

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK  
SIÇAN MODELİNDE METFORMİNİN DİYABETİK  
NÖROPATİ VE BİLİŞSEL FONKSİYONLAR ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Kevser TANBEK**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Doç.Dr.Ergül ALÇİN  
Yüksek Lisans Tezi – 2015**

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

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE  
METFORMİNİN DİYABETİK NÖROPATİ VE BİLİŞSEL FONKSİYONLAR  
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**KEVSER TANBEK**

**Fizyoloji Anabilim Dalı  
Yükseklisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Ergül ALÇİN**

**2.Danışman  
Prof. Dr. Sedat YILDIZ**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2015/26 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA  
2015**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Kevser TANBEK'in "Streptozotosin İle İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Modelinde Metforminin Diyabetik Nöropati ve Bilşsel Fonksiyonlar Üzerine Etkisinin Araştırılması "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/08/2015

Prof. Dr. Sedat YILDIZ  
İnönü Üniversitesi  
2. Tez Danışmanı,  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. M. Hanifi EMRE  
İnönü Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Nigar VARDI  
İnönü Üniversitesi  
Üye

Doç. Dr. Ergül ALÇİN  
Hacettepe Üniversitesi  
Tez Danışmanı,  
Üye

Doç. Dr. Mehmet AYDIN  
Zirve 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 ....../....../2015 tarih ve 2015/..... 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 .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Diabetes Mellitus (DM).....	2
2.2. DM Sınıflandırılması.....	2
2.2.1. Tip I Diyabet (İnsüline bağımlı diyabet: IDDM).....	2
2.2.2. Tip II Diyabet (İnsüline bağımlı olmayan diyabet: NIDDM).....	2
2.2.3. Sekonder Diyabet.....	3
2.2.4. Gebelik Diyabeti (GDM).....	3
2.2.5. Glikoz Toleransının Azalması.....	3
2.3. Diyabetik Komplikasyonlar .....	3
2.3.1. Akut Komplikasyonlar .....	3
2.3.2. Kronik Komplikasyonlar .....	4
2.3.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar(Makroanjiopati).....	5
2.3.2.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar (Mikroanjiopati) .....	5
2.3.2.2.1. Diyabetik Retinopati.....	5
2.3.2.2.2. Diyabetik Nefropati .....	5
2.3.2.2.3. Diyabetik Nöropati.....	6
2.3.2.2.4. Diyabetik Nöropatinin Sınıflandırılması .....	7
2.3.2.2.5. Diyabetik Nöropati ve Diyabette Tuzak Nöropati Patogenezi.....	7
2.4. Öğrenme ve Bellek.....	9
2.4.1. İmplicit ve Eksplisit Belleğin Moleküler Temelleri .....	12
2.4.2. Belleğin Pekiştirilmesi.....	13
2.4.3. DM ve Bilişsel Fonksiyonlar Üzerine Etkisi .....	15
2.5. DM Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.....	15
2.5.1. İnsülin.....	17
2.5.1.1. İnsülin Analogları .....	17

2.5.1.1.1. Kısa Etkili İnsülin Analogları .....	17
2.5.1.1.2. Uzun Etkili İnsülin Analogları .....	17
2.5. Oral antidiyabetikler.....	17
2.5.1. Metformin.....	18
2.6. Deneysel Diyabet Modelleri.....	19
2.6.1. Diyabetin farmakolojik induksiyonu.....	20
2.6.1.1. Streptozotosin .....	20
2.6.1.2. Streptozotosinle diyabet oluşturma fazları.....	21
2.6.1.3. STZ'nin Etki Mekanizması .....	22
2.6.2. Deneysel Diyabette Cerrahi Modeller.....	23
2.6.3. Deneysel Diyabetin Genetik Modelleri.....	24
2.6.3.1. Spontan Diyabet Geliştiren Hayvan Modelleri.....	24
2.6.3.2. Genetik Mühendisliği ile Üretilen Diyabetik Fareler.....	24
2.7. Serbest Radikaller.....	25
2.7.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri .....	26
2.7.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri .....	27
2.7.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri .....	27
2.7.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri .....	28
2.8. Antioksidanlar.....	28
2.9. Oksidatif Stres.....	30
2.10. DM ve Oksidatif Stres.....	30
2.10.1. Glikozun Otooksidasyonu ve Süperoksit Üretimi .....	31
2.10.2. Proteinlerin Glikasyonu .....	31
2.10.3. Poliöl (Sorbitol) Yolağının Aktivitesinin Artması .....	32
3. MATERYAL VE METOT.....	35
3.1. Deney Hayvanlarının Temini .....	35
3.2. Deney Hayvanlarında Diyabet Oluşturulması.....	35
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması .....	37
3.4. STZ ve Metformin Uygulaması.....	37
3.5. Hot Plate Analjezometre .....	37
3.6. Morris Su Labirenti Testi.....	38
3.7. Beyin Dokularının ve Siatik Sinir Dokularının Çıkarılması .....	39
3.8. Beyin Dokularının ve Siatik Sinirin Analizlere Hazırlanması.....	40
3.9. Beyin Dokusunda Yapılan Analizler.....	41

