT-4 hipokampus, serebellum, olfaktör bulbus, az miktarda lateral hipotalamus, arkuat nükleus ve globus pallidus'ta rapor edilmiştir. Nöronal hücrelerde GLUT-3 ve GLUT-8, mikroglial hücrelerde GLUT-5 yer alır. GLUT-8 olarak isimlendirilen glukoz taşıyıcı hipokampus, serebral korteks ve hipotalamusta tanımlanmıştır. GLUT4 ve GLUT8 beyinde insüline duyarlı glukoz taşıyıcılarıdır (19). Beyin dokusuna glukozun geçişi ekstrasellüler glukoz konsantrasyonuna bağlıdır. Bu yüzden hiperglisemik durumlarda hücre içi glukoz seviyesi anormal derecede yüksektir. Kan plazmasında glukoz miktarının normal değerlere göre artması ile meydana gelen kısa süreli hiperglisemi ve DM'de olduğu gibi uzun süreli hiperglisemi çeşitli metabolik yollar aracılığıyla kan beyin bariyeri yapısının değişmesine ve nöronal hasara neden olabilir (20). Bu metabolik yollardan bazıları nöronal aktiviteden bağımsız olarak pasif yanıtların yer aldığı indirekt yolu oluşturur.

Ayrıca hipergliseminin santral sinir sistemindeki nöronlarda gen ekspresyonunda oluşturduğu aktif yanıtların nöronal hasarda çok önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir (21).

2.4.1. Hipergliseminin Santral Sinir Sisteminde Oluşturduğu Aktif Yanıtlar

Hipergliseminin santral sinir sisteminin çeşitli nöronlarında gen düzeyinde meydana getirdiği değişiklikler yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Hipergliseminin santral sinir sistemi'nde oluşturduğu aktif yanıtlar.

2.4.1.1. Hipotalamik Nöronlardaki Değişiklikler

Kronik hipergliseminin neden olduğu hiperosmolariteye bağlı olarak hipotalamik supraoptik ve paraventricüler nükleusta yer alan magnosellüler nörosekretuar sinir hücrelerinden vazopressin salınımında artış olduğu görülmüştür (22). Bu hücreler ekstrasellüler osmolarite değişikliklerini algılayan mekanosensitif voltaj kapılı sodyum kanalları içerirler. Hiperglisemiye bağlı olarak hiperosmolar durumun devam etmesi

sodyum kanallarının up-regülasyonuna ve sodyum kanal sayısının artması ile birlikte aksiyon potansiyelinin eşik değerin düşmesine neden olur. Bu hücrelerdeki moleküler değişiklikler hücrelerin dejenerasyonuna neden olur. Magnosellüler nörosekretuar hücrelerin up-regülasyonu nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) enzimi ve N-metil- D- aspartat (NMDA) reseptörlerin artışına, bu artışın kronik olması hücre içinde kalsiyumun birikmesine ve nitrik oksit (NO) üretiminin artmasına neden olur (23). Yüksek konsantrasyondaki NO, reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı koruyucu olabilmesine karşın, nöronların aşırı aktivasyonu sonucu gelişen glutamat toksisitesine neden olur (21).

2.4.1.2. Hipokampal Nöronlardaki Değişiklikler

Diyabetli kişilerde kronik hiperglisemiye bağlı olarak ortaya çıkan ilerleyici demans insidansı da yüksektir (24). In vitro elektrofizyolojik ölçümlerde diyabetik hayvanların hipokampusundaki CA1 ve CA3 bölgelerinde hipergliseminin şiddetine bağlı olarak nitrik oksit sentaz mRNA ve protein konsantrasyonları azalmaktadır. Bu da uzun süreli potansiyasyonun azalması, uzun süreli depresyonun da kolaylaştığı kognitif hafıza ve öğrenmede bozulmaya neden olur (25, 26). Yine diyabetli kişilerde ve yapılan deneysel çalışmalarda hücre içi kalsiyum seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Kalsiyum düzeyindeki değişikliklerin artmış uzun süreli depresyon ve azalmış uzun süreli potansiyasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir (27). Deneysel diyabet çalışmalarında hipokampal dentat girusta insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve reseptörlerinin ekspresyonunun downregülasyonunun nöronal apoptoz eğilime neden olduğu gösterilmiştir (28).

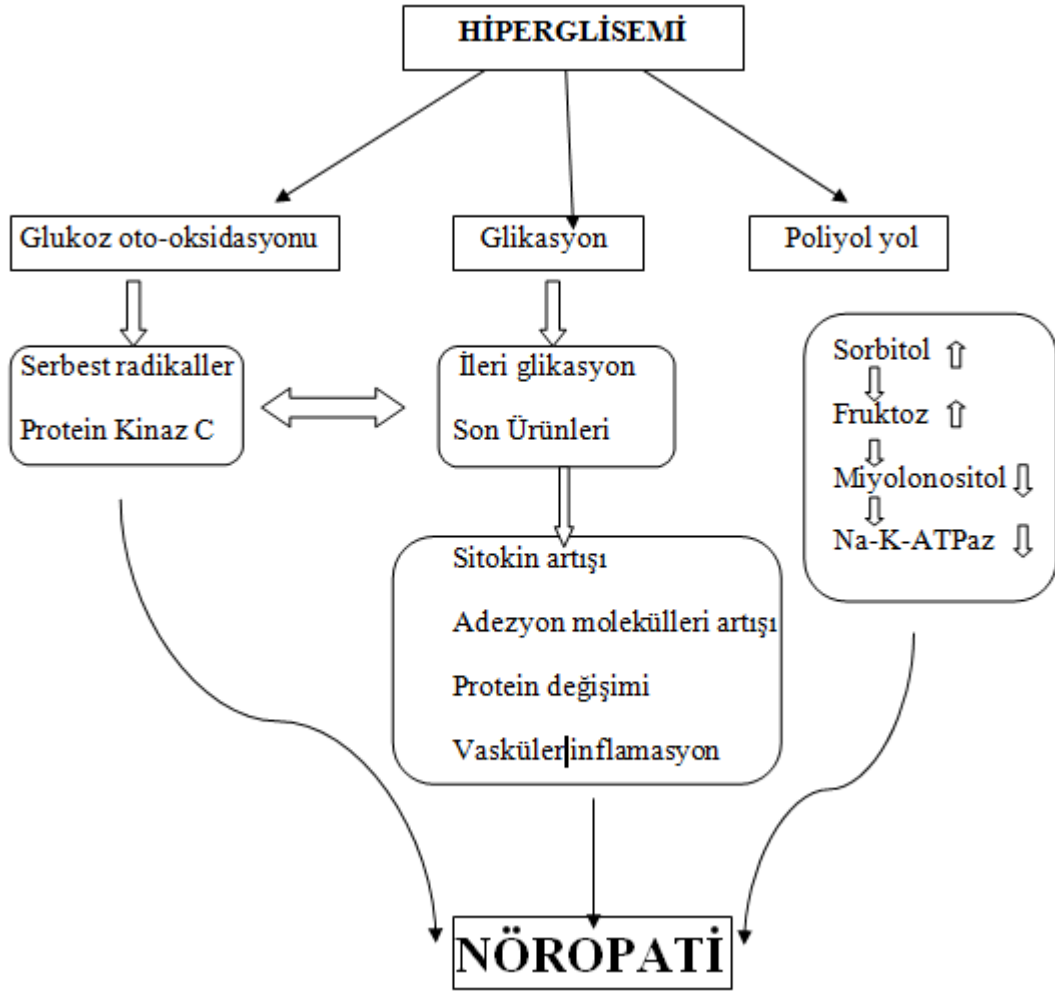
2.4.1.3. Oksipital ve Frontal Kortekste Nöronal ve Glial Hücrelerdeki Değişiklikler

Miyozin-Va; hücrede mRNA taşınması, membran trafiği ve sinaptik plastisitede görev alan önemli bir proteindir (29). Miyozin-Va proteininin ekspresyonundaki azalma sinaptik iletide azalmaya neden olur. Hipergliseminin oksipital ve frontal kortekste glial hücrelerde motor protein miyozin-Va gen ve protein ekspresyonunda azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (30).

2.4.2. Hipergliseminin Santral Sinir Sisteminde Oluşturduğu Pasif Yanıtlar

DM, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (31). Bunlara ek olarak, devam eden oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (32, 33). Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini inceleyen çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (33, 34).

Endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda inkübe edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir (35, 36). Hiperglisemi sonucu reaktif oksijen türlerinin oluşumu başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır (37).



Şekil 2.2. Hipergliseminin Santral Sinir Sistemi'nde oluşturduğu pasif yanıtlar

2.4.2.1. Glukoz oto-oksidasyonu

Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında ara metabolit olarak süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) açığa çıkar. Elektron taşıma zincirinde oksidatif fosforilasyonda yer alan glukozun oksidasyonu enerji üretiminde görev alan indirgenmiş nikotinamid dinükleotid (NADH) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) üretimini sağlar. Mitokondrial elektron taşıma zinciri ile oluşturulan elektrokimyasal proton gradiyenti iki ana bölgede hücre içi süperoksit radikallerinin üretimine neden olur. Bu nedenle mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi radikal türlerin üretim kaynağıdır. İlki NADH dehidrogenaz kompleksi (Kompleks I) ve ubikinon, diğeri Kompleks III arayüzeyidir (38). Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak $O_2^{\cdot-}$ oluştuğu düşünülmektedir. DM

yüksek hiperglisemi mitokondrial süperoksit üretimini artırarak protein kinaz C üretimini de başlatır. Aktive olmuş protein kinaz C ise damar geçirgenliği ve sitokin üretimini arttırarak damar komplikasyonlarının patogeneğinde rol oynayan önemli bir moleküldür (39).

2.4.2.2. Glikasyon

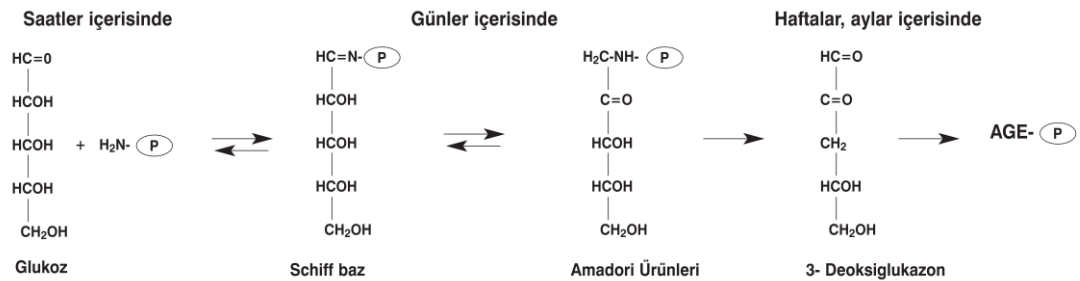
Proteinler, lipoproteinler ve nükleik asidlerde bulunan azotlu grupların, indirgeyici şekerlerin karbonil grupları ile enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlara uğrayabilirler. Glikasyon sonucu oluşan heterojen bileşikler olan ileri glikasyon ürünleri (AGEs) glikozillenmiş proteinlere örnektir. Proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonu olan ve normal koşullarda düşük oranda gerçekleşen protein glikasyonu, şekerin karbonil grubu ile proteinlerin terminal amino asidindeki α -amin grubuna veya lizin amino asidinin serbest amino grubunun Schiff bazı oluşturmasıyla başlamaktadır. Oluşan dayanıksız Schiff bazların (aldimin) oluşumu saatler içerisinde gerçekleşmekte ve sonrasında günler içerisinde stabil ketoamin ürünleri olan Amadori ürünlerine, onlar da dikarbonil bileşiklerine ve sonrasında da haftalar içerisinde AGEs'ye dönüşmektedir.

Bir proteindeki glikasyonun derecesini ortamdaki şeker konsantrasyonu belirler. Protein glikasyonu yarı ömrü kısa olan albumin ve hemoglobin proteinlerinde olduğu gibi kollajen, elastin gibi yarı ömrü uzun olan tüm proteinlerde görülebilir. İnsanda non-enzimatik protein glikozillenmesinin en önemli örneği hemoglobinin glikozillenmesidir (HbA_{1c}). Hemoglobin glikozillenme derecesi, hipergliseminin süresi ve düzeyine bağlıdır. Normalde dolaşımdaki HbA_{1c} dir. Son 2-3 aylık ortalama kan glukoz düzeyine bağlı olarak bu oran değişebilir. Kronik hiperglisemide bu oran Hb 'in %12'sini aşabilir. HbA_{1c} konsantrasyonundaki değişiklikler diyabet tedavisinin etkinliğini izlemek için kullanılabilir. Plazma fruktozamin konsantrasyonunda plazma proteinlerinden olan albuminin glikasyonunun ölçütüdür. Fruktozamin HbA_{1c} 'ye göre daha kısa süredeki glisemik kontrolü gösterir.

Glikasyonun yanı sıra enzimatik olmayan dehidrasyon, kondenzasyon ve halkalaşma reaksiyonlar devam ederek AGEs oluşumunu arttırır. Hiperglisemide, glukozun lens proteinlerine çapraz bağlarla bağlanma özelliği, lizin amino grubunun non-enzimatik glikozillenmesi ile olmaktadır. Burada, glikozillenmenin son ürünleri, lensin kristalin proteinine bağlanır. Böylece lensin spektroskopik özellikleri bozulur

ve katarakt gelişir (10). Bağ doku komponentlerinin glikozillenmesindeki artışın bir diğer önemi, lipoproteinlerin arter duvarında tutulması ile gelişebilen aterogenezisdir. Damar endotellerinde bulunan glikozillenmiş proteinlerinin LDL kolesterole bağlanmaları normal kolesterole göre 3 kat daha fazladır. Endotellerde lipid birikmesi ve lipid plakların oluşması, makrofajların devreye girerek köpük hücre formasyonuna bağlı makrofaj orijinli büyüme faktörü sekresyonunun arttırır. Düz kas hücresi mitogenezi veya diğer makrofaj ürünleri retinada, glomerüllerde, koroner arterlerde, beyin arteriolleri ve periferik damarların daralmasına neden olur. AGEs'lerin DNA ile reaksiyonları kromozomal değişikliklere, DNA zincirinde kırılmalara, DNA'nın tamiri, replikasyon ve transkripsiyonunda bozukluklara neden olabilir. Diyabetik hiperglisemilerde bu olayların artması erken hücre yaşlanmasına sebep olmaktadır (40).

Deneyssel hayvan çalışmalarında AGEs'nin sensoryomotor sinir iletim hızını ve periferik sinirlere kan akımını azaltarak diyabetik nöropatiyi artırdığı görülmüştür. Ayrıca glikasyona uğramış yüksek hemoglobin düzeylerinin psikomotor etkinlikte ve motor hızda azalmalara neden olduğu gösterilmiştir (41). AGEs Alzheimer hastaların senil plak ve nörofibriller yumaklarında bulunmuştur. Yaşlı serebrovasküler bozukluğu bulunan hastaların kortikal nöronlarında ve serebral damarlarında bulunan AGEs kognitif bozulmaların şiddetiyle de ilişkilendirilmiştir. Diyabetik hastalarda Alzheimer hastalığı riski yüksektir. Alzheimer hastalığı bulunan diyabetik hastalarda büyük AGEs birikimleri ve reseptörlerinin upregülasyonu bu ilişkiyi güçlendirmektedir.



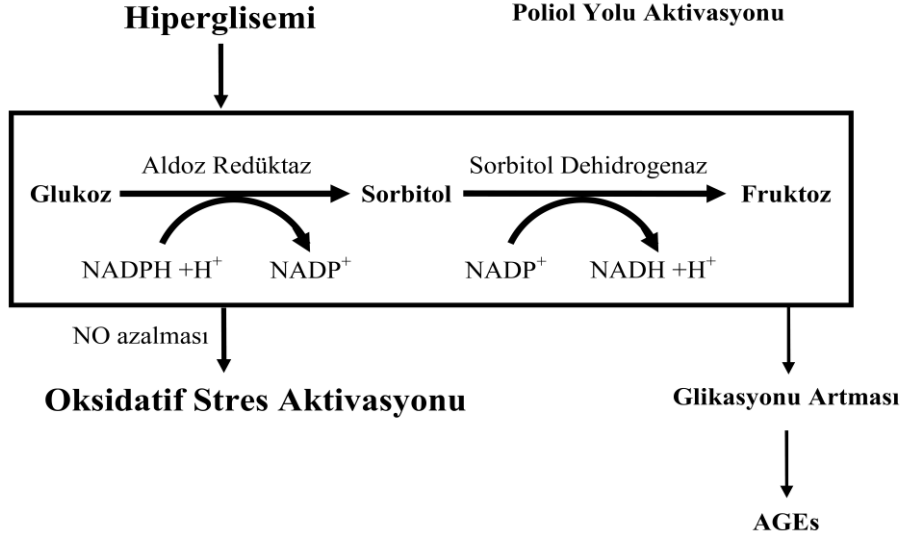
Şekil 2.3. Proteinlerin glikasyonu ve AGE oluşumu

2.4.2.3. Poliol Yolu

Hücre içi poliol (sorbitol) metabolik yolu aktif olunca, sorbitol hücre içinde birikmeye başlar. Hiperglisemi ile birlikte lens, sinir, retina, böbrek, kan damarlarında glukozun hücre içine girmesi için insüline ihtiyaç olmadığından hücre içi glukoz kandaki seviyeye ulaşır. Hücre içi glukoz miktarı fizyolojik düzeyleri aşınca glukoz için yüksek Km değerine sahip olan aldoz redüktaz enzimi aktifleşir ve poliol yolu aktifleşir. Ağır diyabette göz merceğinde sorbitol gibi şeker alkollerinin birikmesi, suyun tutulmasına neden olur. Göz merceği artan osmotik basınçtan dolayı şişmeye başlar dolayısıyla lentiküler opasitler ve katarakt oluşur.

Glukozun katıldığı metabolik yollardan biri olan poliol yolağı aktif olduğunda reaksiyonun ürünü olan fruktoz miktarı artar. Fruktozdan meydana gelen gliseraldehitin gliserole dönüşmesi ve gliserolün de lipid sentezini arttırması diyabetiklerdeki hiperlipidemiye açıklar. Glukozun sorbitol yolu ile fruktoz ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak, hücre miyoinozitol düzeyi azalır ve sinir iletim hızı için önem taşıyan Na^+-K^+ ATPaz enzim aktivitesi azalır (42). DM'de miyoinozitol miktarı ya sorbitol metabolik yolu aktivitesi artışına bağlı olarak ya da hiperglisemiye bağlı olarak hücrelere miyoinozitol girişine bağlı olarak azalmaktadır. Miyoinozitol, böbrek dışı dokularda, geri dönüşümlü olarak membran fosfolipidlerinin ve fosfoinozitidlerinin yapısına girer. Hücre dışı olayların hücre içi mesajlar olarak iletiminde etkin olan fosfoinozitid metabolitlerinin azalışı Na-K ATPaz aktivitesindeki azalışa paralel olarak sinir iletim hızında da bir azalmaya sebep olmaktadır.

Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanılır. Hücre fonksiyonlarının gerçekleşmesi için önemli olan okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi işlemi ve NO sentezi için NADPH gerekli olduğundan, poliol yolunun aktif olması NADPH miktarını azalmasına ve böylece glutatyon miktarını azaltarak antioksidan etkinliğin azalmasına yol açar (43). Redükte glutatyonun ve vazodilatatör olan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarını artmasına neden olur. Vazodilatör mediatörlerin kaybı, endonöronal kan akımı, endonöronal hipoksi veya iskemi sonucu nöronların hasarında neden olur (40).



Şekil 2.4. Poliöl Yolunun DM ile Aktivasyonu

2.5. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres diyabet, kalp hastalıkları, yaşlanma gibi pek çok olayın patogenezinde önemli bir role sahiptir. DM’da serbest radikallerin; non-enzimatik glikasyon, enerji metabolizması değişikliklerinden kaynaklanan metabolik stres, poliöl yolağının aktivasyonu, hipoksi ve iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarı sonucu arttığı ve antioksidan savunma duvarının aşılması diyabetik komplikasyonlara yol açtığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (44, 45).

Lipid peroksidasyonu, hem yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktifleşen lipooksijenaz yolu ile prostoglandinlerden, hem de serbest radikaller ve geçiş metallerinin etkisi ile endotelial ve fagositik hücrelerin membranlarında bulunan lipidlerden, nonenzimatik yolla oluşmaktadır. Daha sonra her iki yola ait ürünler, karşılıklı olarak birbirlerini aktive ederek, lipid peroksidasyonunu artırmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar da ise, plazma lipid peroksidlerindeki artış, diyabetin yanı sıra vasküler hastalıklar ve hipertrigliseridemi ile ilişkilendirilmiştir. Vasküler komplikasyonları olan diyabetli hastalarda, hiperglisemiye bağlı hem LDL oksidasyonu hem de nonenzimatik glikasyon artmaktadır.

DM’da lipid peroksidasyonunun yanı sıra protein oksidasyonu da artmaktadır. Sistemik oksidatif stres, proteinlerin karbonil gruplarının artışına neden olmaktadır. Stres olarak tanımlanan protein karbonil gruplarındaki bu artışın; hiperglisemi,

hiperlipidemi, oksidatif stres veya reaktif karbonil türevlerinin detoksifikasyonundaki azalmadan kaynaklanabileceği literatürlerde bildirilmektedir (46).

Oksidatif stresin vücutta diğer bir hedefi ise insülin sentezi ve salınımından sorumlu olan pankreas β hücreleridir. DM uzun süreli kan glukoz ve serbest yağ asitlerinin artışı pankreas β hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır . Pankreas β hücrelerinin SOD, GSH-Px, CAT gibi antioksidan enzimler bakımından yeterli savunması olmadığında serbest radikallere karşı duyarlıdır. Serbest radikallerin artması ve artan lipit peroksidasyonu sonucu Langerhans adacık hücrelerindeki glukozun oksidasyonu artar ve insülin salınımı inhibe olur. DM oksidatif stresin artışına neden olduğu gibi oksidatif stresin artışında DM neden olmaktadır.

DM'daki uzun süreli hiperglisemi, açıklanan mekanizmalar ile sürekli ve şiddetli olarak oksidatif stresi tetiklemektedir. Serbest radikal üretiminden başka hipergliseminin laktat üretimini ve doku asidozunu artırdığı, serebral kan akımını azaltıp, hipertrombotik durum ve vazojenik ödem oluşturarak serebral otheregülasyonu bozmaktadır (47).

Sonuç olarak; kısa süreli ya da uzun süreli hiperglisemi sonucu artan serbest radikal üretimi, vazojenik ödem, serebral kan akımında azalma bunun yanında santral sinir sistemi hücrelerinde gen ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler nöronal ve endotelial hasara neden olmaktadır. Bu hasar ensefalopati, kognitif ve davranışsal bozukluklar gibi önemli klinik sorunlara neden olmaktadır.

2.6. Deneysel Diyabet Modelleri

Diyabet çeşitli hayvan türlerinde farmakolojik, cerrahi veya genetik manipülasyonlar ile indüklenebilir. Diyabet konusunda deneylerin çoğu kemirgenler üzerinde yapılmasına rağmen bazı deneylerde büyük hayvanlar da kullanılmaktadır.

2.6.1. Cerrahi Yöntemlerle Oluşturulan Diyabet Modeli

Deneysel diyabet araştırmalarında kullanılan modellerden biri, pankreasın tamamen çıkartılmasıdır. Son yıllarda doğal ürünlerin etkilerini araştırmak için yapılan çalışmalarda özellikle sıçan, domuz, köpek ve primatlar gibi hayvan türleri üzerinde model olarak kullanılmaktadır. Bu teknikte; yüksek seviyede teknik uzmanlık ve yeterli ameliyat donanımı gereklidir. Büyük bir ameliyat gerektirdiği için enfeksiyon riski yükselir, yeterli postoperatif analjezi ve antibiyotik kullanımı artar. Ayrıca malabsorpsiyonu önlemek için pankreas enzim takviyesine ihtiyaç duyulur. Gelişen

hipoglisemiye karşı pankreasın antagonistik regülasyonunun kaybolması gibi durumlardan dolayı DM çalışmalarında model olarak kullanımı zordur.

Son zamanlarda, kısmi pankreatektomi kullanılmaktadır. Orta seviyedeki hipoinsülineminin oluşması için pankreasın %80 den fazla kısmının alınması gerekmektedir. Bu yöntemde ise daha fazla pankreasın rezeksiyonu önemli hipoinsülinemiye neden olabilir (48).

2.6.2. Deneysel Diyabetin Genetik Modelleri

Spontan diyabet geliştiren hayvan modellerinde kimyasal maddelerden (alloksan ve STZ gibi) kaynaklanan yan etkiler yoktur. İnsanda görülen diyabette olduğu gibi, deney hayvanları heterojen ve karmaşık özellikler gösterir. Bu modellerde insülin direnci, obezite, dislipidemi ve hipertansiyon görülür (48, 49). Bu tip deney hayvanlarının kullanılması insan Tip 2 diyabetinde gözlemlenen bazı olayları araştırmak için oldukça önemlidir. Kendiliğinden diyabetik olan Goto-Kakizaki (GK) sıçanı, glukoz intolerant nondiyabetik *Wistar albino* sıçanlarının nesiller boyunca seçici çoğalmadan kaynaklanan Tip 2 diyabetin genetik eğilimli bir modelidir. Tip 1 diyabet modelleri ile ilgili non-obez diyabetik (NOD) farelerde tipik olarak 12. ve 30. haftalar arasında hiperglisemi gözlenir. Bu modellerin büyük bir avantajı, ateroskleroz modeli olarak kullanılmasıdır ve birçok doğal ürünün etkinliğinin test edilmesidir (49). Doğal ürünler ile yapılan araştırmalarda en fazla kullanılan modellerden birisi NOD fareleridir, diğeri ise GK sıçanlarıdır.

Genetik mühendisliği ile üretilen diyabetik farelerde ise, glukoz metabolizmasında önemli rolü olan proteinler fazla ya da az sentezlenmektedir (48). Bu modeller yüksek maliyetlidir. Son yıllarda bu alanda önemli gelişmelerin ortaya çıkmasına rağmen, bu modellerde doğal ürünlerle ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Çünkü potansiyel terapötik ajanların etki mekanizmalarının pankreatik β -hücrelerinin büyümesini ya da ölümünü inhibe etmesi yönündeki etkilerinin araştırılması kısıtlıdır (50).

2.6.3. Diyabetin Farmakolojik İndüksiyonu

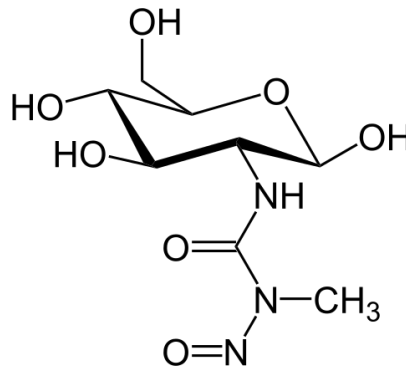
Farmakoloji alanında son yıllarda yayınlanan araştırmaların çoğunda farmakolojik indüksiyon modeli kullanılmaktadır. Bu modelin oluşturulmasında streptozotosin (% 69) ve alloksan (% 31) en sık kullanılan kimyasallardır. Bu model

diyabetin farklı yönlerinin araştırılmasında oldukça faydalıdır. Bu maddelerin her ikisi de enjekte edildikten (intravenöz, intraperitoneal veya subkutan) kısa bir süre sonra diyabetojenik etkilerini gösterirler. Diyabetin indüklenmesinde kullanılan bu ajanların dozu, hayvan türlerine, diyabet oluşturma modeline ve hayvanların beslenmesine bağlıdır. Verilen doza göre Tip 1, Tip 2 diyabet veya glukoz intoleransına benzer bir sendrom indüklenebilir (51).

Vakor, diphenylthiocarbazon ve 8-Hydroxyquinolone gibi maddeler toksik etki düzeyleri yüksek olduğu için deneysel diyabet araştırmalarında kullanımları sınırlıdır (52).

2.6.3.1. Streptozotosin

Açık ismi 2-Deoksi-2-(([metil (nitrozo) amino] karbonil) amino)- β -D-glucopyranose olan Streptozotosin (STZ) 1950'li yıllarda toprakta keşfedilmiş bir antibiyotiktir. STZ antimikrobiyal etkisinin yanı sıra, kemoterapötik alkilleyici olarak da kullanılmaktadır (53, 54). İlk defa Rakieten ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar ile 1963 yılında STZ'nin diyabetojenik etkisinin olduğunu bildirilmiştir. Diyabet araştırmalarında STZ en uygun diyabetojenik ajandır. STZ'nin neden olduğu insülinopenya (hipoinsülinizm) sendromuna STZ diyabeti adı verilmektedir (54). STZ pankreas spesifik olarak nekroz oluşturur. β -hücrelerinde oluşan harabiyet insülin salınımını geri dönüşümsüz olarak baskılar. Bundan dolayı deneysel diyabet indüklemesinde tercih edilmektedir (51, 55).



Şekil 2.5. Streptozotosin'in Kimyasal Yapısı

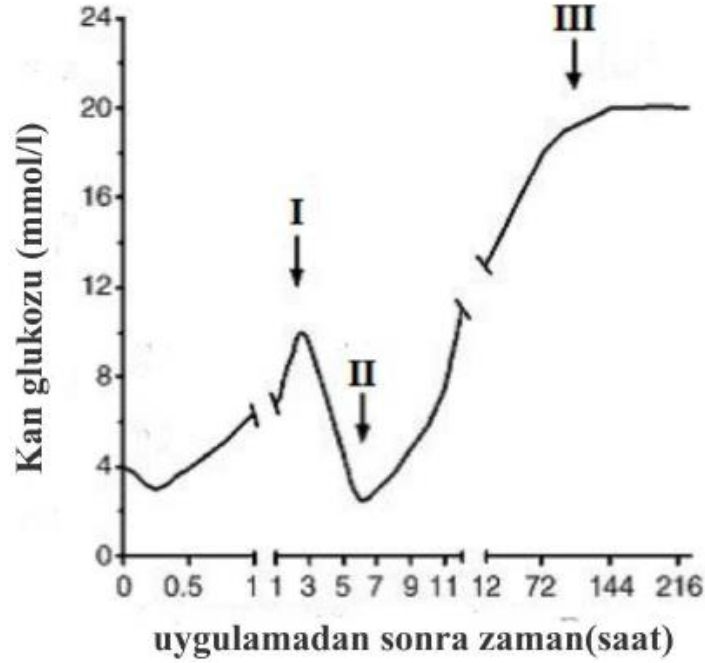
2.6.3.2 Streptozotosin ile İndüklenen Diyabet Modeli

STZ ile indüklenen diyabette kan glukozunun trifazik yanıtları şekil 2.6'da gösterilmektedir (51). STZ'ye tepki olarak organizmada plazma insülin seviyesinde azalma, pankreasın ince yapısındaki değişiklikler ve sonuçta nekrotik pankreas β hücre ölümünün gerçekleştiği bildirilmiştir (51).

Birinci faz, kan glukoz konsantrasyonunun artışı (1 saat STZ verildikten sonra) ve plazma insülinin azalması ile başlar. Bu faz genellikle 2-4 saat süren hiperglisemi ile karakteristiktir. Bunun nedeni STZ'nin pankreas β hücrelerindeki GLUT-2 reseptörlerine bağlanarak insülin salgısının inhibisyonudur (hipoinsülinemi). Bu fazda pankreasın β hücrelerinde intraselüler vakuolizasyon, GER dilatasyonu, golgi alanının azalması, salgı granüllerinin ve içerdiği insülinin azalması ve mitokondri şişmesi gibi bazı morfolojik değişiklikler ortaya çıkar (48).

İkinci faz (hipoglisemik faz), genellikle STZ enjeksiyonundan 4-8 saat sonra görülür ve birkaç saat sürer. STZ'nin hücre membranı ve salgı granüllerinin zarlarını parçalaması sonucunda dolaşım sistemine yüksek miktarda insülin salınır, böylece şiddetli geçici hipoglisemi ortaya çıkar. Bu faz sonunda β -hücrelerinde birtakım ciddi morfolojik değişiklikler görülür (48-50).

Üçüncü faz, kalıcı diyabetik hiperglisemi fazıdır. Morfolojik olarak, β -hücrelerinin granüllerini tamamen boşaltmaları ve ölmeleri 12-48 saat içinde gerçekleşir.



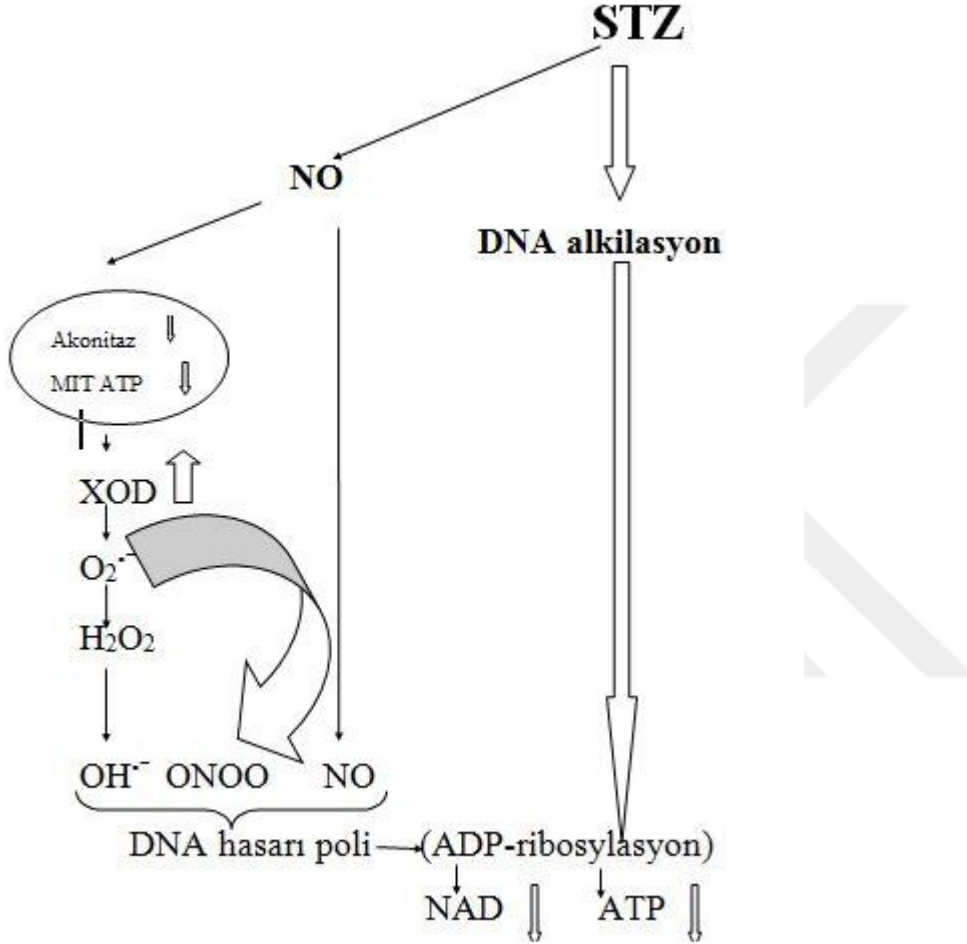
Şekil 2.6. STZ enjeksiyonundan sonraki kan glukoz değişimi

2.6.3.3. Streptozotosinin Etki Mekanizması

STZ insülin salgılanmasını inhibe ederek insüline bağımlı diyabete neden olur. Alloksanda olduğu gibi, STZ de pankreas β hücreleri tarafından spesifik olarak hücre içine alınır ve biriktirilir. STZ pankreatik β -hücrelerinin plazma membranında bulunan GLUT 2 ile seçici olarak hücreye taşınır (56, 57).

GLUT 2 reseptörü bulunmayan hücrelerin STZ'ye dayanıklı olduğu rapor edilmiştir (58, 59). STZ'nin toksisitesi metilnitrozüre kısmının DNA alkilleme aktivitesine bağlıdır. STZ'den DNA'ya metil grubunun transferi hasara neden olur ve DNA fragmentasyonu ile sonuçlanır (60, 61). DNA'nın tamiri için poli ADP-riboz polimeraz (PARP) yüksek derecede stimüle edilir. Bu olay hücredeki NAD^+ ve daha sonra ATP depolarını azaltır. Hücresel enerji depolarının tükenmesi sonucunda pankreasın β hücreleri nekroza uğrar (62). STZ aynı zamanda protein yapılarında metilasyona neden olur (63). Sonuçta DNA metilasyonu beta hücresinin ölümünden sorumludur, STZ'den kaynaklanan protein metilasyonu da muhtemelen beta hücresinde fonksiyonel bozukluklara neden olur. Alternatif hipoteze göre STZ'nin diyabetojenik etkisinin bir kısmı intraselüler NO donör potansiyeline bağlıdır (64). STZ ve metilnitrozüre nitrozo grubu içerirler ve hücrede NO artışına sebep olurlar. STZ'nin

guanilil siklaz aktivitesini ve cGMP formasyonunu artırdığı ve bu artışların NO'dan kaynaklandığı öne sürülmüştür (65). Son olarak, az miktarda reaktif oksijen türleri (ROS) ($O_2^{\cdot-}$ ve $HO\cdot$) jenerasyonu (66), STZ etkisiyle birlikte β -hücrelerinin yıkımını hızlandırabilir fakat burada ROS'un önemli bir rolü yoktur (55) (Şekil 2.7).

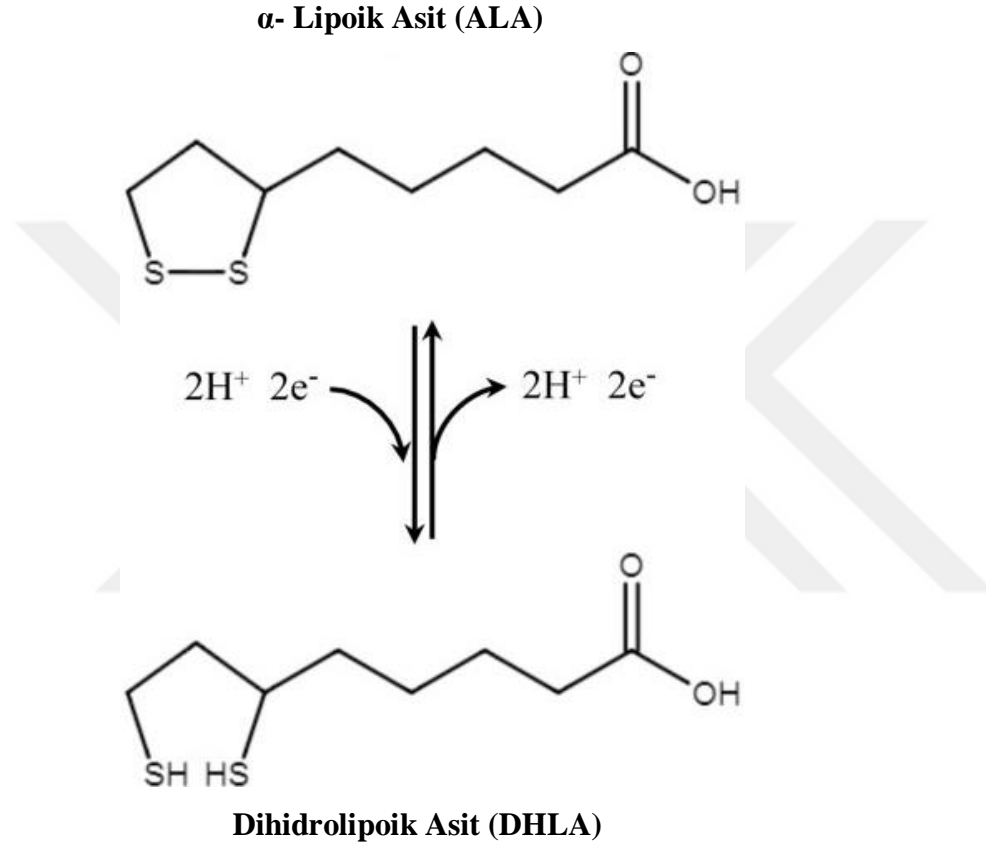


Şekil 2.7. Sıçan pankreas β hücrelerinde STZ toksisitesinin mekanizması

2.7. Alfa Lipoik Asid

Alfa lipoik asid (ALA), kimyasal ismi 1,2 dithiolan-3 pentanoic asid olan tiolitik asid, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktiviteye sahip fizyolojik sistemlerde bulunan önemli bir moleküldür (67). Diyetle ıspanak, brokoli, domates ve et ürünlerinde alınabilir. İlk kez L Reed tarafından 1951 yılında sığırci karaciğerinden izole edilmiştir. ALA, bitki ve hayvan mitokondrilerinde oktanoik asit ve sistein (sülfür vericisi)'den enzimatik reaksiyonlarla sentezlenir. Yükseltgenmiş formunda intramoleküler disülfid

bağı oluşturan, disülfid türevi bir oktanoik asittir. ALA'nın okside olmuş ditiyolan halkası çevresel şartlara bağlı olarak moleküle yüksek bir indirgeme özelliği kazandırmaktadır. ALA'nın iki ayrı izomerik konfigürasyonu vardır. R formu doğal, S formu ise sentetiktir (68). ALA ve Dihidrolipoik Asidin (DHHLA) kimyasal reaktivitesini sağlayan da ditiyolan halkasıdır (Şekil 2.8). Bu yapı ALA'yı bilinen tiyol içeren diğer biyomoleküller arasında özgün kılmaktadır.



Şekil 2.8. ALA ve DHHLA'nın kimyasal yapısı

ALA insan diyetinde yeterli miktarda bulunmasına rağmen, de novo olarak mitokondride lipoik asid sentaz tarafından sentezlenmektedir. Hem lipid hem de sulu ortamda çözünür, kolayca emilir ve hücrelere taşınarak, DHHLA'ya indirgenir. Oral kullanımından 30 dk sonra sistemik dolaşıma geçen aktif LA miktarı % 30'dur (69). ALA hücreye girdikten sonra sitozolik enzimler olan GSH redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz ve mitokondrial enzim E3 tarafından indirgenmektedir. ALA barsaktan emildikten sonra, çeşitli dokularda metabolik değişikliğe uğradıktan sonra salgılanır. Lipoat metabolizmasındaki katabolik süreç pentanoik asid yan zincirinin β -oksidasyonu

üzerinden gerçekleşmektedir. ALA metaboliti olan 3 ketolipoat, serbest ALA'nın β -oksidasyonla salgılandığını göstermektedir (67, 70).

ALA mitokondri enerji metabolizmasının sitrik asid siklusundaki önemli bileşiklerinden multienzim dehidrogenaz kompleksinin (piruvat dehidrogenaz, α -ketoasit dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz) kofaktörüdür. ALA ekzojen verildiğinde serbest radikal temizleyici, metal şelasyonu, lipid peroksidasyonun inhibisyonu, vitamin E, askorbik asid ve glutatyonun rejenerasyonu gibi antioksidan etkilere sahiptir (68). ALA ve DHLA doğal olarak fizyolojik sistemlerde bulduklarından ideal terapötik antioksidan olduğu düşünülebilir. Redükte DHLA ve okside ALA formlarının her ikisi de $\bullet\text{OH}$, HOCl ve $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'i doğrudan temizler, H_2O_2 ise redükler. DHLA'nın, ALA'ya göre antioksidan etkisi daha fazladır (67). ALA, antioksidan etkiye ilaveten bazı metabolik yollarda enzim aktivitelerini de etkileyebilir. Hepatik mikrozomal enzimlerden sitokrom P450 redüktaz ile disülfid-tiol değişimi yoluyla P450 redüktazı inhibe edebilir. Nitrik oksit sentaz ile sitokrom P450 redüktaz homologdur. Bu yüzden ALA nitrik oksit sentazı da inhibe edebilir (67). DHLA'nın antioksidan etkisi kanıtlanmış olmasına rağmen özellikle demirin varlığında prooksidan etki gösterebilir. DHLA *invitro* hem ferrik hem ferröz demir ile şelat oluşturur. Bu nedenle demirin oksidatif hasarını önler. Ancak ferritinden demirin ayrılmasını ve Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye dönüşümünü azaltarak oksidatif hasarı arttırabilir. ALA ve DHLA'nın antioksidan ve prooksidan olarak fonksiyon gösterme yeteneği oksidan stresin tipi ve fizyolojik şartlar tarafından belirlenmektedir. Tiyol bileşikleri tarafından oluşturulan prooksidan etkilerin çoğu $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve $\bullet\text{OH}$ oluşmasına bağlanmaktadır (70).

ALA biyoyararlanımı ve absorpsiyonu ile yapılan çalışmalarda diyetle R-ALA yada S-ALA alımında büyük farklılıkların olmadığı ve farklı oranlarda karıştırılarak alındığında bile biyoyararlanımı %40'ı geçmemiştir (71). Yemeklerden 30 dk önce alınması gerekmektedir. Oral alımından sonra gastrointestinal kanalda absorbe edilerek diğer organlara geçer. Kan beyin bariyerini serbest geçebilmektedir (72). Karaciğerde bisnorlipoate ve tetranorlipoate metabolitlerine metabolize edilerek renal ekskresyona uğrar. ALA/DHLA amfifilik özelliğinden dolayı vitamin C ve E den bazı önemli avantajlara sahiptir. Amfifilik özelliğinden dolayı hücre membranı ve sitozolde antioksidan aktivite gösterebilmektedir (73).

ALA diyabette insulin rezistansını ve nöropati gelişimini kontrol etmektedir. Bu etkilerini beyinde insülin benzeri uyarılar yaparak gösterir. Beyinde kan glukoz

miktarının arttığı mesajını vererek enerji metabolizmasının düzenlenmesinde önemli enzimlerin genetik yanıtlarını etkilemektedir. İştahı azaltıp kasta enerji kullanımını artırarak leptin benzeri etkiler oluşturur. Oral yolla kısa süreli alfa lipoik asit kullanan tip 2 diyabet hastalarında insüline duyarlılığın ve glukoz kullanımının düzenlendiği görülmüştür ancak HbA_{1c} seviyelerinde düşüş gözlenmemiştir (74).

ALA toksisitesine dair yapılan çalışmalarda güçlü bir doğal antioksidan olan Vitamin C takviyesinde gözlemlenen prooksidan etki gözlenmemiştir. Ratlarda LD₅₀ 2,000 mg/kg olarak bildirilmiştir. İnsanlarda LD₅₀ hayvanlardaki gibi kesin bir doz olmamakla beraber genç bayanlarda 100,000 mg, yetişkin erkekler için 200,000 mg aralığındadır. ALA intravenöz ek takviye kullanımında kişinin yaş ve vücut kitle indeksine göre bu aralıklarda dozlar belirlenir. Klinik uygulamalarda günlük 1,800 ve 2,400 mg aralığında kullanımına dair hiçbir yan etki gözlemlenmemiştir (75).

ÇALIŞMA PLANI

wistar albino erkek sıçan
250-300g
ad libitum
her kafeste 4 sıçan



2. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Hayvanlarının Temini

Çalışmamızda İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen *Wistar albino* türü erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışmanın tüm aşamalarında, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan 20.01.2015 tarih ve 2015 /A-11 nolu etik kurul kararına uygun çalışıldı. Çalışmada kullanılan 250-300 g ağırlığındaki erkek sıçanlar deney gününe kadar standart barınma kafeslerinde tutuldu. İçme suları günlük değiştirildi ve gün aşırı kafes temizliği yapıldı. Sıçanlar oda sıcaklığı 22-24 °C arasında, havalandırma şartları sağlanmış, aydınlatılması 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanan odalarda barındırıldılar. Sıçanlar çalışma boyunca *ad libitum* standart pellet yemle beslendi. Bir kafeste en çok 4 sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldılar. STZ uygulanan gruplarda kayıp olabileceği olasılığı düşünülerek, istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar elde edilebilecek en az sayıda sıçan kullanılarak her gruba 10 sıçan alındı 1. grup kontrol grubu; 10 adet sıçan, 2.grup STZ grubu; 10 adet sıçan, 3.grup STZ+ALA 10 adet sıçan, 4. grup ALA olacak şekilde toplam 40 adet sıçan gruplandırıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara hiçbir müdahale yapılmadan diğer gruplarla eşit koşullarda tutuldu.

3.2. Deney Hayvanlarında Diyabet Oluşturulması

Çalışmamızda diyabet oluşturulacak sıçanlar 12 saat öncesinden aç bırakıldı. Vücut ağırlıkları dikkate alınarak 0,1 M sodyum sitrat tamponu (pH 4,5) ile taze hazırlanmış 50 mg/kg STZ (Sigma-aldrich CAS no:18883-66-4) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Literatür taramalarında STZ ile oluşturulan diyabet modellerinde 65 mg/kg ile 40 mg/kg arasında değişen STZ dozları kullanılmıştır. yapılan çalışmalar doğrultusunda bizim çalışmamızda rat ölümü olmaması ve tek dozla diyabet oluşturmak amacı ile 50 mg/kg STZ dozunu kullandık (76, 77). Ani ve şiddetli hipoglisemiye önlemek için, STZ enjeksiyonundan sonraki 24 saat boyunca %10' luk glukoz solüsyonu içme suyu olarak sıçanlara verildi. STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra kuyruk kanından kan glukoz ölçümü yapıldı. Kan glukoz seviyeleri 200 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar diyabet olarak kabul edildi (78) ve STZ ile STZ+ALA gruplarına alındı.

3.3. ALA Uygulanması

Çalışmamızda oluşturduğumuz dört gruptan ALA grubu ve diyabet oluştuktan sonra ALA tedavisi uygulanan ve STZ+ALA grubundaki sıçanlara çalışmanın ilk gününden itibaren 6 hafta boyunca ALA (abcamBiochemical CAS No:1077-28-7) uygulaması yapıldı. Her gün aynı saatte (10:00-11:00) günlük taze hazırlanmış ALA 100 mg/kg/gün (79) dozunda her hayvana 0.5 ml çözelti şeklinde oral gavajla verildi.

3.4. Öğrenme Testinin Yapılması

Morris su labirenti (Morris Water Maze) testi kemirgenlerde görsel mekânsal öğrenme ve hafıza gelişimini anlayabilmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu çalışmada deneysel diyabet oluşturulan ratlarda ALA'nın uzun süreli hafıza üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapıldı.



Şekil 3.1. Çalışmamızda kullanılan Morris Water Maze Testi

Çalışmamızda odanın paravanlarla çevrili kısmına yerleştirilen 120 cm genişliğinde ve 60 cm boyunda içi 40 cm kadar su dolu siyah renkli polikarbon bir tank kullanıldı. Tanktaki suyun sıcaklığı 22 °C'de sabit tutuldu. Doğu, batı ve güney yönlerinin lokalize edilebilmesi amacıyla deney sonuna kadar yerleri değiştirilmeden duvarlara hayvanların dikkatini çekebilecek renk ve şekilde ipuçları yerleştirildi. Kuzey

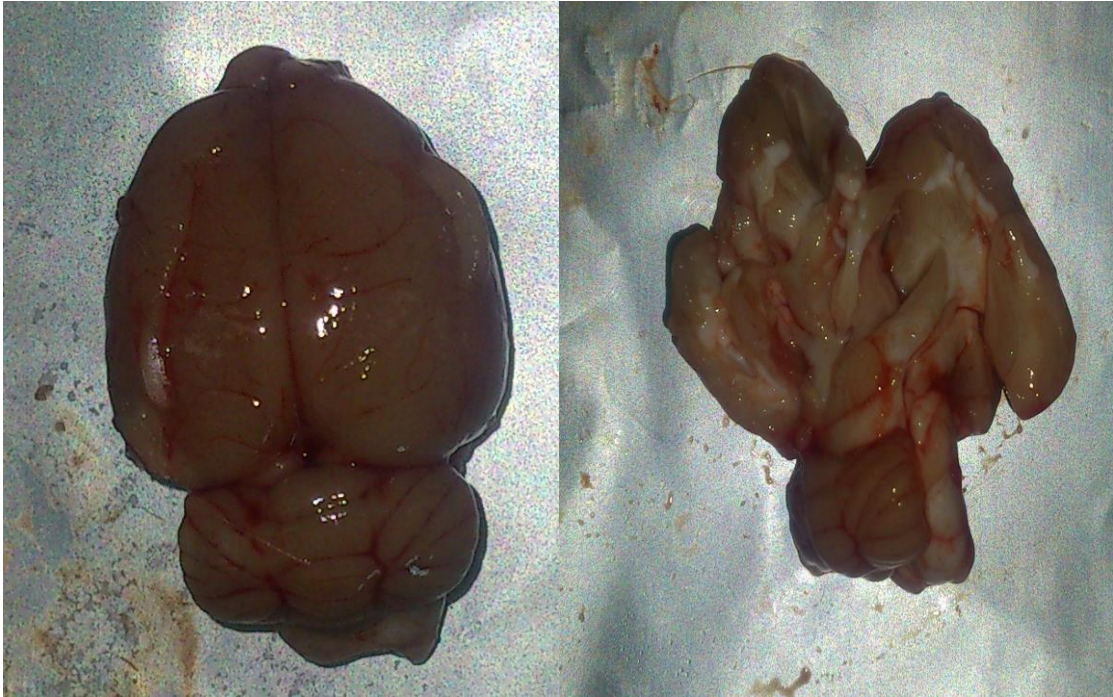
duvarı boş bırakıldı. Odanın tavanına havuzu ortalayacak şekilde yerleştirilen kamera, görüntülerin kaydedilip verilerin işleneceği bir izleme programı yüklü bilgisayara bağlandı. Havuza su yüzeyinin 2 cm altında kalacak şekilde platform yerleştirildi ve sıçan platforma çıktığında kendini güvende hissetmesi amacıyla platformun yüzeyi pençeleriyle tutunabileceği siyah renk kumaşla kaplandı.

Deney başlamadan önce (habitüasyon günü) hayvanlar havuza bırakılarak 90 sn süreyle yüzmelerine izin verildi. Bu alıştırma yüzüşü sonrasında testin görsel mekânsal öğrenme bölümüne başlandı. Yönler ve hayvanlar düzenli bir sırayla seçilerek yüzleri duvara dönük şekilde doğu, batı, kuzey ve güney yönlerinden havuza bırakılarak yüzdürüldü ve görüntüleri kaydedildi. 90 sn içinde platformu bulamayan hayvanlar platforma yerleştirilerek 30 sn dinlendirildi ve latansları 90 sn olarak kabul edildi. Ardışık 4 gün boyunca (spatial oryantasyon) deney tekrarlandı ve veriler kaydedildi. Her gün hayvanların havuza bırakılma sıraları ve bırakıldıkları kadranda düzenli bir sıra içerisinde yapıldı. Mekânsal öğrenmeden 4 gün sonra yani deneyin 43. gününde (retansiyon günü) uzun süreli hafızanın değerlendirilmesi yapıldı. Testin 5. günü platform çıkarıldı ve ratlar aynı sırayla yine 4 yönden havuza bırakılarak yüzdürüldü ve görüntüleri kaydedildi. 90 sn içinde platformun bulunduğu kadranda hayvanların geçirdikleri süre hesaplanarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi.