3.9.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini.....	41
3.9.2. GSH Analizi.....	42
3.9.3. MDA Miktarının Tayini .....	42
3.9.4. Doku Homojenat ve Süpernatant Ekstraktlarında Protein Tayini .....	43
3.9.5. Beyin Doku Süpernatantından TAS –TOS ve OSI Analizi. ....	44
3.10. İstatistik Analizler.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Sıçanların Deney Süresince Canlı Ağırlıkları .....	46
4.2. Sıçanların Deney Süresince Kan Glikoz Düzeyleri .....	47
4.3. Hot Plate Analjezimetre Bulguları.....	48
4.4. Morris Water Maze Sonuçları .....	50
4.5. Sıçanların Beyin Dokularında Oksidatif Stres Parametre Bulguları.....	56
4.5.1. Sıçanların Beyin Dokularında TAS –TOS- OSI seviyesi.....	57
4.5.2. Sıçanların Beyin Dokularında GSH seviyesi.....	58
4.5.3. Sıçanların Beyin Dokularında SOD aktivitesi.....	59
4.5.4. Sıçanların Beyin Dokularında MDA seviyesi .....	60
4.6. Histolojik Bulgular .....	61
4.6.1. Siyatik Sinir.....	61
4.6.2. Hipokampus Dokusu.....	64
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR .....	73
EKLER.....	83
EK 1: ETİK KURUL KARARI.....	83
EK 2: ÖZGEÇMİŞ.....	84

## TEŞEKKÜR

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan Anneme ve Babama teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tez çalışmamın tüm aşamalarında ilgilenen ve tezimin bitiş sürecinde üniversitemizden ayrılarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde akademik kariyerine devam eden tez danışmanım Doç. Dr. Ergül ALÇİN'e teşekkür ederim. Çalışmalarımın aksamaması için yardımcı olan ve danışmanlığımı üstlenen Fizyoloji A.D. Başkanı Prof. Dr. Sedat YILDIZ'a, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. öğretim üyelerine, asistanlarına ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan Prof. Dr. Elif ÖZEROL'a, histolojik değerlendirmeler için Prof. Dr. Nigar VARDI ve Arş. Görv. Azibe YILDIZ'a istatistik hesaplama ve değerlendirilme aşamasında katkılarından dolayı Doç. Dr. Cemil ÇOLAK'a teşekkür ederim.

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

Kevser TANBEK

## ÖZET

### **Streptozotosin ile İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Modelinde Metforminin Diyabetik Nöropati ve Bilişsel Fonksiyonlar Üzerine Etkisinin Araştırılması**

**Giriş/Amaç:** Nörodejenerasyon diyabetin en önemli komplikasyonlarından biridir. Nörodejenerasyona bağlı olarak gelişen bilişsel fonksiyon bozuklukları ve periferik nöropati gibi diyabetik komplikasyonların altında yatan mekanizma henüz tam olarak açık değildir. Streptozotosin özellikle memeli pankreasında insülin üreten beta hücrelerinde toksik etki gösteren, doğal olarak oluşan kimyasal bir maddedir. Bu çalışmada diyabetik sıçanlarda metforminin olası nöroprotektif etkilerini araştırmayı amaçladık.