3.5. Çalışmanın Sonlandırılması ve Beyin Dokularının Çıkarılması

Çalışmamızda 6. haftanın sonunda 5 mg/kg xylazine ile 50 mg/kg ketamin kokteyli i.p. uygulanarak genel anestezi altında sıçanların karın derisi bistüri yardımıyla açıldı. Kalpten alınabilecek tüm kan alınarak sıçanlar sakrifiye edildi. Sonrasında sıçanların kafatasları açılarak beyin dokuları çıkarıldı. Kuru buz üzerinde ve sıvı azot sprey kullanılarak beyin dokusundan korteks, hipokampus, hipotalamus ve stratum bölgeleri ayrıldı. Beyin bölgelerinden bir miktar histolojik incelemeler için ayrıldı. Diğer parçalar ise biyokimyasal incelemeler için hemen alüminyum folyoya sarılıp grup numaraları belirtilerek plastik kaplara konuldu. Kan örnekleri daha sonra yapılabilecek çalışmalarda kullanılmak üzere 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen serum tüplere aktarıldı. Sonra tüm numuneler -80 C° dereceye ayarlı derin dondurucuda biyokimyasal testlerin yapılacağı güne kadar saklandı. Deneyden bir gün önce derin dondurucudan çıkarılan beyin dokularının bir gece süreyle buzdolabında (+4 C°) bekletilerek buzlarının çözülmesi sağlandı. Ertesi gün dokular tartılarak her bir

örneğin yaş doku ağırlığı kayıt edildi. içi buz dolu taşıma kaplarına yerleştirilmiş cam tüplere aktararak soğukluğu muhafaza edildi. Yaş doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde üzerine soğuk Tris-HCl tamponu (pH 7,4, 0.2 mM) eklenerek homojenizatörde 16000 devir/dakika hızda 3 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat vortekslendikten sonra eppendorf tüplere aktarıldı ve bu homojenatlarda MDA, PC ve protein tayinleri yapıldı. Homojenatların bir bölümü, 1 saat süreyle 2200 g'de +4 C° soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlar SOD, CAT, GSH-Px, GSH, TAS, TOS ve protein tayinlerinde kullanıldı.



Şekil 3.2 Rat Beyin Dokusu

3.6. Beyin Dokusunda Yapılan Analizler

3.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Kullanılan Reaktifler: Substrat solüsyonu [0,3 mmol/L ksantin, 0,6 mmol/L Na₂EDTA, 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, 1 g/L BSA] ksantin oksidaz (XO:167 U/L), 2 M (NH₄)₂SO₄, 0,8 mmol/L CuCl₂.

Deneyin prensibi: SOD aktivitesi Sun (80) ve arkadaşları tarafından tanımlanan, Durak ve arkadaşları tarafından modifiye edilen NBT indirgeme yöntemiyle çalışıldı (81). Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen

süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Reaksiyon ürünü olan bu renkli formazonlar 560 nm'de maksimum absorbanı verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağılı olarak açık renk oluşmaktadır. Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

Deneyin yapılışı: Daha önce elde edilen homojenat süpernatantının bir kısmı 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı içinde vortekslenip 30 dk süreyle 2200xg devirde soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

	Kör	Numune
Substrat solüsyonu	2.85 ml	2.85 ml
Kloroform-Etanol Ekstraktı	-	0.100 ml
Bidistile su	0.100 ml	-
XO (167 Ü/l)	0.050 ml	0.050 ml

25 C°'de 20 dakika inkübasyon süresi başlatıldı.

CuCl ₂	1 ml	1 ml
-------------------	------	------

Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm'de okundu.

SOD aktivitesinin hesaplanması: % İnhibisyon= $(A_K - A_N) / A_K \times 100$

A_K: Kör absorbanı

A_N: Numune absorbanı

%50'lik inhibisyona 1 U denildiği için

Aktivite (U/ml)= $[(\% \text{ inhibisyon} / 50) \times (1 / 0.1)] \text{ ml}$

Spesifik aktivite (U/mg protein)= $[U / \text{ml} / \text{mg} / \text{ml} \text{ protein}]$.

Sonuçlar, U/mg protein olarak ifade edildi.

3.6.2. GSH Analizi

Kullanılan reaktifler: 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (1,5 mg/ml), GSH redüktaz (6 U/ml), NADPH (4 mg/ml), pH :7 fosfat tamponu

Prensibi: GSH konsantrasyonu Beutler ve ark. metoduna göre ölçüldü (82) GSH seviyesi, 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellmann's solüsyonu) ile sülfhidril gruplarının sarı renk oluşturması ve bu rengin 412 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. GSH seviyesi µmol/ g protein olarak verildi.

Deneyin yapılışı:

Kör	Numune
1 ml tampon	1 ml tampon
10 µl numune	10 µl distile su
50 µl NADPH	50 µl NADPH
20 µl DTNB	20 µl DTNB
20 µl GSH redüktaz	20 µl GSH redüktaz

Vortexle karıştırılıp, 5 dk beklenir. Numunelerin absorbensları 412 nm de köre sıfırlanarak spektrofotometrik olarak okundu.

Hesaplama: 2500-1000-500-250-100-10 µmol/g protein konsantrasyonlarda hazırlanan standart GSH solüsyonlarının konsantrasyonuna bağlı olarak vermiş oldukları absorbens değişim grafiğine göre sonuçlar hesaplanır. Değerler µmol/g protein cinsinden hesaplanır .

3.6.3. MDA miktarının tayini

Kullanılan reaktifler: % 0,675 tiobarbitürik asit (TBA) çözeltisi, %10 triklorasetikasit (TCA) çözeltisi ve 20 mM 1,1,3,3- tetrametoksipropan (standart).

Prensibi: Esterbauer ve Cheeseman'nin metodu ile çalışıldı (83). En çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemidir. Asidik ortamdaki tiyobarbitürik asit ile 90-95 C° de reaksiyona giren malondialdehit (MDA) ve diğer TBARS, pembe renkli kromojen meydana getirir. Onbeş dakika kaynatıldıktan sonra hızla soğutulan numunelerin absorbensları 532 nm de spektrofotometrik olarak okundu.

Deneyin Yapılışı:

	NUMUNE	KÖR
Homojenat	0,5 ml	-
TCA % 10	2,5 ml	2,5 ml
Deiyonize su	-	0,5 ml

90 °C 15 dakika bekletildikten sonra 3000 g 'de 10 dakika santrifüj edildi

Süpernatant	2 ml	2 ml
TBA % 0,675	1 ml	1 ml

90 °C 15 dakika bekletilir, soğutulur ve köre karşı 532 nm'de okunur.

Hesaplama: 20 mM/L stok standart çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve elde edilen sonuçlar ile standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti numunelere uygulanarak MDA miktarı yaş gram doku başına nanomol olarak hesaplandı.

3.6.4. GSH-Px Aktivitesinin Tayini

Kullanılan reaktifler: 150 mM redükte GSH, 8 mM NADPH, 1 M NaN_3 , enzim [1,5 ml 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 50 μl GSH-redüktaz], 2 mM H_2O_2 , fosfat tamponu (50 mM, pH:7,5).

Deneyin prensibi: GSH-Px aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (84). GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP^+ 'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.

Enzim ünitesi; birim zamanda okside olan mikromol NADPH miktarıdır.

Deneyin yapılışı: Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanan spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri 5 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

Fosfat tamponu 5 mM EDTA'lı	2,65 ml
Redükte GSH (150 mM)	0,10 ml
NADPH (8 mM)	0,10 ml
Enzim (23,3 Ü/L)	0,01 ml
NaN_3 (1 M)	0,01 ml
Süpernatant	0,02 ml

30 dakika oda ısısında inkübasyon

H_2O_2 (2 mM)	0,100 ml
-------------------------------	----------

Hesaplama: Sonuçlar, IU/L mg protein olarak hesaplandı.

Hesap: $\text{IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1/0.02)$

Spesifik aktivite (IU/L mg protein) = $(\text{IU/L}) / (1000 \times W)$

W: gram protein miktarı

3.6.5. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Kullanılan reaktifler: Fosfat tamponu (pH 7.0, 50 mM) ve fosfat tamponu kullanarak absorbansı 0.500 nm'ye ayarlanmış olan H₂O₂ çözeltisi.

Deneyin prensibi: Katalaz aktivitesi Aebi'nin metoduna göre ölçüldü(85). 240 nm'de maksimum absorbans veren H₂O₂ deney ortamına ilave edilen katalaz aktivitesiyle su ve oksijene parçalanır. Bu durum ultraviyole (UV) spektrumunda absorbans azalmasına neden olup absorbanstaki azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Bir CAT ünitesi: Birim zamanda bir mikromol H₂O₂'i suya çeviren enzim miktarıdır.

Deneyin yapılışı: Kör olarak fosfat tamponunun kullanıldığı UV spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda sıfır ayarı yapıldıktan sonra H₂O₂ çözeltisi 0.500 absorbans verecek şekilde aynı tampon ile dilüe edildi ve substrat olarak kullanıldı. Substrat içine numune ilavesiyle her 15 saniyede bir defa olmak üzere 2 dakika süre ile absorbans azalması kaydedildi. Hesaplamada 1 dakikalık lineer absorbans azalması değerleri esas alındı.

	Kör	Numune
Fosfat Tamponu (50 mM, pH=7)	3 ml	-
H ₂ O ₂ çözeltisi (A ₂₄₀ =0.500)	-	2,99 ml
Süpernatant	-	0,01 ml

Hesaplama: Sonuçlar, k/g protein olarak hesaplandı.

$$k = [2.3 \times \log (OD_1/OD_2)] / \Delta t \text{ (sn)}$$

$$k/g \text{ protein} = k / [(g/ml \text{ protein}) \times 1000]$$

k : reaksiyon hız sabiti

9.6.6. Protein Karbonil Miktarının Tayini

Kullanılan reaktifler: DNPH (10 mM 2 M HCl içerisinde çözülmüş), 6 M guanidine (20 mM pH 2.3 potasyum fosfat içerisinde hazırlanmış), TCA, etanol:etil asetat (1:1,v/v), 100 mM NaOH

Prensibi: Plazmada protein karbonil tayini, Reznick ve Packerin yöntemine göre yapıldı (86). Yöntemin prensibi, plazmadaki proteinlerin 2,4 dihidrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları sarı rengin 360 nm ölçümü esasına dayanır.

Deneyin Yapılışı:

- ✓ 0,5 ml doku homojenatı üzerine 0,5 ml % 20 TCA eklenip vortexlenir.
- ✓ 11000 g 10 dk santrifüj edilip süpernatant dökülür.
- ✓ 0,5 ml 2 N HCL içinde hazırlanmış 10 mM DNPH eklenip vortexlenir.
- ✓ 1 saat inkübe edilir ve her 10 dk bir vortexlenir.
- ✓ İnkübasyon bitince 0,5 ml % 20 TCA eklenip vortexlenir
- ✓ 11000 g 4 dk santrifüj edilip süpernatant dökülür.
- ✓ Pellet üzerine 1 ml etanol/etil asetat eklenip vortexlenir,10 dk beklenir
- ✓ 11000 g 4 dk santrifüj edilip süpernatant dökülür. (x3)
- ✓ Tortunun üzerine 0,9 ml 100 mM NaOH eklenir.
- ✓ 37°C 15 dk benmaride çalkalanarak tortunun çözünmesi sağlanır.
- ✓ 11000 g 5 dk santrifüj edilir
- ✓ 1 ml kuvvetler ile 360 nm'de numunelerin absorbanları okunur.

Hesaplama: Sonuçlar nmol/mg protein şeklinde ifade edilir.

Örneklerdeki DNPH konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$A = 22000 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

3.6.7. Doku Homojenat ve Süpernatant Ekstraktlarında Protein Tayini

Kullanılan reaktifler: A reaktifi: 20 mmol CuSO₄, 34 mmol Na₃Sitrat, B reaktifi: 0.19 mmol Na₂CO₃, 0,1 mol NaOH ve Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) reaktifleri kullanıldı.

Deneyin prensibi: Protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi (87). Bu yöntemde, alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

Deneyin yapılışı:

	Numune	Kör
Numune	10 µl	-
Deiyonize su	490 µl	500 µl
C Reaktifi (5/1:B/A)	2,5 ml	2,5 ml

Karıştırılır, 5-10 dakika beklenir.

D Reaktifi (1/1:FCF/d.s.)	0,25 ml	0,25 ml
---------------------------	---------	---------

30 dakika oda ısısında bekletilir ve 700 nm’de köre karşı OD okunur.

Hesaplama: Standart grafiği çizmek için konsantrasyonu bilinen sığır serum albümininden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. “OD – mg/ml protein konsantrasyonu” grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu. Standart ve numuneler köre karşı 700 nm’de okundu.

$$\text{Protein (mg/ml)} = (K_{st}/A_{st}) \times AN$$

K_{st} : Standardın konsantrasyonu

A_{st} : Standardın absorbansı

AN: Numunenin absorbansı

3.6.8. Beyin Doku Süpernatant Ekstraktlarında TAS –TOS ve OSI Analizi

Toplam Antioksidan Kapasite (TAS) ölçümü Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate readerda ticari TAS kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak yapıldı. Bu kit ile asidik bir ortamda (asetat buffer 30 mmol/L; pH 3.6) sadece hidrojen peroksidi kullanarak redükte ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) molekülü, $ABTS^{*+}$ okside forma dönüşür. Asetat buffer solüsyonundaki konsantre (koyu yeşil) $ABTS^{*+}$ molekülleri uzun bir süre daha kararlı kalır. Yüksek pH daha yoğun bir asetat buffer (asetat buffer 0,4 mol/L; pH 5,8) ile dilüe edildiği zaman, rengi yavaş yavaş kendiliğinden daha açık hale dönüşür. Analiz yapılan örnekteki mevcut antioksidanlar konsantrasyonlarıyla orantılı olarak bu renkteki azalmayı bir dereceye kadar arttırır. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak izlenebilir ve renkteki açılma oranı örnekteki TAS ile orantılıdır. Mikroplate reader da 660 nm’de okunan absorbans değişimindeki deney sonuçları TAS ölçüm testleri için kullanılan standart antioksidan ve bir vitamin E analogu olan trolox solüsyonununla kalibre edilir. Sonuçlar µmol Trolox Equivalent /L biriminde ifade edilir (88, 89).

Toplam Oksidan Kapasite (TOS) ölçümü Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate readerda ticari TOS kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit ile örneklerdeki mevcut oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksi ferrik iyon oksitler. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon mediumunda bulunan gliserol moleküller tarafından gerçekleştirilir. Asidik ortamda ferrik iyonlar xyleneol orange ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen, renk yoğunluğu örnekteki toplam oksidan molekül miktarı ile orantılıdır. Deney, hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) ifade edilir (90).

Oksidatif Stres İndeksi (OSI) oksidatif stres derecesinin bir indikator parametresi olup, hesaplanması formüldeki gibidir. Total Antioxidant Status ve Total Oxidant Status Kitlerini kullanarak OSI hesaplandı.

$$\text{OSI} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}}{\text{TAS, mmol Trolox Equivalent/L}}$$

3.7. Histolojik Analizler

Alınan beyin korteks dokusu örnekleri ışık mikroskopik inceleme için % 10'luk nötral fosfat tamponlu formaldehit ile 48 saat süresince tespit edildi. Tespit işlemini sonrasında beyin dokusu örnekleri rutin histolojik doku takip prosedüründen geçirildikten sonra parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile 6 μm kalınlığında kesitler alınarak lamlar üzerine yerleştirildi. Lamlar üzerine alınan kesitler hematoksilin-eozin (H-E) ve Toluidine blue ile boyandıktan sonra Nikon Optiphot-2 ışık mikroskobu, Nikon DS Fi2 kamera ve Nikon DS-L3 görüntü analiz sistemi (Nikon Corporation, Tokyo Japan) ile incelenerek fotoğraflar çekildi.

Transmission elektron mikroskopik inceleme için alınan beyin dokusu örnekleri Leica EM AMW Automatic Microwave Tissue Processor (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) cihazında %2,5 gluteraldehit ve %1 osmium tetroksit ile tespit edildikten sonra aseton serilerinden (%30, %50, %70, %90, %100) geçirilerek dehidratasyon işlemi uygulandı. Daha sonra beyin doku örnekleri epoxy resin (Araldit CY212) bloklar içine gömüldü. Araldit bloklardan ultramikrotom yardımıyla 80 nm kalınlığındaki kesitler bakır gridler üzerine alındı. Gridler üzerine alınan ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlama işlemini takiben Zeiss Libra 120

Transmission elektron mikroskop (TEM) (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany) ile incelenerek fotoğraflar alındı.

3.8. İstatistiksel Analizler

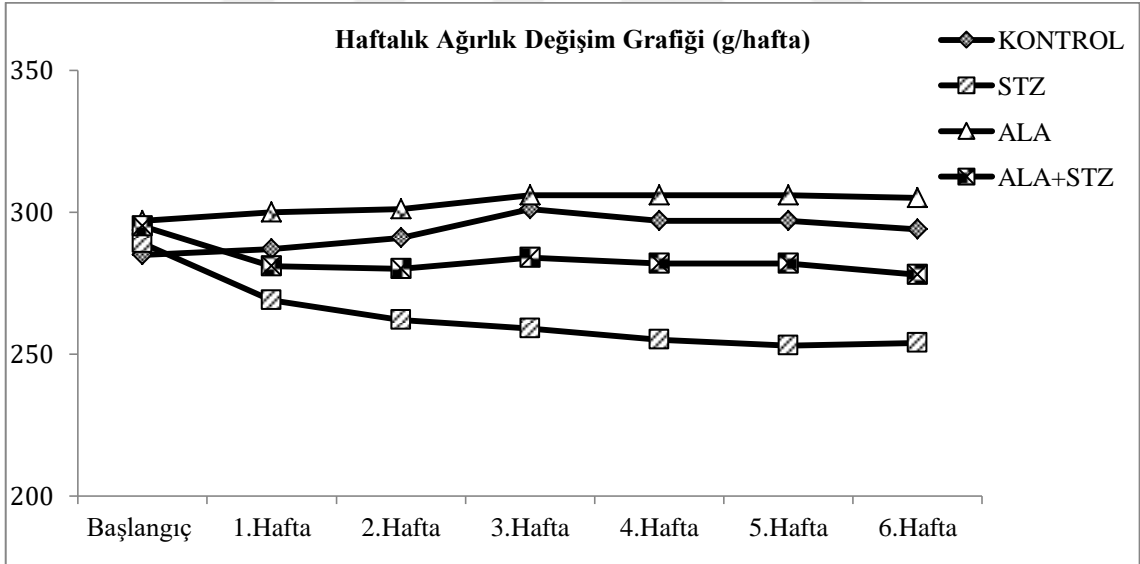
Çalışmada değerlendirilecek olan PC analizinde gruplar arası en büyük farklılık 11,9 , standart sapma 5,89 , tip I hata (α) 0,05, güç 0,90 ve grup sayısı 4 olduğunda her grupta en az 8 deneğin olması güç analiziyle belirlendi (91). STZ uygulamasında hayvanların ölebileceği göz önüne alınarak her gruba 10 adet rat alındı.

İstatistiksel değerlendirmelerde değişkenlerin gruplar arası farklılıklarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Grupların ikişerli karşılaştırılmalarında ise Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizlerde İnönü Üniversitesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı adına lisanslı IBM SPSS Statistics 22.0 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Deney Süresince Sıçanların Vücut Ağırlıkları

Deneyde kullanılan tüm sıçanların haftalık vücut ağırlıkları ölçülerek gruplardaki sıçanların ortalama ağırlıkları arasındaki değişim tablo 4.1 ve şekil 4.1 verildi. Çalışmamızın ikinci haftasında STZ grubunda kontrol grubuna göre ciddi kilo kaybı olduğu tespit edildi ($p<0.05$). STZ+ALA ve STZ grubu arasındaki kilo farkı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Gruplar arasındaki farklılık çalışmanın ilerleyen haftalarında da devam etti. Çalışmamızda grupların ortalama canlı ağırlıklarının altı haftalık takibi sonucunda STZ gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır. STZ+ALA grubunun vücut ağırlığındaki değişimin STZ grubuna göre istatistiksel olarak farklı ancak kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır. altı haftalık kilo kaybının STZ grubuna göre daha yavaş olduğunu gözlemledik .



Şekil 4.1. Sıçanların deney süresince vücut ağırlıkları ortalaması (g/hafta) a; Kontrol grubu ile, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

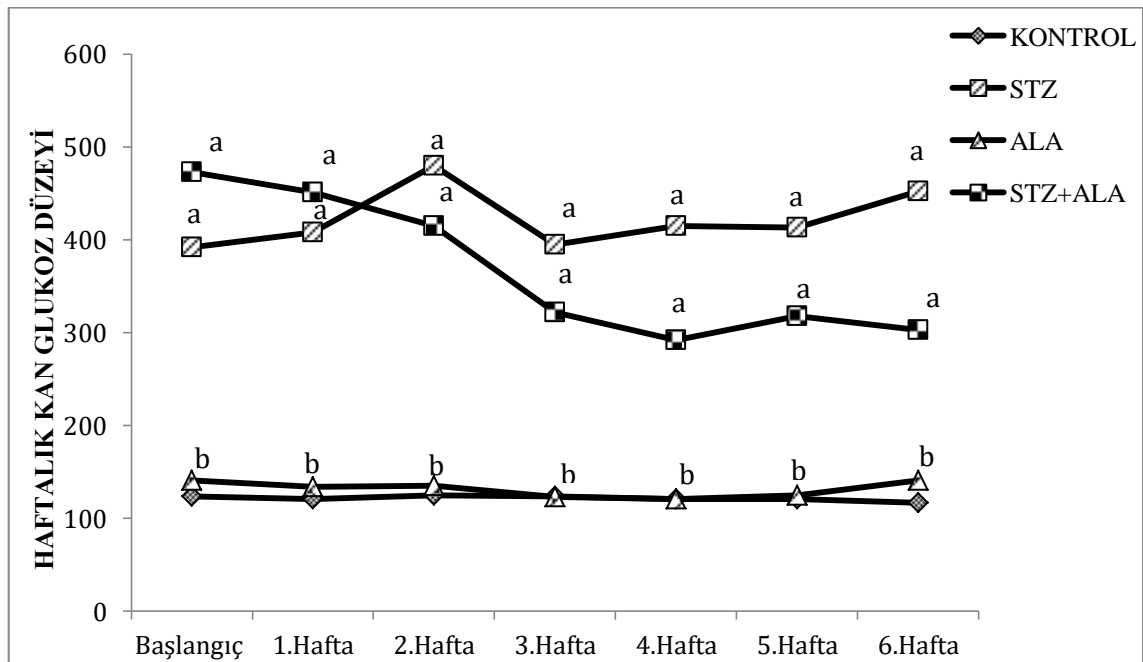
Tablo 4.1. Haftalara göre deney gruplarındaki sıçanların ortalama canlı ağırlıkları (g)

Gruplar	Başlangıç	1.Hafta	2.Hafta	3.Hafta	4.Hafta	5.Hafta	6.Hafta
Kontrol	285±28	287±24	291±21	301±23	297±28	297±28	294±37
STZ	289±20	269±22	262 ^a ±21	259 ^a ±21	255 ^a ±20	253 ^a ±20	254 ^a ±24
ALA	297±20	300 ^b ±22	301±27	306 ^b ±21	308 ^b ±20	306 ^b ±20	305 ^b ±24
ALA+STZ	295±13	281±22	280 ^b ±27	284 ^b ±30	282 ^b ±31	282 ^b ±31	278 ^b ±45

Veriler ortalama ± SD olarak verilmiş ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. a; Kontrol grubu ile, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

4.2. Deney Süresince Sıçanların Ortalama Kan Glukoz Düzeyleri

Çalışma gruplarımızdaki tüm sıçanların haftalık kan glukoz düzeyleri ölçülerek gruplar arasındaki değişim tablo 4.2 ve şekil 4.2’de gösterildi. Gruplara göre ilk ve çalışmanın ilerleyen haftalarında ortalama kan glukoz düzeyleri kıyaslandığında kontrol grubu ile STZ ve STZ+ALA grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı iken STZ ve STZ+ALA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p<0.05).



Şekil 4.2. Deney gruplarındaki sıçanların deney süresince haftalara göre kan glukoz düzeyleri (mg/dl) Veriler ortalama ± SD. a; Kontrol grubu, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

Tablo 4.2. Gruplara göre sıçanların haftalık ortalama kan glukoz düzeyleri (mg/dl)

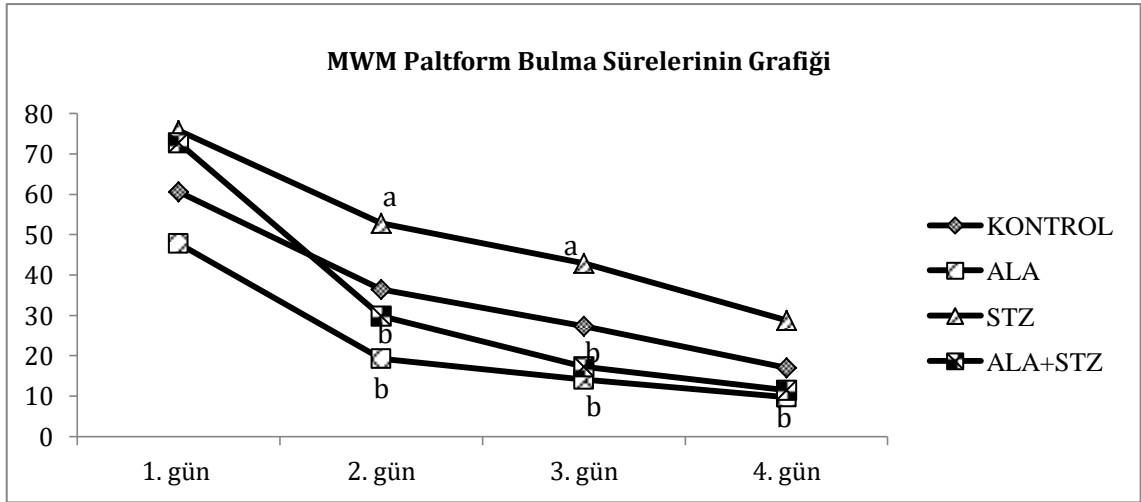
Gruplar	Başlangıç	1.Hafta	2.Hafta	3.Hafta	4.Hafta	5.Hafta	6.Hafta
Kontrol	124±10	121±7	125±11	124±10	121±7	121±13	117±13
STZ	392 ^a ±106	408 ^a ±133	480 ^a ±71	395 ^a ±106	415 ^a ±105	413 ^a ±120	452 ^a ±120
ALA	141 ^b ±19	134 ^b ±16	135 ^b ±19	123 ^b ±6	121 ^b ±9	125 ^b ±11	141 ^b ±19
STZ+ALA	473 ^a ±175	451 ^a ±107	415 ^a ±128	322 ^a ±136	292 ^a ±169	318 ^a ±165	300 ^a ±132

Veriler ortalama \pm SD ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. a; Kontrol grubu ile, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

4.3. Morris Water Maze Sonuçları

Morris Water Maze testi ile sıçanlarda bilişsel fonksiyon değerlendirilmesi yapıldı. Sıçanlar hergün dört farklı kadrandan havuza bırakılarak 4 günlük öğrenme denemeleri yapıldı ve sonuçlar Tablo 4.3'de gösterildi. Deneyin 5. günü platform bulunduğu kadrandan çıkarıldı. Ratların platformu bulmak için bu kadranda geçirdikleri süre ve geçme sayısı hesaplandı. Gruplar arasındaki farklılıklar hesaplanırken kat edilen yollar cm, zaman sn olarak ölçüldü.

MWM sonuçlarında STZ grubundaki sıçanların dört günlük platformu bulma süresi Kontrol grubuna göre uzamış ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). STZ+ALA grubunun platformu bulma süresi STZ grubuna göre kısa ve Kontrol grubu verilerine yakın değerlerde bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p<0.05$) (Şekil 4.3). ALA grubunun ilk günden itibaren platformu bulma süresi daha kısadır. ALA grubunun bu verileri STZ ve STZ+ALA grubundan istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



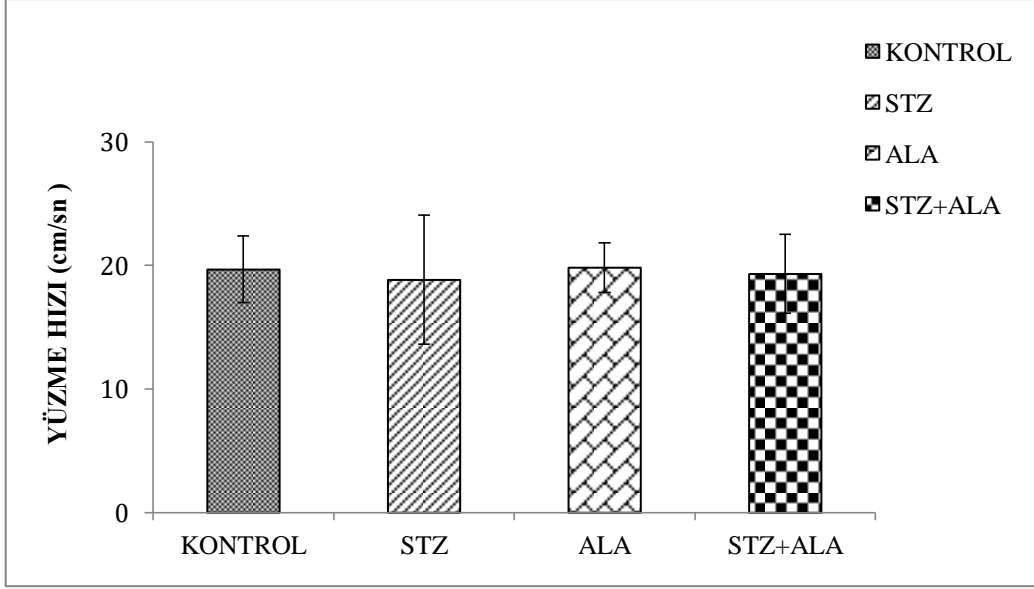
Şekil 4.3. MWM grupların 4 günlük ortalama platformu bulma süre sonuçları (sn). Veriler ortalama \pm SD a; Kontrol grubu ile, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Tablo 4.3. MWM grupların 4 günlük ortalama platformu bulma süre sonuçları (sn)

	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
Kontrol	60,61 \pm 10,77	36,39 \pm 14,52	27,28 \pm 9,65	16,97 \pm 14,08
STZ	75,72 \pm 14,79	52,83 ^a \pm 5,86	42,86 ^a \pm 20,3	28,72 \pm 9,04
ALA	47,78 \pm 11,23	19,33 ^b \pm 9,37	14,19 ^b \pm 23,04	9,81 ^b \pm 11,48
ALA+STZ	72,69 \pm 13,76	29,89 ^b \pm 3,85	17,31 ^b \pm 16,46	11,42 ^b \pm 5,39

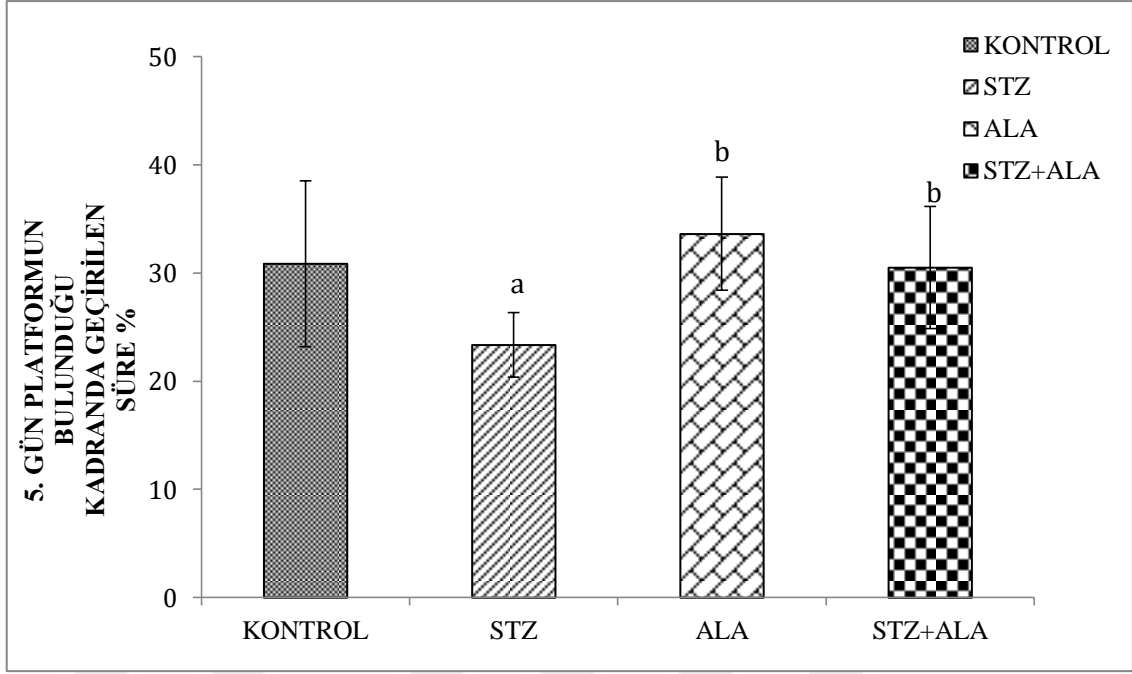
Veriler ortalama \pm SD a; Kontrol grubu ile, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

MWM testinde öğrenme becerisinin değerlendirildiği 5. Günde platform kadrandan çıkarıldı ve ratların bu alanı etraftaki yer-yön işaretlerini kullanarak hatırlayabilme yetenekleri ölçüldü. Diyabete bağlı kilo ve güç kaybına bağlı olarak gruplar arasında yüzme hızında farklılıkların kıyaslanması açısından grupların yüzme hızları değerlendirildi (Şekil4.4). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.



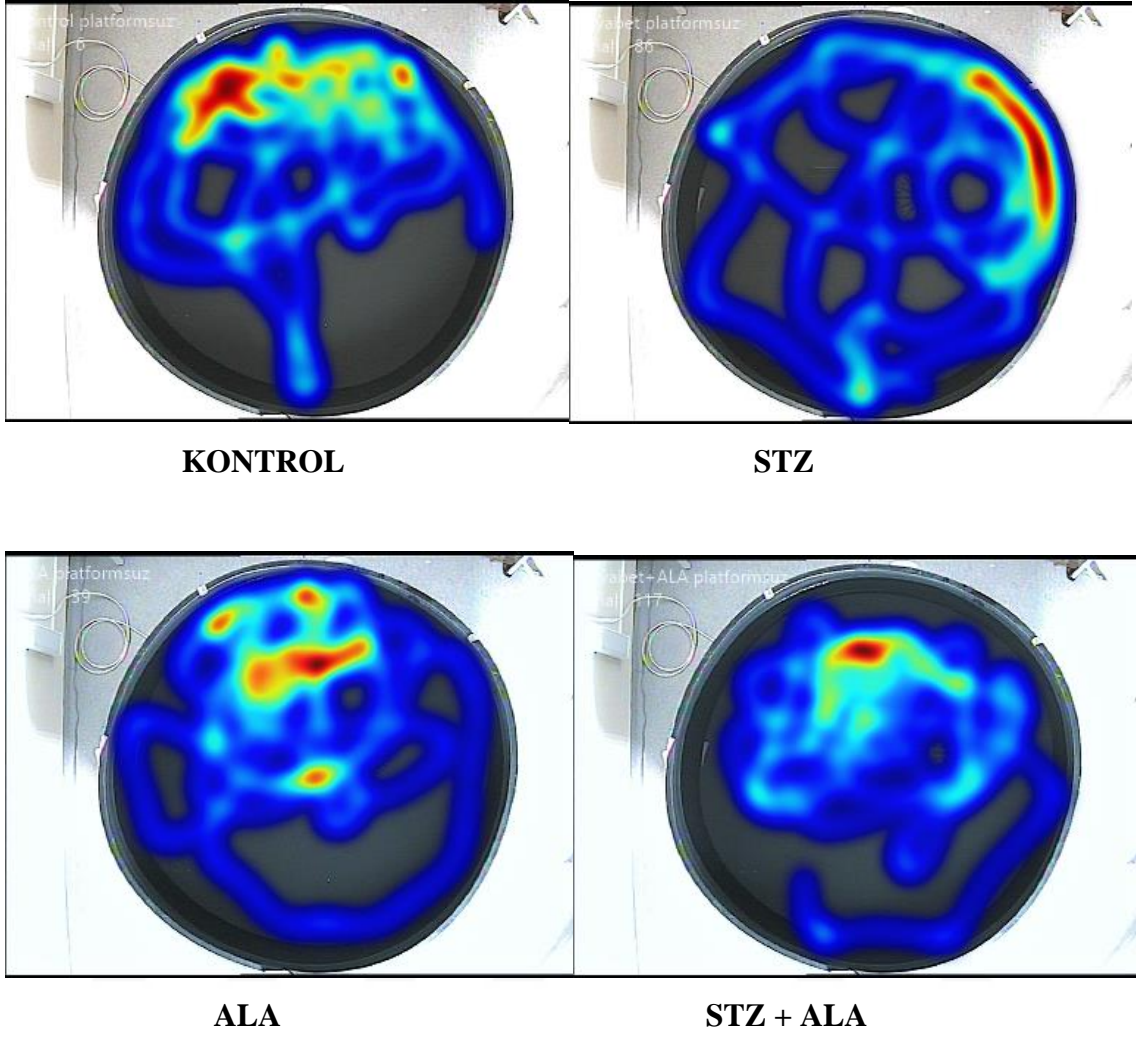
Şekil 4.4. MWM platformsuz hafızda 5. gün yüzme hızı (cm/sn) .veriler ortalama ± SD

MWM sonuçlarında sıçanların 5. Gün platformun bulunduğu kadranda geçirdikleri süre % olarak kıyaslandı. STZ grubundaki sıçanların platformu bulmak için platformun bulunduğu kadranda geçirdikleri süre Kontrol grubuna göre kısadır ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). ALA uygulanan gruptaki sıçanların bu kadranda geçirdikleri süre Kontrol grubundan daha kısadır. SZT+ALA grubunun aldığı yol mesafesi STZ grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olacak kadar kısalmıştır ($p < 0.05$). STZ+ALA grubu Kontrol ve ALA grubu ile kıyaslandığında aradaki farklılık anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. MWM grupların 5. gün platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre (sn) bulguları. Veriler ortalama \pm SD. a; Kontrol grubu ile, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

MWM testinin uygulandığı beşinci günde platform çıkartılarak sıçanlar yüzdürüldü ve beşinci gün sıçanların platformun bulunduğu kuzey batı kadranda aldıkları toplam yol vücut ısı haritasında incelendiğinde kontrol grubunun en kısa yolla platformun bulunduğu kadrana yöneldiği görülmektedir. STZ grubunun izlemiş olduğu yol karışık ve yoğunlaşmalar platformun bulunmadığı kadrarlarda yaygındır. Kontrol, STZ+ALA ve ALA grubunu görüntülerinde ise yoğunlaşmanın platformun bulunduğu kadranda olduğu ve izlenen yolun daha kısa olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6. 5. Gün kuzey doğu yönünde yüzmek için bırakılan sıçanların platformsuz havuzda izledikleri yolun ısı haritası (heat map) görüntüsü

4.4. Sıçanların Beyin Dokularında Oksidatif Stres Parametre Bulguları

Tablo 4.6. Sıçanların beyin dokularında oksidatif stres parametrelerine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel ölçütler I

BEYİN DOKUSU	GRUP	SOD (U/mg prot)	CAT (U/g prot)	GSH -Px (U/mg prot)	GSH (µmol/g prot)	MDA (nmol/g prot)
KORTEKS	KONTROL	0,081± 0,021	0,657± 0,24	1,78± 0,83	1,67± 0,68	31± 19
	STZ	0,039± 0,030 ^a	0,289±0,23 ^a	0,707± 0,41 ^a	1,16± 0,14	34± 21
	ALA	0,075± 0,034	0,572± 0,26	1,24± 0,54	1,56± 0,47	23± 6 ^b
	STZ +ALA	0,071± 0,010 ^b	0,503±0,25 ^b	1,108± 0,38	1,29± 0,48	30± 9
STRİATUM	KONTROL	0,237± 0,112	0,741± 0,24	2,41± 0,78	6,2 ±1,37	54± 27
	STZ	0,170± 0,097	0,214±0,18 ^a	1,87± 0,94	5,26± 1,31	166± 56 ^b
	ALA	0,200± 0,082	0,559± 0,22	2,164± 1,35	8,03± 1,81	51,4± 26,5
	STZ +ALA	0,218± 0,090	0,415±0,27 ^b	1,73± 1,05	6,12± 3,38	48,6± 38,6
HİPOTALAMUS	KONTROL	0,254± 0,127	0,737± 0,69	6,46± 1,9	10,1± 2,1	105± 31
	STZ	0,126± 0,096	0,401± 0,30	5,93± 2,23	6,96± 1,68	156,3±31,4 ^a
	ALA	0,247± 0,053	0,708± 0,41	6,59± 2,10	9,4± 2,54	89,9±34,8 ^b
	STZ +ALA	0,205± 0,071	0,684± 0,35	5,48± 2,6	6,98± 3,35	117± 46 ^b
HİPOKAMPÜS	KONTROL	0,102± 0,035	0,720± 0,23	2,27± 1,19	3,09± 1,58	33,7± 19,2
	STZ	0,095± 0,059	0,441± 0,15	1,32± 0,67 ^a	2,8± 1,39	46,9± 21,4
	ALA	0,120± 0,085 ^b	0,684± 0,19	1,79± 1,04	3,82± 1,97	19,9±13,6 ^{ab}
	STZ +ALA	0,107± 0,076	0,473± 0,12	1,39± 0,97	2,94± 1,21	34,3± 12,2

Veriler ortalama ± SD a; Kontrol grubu, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

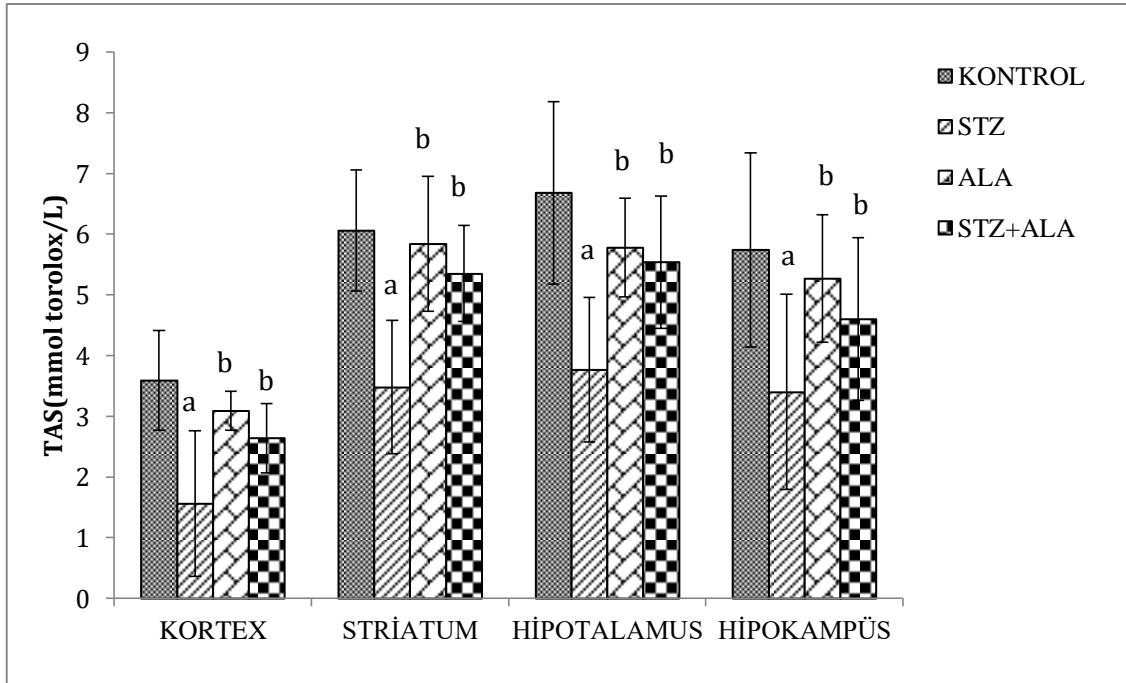
Tablo 4.7. Sıçanların beyin dokularında oksidatif stres parametrelerine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel ölçütler II

BEYİN DOKUSU	GRUP	TAS (mmoltrolox Eqv/L)	TOS ($\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	OSI (arbitrary units)	PC (nmol/mg prot)
KORTEK	KONTROL	3,59± 0,82	279± 52	77,71± 57	5,18 ±1
	STZ	1,56± 1,2	442± 98	283,33± 64	8,27± 1,3 ^a
	ALA	3,09± 0,32	256± 64	82± 45	5,6± 1,8 ^b
	STZ +ALA	2,64± 0,57	406± 54	153± 50	6,86± 2,5
STRİATUM	KONTROL	6,06± 1	2006± 645	331,02± 50	4,44± 1,21
	STZ	3,48± 1,1	2627± 644	754,88± 44	8,23± 3,25 ^a
	ALA	5,84± 1,11	2024± 345	346,57± 70	3,06± 1,05 ^b
	STZ +ALA	5,35± 0,79	2195± 663	410,28± 48	6,74± 2,35 ^a
HİPOTALAMUS	KONTROL	6,68± 1,5	2306± 702	345,20± 50	3± 0,5
	STZ	3,77± 1,19	2717± 561	723,34± 41	4,86± 3,3 ^a
	ALA	5,78± 0,81	2275± 430	393,59± 120	3,72± 1,5
	STZ +ALA	5,54± 1,09	2616± 696	472,38± 53	4,23± 1,07
HİPOKAMPÜS	KONTROL	5,74± 1,6	692± 200	120,55±65	2,06± 0,56
	STZ	3,4± 1,61	997± 581 ^a	293,23± 128	4,75± 2,75 ^a
	ALA	5,27± 1,05	743± 210	140,98± 60	2,62± 1,5 ^b
	STZ +ALA	4,6± 1,34	735± 232	159,78± 68	3,13± 2,2 ^b

Veriler ortalama ± SD a; Kontrol grubu, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

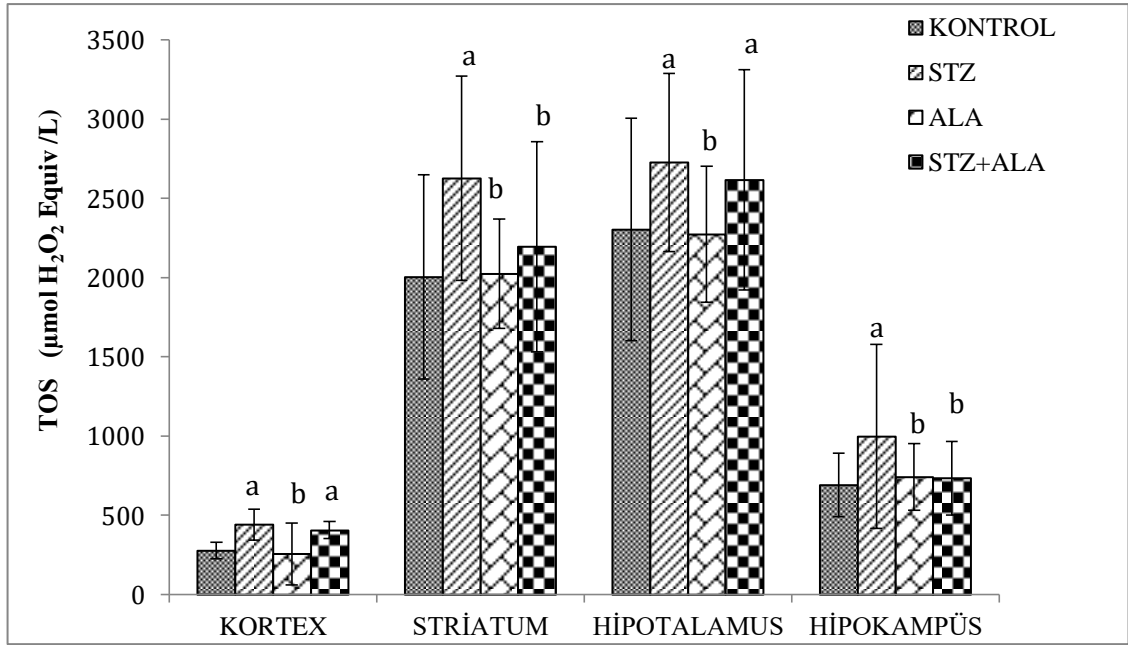
4.4.1. Sıçanların Beyin Dokusu TAS –TOS- OSI Sonuçları

Beyin dokusunun farklı bölgelerinde değerlendirilen TAS değerleri şekil 4.7’de verildi. Korteks, striatum, hipotalamus ve hipokampus bölgelerinde STZ grubundaki azalış Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). ALA ve STZ+ALA grubundaki azalış kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı değildir ancak STZ grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).



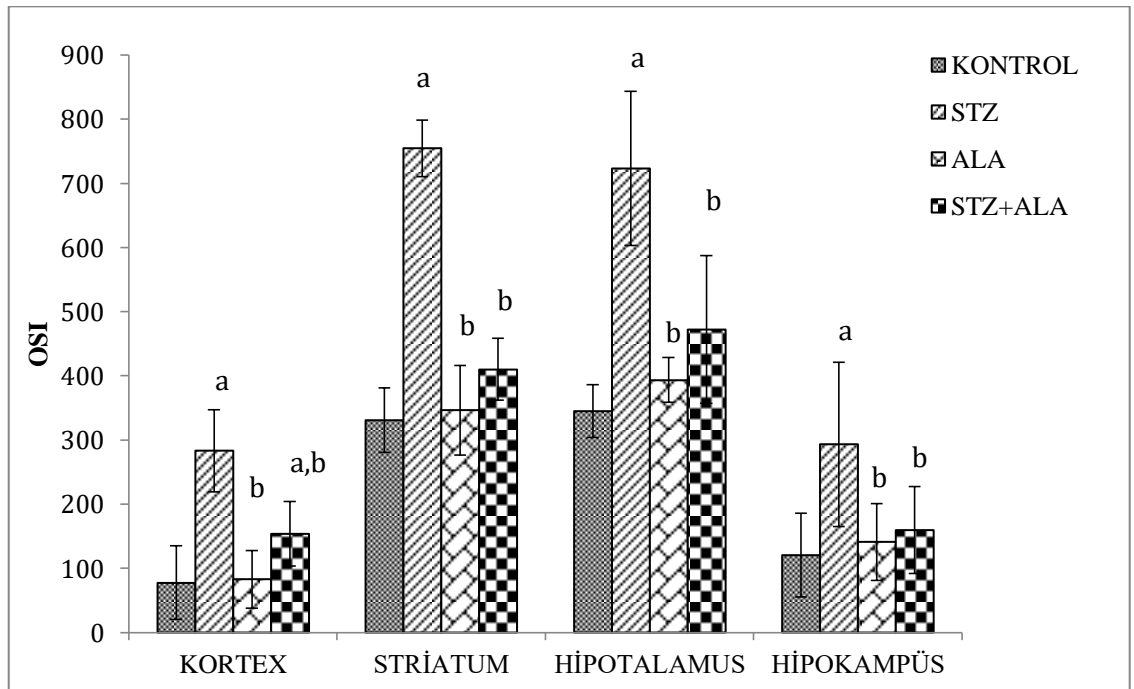
Şekil 4.7. Beyin dokusunun TAS analiz sonuçları. a; kontrol grubu, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan TOS değerleri Şekil 4.8’de verildi. Korteks, striatum, hipotalamus ve hipokampus bölgelerinde STZ grubundaki artış kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlıdır ($p<0.05$). ALA uygulaması yapılan ratlarda TOS düzeyi kontrol grubundan farksız, STZ grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür ($p<0.05$). STZ+ALA grubunda ise korteks ve hipotalamus bölgelerinde anlamlı bir azalma olmamıştır. Striatum ve hipokampus bölgelerinde TOS düzeyindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.8. Beyin dokusunun TOS analiz sonuçları. a; Kontrol grubu, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

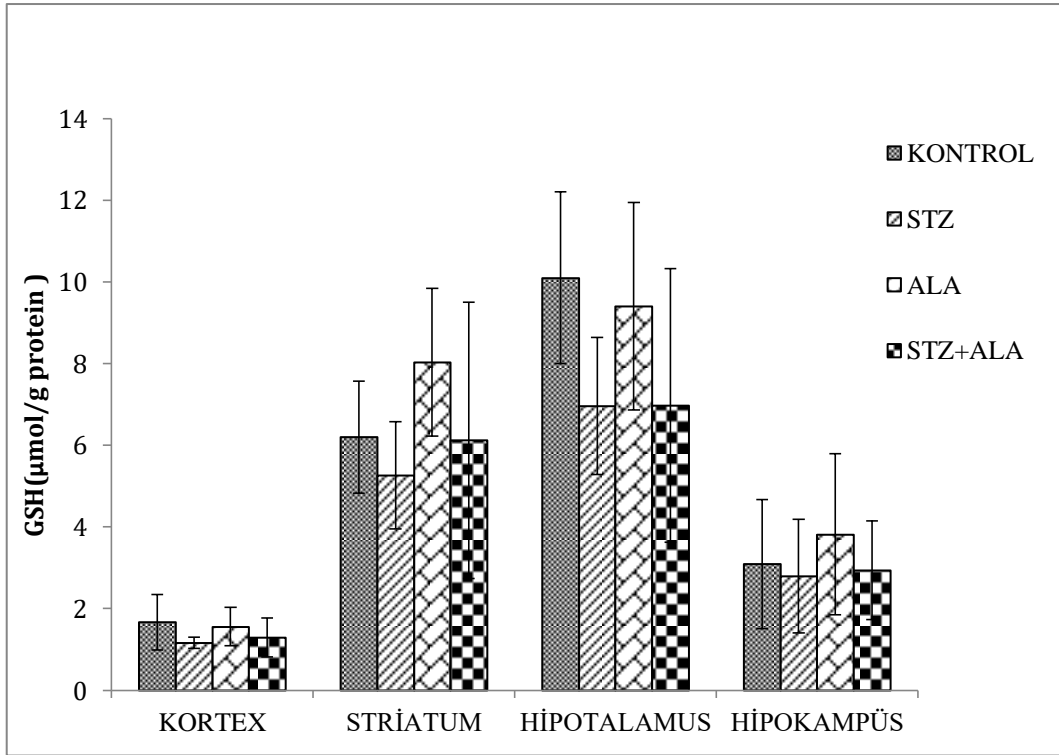
Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan OSI değerleri Şekil 4.9’da verildi. Korteks, striatum, hipotalamus ve hipokampus, bölgelerinde STZ grubundaki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.9. Beyin dokusunun OSI analiz sonuçları. a; Kontrol grubu, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

4.4.2. Sıçanların Beyin Dokusu GSH Sonuçları

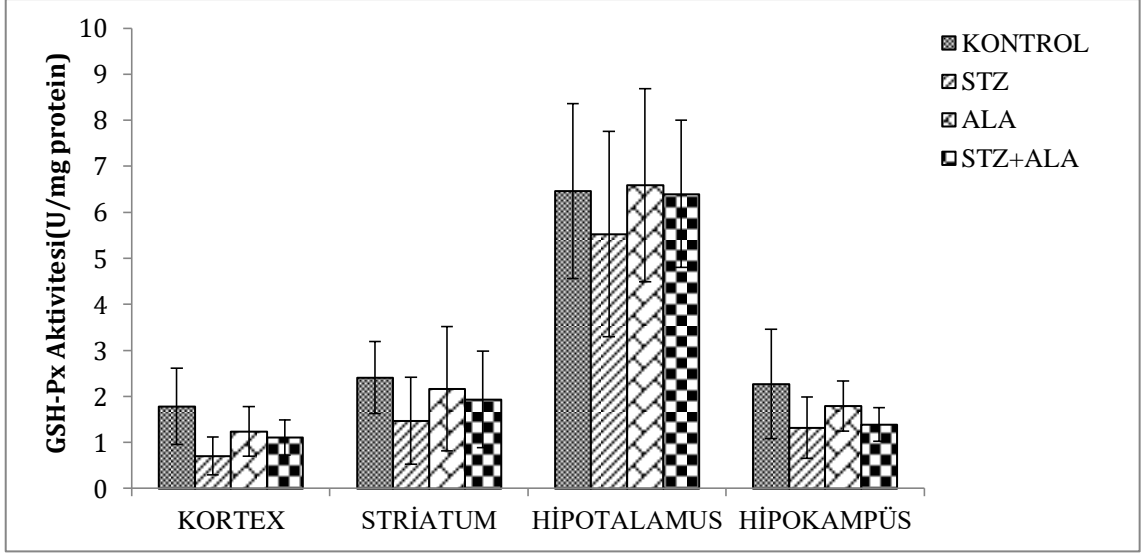
Beyin dokusunun farklı bölgelerinde analiz edilen GSH değerleri Şekil 4.10'da verildi. Hipotalamus, hipokampus, striatum ve korteks bölgelerinde STZ grubundaki azalış kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı değildir. ALA uygulana gruplar ile kontrol grubunun GSH düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadı. Tedavi uygulanan STZ+ALA grubu ile STZ grubu arasında fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.10. Beyin dokusunun GSH analiz sonuçları

4.4.3. Sıçanların Beyin Dokusu GSH-Px Sonuçları

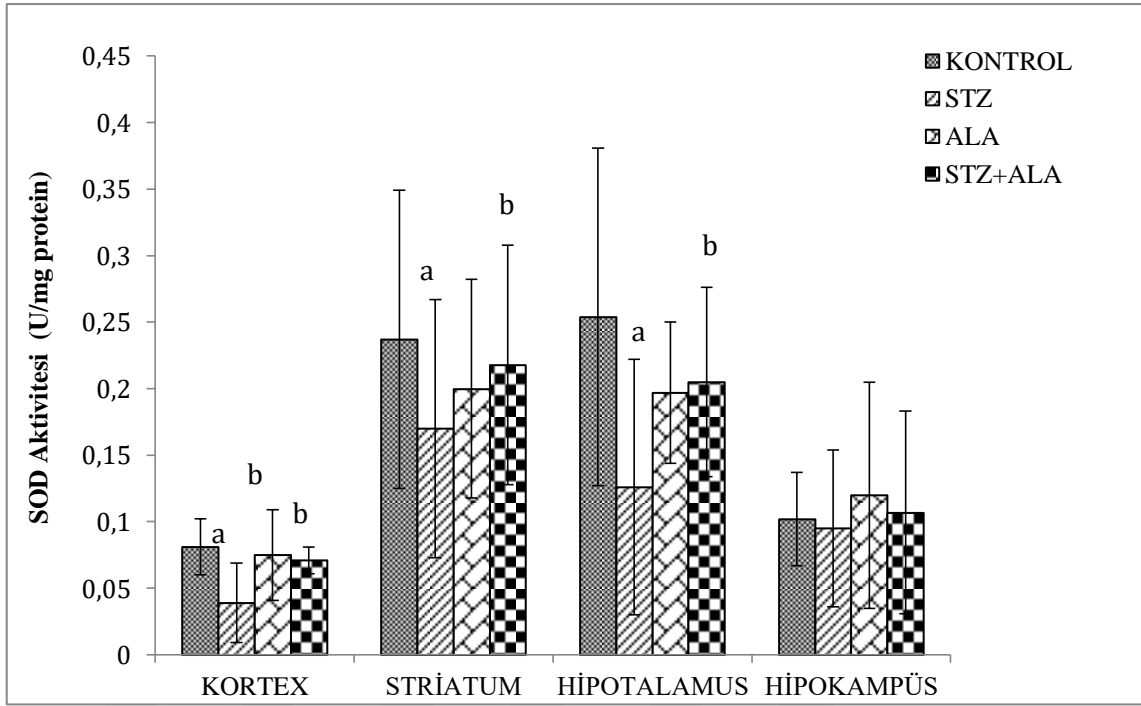
Beyin dokusunun farklı bölgelerinde analiz edilen GSH-Px değerleri Şekil 4.10'da verildi. Hipotalamus, hipokampus, striatum ve korteks bölgelerinde STZ grubundaki azalış kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı değildir. STZ+ALA grubuna ait GSH-Px aktivitesi Kontrol ve ALA grubundan istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.11. Beyin dokusunun GSH-Px analiz sonuçları

4.4.4. Sıçanların Beyin Dokusu SOD Sonuçları

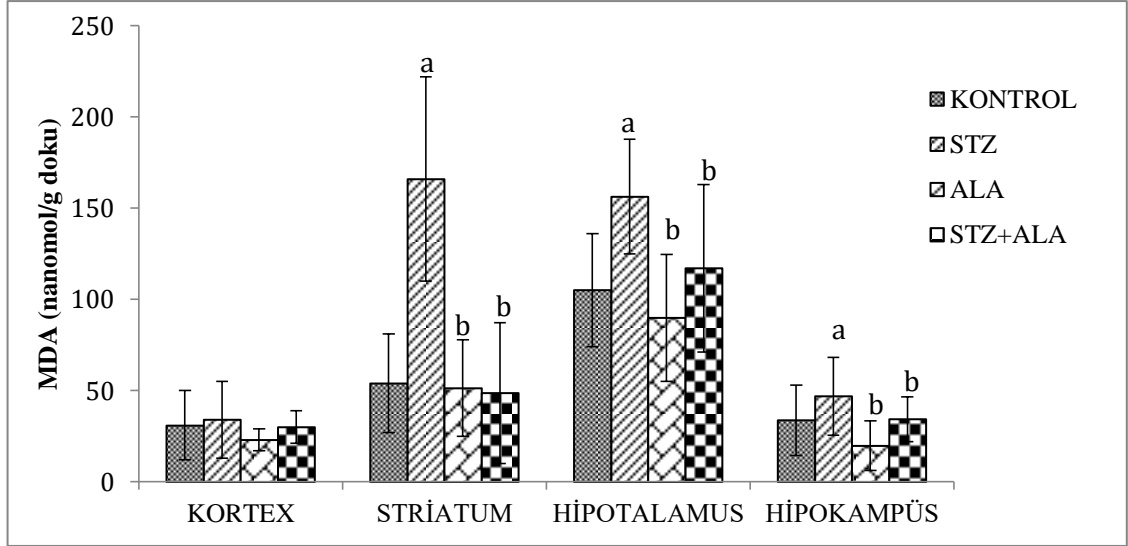
Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan SOD değerleri Şekil 4.12’de verildi. Korteks, striatum ve hipotalamus bölgelerinde STZ grubundaki azalış kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). STZ+ALA uygulaması yapılan ratlarda SOD düzeyi STZ grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($p < 0.05$). Hipokampüs bölgelerinde yapılan analizde STZ grubunda kontrole göre bir azalış ALA uygulaması yapılan gruplarda ise STZ grubuna göre artış olmuş isede gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.12: Beyin dokularında SOD aktivitesinin analiz sonuçları. a; Kontrol grubu ile, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

4.4.5. Sıçanların Beyin Dokusu MDA Sonuçları

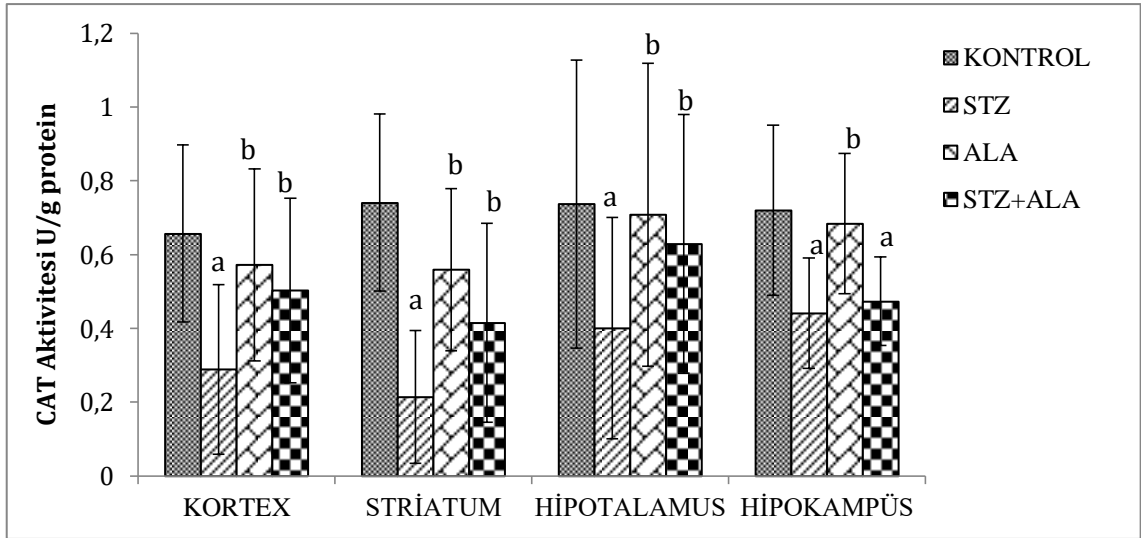
Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan MDA değerleri Şekil 4.13'de verildi. MDA değerindeki artış STZ grubundaki korteks dokuları hariç hipotalamus, hipokampüs ve striatum bölgelerinde kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). STZ+ALA grubundaki veriler kontrol grubu verilerine yakın değerlerde bulundu ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunmadı. ALA ve STZ+ALA grupları arasındaki MDA düzeyindeki azalış STZ grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.13: Beyin dokusunun MDA analiz sonuçları. a; Kontrol grubu, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

4.4.6. Sıçanların Beyin Dokusu CAT Sonuçları

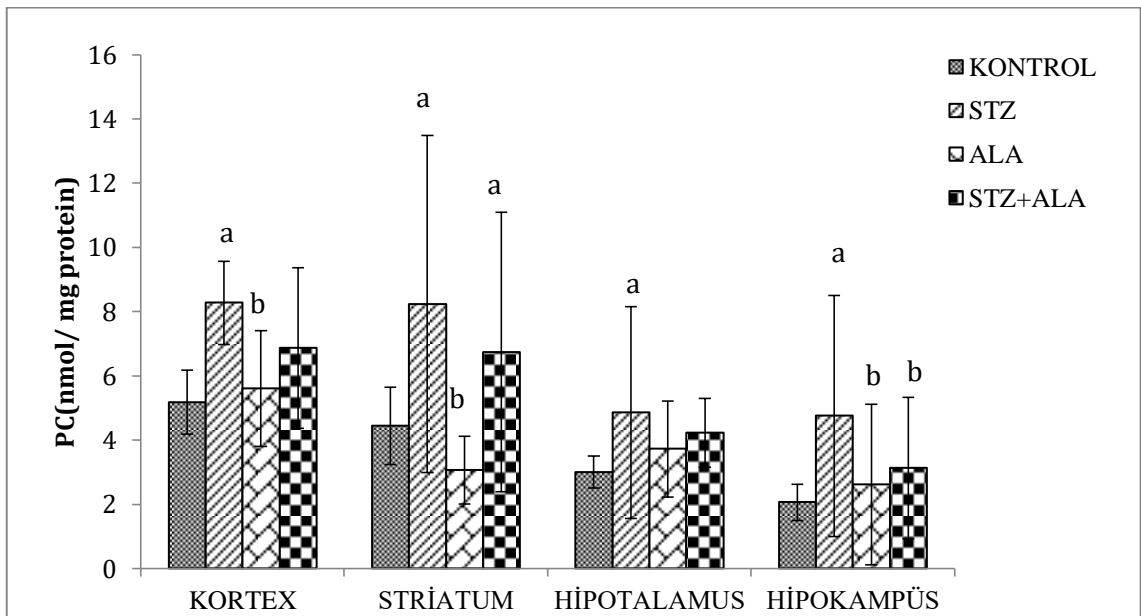
Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan CAT analiz sonuçları Şekil 4.14’de verildi. Korteks, hipotalamus, hipokampüs ve striatum dokularında STZ grubundaki azalış kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Hipokampüs dokusu hariç STZ+ALA grubunun verileri kontrol grubu verilerine yakın değerlerde bulundu ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunmadı. Korteks, hipotalamus ve striatum ALA ve STZ+ALA grupları arasındaki CAT düzeyindeki artış STZ grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Hipokampüs dokusunda STZ ve STZ+ALA grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ve kontrol grubu verileri ile kıyaslandığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.14. Beyin dokusunun CAT analiz sonuçları a; Kontrol grubu, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

4.4.7. Sıçanların Beyin Dokusu PC Seviyesi

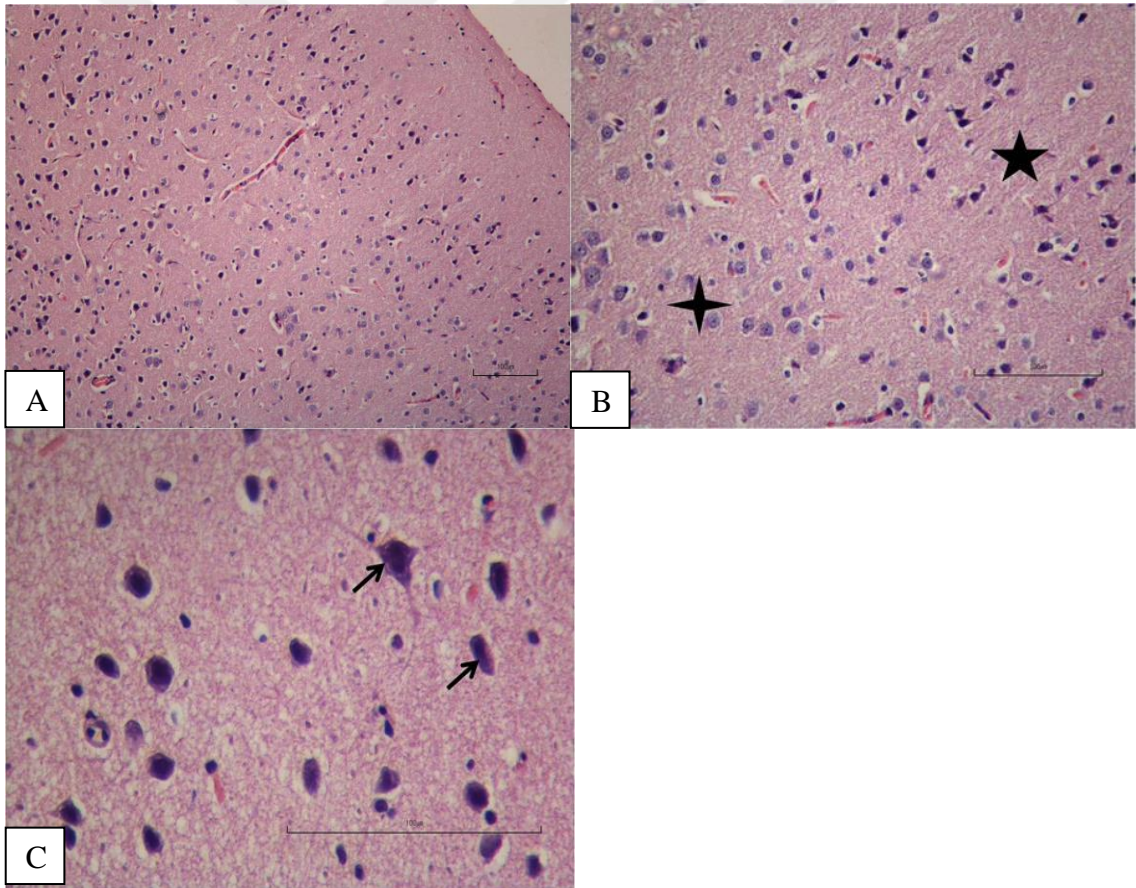
Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan PC analiz sonuçları Şekil 4.15’de verildi. Korteks, hipotalamus, hipokampüs ve striatum dokularında STZ gruplarındaki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Hipokampüs dokusunda STZ+ALA ile STZ grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$).



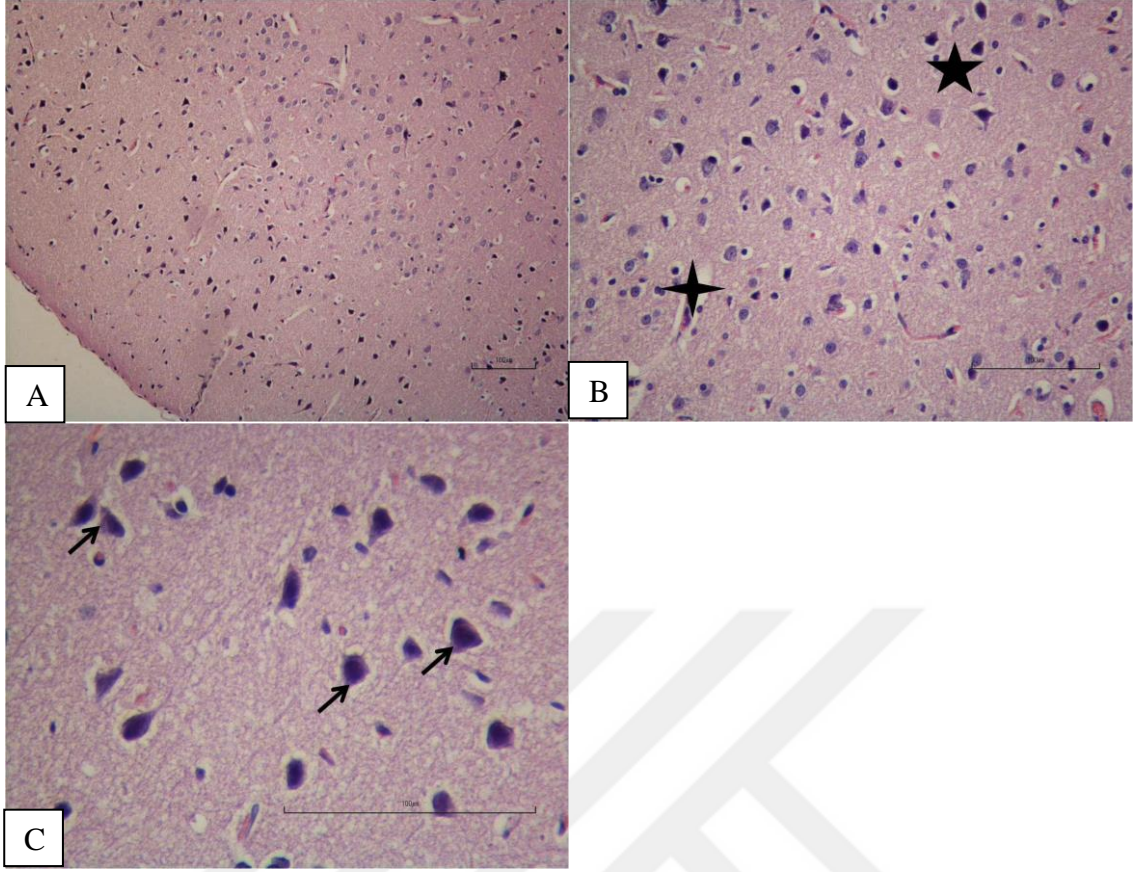
Şekil 4.15. Beyin dokusunun PC analiz sonuçları. a; kontrol grubu, b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

4.5. Sıçanların Beyin Dokusu Histolojik Bulguları

Kontrol grubu (Şekil 4.16) ve ALA (Şekil 4.17) grubuna ait hematoksilin-eosin ile boyanan kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde beyin korteks sitoarkitektürü normal histolojik görünümde değerlendirildi. Bu yapı içerisinde nöron soma yoğunluğu ve glial hücre yoğunluğu normal oranlarda izlendi. Nöron somaları, nukleusları ve glial hücre nukleusları normal sınırlar içinde ancak farklı yoğunluklarda bazofilik bu yapılar dışında kalan alanlar zayıf eozinofilik olarak boyanmıştı. Nöron nukleusları genel olarak ökromatik boyanma özelliği göstermekle birlikte yer yer özellikle piramidal nöronlarda heterokromatik boyanmış nukleuslar izlenmekteydi. Beyin korteks kesitlerinde izlenen kapillar ve diğer damar yapıları normal histolojik görünümde izlendi.

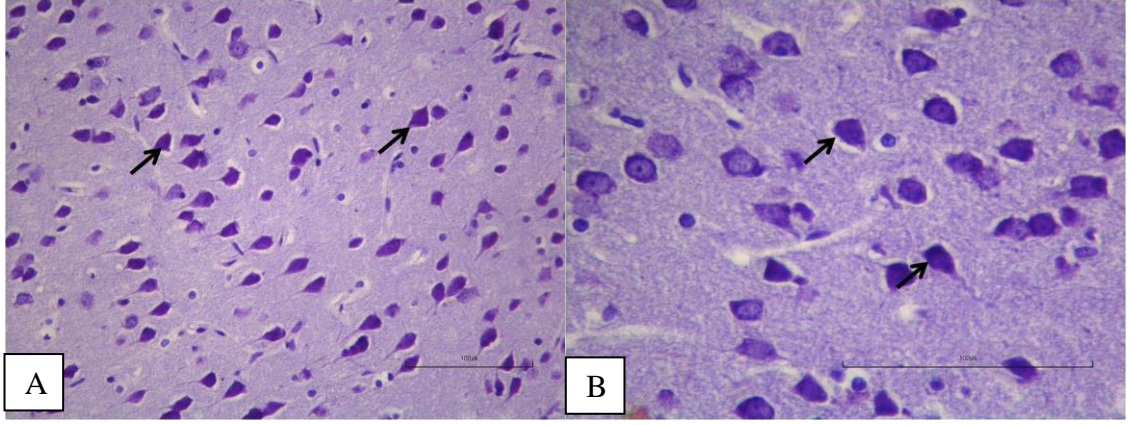


Şekil 4.16. Kontrol Grubu Hematoksilin-Eozin Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri Resim A: Kontrol Grubu; Beyin korteksi. Resim B: Kontrol Grubu; Piramidal nöronlar (beş nokta yıldız), multiform tabaka nöronları (dört nokta yıldız). Resim C: Kontrol Grubu; Piramidal nöron (ok). H-E, Skala=100 µm

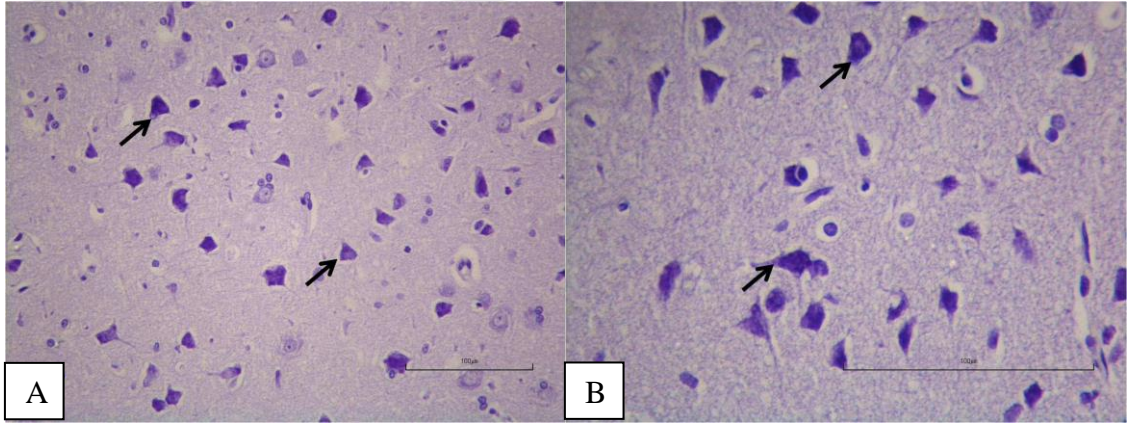


Şekil 4.17. ALA Grubu Hematoksilen-Eozin Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri Resim A: ALA grubu; Beyin korteksi. Resim B: ALA Grubu; Piramidal nöronlar (beş nokta yıldız), multiform tabaka nöronları (dört nokta yıldız). Resim C: ALA grubu; Piramidal nöron (ok). H-E, Skala=100 µm

Kontrol grubu (Şekil 4.18) ve ALA (Şekil 4.19) grubuna ait Toluidine mavisi ile boyanan kesitlerde nöron çekirdekleri, ökromatik, çekirdekcikleri belirgin ve düzgün sınırlı ve mavi renkte boyanmış olarak görüldü. Nöron soma sitoplazmik alanları çekirdeklere oranla daha koyu mavi renkte boyanmıştır. Toluidine mavisi ile boyanan beyin korteks kesitleri normal histolojik yapıda değerlendirildi.



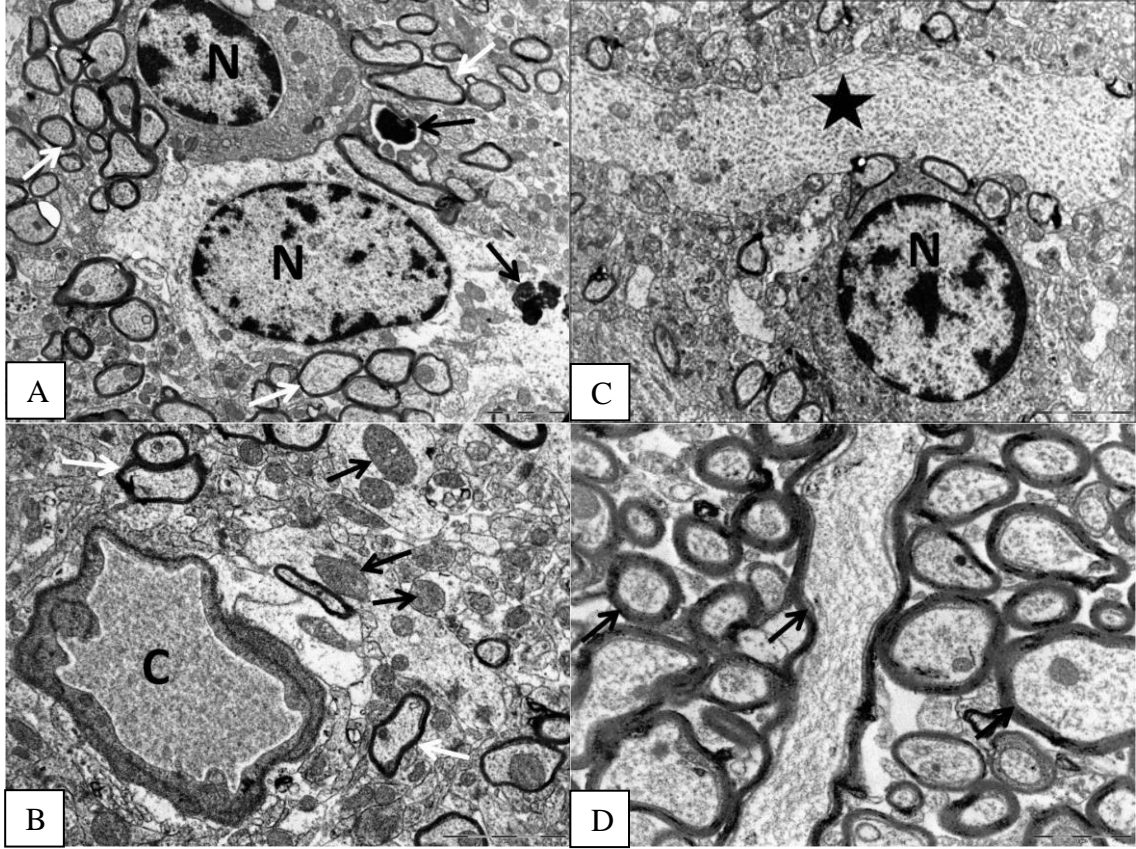
Şekil 4.18. Kontrol Grubu Toluidine Mavisi ile Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri Resim A: Kontrol Grubu; Piramidal nöron somaları (ok). Resim B: Kontrol Grubu; Piramidal nöron somaları (ok). Toluidine blue, Skala=100 µm



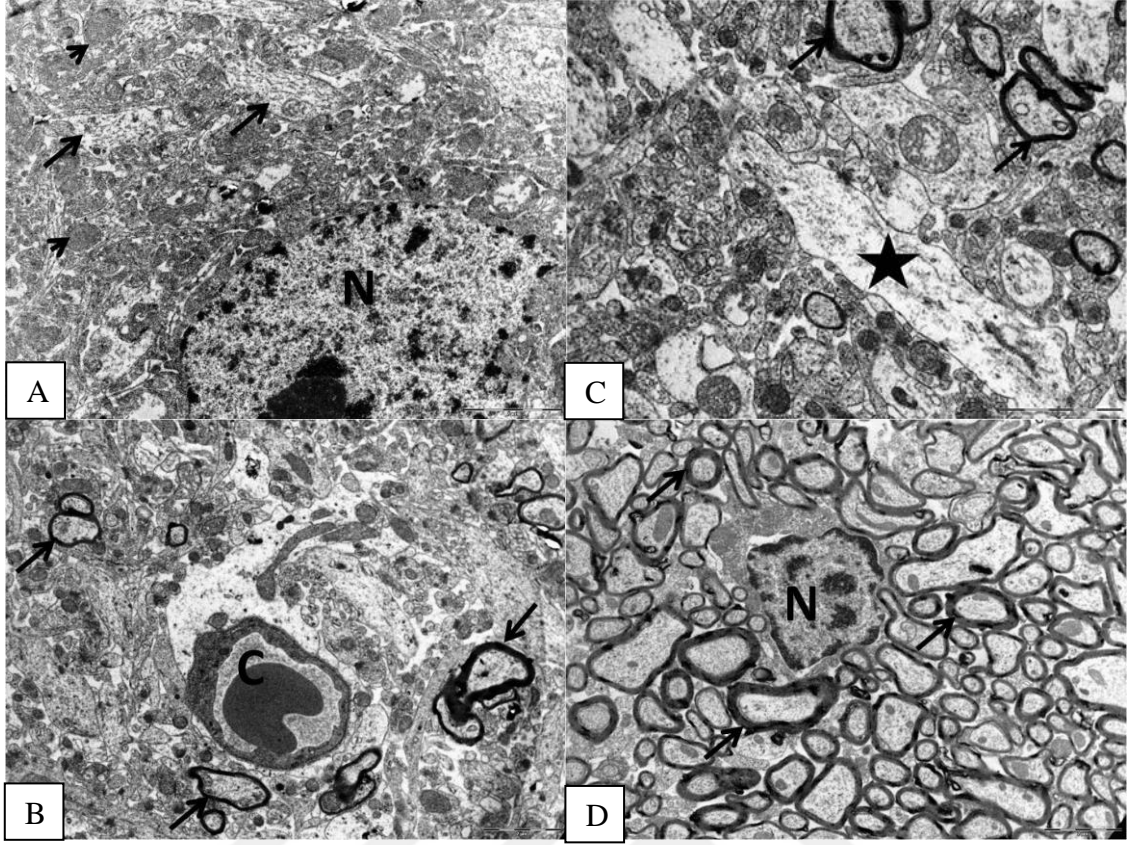
Şekil 4.19. ALA Grubu Toluidine Mavisi ile Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri Resim A: ALA grubu; Piramidal Nöron somaları (ok). Resim B: ALA grubu; Piramidal nöron somaları (ok). Toluidine blue, Skala=100 µm

Kontrol (Şekil 4.20) ve ALA (Şekil 4.21) gruplarına kesitlerin transmission elektron mikroskopik incelenmesinde nöronlar normal organel yapısına ve içeriğine sahip olarak izlendi. Bazı nöronların somatik sitoplazmalarında küçük lizozom yapıları görüldü. Nöronların nukleusları iri, oval-yuvarlak şekilli, düzgün konturlu, ökromatik görünümde olup normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi. Kesit alanlarında izlenen vasküler ve perivasküler yapılar normal ultrastrüktürel görünümde izlendi. Değişik çaplarda görülen miyelinli aksonlarda miyelin kılıf homojen elektron yoğun görünümde olup kalınlığı akson çapı ile doğru orantılı olarak değişmekteydi. Aksolemma miyelin kılıf iç yüzünde miyelin kılıf sınırına bitişik olarak düzgün yapıda izlendi. Aksoplazma içinde nörofilament yoğunluğu normal sınırlar dahilinde olup yer yer aksoplazmik

alanlarda mitokondriyonlar görüldü. Miyelinsiz akson kesitleri ve dendrit kesitleri normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi.

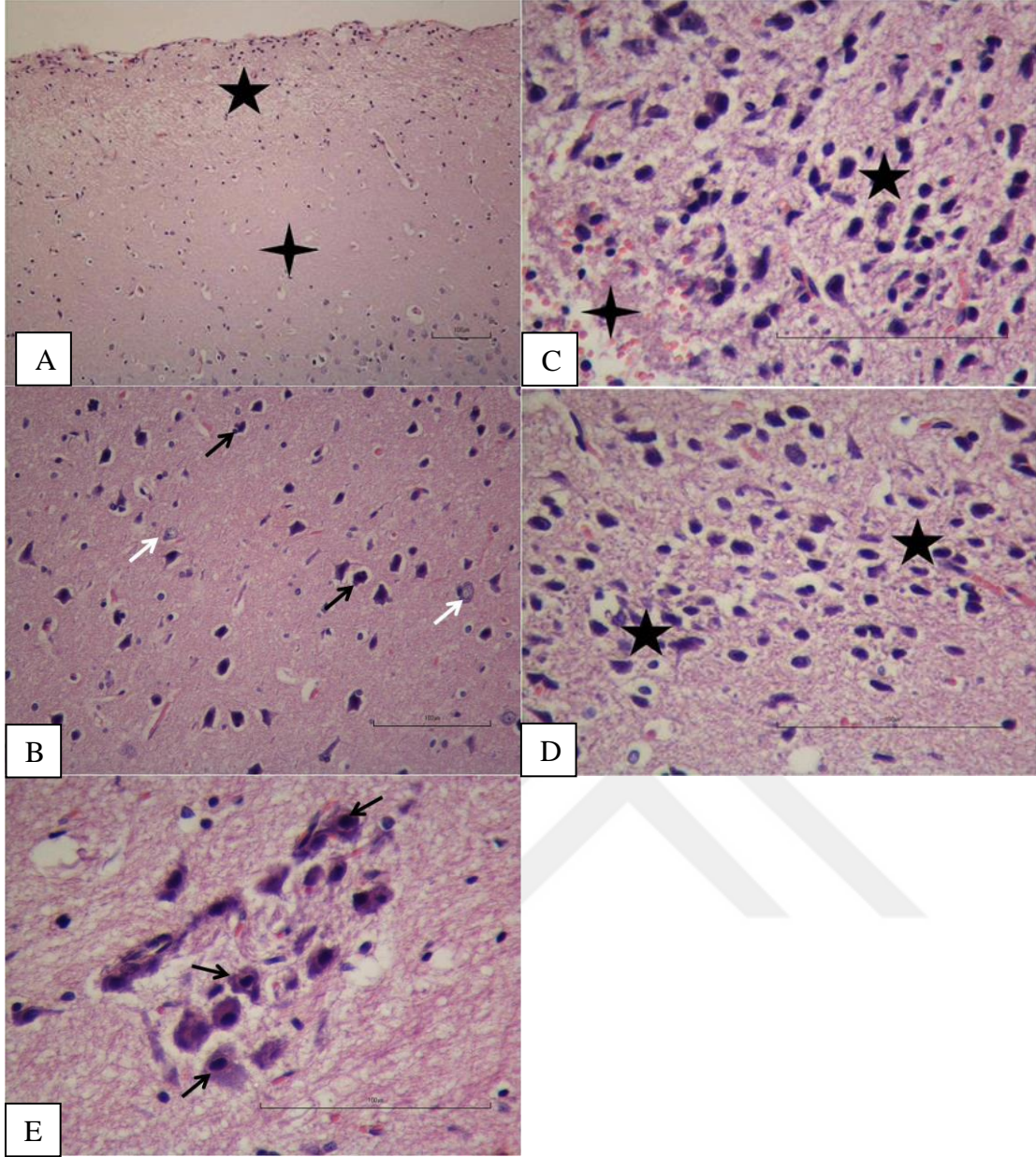


Şekil 4.20. Kontrol Grubu Elektron Mikroskopik Görüntüleri Resim A: Kontrol Grubu; Nukleus (N), miyelinli aksonlar (beyaz ok), lizozom (siyah ok). Resim B: Kontrol Grubu; Kapillar lümeni (C), miyelinli aksonlar (beyaz ok), mitokondriyonlar (siyah ok) Resim C: Kontrol Grubu; Nukleus (N), miyelinsiz akson (yıldız). Resim D: Kontrol Grubu; Nukleus (N), miyelinli akson (ok). TEM, Skala=2 μ m



Şekil 4.21. Grubu ALA Elektron Mikroskopik Görüntüleri Resim A: ALA grubu; Nukleus (N), miyelinsiz aksonlar (ok). Resim B: ALA grubu; Kapillar lümeni (C), miyelinli aksonlar (ok). Resim C: ALA grubu; Miyelinsiz akson (yıldız), miyelinli aksonlar (ok). Resim D: ALA grubu; Nukleus (N), miyelinli aksonlar (ok). TEM, Skala=2 µm

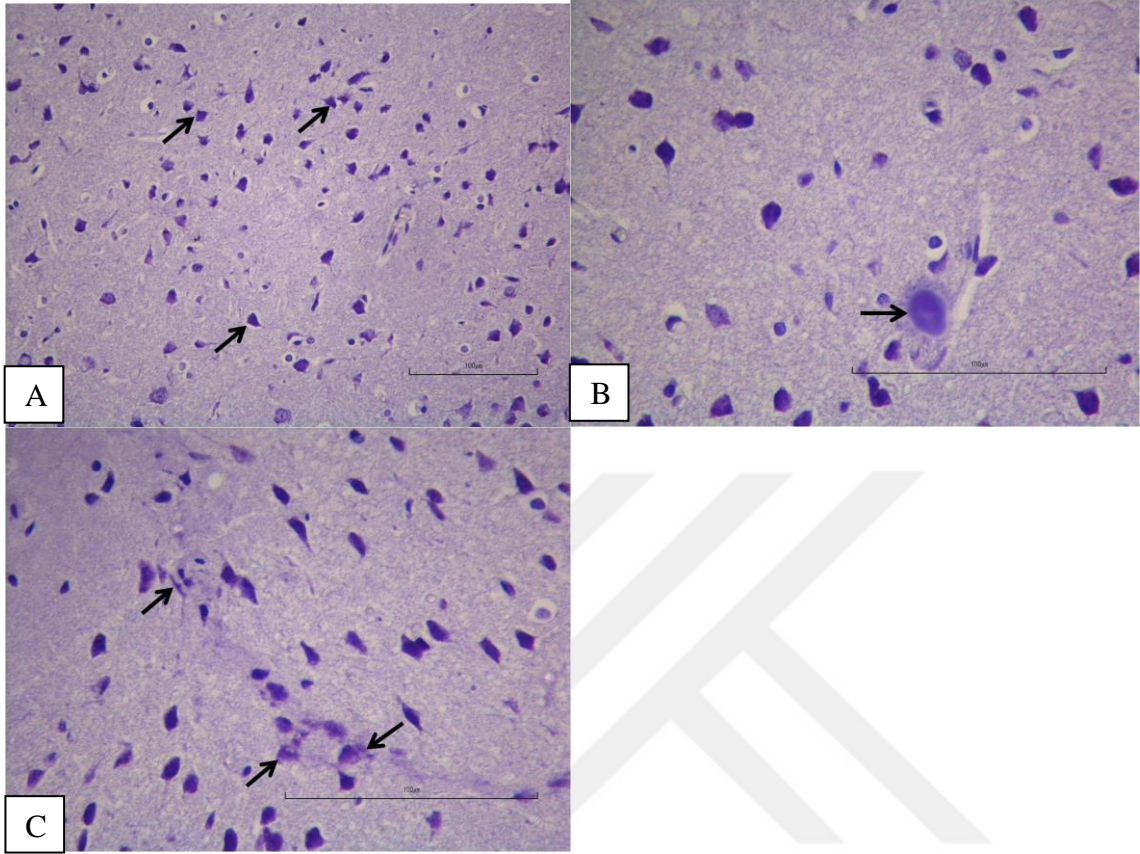
STZ grubuna ait hematoxilen-eosin ile boyanan kesitlerin (Şekil 4.22) ışık mikroskopik incelenmesinde beyin korteksi lamina molekülare ve lamina granularis eksterna tabakalarına yayılan vakuolizasyon izlendi. Bazı kesitlerde beyin korteks alanlarında nöron yoğunluğunda belirgin azalma dikkati çekti. Tüm beyin korteksi tabakalarında yerleşik nöronların nukleuslarında heterokromatik yer yer piknotik görünüm izlenmekle birlikte özellikle piramidal nöronlarda heterokromatik-piknotik nukleus yapısı daha belirgindi. Bazı korteks alanlarında görülen ekstravasküler eritrositler hemoraji yönünde değerlendirildi.



Şekil 4.22. STZ Grubu Hematoksilen-Eozin Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri Resim A: STZ grubu; Beyin korteksi. Molekölare tabakasında vakuolizasyon, kortekste azalmış nöron yoğunluğu Resim B: STZ grubu; Piramidal nöronlarda heterokromazi (siyah ok), nöronlarda kromatolizis (beyaz ok) Resim C: STZ grubu; Nöronlarda heterokromazi artışı ve piknozis (beş nokta yıldız), ekstrasvasküler alanda eritrositler (dört nokta yıldız Resim D: STZ grubu; Nöronlarda heterokromazi artışı, piknozis ve dejenerasyon (yıldız) Resim E: STZ grubu; Piknotik nükleuslu, eosinofilik sitoplazmalı nöronlar ve nörofibriler dejenerasyon (ok), H-E, Skala=100 µm

Toluidine mavisi ile boyanan kesitlerde nöronlarda yaygın olarak koyu heterokromatik nükleus yapısı, yer yer küçük, düzensiz sitoplazmalı nöron grupları

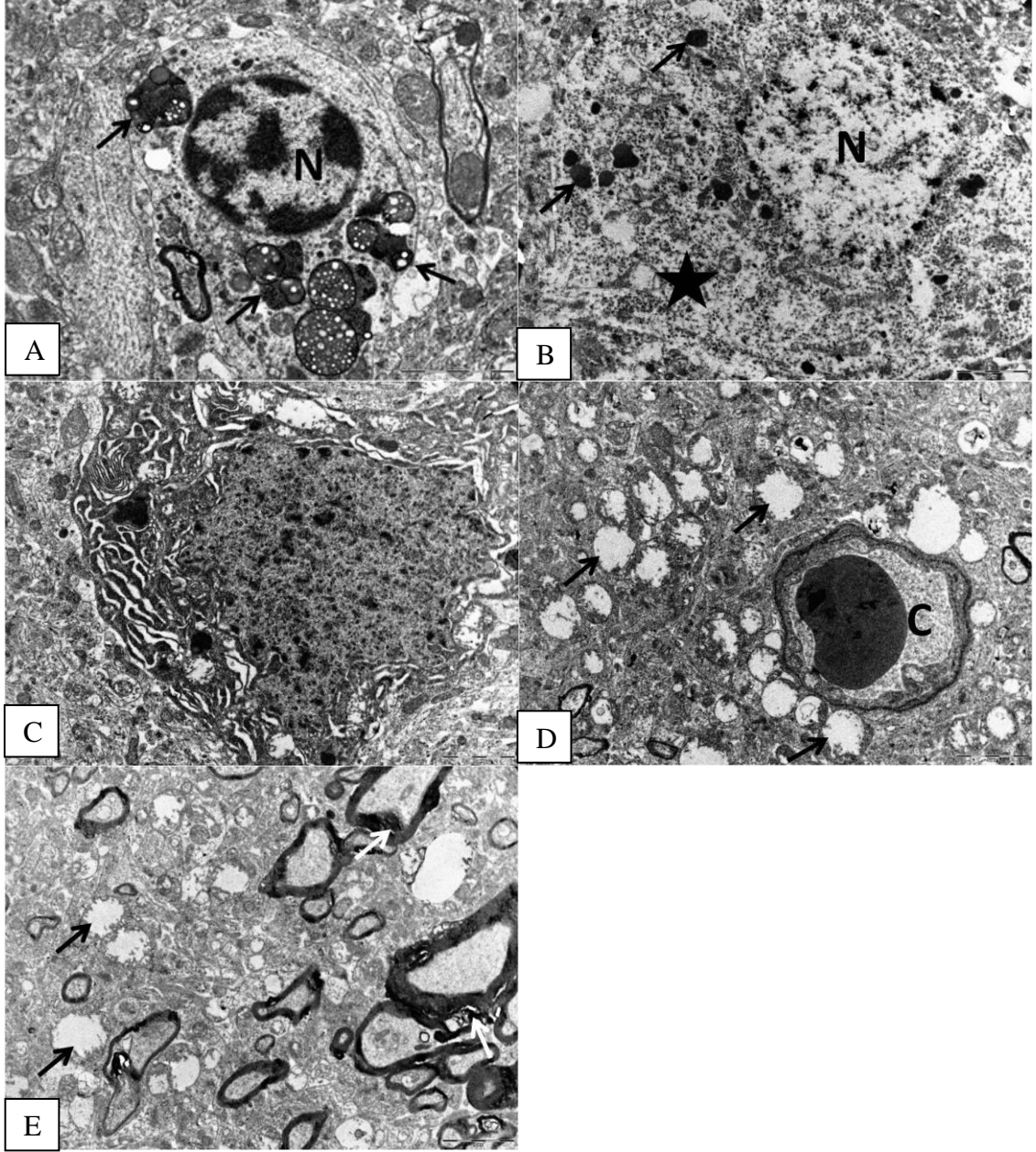
etrafında nörofibriler yoğunlaşma ve karyolizis özellikleri gösteren aşırı dilate hücreler tespit edildi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. STZ Grubu Toluidine Mavisi ile Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri Resim A: STZ grubu; Piramidal Nöron somaları (ok). Resim B: STZ grubu; Kromatolitik dev nukleuslu hücre (ok). Resim C: STZ grubu; Nöron ve nörofibriler dejenerasyon (ok). Toluidine blue, Skala=100 µm

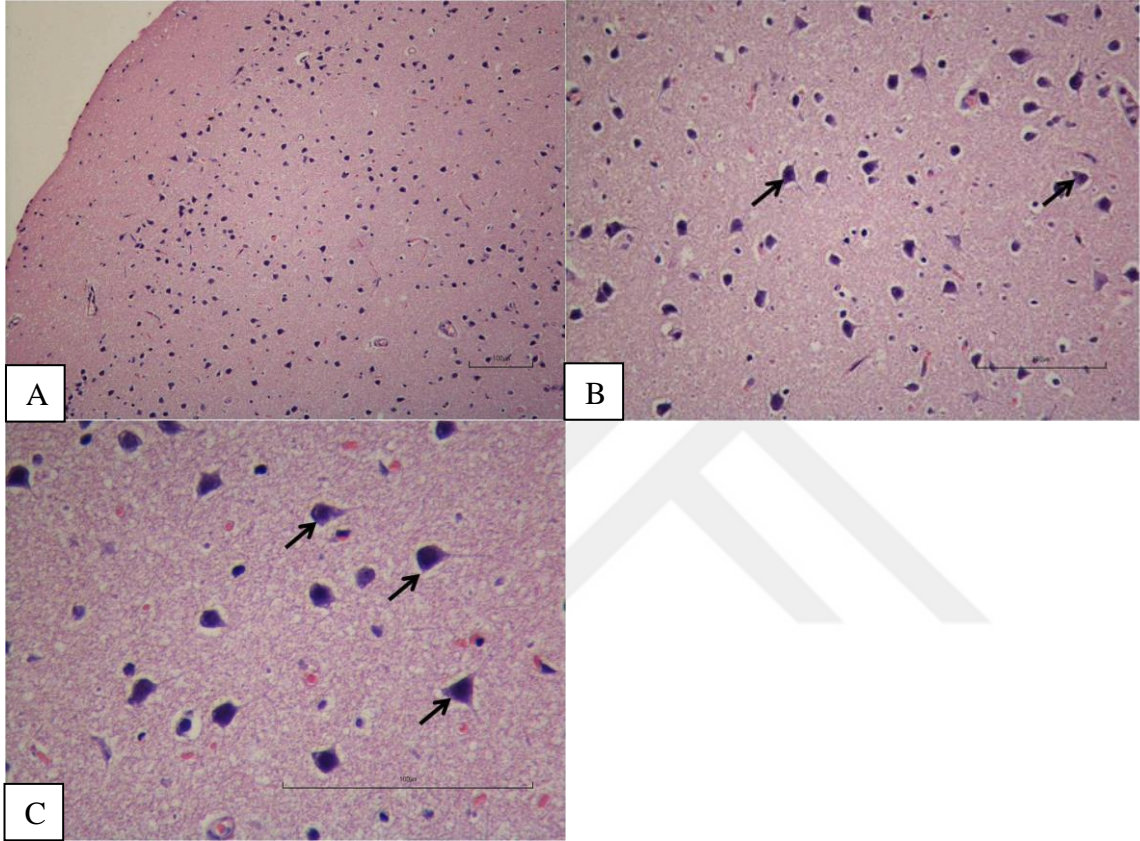
STZ grubuna ait kesitlerin transmision elektron mikroskopik incelenmesinde (Şekil 4.24) çok sayıda nöronda değişik derecelerde karyolizis ve kromatolizis izlendi. Bu nöronların bir kısmında nuklear kromatinin tamamen kaybolduğu, sitoplazmik organellerin bütünlüğünün bozularak sitoplazmik granüller şeklinde görüldüğü saptandı. Bazı nöronlarda ise nuklear karyolizis ile birlikte endoplazmik retikulum dilatasyonu, lizozom artışı, otofagozomlar, mitokondriyonlarda dilatasyon ve krista kaybı, mitokondriyal matrik içinde miyelin figürler ve vakuoller dikkati çekti. Miyelinli ve miyelinsiz aksonların aksoplazmik bölgelerinde, dendritlerin dendroplazma bölgelerinde nörofibril ve nörotubul kaybı dikkati çekti. Miyelinli aksonlarda miyelin

kılıfta incelme, miyelin kılıf hasarı ve dejenerasyonu saptandı. Bazı miyelinli aksonlarda aksolemma ve miyelin kılıf arasında ayrılmalar tespit edildi.



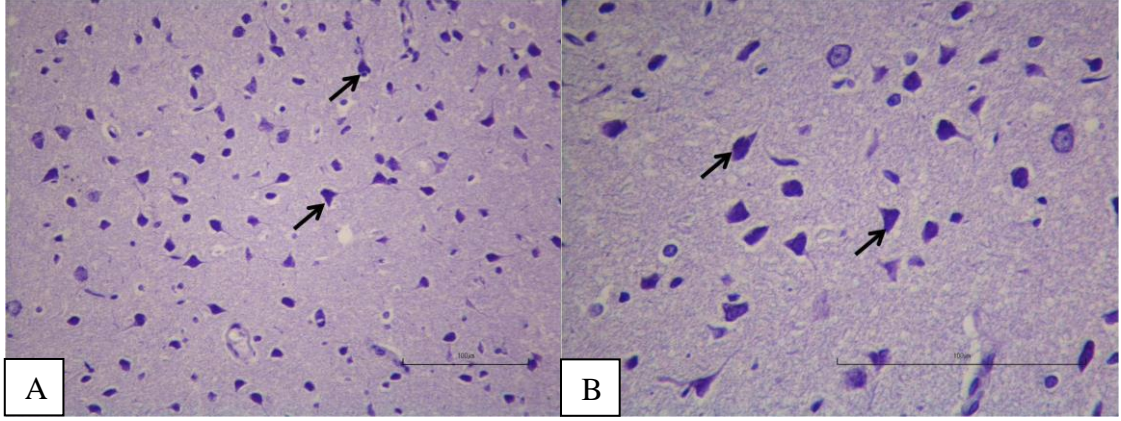
Şekil 4.24. STZ Grubu Elektron Mikroskopik Görüntüleri Resim A: STZ grubu; Kromatolitik nukleus (N), total organel dejenerasyonu (yıldız), lizozomlar (ok). Resim B: STZ grubu; Kromatolitik nukleus (N), endoplazmaik retikulum dilatasyonu (yıldız), mitokondriyal dilatasyon ve krista kaybı (ok). Resim C: STZ grubu; Nukleus (N), intraselüler otofagozomlar (ok). Resim D: STZ grubu; Kapillar lümeni (C), mitokondriyonlarda dilatasyon ve krista kaybı (ok). Resim E: STZ grubu; Mitokondriyonlarda dilatasyon ve krista kaybı (siyah ok), miyelin kılıf hasarı (beyaz ok). TEM, Skala=2 µm

STZ+ALA grubuna ait hematoxilen-eosin ile boyanan kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde (Şekil 4.25) beyin korteksi sitoarkitektürü normal histolojik görünümde değerlendirildi. Korteks tabakalarında yerleşik nöronların nukleuslarında yer yer heterokromatik nukleus yapısı dikkati çekti. Heterokromazi artışının özellikle piramidal nöronlarda daha belirgin olduğu saptandı. Nöron sitoplazmik sınırları genel olarak düzgün olup normal yapıda değerlendirildi.



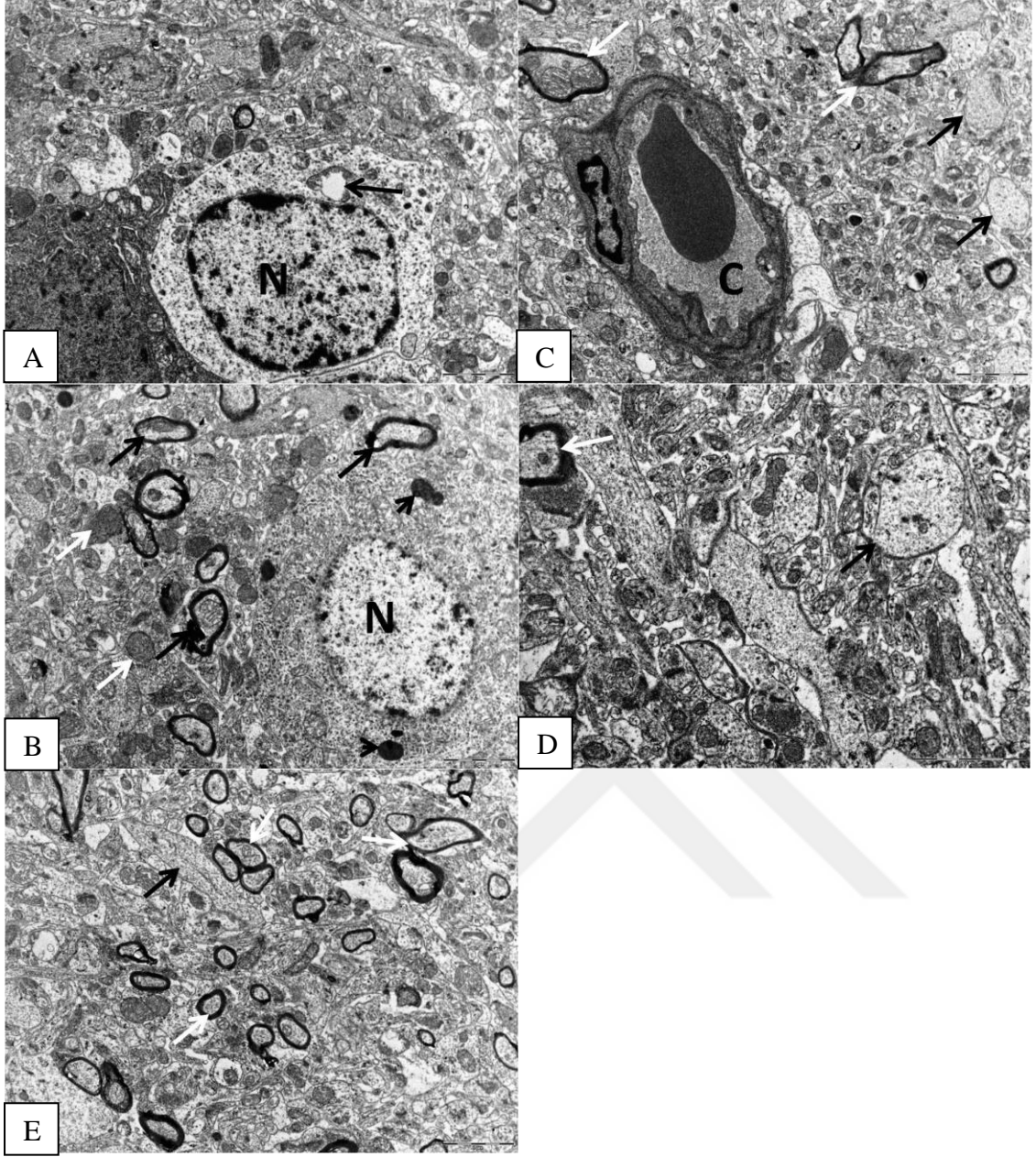
Şekil 4.25. STZ+ALA Grubu Hematoxilen-Eozin Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri Resim A: STZ + ALA grubu; Beyin korteksi Resim B: STZ+ALA grubu; Piramidal nöron (ok). Resim C: STZ+ALA grubu; Piramidal nöron (ok). H-E, Skala=100 µm

Toluidine mavisi ile boyanan kesitlerde (Şekil 4.26) nöronların nukleuslarında yer yer minimal minimal heterokromazi artışı izlendi. Nöronlarda genel olarak Nissl granülleri yoğunluğu normal düzeyde izlenmekle birlikte nadir olarak kromatolizis bulguları izlenen nöronlara rastlandı.



Şekil 4.26. STZ+ALA Grubu Toluidine Mavisini ile Boyamada Işık Mikroskopik Görüntüleri Resim A: STZ+ALA grubu; Piramidal nöron (ok). Resim B: STZ + ALA grubu; Piramidal nöron (ok). Toluidine blue, Skala=100 µm

STZ+ALA grubuna ait kesitlerin transmision elektron mikroskopik incelenmesinde (Şekil 4.27) nöron ve glia hücrelerinin çoğunluğu normal ultrastrüktürel görünümde değerlendirildi. Ancak bazı nöronların mitokondriyonlarında dilatasyon ve krista kaybı saptandı. Nöron sitoplazmalarında yer yer küçük lizozomlar izlendi. Nöron sitoplazma yoğunlukları normal görünümde olmakla birlikte az sayıda nöronda karyolizis görünümü izlendi. Nöron dendroplazma ve aksoplazma yoğunlukları ve nörofilament içeriği genel olarak normal görünümde değerlendirilmekle birlikte yer yer nörofilament içeriği azalmış akson yapılarına rastlandı. Miyelinli aksonlarda miyelin kılıf düzenli ve normal yapıda izlendi, ancak bazı aksonların miyelin kılıflarında lokal, elektron-yoğun, düzensiz alanlar saptandı.



Şekil 4.27. STZ+ALA Grubu Elektron Mikroskobik Görüntüleri Resim A: STZ+ALA grubu; Nukleus (N), mitokondriyal dilatasyon ve krista kaybı (ok). Resim B: STZ+ALA grubu; Nukleus (N), mitokondriyonlar (beyaz ok), miyelinli aksonlar (siyah ok), lizozom (ok başı). Resim C: STZ+ALA grubu; Kapillar lümeni (C), miyelinli aksonlar (beyaz ok), miyelinsiz aksonlar (siyah ok). Resim D: STZ+ALA grubu; Miyelinli aksonlar (beyaz ok), miyelinsiz aksonlar (siyah ok). Resim E: STZ+ALA grubu; Miyelinli aksonlar (beyaz ok), miyelinsiz aksonlar (siyah ok). TEM, Skala=2 µm

5. TARTIŞMA

Diyabetes mellitus (DM), beyin dahil olmak üzere tüm vücut organlarını sessizce ve yavaş yavaş etkileyen metabolik bir hastalıktır. DM beyinde meydana getirdiği hasar sonucunda bilişsel fonksiyonlarda bozulmalara neden olabilmektedir. DM hastaları diyabet olmayan kişilerle karşılaştırıldıklarında, bu hastalarda özellikle hafıza ve yönetsel fonksiyonları içerecek şekilde bilişsel fonksiyon kayıplarının geliştiği görülmektedir. Bilişsel fonksiyonlardaki bozulma paterni Tip 1 ve Tip 2 DM'de genellikle farklıdır. Tip I DM'de psikomotor yavaşlama ve mental yetkinlikte azalma izlenirken, Tip II DM'de ise psikomotor yeterlilikte, dikkatte, öğrenmede ve hafızada azalma görülmektedir. Bu durumdan; diyabetin başlangıç yaşı, kötü glisemik kontrol, ilerleyen yaş, zamanla artış gösteren insülin direnci ve metabolik sendrom varlığı gibi faktörler sorumlu görülmektedir (92, 93).

Diyabet vasküler demans için bir risk faktörü olarak düşünülmektedir. Bu tip demans (bunama), genellikle beyine giden kan akışının engellenmesi veya azalması ile meydana gelen beyin hasarlarından dolayı meydana gelmektedir. Diyabetik hastaların vasküler demans riski 2-4 kat, Alzheimer hastalığı (AH) riski 1,5-2 kat artmıştır. Özellikle Tip 2 DM'de beyin; vasküler bozukluklardan, glukoz toksisitesinden, hipoglisemik toksisiteden, hipoglisemik epitozlardan ve serebral insülin sinyalizasyon bozukluklarından etkilenmektedir. Tip 2 DM ile AH gelişimi arasında bağlantı olduğu son çalışmalarda ileri sürülmektedir. Bu hipotezi destekleyen çalışmalarda, diyabet hastalarında AH gelişme riskinin % 65 oranında artmış olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmaların bulgularına göre, Tip 2 DM, AH gelişme sürecini de hızlandırabilmektedir (11, 94-96). Bununla birlikte diyabet, hafif kognitif bozuklukların meydana gelme riskini arttırabilmektedir. Hafif kognitif (düşünme) bozukluklar, normal yaşlanmada olan bellek problemlerinden daha fazla soruna neden olan bir durumdur. Hafif kognitif bozukluklar AH ve diğer demans tiplerine neden olabilmektedir.

Postmortem incelemelerde, serebral korteks, hipokampus ve diğer temporal lob yapılarında gözlenen nörotik plak, nörofibriler düğüm varlığı ve sinaptik yapıların kaybolmuş olması gibi mikroskobik benzerliklere dayanarak, Tip 2 DM-AH ilişkisinin insülin direnci üzerinden olabileceği ileri sürülmektedir. İnsülin sinyalizasyon yolağındaki bozuklukların düzeltilmesi ile sorunlar geriletilebilecek gibi görünmektedir (95). Diyabet ve Alzheimer arasındaki ilişkinin belirlenmesi, Alzheimer ve diyabetin

önlenmesi ve tedavisine yönelik çalışmaların sayısı son yıllarda artarak devam etmektedir.

Birçok metabolik yolda kofaktör olan alfa lipoik asit (ALA); endojen, antioksidan, antiinflamatuvar etkilere sahip bir moleküldür. ALA ile yapılan hayvan çalışmalarında antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı rapor edilmektedir. DM başta olmak üzere Alzheimer, Down Sendromu, beyin iskemi gibi ROS artışının fazla olduğu durumlarda ALA kullanımının oksidan-antioksidan dengeyi koruyarak komplikasyonların azalması yönünde faydalı olduğu çalışmalarda gösterilmektedir. ALA ile yapılan in vitro çalışmalarda iskelet kası ve adiposit membranlarında GLUT-1 ve GLUT-4 translokasyonunu arttırarak insulin benzeri etki gösterdiği bildirilmektedir (68).

Bizim çalışmamızda DM'nin beyin dokusunda etkilerini incelemek ve ALA'nın diyabetik komplikasyonları üzerine etkinliğinin incelenmesi amaçlandı. Ratlarda diyabet modelini oluşturmak için STZ kullandı ve rat beyin dokusunda oksidan-antioksidan parametreleri inceleyerek ALA'nın diyabetik ratların beyin dokularında yapısal değişimlerdeki etkinliği araştırıldı. Diyabetik ratların beyin dokusundaki bu değişimler ve bilişsel fonksiyonlardaki azalmalarakarşı ALA'nın antioksidan etkisiyle göstermiş olduğu koruyucu etkinliği incelendi.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz ratların haftalık ağırlık takibi yapılması sonucunda; diyabet oluşturulan gruplara ait ratlarda kilo kaybı kontrol grubundaki ratlar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. Diyabetik olup ALA tedavisi uygulanan gruba ait ratlarda (STZ+ALA) kilo kaybı diyabetik gruptaki ratlar kadar hızlı ve yüksek değildi. Elde ettiğimiz bulgular, literatürdeki deneysel diyabetik rat modellerinde meydana gelen kilo kaybı bulguları ile örtüşmektedir. Çalışmamızda günlük yem ve su tüketimi takibi yapılmadı. Ancak diyabetik ratlarda aşırı su tüketimi, dehidrasyon ve STZ enjeksiyonundan sonraki birkaç günde gözlemlenen halsizlik dışında çalışmamızdaki tüm ratlarda günlük yem tüketiminde dikkate değer bir azalma gözlemlenmedi. Diyabetik ratlardaki kilo kaybının bozulmuş karbonhidrat metabolizmasının bir sonucu olduğunu düşündürmektedir.

2015 yılında yapılan bir çalışmada STZ enjeksiyonu ile oluşturulan diyabetik ratlar ile diyabetik olmayan ratlarda dental orjinli enfeksiyon gelişimi kıyaslanmıştır. Ratlarda günlük tüketilen yem miktarında değişim olmamasına rağmen vücut ağırlıklarında ve organ ağırlıklarında diyabete bağlı değişimler gözlemlenmiştir. İnsülin

eksikliği ve diyabet gelişimine neden olan insülin direncinin glikojenezi artırıp, glikolizisi azaltarak şeker ve protein sentezinin azalmasına ve böylece kilo kaybına neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca glukozu insülininden bağımsız olarak hücre içerisine alan böbrek ve karaciğer doku ağırlıklarında ise diyabet olmayan ratlara göre artış gözlenmektedir. Bu çalışma ile ayrıca diyabet gelişiminin oral enfeksiyonları arttırarak kilo kaybını arttırabileceği de bulgular arasındadır (75).

Çalışmamızda tüm sıçanların kuyruktan alınan kanlarla, STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra diyabetik ratların belirlenmesi ve haftalık kan glukoz takibi kan glukoz ölçümü ile yapıldı. Kan glukoz düzeyi 200 mg/dl üzerinde olan ratlar diyabetik gruplara alındı ve çalışmanın devam ettiği 6 hafta boyunca kan glukoz değerleri 200 mg/dl üzerinde devam etti. STZ ve STZ+ALA grupları kontrol ve ALA grupları ile kıyaslandıklarında kan glukoz düzeyleri arasındaki istatistiksel anlamlı farklılıklar çalışma süresince devam etti. ALA tedavisi uygulanan STZ+ALA grubunun haftalık kan glukoz takibinde STZ grubundaki kadar yüksek olmamakla birlikte kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılık devam etmekteydi. Bulgularımıza dayanarak ALA'nın antidiyabetik etkinliğinden söz etmek güçtür. Daha yüksek dozlarda ALA kullanımı hipergliseminin kontrolünde etkin olabilir. Çalışmamızda ALA kullanma tercihimiz antidiyabetik etkinliğinin olmasından değildi. Literatürlerde yapılmış birçok antidiyabetik maddenin kan glukozunu düzenleyerek diyabetik komplikasyonların ortadan kaldırılabileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızdaki amaç, DM'de devam eden hiperglisemide ALA'nın koruyucu etkilerini incelemektir. Çalışma bulgularımıza göre ALA antidiyabetik etkiden ziyade antioksidan etkinliği ile beyin dokusunda diyabetik komplikasyonların giderilmesinde etkin olmaktadır.

Çalışmamızda tüm ratların beyin dokusunun hipokampus, hipotalamus, korteks ve striatum bölgelerini çıkararak oksidan -antioksidan parametrelerin ölçümünü yaptık. Beyin dokusundaki bu bölgeler bilişsel fonksiyonlar açısından önemli anatomik alanlardır. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada total beyin dokusu yerine beyin özel alanlarında çalışmalar yapılması tercih edilmektedir. Beyin dokusunun hafıza ve öğrenmeyle ilişkili özel doku alanlarında çalışmak doku miktarının küçüklüğü sebebiyle çalışmamızın eleştiriye açık bir yanı olabilir. Fakat yaptığımız literatür çalışmalarında benzer dokularda hatta amigdala gibi 3-5 mg küçüklüğünde dokularla yapılmış çalışmalar mevcuttur (97).

Çalışmamızda beyin hipokampus, korteks, talamus ve striatum bölgelerinde incelemiş olduğumuz SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzimlerin aktivitesi diyabetik olan STZ grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. ALA tedavisi uygulanan diyabetik STZ+ALA grubu STZ grubu ile kıyaslandığında antioksidan enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış vardır. Çalışma bulgularımızda antioksidan enzim aktivitelerindeki bu anlamlı artış ve azalmalar beyin dokusunun her bölgesinde aynı lineariteyi sağlayamamaktadır. Bulgularımızın bu yönüyle literatürlerdeki çalışmalar ile kıyaslanamamaktadır. Yapılan çalışmalarda beyin dokusunun farklı alanlarında artış ve azalışlar aynı doğrultuda ve neredeyse tümünde standart sapmalar bile aynı aralıktadır. Bulgularımıza dayanarak beyin dokusunun farklı bölgelerinde farklı glukoz transport proteinlerinde olduğunu ve glukoz toksisitesine toleransın farklı olabileceği bu nedenle tüm beyin dokusunun hiperglisemiden aynı düzeyde etkilenemeyeceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA, protein oksidasyonunun belirteci olan PC düzeyleri diyabetik gruplarda kontrol ve ALA grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterirken ALA tedavisi uygulanan STZ+ALA grubunda STZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı iyileşmeler gözlemlendi. Ayrıca diyabetik ratlarda aşırı aktive olan poliol yolağının neden olduğu GSH düzeylerindeki değişiklik çalışmamızın diyabetik gruplarda Kontrol ve ALA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma şeklinde gerçekleşti. STZ+ALA grubunda ise STZ grubuna göre GSH düzeylerinde anlamlı iyileşmeler bulundu. GSH düzeyindeki bu iyileşmeyi GSH-Px aktivitesindeki artıştan ve hiperglisemik değerlerde devam eden ancak STZ grubuna göre glukoz düzeyindeki azalmadan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda beyin dokularında total oksidan ve antioksidan düzeylerinin analiz sonuçları diyabetik gruplarda (STZ ve STZ+ALA), Kontrol ve ALA gruplarına göre tüm beyin bölgelerinde oksidatif stres parametrelerinin attığını antioksidan kapasitenin azalttığını göstermektedir. STZ+ALA grubu STZ grubuyla kıyaslandığında ALA uygulamasının antioksidan etkinliğinden dolayı total oksidan düzeyde azalış gözlemlenirken total antioksidan düzeyde artış anlamlıydı ve genel olarak diğer bulgularla örtüşmekteydi.

Bilişsel fonksiyonların değerlendirilmesinde kullandığımız MWM testinde ilk 4 gün ratların platformu bulma süreleri ve izledikleri yol mesafeleri ölçülerek ratların

öğrenme ve yer-yön bulma becerileri değerlendirildi. Bu bulgularımıza göre diyabetik ratların kontrol ve ALA grubuna göre platformu bulma süreleri ve izledikleri yolun mesafesi daha uzundu. Diyabetik ratlardaki MWM bulguları literatürdeki diyabetik çalışma bulgularını desteklemektedir. STZ+ALA grubunda platformu bulma süresi STZ grubuna göre anlamlı derecede kısalmış ve alınan yol mesafesinde kısalmıştır. MWM testinin 5. değerlendirme gününde ise platform çıkartılarak ratların platformun bulunduğu kadranda geçirdikleri süre ölçülerek ratların hafıza ve hatırlama güçleri değerlendirildi. Bu bulgularda ise STZ grubu ratların kontrol ve ALA grubuna göre platformun bulunduğu kadranda daha az süre geçirdiği ve STZ+ALA grubunda ise bu sürenin STZ grubundan daha uzun olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diyabetik ratlarda oluşabilecek kilo ve güç kaybının yüzme hızını etkileyebileceğini düşünerek değerlendirmeye aldığımız yüzme hızlarında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Çalışma bulgularımıza dayanarak diyabetik ratlarda gözlemlemiş olduğumuz bilişsel fonksiyon kaybının beyin dokusunda artan oksidatif strese bağlı gelişen nöron hasarından kaynaklanabileceğini öngörüyoruz. Tedavi uyguladığımız STZ+ALA grubundaki bilişsel fonksiyonlardaki iyileşmesinde yine diyabette bozulmuş oksidan dengeyi düzenleyerek nöroprotektif etki göstermektedir.

Diyabette uzamış hipergliseminin, SOD enziminin progresif glikasyonuna ve dolayısı ile aktivitesinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (98, 99). Buna ek olarak ROS'ların sinyal iletilicileri gibi davranarak, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) üzerinden, SOD gibi antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu azalttığı ileri sürülmüştür(96).

Beyin tüm vücut ağırlığının %2 ağırlığı kadar küçük bir doku olmasına rağmen tüm oksijenin % 20'sini kullanmaktadır. Ayrıca CAT aktivitesi beyin dokusunda karaciğer dokusunun % 10 kadardır. Bu dezavantaj beyin dokusunu oksidatif strese karşı korumasız hale getirmektedir (100).

Artan oksidatif stres beta amiloid birikimini arttırarak otofagozomlarda otofaji artışına neden olmaktadır. Otofajinin fazla aktif olması beyinde protein yıkımı arttırarak amino asit havuzunun artışına ve fazla enerji ihtiyacına neden olurken otofajinin baskılanması ubiquitinleşen proteinlerin sinir hücrelerinde birikerek nörodejenerasyona neden olmaktadır (101).

2014 yılında yapılan bir çalışmada farelerde oluşturulan fokal iskemi modelinde ALA'nın beyin dokusu üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Operasyondan 30 dk önce

farelere verilen 50 mg/kg ALA beyin dokusunda iskemi gelişen farelerde korteks dokusunda SOD aktivitesini arttırarak beyin dokusunu iskemiden korumuştur. ALA beyin dokusunda SOD aktivitesinin artışının yanı sıra oksidatif stresin artışına yanıt olarak sirtuin ailesinden NAD⁺ bağımlı SIRT 1 ve peroxisome porilifatör activited receptör- γ -coactivator-1 α (PGC-1 α) aktivitesinide arttırarak oksidatif stresle beraber artış gösteren nöron ölümünü engellemiştir (102).

Thakur ve ekibinin yapmış oldukları başka bir çalışmada ise 65 mg/kg STZ i.p. uygulaması ile diyabet oluşturulan ratlarda antioksidan etkinliğe sahip geleneksel tıpta kullanılan *andrographis paniculata* bitkisinin öğrenme üzerindeki etkinliğine bakılmıştır. Tedavi 10 gün gibi kısa bir süre devam etmesine rağmen 15 ve 30-60 mg/kg dozlarında bile bilişsel fonksiyonların düzelmesinde etkili olduğu belirtilmiştir. MWM testi ile değerlendirilen bilişsel fonksiyonlardaki düzelmenin, diyabette beyin dokusunun özellikle hipokampüs ve prefrontal korteks bölgelerinde artan oksidatif stresin tedavi ile SOD, CAT aktivitesinin artışından ve lipid peroksidasyonunu bir göstergesi olan MDA düzeyinin düşürülmesinin etkili olduğu ileri sürülmektedir. Diyabetli ratlarda hipokampüs ve prefrontal korteks bölgelerinde artan AChE aktivitesi uygulana tedavi ile kontrol grubu değerlerine düşürülmüştür. Çalışmada tartışılırken değinilmeyen bir husus ise bu antioksidan maddenin aynı zamanda antidiyabetik etkisindedir. Tedavi grubundaki ratlarda kan glukoz düzeyi kontrol grubu değerleri ile istatistiksel olarak farksız olduğu gösterilmiştir. Hiperglisemik etkilerin ortadan kalkması da bilişsel fonksiyonlarda düzelmeleri sağlayabilir. Bizim çalışma bulgularımızda 6 haftalık ALA uygulaması kan glukoz düzeyinde anlamlı bir azalışa neden olmazken antioksidan etkinliği ile öğrenme üzerinde olumlu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir (76).

Bir başka çalışmada alloxan kullanılarak diyabetik rat modeli oluşturulmuş ve 14 gün boyunca tedavi için kullanılan n-asetil sistein ve deferoxamin subkutanöz uygulanmıştır. Diyabetik ratlarda davranış bozuklukları açık alan testi ile öğrenme bozuklukları yüzme testi ile belirlenmiştir. Diyabetik ratların beyin dokularında prefrontal korteks, hipokampüs, amigdala ve nucleus acumbens bölgelerinde artmış olan PC ve TBARS düzeyleri tedavi gruplarındaki ratlarda antioksidan kullanımıyla azalmıştır. Ayrıca beynin bu bölgelerinde diyabet gelişimiyle azalmış olan SOD ve CAT aktivitesi tedavi gruplarında kontrol grubu düzeylerine yükselmiştir. Antioksidan etkinlik diyabetik ratlarda gözlemlenen davranış bozukluklarının düzelmesinde etkili

olmuştur. Ayrıca öğrenme testinin sonuçları da diyabette gelişen bilişsel fonksiyonlardaki olumsuzlukları gidermede antioksidan kullanımının etkili olduğunu göstermiştir (97).

Xiang wang ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada 60 mg/kg STZ ile oluşturulan diyabetik rat modelinde *Radix astragali* bitkisinin etken maddesi olan *calycosin* 5 hafta boyunca günlük 20 mg/kg i.p. olarak uygulanmıştır. Diyabetik ratlarda gelişen nöronal hasarların iyileşmesinde etkin olan *calycosin* bu etkisini diyabetin hipokampus dokusunda oluşturduğu patoloji sonucu kognitif fonksiyon bozukluklarının ölçümünde biomarkır olan sinapsin (SYN), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ve postsynaptic density protein (PSD-95) moleküllerinin mRNA ifadelerini düzenleyerek göstermiştir. Diyabet ile bu moleküllerin azalmış transkripsiyonlarının kontrol grubu değerlerine ulaşması, *calycosin*'nin DM artan oksidatif stresi azaltması ile ilişkilendirilmiştir. Çalışma bulgularına baktığımızda *calycosin* kullanılan gruplarda GSH-Px, SOD aktivitesi artmış ve MDA AChE miktarı azalmıştır. Bu bulgular *calycosin*'in antioksidan etkisini düşündürmektedir. Çalışmacılar da kognitif fonksiyonlardaki düzelmenin sebebinin buna bağlamışlardır. MWM testindeki bilişsel iyileşmeler beyin dokusundaki oksidatif hasarın azaltılarak, nöronlardaki yapının korunması sağlanarak, diyabetik kognitif bozulmalara karşı faydalı olabileceğini göstermektedir. Çalışma bulgularında ayrıca ratların kan glukoz ve insülin düzeylerine de bakılmış ve *calycosin*'nin diyabetik ratlarda kan glukoz düzeyini anlamlı düzeyde azaltırken insülin düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır. Çalışmanın tartışma kısmında değinilmemiş olmasına rağmen *calycosinin* beyin dokusu üzerindeki olumlu etkisini diyabetik nöropati ile birlikte artan yüksek kan glukoz toksisitesini de ortadan kaldırılmasıyla da ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (44). Bizim çalışmamızda ise tedavi gruplarında kullanmış olduğumuz ALA diyabetik ratlarda antidiyabetik bir etki göstermemiştir. STZ ve STZ+ALA gruplardaki aşırı kan glukoz düzeyi çalışma süresince devam etmiştir.

Parasad ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise 55 mg/kg STZ ile diyabet modeli oluşturulan ratlarda monoterpen olan *geraniol* 8 hafta boyunca 100 mg/kg/gün şeklinde uygulanmıştır. Çalışma bulgularına göre 8 haftalık deney süresince diyabetik ratlarda davranış bozukluklarının olduğu ve *geraniol* kullanımının bu etkileri ortadan kaldırmada etkili olduğu davranış testleri ile gösterilmiştir. Diyabetik ratlarda gözlenen davranış bozukluklarını düzelmesinde etkin

olan *geraniol*'ün bu etkinliğini araştırmak için yapılan araştırmalarda beyin dokusunun korteks, hipokampus, serebellum ve striatum bölgeleri incelenmiştir. Diyabetin beyin dokusunun bu bölgelerinde ROS, protein karbonil düzeylerini ve lipit oksidasyonunu arttırarak, ayrıca GSH düzeyini azaltarak öğrenme ve davranış bozukluklarına neden olduğu kanıtlanmıştır. Tedavi edici olarak kullanılan *geraniol*'ün tedavi edici etkinliği antioksidan aktivitesinden kaynaklanmış olabileceği rapor edilmiştir. *Geraniol* uygulanan ratlarda diyabetik ratlara göre azaltmış olduğu kan glukoz düzeyi çalışma boyunca toksik düzeyde ölçülerek antidiyabetik etkisinin yeterince etkili olmadığı gösterilmiştir. *Geraniol* kullanımı beynin hipokampus dokusu dışında MDA, PC, hidroksiperoksidaz ve nitrat düzeylerini kontrol grubu değerlerine yakınlılaştırarak beyin dokusu üzerinde diyabetik nöropatinin etkilerini azaltmıştır. Ayrıca beyin dokusu ve siyatik sinir dokusunda diyabetik ratlarda değişmiş olan asetil kolinesteraz aktivitesi, mitokondrial aktivitenin ölçütü olan NADH-CytC (kompleks I-III) redüktaz, dopamin ve sistolik kalsiyum seviyeleri de *calycosin* kullanımıyla normale dönerek davranış bozukluklarının giderilmesinde etkili olmuştur. Bu çalışmada araştırmacıların ortak görüşü ratlarda MWM bulgularındaki iyileşmeler ve davranış testlerindeki normalleşmeler geraniolün sadece antioksidan aktivitesinden değil ayrıca nöroprotektif etkisinden de olabileği yönündedir (91).

Başka bir çalışmada karotid arter oklizonu yapılarak oluşturulan serebral iskemi modelinde ratların hipokampus ve frontal korteks bölgelerinde ROS ve MDA konsantrasyonu artarken GSH –Px aktitesi azalmıştır. Beyin dokusunun hipokampus ve frontal korteks alanlarındaki oksidan antioksidan dengedeki değişimlerin ratlarda kognitif bozulmalara neden olduğu MWM testi ile gösterilmiştir (103).

Xiang Hong Jing ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları çalışmalarında ratlar STZ ile diyabet gelişiminden 7 gün sonra karotid arter oklizonu ile iskemi oluşturulmuş ve 30 gün sonra ratlarda beyin fonksiyonları MWM ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular kan glukoz düzeyinin diyabet ve iskemi olan grupta diyabet olan gruba göre daha düşüktür ancak MWM bulgularında platformu bulma süresi daha uzun platformun bulunduğu kadranda geçirilen süreninin daha kısa olduğunu göstermiştir. Elektroakupunktur ile hipokampusün CA1 bölgesinde LTP miktarı arttırılarak oluşturulan yenilenmelerin, beyinde oluşan nöroderejenerasyon sonucu bozulan öğrenme kaybının kontrol grubu değerlerine yakın olmasında etkili olduğu ileri sürülmektedir (104).

Zhao Ran-Ran ve ekibinin 2014 yılında yapmış oldukları başka bir çalışmada ise karotid arter oklizyonu ile oluşturulan iskemide beyin dokusunda artan ROS ve vasküler bozulmalara bağlı gelişen uzaysal öğrenme ve hafıza üzerinde olumsuz etkilere karşı ALA etkinliği araştırılmıştır. 28 gün boyunca verilen 50 mg/kg I.P. ALA uygulaması ratlarda artan ROS, MDA, platformu bulma sürelerini kontrol grubu değerlerine yaklaştırırken beynin hipokampus dokusunda GSH düzeyini arttırmıştır. Platformu bulma süresini kısaltmıştır. Bu etkilerini de hipokampus dokusunda vasküler bozukluklara bağlı gelişen öğrenme, hafıza ve bilişsel fonksiyon bozuklukları üzerinde önemli rol alan kolinerjik sistemde asetilkolin asetilkolin esteraz ve asetil kolin transferaz aktivite ve miktarını düzenleyerek gösterdiği bildirilmiştir (105).

Zhao ve arkadaşlarının yapmış oldukları başka bir çalışmada 60 mg/kg STZ I.P. uygulanarak diyabet oluşturulan ratlar diyabet oluşturulmadan bir hafta öncesinden % 4 balık yağı içeren yemlerle 5 hafta boyunca beslenmişlerdir. 5 haftanın sonunda ratlar bilişsel fonksiyonların değerlendirilmesi için MWM testine tabi tutulmuştur. Diyabet gruplarında platformu bulma süreleri uzamış, platform çıkarılarak yüzdürüldüklerinde ise platformun bulunduğu kadranda geçme sıklıkları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Çalışmanın sonunda çıkarılan hipokampus dokusundan elektron mikroskop incelemeleri yapılmıştır. Yapılan hipokampus dokusuna ait elektron mikroskop bulgularında ise kontrol grubunda piramidal nöronlarda nükleus membranları, kromotin ve mitokondriyer normal iken diyabetik ratlarda bu yapıların bozulduğu, kromotinlerin agrete olduğu mitokondri kristallerinde bozulmalar olduğu ve erken apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiği gösterilmiştir. Yine yapılan immünohistokimya çalışmaları ile TUNEL pozitif hücrelerin ve hücre apoptozisinde belirteç olan bax pozitif/bcl-2 pozitif hücre sayısının oranının diyabette arttığı ve balık yağının bu oranı % 40 azalttığı böylece diyabette gelişen bilişsel fonksiyon bozulmalarının düzeldiği gösterilmiştir (106).

Yapılan elektrofizyolojik ve nöroanatomik çalışmalar ile hipokampal formasyonun hafızada önemli rol üstlendiği (107) ve ratlarda yapılan çalışmalar ile özellikle uzaysal hafızanın güçlülüğünün hipocampal aktiviteye bağlı olduğu gösterilmiştir (108, 109).

Davranışsal beyin araştırmaları dergisinde 2011 yılında yayınlana Bhutada P. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise berberinin 5 gün ve 30 günlük kullanımlarının diyabetik ratlarda bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Bu araştırmanın sonuçları korteks ve hipokampus bölgelerinde GSH ve MDA düzeyleri ile antioksidan sistemin ve kolin esteraz (ChE) aktivitesi ile de kolinerjik sistemin korunmasının beyin fonksiyonları üzerinde diyabetin olumsuz etkilerini azaltacağını göstermiştir (110).

Patrica Nardin ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada 75 mg/kg STZ uygulanan 12 kontrol 12 diyabetik ratta araştırmanın 60. gününden sonra serum ve serobrospinal sıvı kıyaslamaları yapılmıştır. Diyabetik ratlarda kilo kaybı ve artan kan glukoz düzeyi kontrol grubu ile kıyaslanmış ve aradaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Glikolize hemoglobin diyabetik grupta kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunurken diyabetik ratlardaki C peptid ölçümü sıfır çıkarak kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Serum ve serobrospinal sıvıda ölçülen AGEs düzeyleri ise diyabetik ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Hipokampus dokusunda GLUT-1 reseptör mRNA düzeyi incelenerek diyabette artan hipergliseminin GLUT-1 gen ifadesinin düzeyini arttırdığını bununda kan beyin bariyerinde bulunan endotel hücrelerinden glukozun alınımını arttırdığı rapor edilmiştir. Bunun aksini iddia eden çalışmalarda ise hipogliseminin GLUT-1 reseptör gen ifadelerini arttırdığı yönündedir (111). Bu bağlamda net bir mekanizma açıklanamamakla birlikte, artan AGE'nin inflamasyonu artırarak astroglial hücrelerdeki NMDA reseptörlerinin subünitlerinde anormalilere neden olarak hipokampus dokusundaki glutaminerjik iletimi bozduğuna bağlamışlardır (112).

Kailash Manda ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada X-RAY ışınlarına maruz bırakılan ratlarda MWM ile yapılan testlerde bilişsel fonksiyon kayıplarının olduğunu, serebellum da lipit peroksidasyonunun, protein karbonil düzeylerinin arttığı, sülfidril grubu içeren antioksidan düzeyin azaldığı gösterilmiştir. Bu ratlarda ALA uygulamasının bilişsel fonksiyonlardaki bozulmayı önemli oranda geriye döndürdüğü, bunuda antioksidan etki ile sağladığı ileri sürülmüştür. Ayrıca yapılan histolojik incelemelerde serebellumdaki purkinje hücrelerinin sıralı düzeninin bozulduğu ve nekrotik yapıda oldukları ayrıca radyasyonun serebellar granüler hücre sayısını azalttığı ALA uygulamasının bu bozuklukları önemli oranda geriye döndürdüğü gösterilmiştir (113).

Lou-Yan Ma yapmış olduğu bir çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda 8, 10 ve 12 haftalarda ratlarda gözlemlenen bilişsel bozuklukların beta amiloid yapımındaki artıştan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Ayrıca elektron mikroskobisi ile

yapılan incelemelerde hipokampus bölgesinde sinaptik yarıkların haftalara göre kontrol grubundan çok daha büyük olduğu, glutinasyonda artış olduğu, kromatin hücre merkezinden uzaklaşarak hücreyi apapotozise yönelttiği gösterilmiştir. Ayrıca hipokampus Ca1 bölgesindeki piramidal nöronların istatistiksel olarak anlamlı derecede apoptotik olduğu gösterilmiştir (101).

Bahsi geçen araştırmaların sonuçları dikkate alındığında çalışma bulgularımızın literatür bulgularını desteklediği görülmektedir. Histolojik yapılan ışık ve elektron mikroskopik inceleme bulgularımıza göre STZ grubuna ait kesitlerde izlenen ışık mikroskopik ve ultrastrüktürel hasar ve dejenerasyon bulgularının STZ+ALA grubundaki kesitlerde bir kısmının görülmediği bir kısmının ise belirgin şekilde azaldığı tespit edildi. Beyin korteks alanlarında nöron yoğunluğunda belirgin azalma dikkat çekicidir. Kontrol ve ALA grupları ile karşılaştırıldığında STZ grubuna ait beyin korteks tabakalarındaki yerleşik nöronların nukleuslarında heterokromatik yer yer piknotik görünüm izlenmekle birlikte özellikle piramidal nöronlarda heterokromatik-piknotik nukleus yapısı daha belirgindi. STZ grubunun transmission elektron mikroskopik incelenmesinde ise çok sayıda nöronda değişik derecelerde karyolizis ve kromatolizis izlendi. Bu nöronların bir kısmında nuklear kromatinin tamamen kaybolduğu, sitoplazmik organellerin bütünlüğünün bozularak sitoplazmik granüller şeklinde görüldüğü saptandı. Bazı nöronlarda ise nuklear karyolizis ile birlikte endoplazmik retikulum dilatasyonu, lizozom artışı, otofagozomlar, mitokondriyonlarda dilatasyon ve krista kaybı, mitokondriyal matriks içinde miyelin figürler ve vakuoller dikkati çekti. Miyelinli ve miyelinsiz aksonların aksoplazmik bölgelerinde, dendritlerin dendroplazma bölgelerinde nörofibril ve nörotubul kaybı dikkati çekti. Miyelinli aksonlarda miyelin kılıfta incelmeye, miyelin kılıf hasarı ve dejenerasyonu saptandı.

STZ+ALA grubuna ait mikroskopik inceleme sonuçları Kontrol ve ALA grupları ile kıyaslandığında, beyin korteksi sitoarkitektürü normal histolojik görünümde değerlendirildi. Nöron sitoplazmik sınırları genel olarak düzgün olup normal yapıda değerlendirildi. Nöronların nukleuslarında yer yer minimal heterokromazi artışı izlendi. Nöronlarda genel olarak Nissl granülleri yoğunluğu normal düzeyde değerlendirildi. STZ+ALA grubuna ait kesitlerin TEM incelenmesinde nöron ve glia hücrelerinin çoğunluğu normal ultrastrüktürel görünümde olduğu tespit edildi. Ancak bazı nöronların mitokondriyonlarında dilatasyon ve krista kaybı saptandı. Nöron sitoplazmalarında yer yer küçük lizozomlar izlendi. Nöron sitoplazma yoğunlukları

normal görünümde olmakla birlikte az sayıda nöronda karyolizis gözlenmiştir. Nöron dendroplazma ve aksoplazma yoğunlukları ve nörofilament içeriği genel olarak normal görünümde değerlendirilmekle birlikte yer yer nörofilament içeriği azalmış akson yapılarına rastlandı. Miyelinli aksonlarda miyelin kılıf düzenli ve normal yapıda olduğu görüldü.

Kontrol ve ALA grupları ile karşılaştırıldığında STZ grubuna ait kesitlerde izlenen mikroskobik, ultrastrüktürel hasar ve dejenerasyon bulgularının STZ+ALA grubundaki kesitlerde bir kısmının görülmediği bir kısmının ise belirgin şekilde azaldığı tespit edildi.

Sonuç olarak çalışma bulgularımız ve daha önce yapılmış çalışmalar göstermiştir ki; DM'de hiperglisemi beyin dokusunda oksidatif stresi artırıp, antioksidan savunmayı azaltarak oksidan-antioksidan dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Bozulan bu denge beyin dokusu nöronlarında yapısal bozulmaları ve fonksiyon kayıplarını arttırmaktadır. Beyin dokusunda gelişen nöropati bilişsel fonksiyonların bozulmasına yol açmaktadır. Endojen, enzimatik olmayan ve birçok metabolik yolda kofaktör olan ALA'nın antioksidan ve nöroprotektif etkisinin diyabetik nöropatinin gelişimini önlemede ve bilişsel fonksiyon bozukluklarının iyileştirilmesinde etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Kronik, metabolik bir hastalık olan DM vücudun tüm dokularında sekonder komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır. Gelişen nöropatinin özellikle merkezi sinir sistemi ve beyin dokusunda komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır.
- DM rat beyin dokusunda oksidatif stresin artışına, antioksidan sistemin zayıflamasına neden olmuştur.
- Sinir hücrelerinde zayıflayan antioksidan sistemin artan lipid peroksidasyonu karşısında miyelin zarın yapısal dejenerasyonunu artmıştır.
- Hiperglisemik toksisite beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapısal dejenerasyonlara yol açmıştır.
- Beyin dokusunda gelişen yapısal ve fonksiyonel bozulmalar bilişsel fonksiyonlarda bozulmalara neden olmaktadır. Ratlarda yer yön bulma ve hafıza yetenekleri zayıflamıştır.
- Diyabetik ratlarda ALA uygulaması beyin dokusunda antioksidan sistemi iyileştirerek oksidatif hasarın neden olduğu yapısal bozulmalara karşı koruyucu etki sağlamıştır.
- Çalışma bulgularımız ALA' nın antioksidan ve nöroprotektif etkinliğinin bozulmuş bilişsel fonksiyonların düzeltilmesinde etkili olabileceğini göstermiştir.
- Özellikle öğrenmenin çok daha etkin olduğu erken yaşlarda gelişen Tip 1 DM'li hastaların tedavisinde bilişsel fonksiyon kayıplarının önlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda ALA'nın faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.
- ALA, çalışma bulgularımızda göstermiş olduğu antioksidan ve nöroprotektif etkinliği ve literatürlerde belirtilen mevcut farmakolojik etkinliği sebebiyle DM ve diğer nöropati gelişimine neden olan hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip bir bileşiktir.

KAYNAKLAR

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.
2. Yang W, Ma J, Liu Z, Lu Y, Hu B, Yu H. Effect of naringenin on brain insulin signaling and cognitive functions in ICV-STZ induced dementia model of rats. *Neurol Sci*. 2014 May;35(5):741-51.
3. Vakfi TD. Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 2013. 3013;3:6.
4. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997 Jul;20(7):1183-97.
5. Expert Committee on the D, Classification of Diabetes M. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.
6. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2008 Jan;31 Suppl 1:S55-60.
7. American Diabetes A. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Jan;38 Suppl:S8-S16.
8. Kelley DE, Goodpaster BH. Effects of exercise on glucose homeostasis in Type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Jun;33(6 Suppl):S495-501; discussion S28-9.
9. Hsu WC, Araneta MR, Kanaya AM, Chiang JL, Fujimoto W. BMI cut points to identify at-risk Asian Americans for type 2 diabetes screening. *Diabetes Care*. 2015 Jan;38(1):150-8.
10. Murray R.K., Grannerr,D.K., Mayes,P.A. ,Rodwell, V.W. (2004) *Harper Biyokimya* (25. Baskı)-93-(N. Dikmen, T. Özgüven çev.) İstanbul Nobel Tıp Kitabevi
11. Plum L, Belgardt BF, Bruning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1761-6.
12. Griffin SJ, Borch-Johnsen K, Davies MJ, Khunti K, Rutten GE, Sandbaek A, Sharp SJ, Simmons RK, van den Donk M, Wareham NJ, Lauritzen T. Effect of early intensive multifactorial therapy on 5-year cardiovascular outcomes in individuals with type 2 diabetes detected by screening (Addition-Europe): a cluster-randomised trial. *Lancet*. 2011 Jul 9;378(9786):156-67.

13. Kurt MA, A. Gürlek, A. Diyabetik Nefropati. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2004;35:5.
14. Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care*. 2004 Jun;27(6):1458-86.
15. Haliloglu G, Temucin CM, Oguz KK, Celiker A, Coskun T, Sass JO, Fischer J, Topcu M. Peripheral neuropathy in a patient with D-2-hydroxyglutaric aciduria. *J Inherit Metab Dis*. 2009 Dec;32 Suppl 1:S21-5.
16. Herculano-Houzel S. Scaling of brain metabolism with a fixed energy budget per neuron: implications for neuronal activity, plasticity and evolution. *PLoS One*. 2011;6(3):e17514.
17. Stocker FP, Schilt W, Schupbach P, Aue WP, Lazeyras F, Herschkowitz N. [Energy metabolism of the brain, detected with ³¹P magnetic resonance spectroscopy during extracorporeal circulation in the rabbit]. *Helv Chir Acta*. 1990 Oct;57(2):373-6.
18. Bischof MG, Krssak M, Krebs M, Bernroider E, Stingl H, Waldhausl W, Roden M. Effects of short-term improvement of insulin treatment and glycemia on hepatic glycogen metabolism in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2001 Feb;50(2):392-8.
19. Shah K, Desilva S, Abbruscato T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2012;13(10):12629-55.
20. Horani MH, Mooradian AD. Effect of diabetes on the blood brain barrier. *Curr Pharm Des*. 2003;9(10):833-40.
21. Klein JP, Waxman SG. The brain in diabetes: molecular changes in neurons and their implications for end-organ damage. *Lancet Neurol*. 2003 Sep;2(9):548-54.
22. Dheen ST, Tay SS, Wong WC. Arginine vasopressin- and oxytocin-like immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Histol Cytol*. 1994 Dec;57(5):461-72.
23. Luo Y, Kaur C, Ling EA. Neuronal and glial response in the rat hypothalamus-neurohypophysis complex with streptozotocin-induced diabetes. *Brain Res*. 2002 Jan 18;925(1):42-54.
24. Grober E, Hall CB, Hahn SR, Lipton RB. Memory Impairment and Executive Dysfunction are Associated with Inadequately Controlled Diabetes in Older Adults. *J Prim Care Community Health*. 2011 Oct 1;2(4):229-33.

25. Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 1997 Jul;20(7):298-303.
26. Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 1996 Sep;45(9):1259-66.
27. Levy J, Gavin JR, 3rd, Sowers JR. Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism? *Am J Med.* 1994 Mar;96(3):260-73.
28. Russell JW, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in sympathetic neurons exposed to high glucose. *Horm Metab Res.* 1999 Feb-Mar;31(2-3):90-6.
29. Reck-Peterson SL, Provance DW, Jr., Mooseker MS, Mercer JA. Class V myosins. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 17;1496(1):36-51.
30. da Costa AV, Calabria LK, Nascimento R, Carvalho WJ, Goulart LR, Espindola FS. The streptozotocin-induced rat model of diabetes mellitus evidences significant reduction of myosin-Va expression in the brain. *Metab Brain Dis.* 2011 Dec;26(4):247-51.
31. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sci.* 1992;50(5):335-9.
32. Van Dam PS, Van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metab Rev.* 1995 Oct;11(3):181-92.
33. Bukan N, Sancak B, Yavuz O, Koca C, Tutkun F, Ozcelikay AT, Altan N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Biochem Biophys.* 2003 Dec;40(6):447-50.
34. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 1999 Jan;48(1):1-9.
35. Rosen P, Du X, Tschope D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol? *Mol Cell Biochem.* 1998 Nov;188(1-2):103-11.
36. Du X, Stocklauser-Farber K, Rosen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human

- endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med*. 1999 Oct;27(7-8):752-63.
37. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002 Sep;5(5):561-8.
 38. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):787-90.
 39. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998 Jun;47(6):859-66.
 40. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):612-28.
 41. Diabetes C, Complications Trial/Epidemiology of Diabetes I, Complications Study Research G, Jacobson AM, Musen G, Ryan CM, Silvers N, Cleary P, Waberski B, Burwood A, Weinger K, Bayless M, Dahms W, Harth J. Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N Engl J Med*. 2007 May 3;356(18):1842-52.
 42. Coppey LJ, Gallett JS, Davidson EP, Dunlap JA, Yorek MA. Effect of treating streptozotocin-induced diabetic rats with sorbinil, myo-inositol or aminoguanidine on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity and vascular function of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Int J Exp Diabetes Res*. 2002;3(1):21-36.
 43. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38.
 44. Wang X, Zhao L. Calycosin ameliorates diabetes-induced cognitive impairments in rats by reducing oxidative stress via the PI3K/Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Apr 29;473(2):428-34.
 45. Skalská S, Kučera P, Goldenberg Z, Štefek M, Kyselová Z, Jariabka P, Gajdošíková A, Klobučníková K, Traubner P, Štolc S. Neuropathy in a rat model of mild diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin: effects of the antioxidant stobadine in comparison with a high-dose α -lipoic acid treatment. *General Physiology and Biophysics*. 2010;29(1):50-8.

46. Vincent AM, Olzmann JA, Brownlee M, Sivitz WI, Russell JW. Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death. *Diabetes*. 2004 Mar;53(3):726-34.
47. McCormick M, Hadley D, McLean JR, Macfarlane JA, Condon B, Muir KW. Randomized, controlled trial of insulin for acute poststroke hyperglycemia. *Ann Neurol*. 2010 May;67(5):570-8.
48. Chen D, Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2005 Jul;7(4):307-17.
49. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005 Apr;22(4):359-70.
50. Masiello P. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(5-6):873-93.
51. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008 Feb;51(2):216-26.
52. Clark SA, Borland KM, Sherman SD, Rusack TC, Chick WL. Staining and in vitro toxicity of dithizone with canine, porcine, and bovine islets. *Cell Transplant*. 1994 Jul-Aug;3(4):299-306.
53. White FR. Streptozotocin. *Cancer Chemother Rep*. 1963 Jul;30:49-53.
54. Schein PS, Cooney DA, Vernon ML. The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res*. 1967 Dec;27(12):2324-32.
55. Arison RN, Ciaccio EI, Glitzer MS, Cassaro JA, Pruss MP. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes*. 1967 Jan;16(1):51-6.
56. Tjalve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol*. 1976 Jun;69(3):455-6.
57. Karunanayake EH, Baker JR, Christian RA, Hearse DJ, Mellows G. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (14C) - streptozotocin in the rat. *Diabetologia*. 1976 May;12(2):123-8.
58. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 1994 Nov;43(11):1326-33.

59. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000 Dec;43(12):1528-33.
60. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981 Nov 19;294(5838):284-6.
61. Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol*. 1999 Apr 15;57(8):881-7.
62. Sandler S, Swenne I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia*. 1983 Nov;25(5):444-7.
63. Wilson GL, Hartig PC, Patton NJ, LeDoux SP. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*. 1988 Feb;37(2):213-6.
64. Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Dec 30;197(3):1458-64.
65. Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol*. 1995 Dec 22;50(12):2015-20.
66. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn*. 1990 Apr;13(4):259-62.
67. Liang JF, Akaike T. Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured mouse hepatocytes by alpha-lipoic acid. *Chem Biol Interact*. 2000 Jan 3;124(1):53-60.
68. Goralska M, Dackor R, Holley B, McGahan MC. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2003 Feb;76(2):241-8.

69. Carlson DA, Smith AR, Fischer SJ, Young KL, Packer L. The plasma pharmacokinetics of R-(+)-lipoic acid administered as sodium R-(+)-lipoate to healthy human subjects. *Altern Med Rev.* 2007 Dec;12(4):343-51.
70. Cakatay U. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med Hypotheses.* 2006;66(1):110-7.
71. Moini H, Tirosh O, Park YC, Cho KJ, Packer L. R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2002 Jan 15;397(2):384-91.
72. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Oct;1790(10):1149-60.
73. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, Tritschler H, Halliwell B. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res.* 1994 Feb;20(2):119-33.
74. Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015 Dec;93(12):1021-7.
75. Goraca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep.* 2011;63(4):849-58.
76. Thakur AK, Rai G, Chatterjee SS, Kumar V. Beneficial effects of an *Andrographis paniculata* extract and andrographolide on cognitive functions in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol.* 2016 Sep;54(9):1528-38.
77. Liu J, Feng L, Ma D, Zhang M, Gu J, Wang S, Fu Q, Song Y, Lan Z, Qu R, Ma S. Neuroprotective effect of paeonol on cognition deficits of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetic rat. *Neurosci Lett.* 2013 Aug 9;549:63-8.
78. Cintra LT, Samuel RO, Prieto AK, Sumida DH, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Oral health, diabetes, and body weight. *Arch Oral Biol.* 2017 Jan;73:94-9.
79. Skalska S, Kucera P, Goldenberg Z, Stefek M, Kyselova Z, Jariabka P, Gajdosikova A, Klobucnikova K, Traubner P, Stolc S. Neuropathy in a rat model of mild diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin: effects

- of the antioxidant stobadine in comparison with a high-dose alpha-lipoic acid treatment. *Gen Physiol Biophys*. 2010 Mar;29(1):50-8.
80. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988 Mar;34(3):497-500.
 81. Durak I, Akyol O, Es MU, Canbolat O, Akpoyraz M. Element structure in stenotic mitral valves. *Am J Cardiol*. 1993 Feb 1;71(4):355.
 82. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963 May;61:882-8.
 83. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186:407-21.
 84. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967 Jul;70(1):158-69.
 85. Aebi H, Wyss SR, Scherz B, Skvaril F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur J Biochem*. 1974 Oct 1;48(1):137-45.
 86. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994;233:357-63.
 87. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
 88. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004 Apr;37(4):277-85.
 89. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*. 2004 Feb;37(2):112-9.
 90. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005 Dec;38(12):1103-11.
 91. Prasad SN, Muralidhara. Protective effects of geraniol (a monoterpene) in a diabetic neuropathy rat model: attenuation of behavioral impairments and biochemical perturbations. *J Neurosci Res*. 2014 Sep;92(9):1205-16.
 92. Benfenati F. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed*. 2007;78 Suppl 1:58-66.

93. Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci.* 2006;100(5):433-42.
94. Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):13445-52.
95. Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001 Jun;25(4):311-23.
96. Gerozissis K. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol.* 2003 Feb;23(1):1-25.
97. Reus GZ, Dos Santos MA, Abelaira HM, Titus SE, Carlessi AS, Matias BI, Bruchchen L, Florentino D, Vieira A, Petronilho F, Ceretta LB, Zugno AI, Quevedo J. Antioxidant treatment ameliorates experimental diabetes-induced depressive-like behaviour and reduces oxidative stress in brain and pancreas. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016 Mar;32(3):278-88.
98. Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N. Increase in the glycosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glycosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta.* 1987 May 19;924(2):292-6.
99. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1998 Nov;13(11):2829-32.
100. Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 1982 May;42(5):1955-61.
101. Ma LY, Lv YL, Huo K, Liu J, Shang SH, Fei YL, Li YB, Zhao BY, Wei M, Deng YN, Qu QM. Autophagy-lysosome dysfunction is involved in A β deposition in STZ-induced diabetic rats. *Behav Brain Res.* 2016 Oct 20.
102. Fu B, Zhang J, Zhang X, Zhang C, Li Y, Zhang Y, He T, Li P, Zhu X, Zhao Y, Zhang Y, Wang X. Alpha-lipoic acid upregulates SIRT1-dependent PGC-1 α expression and protects mouse brain against focal ischemia. *Neuroscience.* 2014 Dec 5;281:251-7.

103. Li Y, Zhang Z. Gastrodin improves cognitive dysfunction and decreases oxidative stress in vascular dementia rats induced by chronic ischemia. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(11):14099-109.
104. Jing XH, Chen SL, Shi H, Cai H, Jin ZG. Electroacupuncture restores learning and memory impairment induced by both diabetes mellitus and cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 2008 Oct 10;443(3):193-8.
105. Zhao RR, Xu F, Xu XC, Tan GJ, Liu LM, Wu N, Zhang WZ, Liu JX. Effects of alpha-lipoic acid on spatial learning and memory, oxidative stress, and central cholinergic system in a rat model of vascular dementia. *Neurosci Lett.* 2015 Feb 5;587:113-9.
106. Zhao CH, Liu HQ, Cao R, Ji AL, Zhang L, Wang F, Yang RH. Effects of dietary fish oil on learning function and apoptosis of hippocampal pyramidal neurons in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res.* 2012 May 31;1457:33-43.
107. Eichenbaum H. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res.* 1999 Sep;103(2):123-33.
108. Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci.* 2000 Oct;1(1):41-50.
109. Henninger N, Feldmann RE, Jr., Futterer CD, Schrempp C, Maurer MH, Waschke KF, Kuschinsky W, Schwab S. Spatial learning induces predominant downregulation of cytosolic proteins in the rat hippocampus. *Genes Brain Behav.* 2007 Mar;6(2):128-40.
110. Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Tawari S, Patil S, Dixit P, Umathe S, Mundhada D. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Behav Brain Res.* 2011 Jun 20;220(1):30-41.
111. Jurcovicova J. Glucose transport in brain - effect of inflammation. *Endocr Regul.* 2014 Jan;48(1):35-48.
112. Nardin P, Zanotto C, Hansen F, Batassini C, Gasparin MS, Sesterheim P, Goncalves CA. Peripheral Levels of AGEs and Astrocyte Alterations in the Hippocampus of STZ-Diabetic Rats. *Neurochem Res.* 2016 Aug;41(8):2006-16.
113. Manda K, Ueno M, Moritake T, Anzai K. Radiation-induced cognitive dysfunction and cerebellar oxidative stress in mice: protective effect of alpha-lipoic acid. *Behav Brain Res.* 2007 Feb 12;177(1):7-14.

EKLER

Ek 1: Özgeçmiş

1986 yılında Malatya’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya’da tamamlayarak 2014 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümün’de lisans eğitimime başladım ve 2008 yılında mezun oldum. 2009 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı’nda başlamış olduğum lisansüstü eğitimime devam etmekteyim. 2012 yılından beri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilimdalı’nda ÖYP asistanıyım. Biyokimya lisansüstü eğitimimin yanında Fizyoloji Anabilimdalı’nda lisansüstü eğitimim de devam etmektedir.

2: Etik Kurul Belgesi



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 20-01-2015
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2015/A-11
Deneide Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyü : *Wistar albino veya Sprague-Dawley*
Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet
Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 4-6 aylık 220-280 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. Elif ÖZEROL'un yürütücüsü olduğu "Streptozotosin ile İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Modelinde Alfa Lipoik Asidin Beyin Dokusu Üzerine Etkisinin Araştırılması " isimli 2015/A-11 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Denei Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılarā ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Doç.Dr. M. Arif ALADAĞ Başkan	 Prof. Dr. Nigar VARDI Üye	 Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye
 Vet.Hek. M. Zafer BOZBAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mehmet KARATAŞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
 Vet. Med. Salih AVCI Sivil Üye	 Vet. Med. Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	