**Materyal/Metod:** 30 adet *Wistar albino* erkek sıçan kontrol grubu, STZ grubu ve STZ+MET grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Diyabet oluşturmak için 55 mg/kg STZ intraperitoneal olarak uygulandı. Metformin 500 mg/kg dozda altı hafta boyunca her gün oral gavaj yoluyla verildi. Diyabet oluşturulduktan altı hafta sonra sıçanlara Hot-plate analjezi testi ve son haftasında bilişsel fonksiyonların değerlendirilmesi için Morris Water Maze Testi kullanıldı. Siyatik sinir ve hipokampus dokuları histolojik olarak incelendi. Beyin dokusunda oksidatif stres markırlarından MDA, SOD, GSH, TAS ve TOS düzeylerine bakıldı.

**Bulgular:** Gruplara göre altı haftalık ortalama kan glikoz seviyeleri; kontrol 130±29 mg/dl, STZ 486±120 mg/dl ve STZ+MET 256±36 mg/dl'dir. Periferik nöropatinin değerlendirildiği Hot plate bulgularına göre diyabetik grupta ağrı hissetme süresi uzarken metformin grubunda bu sürenin azaldığı anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). MWM sonuçlarında STZ grubundaki sıçanların platformu bulmak için katettikleri mesafe kontrol grubuna göre uzun ve karmaşıktı. STZ+MET grubununun sonuçları kontrol grubu bulgularına benzerdi. Hipokampus dokularında yapılan histolojik incelemelerde; dejenerasyon nöron yüzdeleri kontrol grubu%15,6 STZ % 45,6 ve STZ+MET grubunda %36,5 olarak değerlendirildi. STZ grubundaki dejenerasyon kontrol grubuna göre anlamlıydı. STZ+MET grubundaki iyileşme ise STZ grubuna göre anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ). Siyatik sinir histopatolojik skorlanarak değerlendirildi. STZ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı artış STZ+MET grubunda ise STZ grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ( $p<0.001$ ). Beyin dokusunda yapılan oksidatif stres ve antioksidan analiz sonuçlarına göre STZ grubunda kontrol grubuna göre GSH



ve TAS bulgularında azalma; MDA, TOS, SOD bulgularında anlamlı artışlar bulundu. STZ+MET grubu STZ grubu ile karşılaştırıldığında TAS bulgularındaki artış; SOD ve MDA bulgularındaki azalmalar anlamlı bulundu( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** Bu çalışmayla metforminin diyabetik sıçanlarda; siyatik sinirdeki yapısal bozuklukları onardığı ve hipokampus dokusunda oksidatif stresi ve dejenere nöron sayısını azaltarak diyabete bağlı gelişen bilişsel fonksiyonlardaki bozulmayı düzelttiği gösterildi.

**Anahtar Kelimeler:** Bilişsel Fonksiyonlar, Diabetes Mellitus, Diyabetik Nöropati, Metformin, Streptozotosin

## ABSTRACT

### **Investigation of Effect of Metformin on Diabetic Neuropathy and Cognitive Functions in Streptozotocin Induced Diabetic Rat Model**

**Background/Aim:** Neurodegeneration is one of the most important complications of diabetes. The exact mechanisms underlying neurodegeneration related to diabetic complications such as cognitive deficits and peripheral neuropathy are not clarified yet. Streptozotocin is a naturally occurring chemical that is particularly toxic to the insulin producing beta cells of the pancreas in mammals. In this study, we aimed to investigate the possible neuroprotective effects of metformin (MET) in diabetic rats.

**Materials and Methods:** Thirty male *Wistar albino* rats were randomly divided into three groups: Control group, STZ group, STZ+MET group. STZ (55 mg /kg) was administered intraperitoneally to create diabetes. Metformin (500 mg/kg) was administered by oral gavage every day for six weeks. Hot-plate analgesia test was performed to rats six weeks after. Morris Water Maze Test was used to for the assessment of cognitive function in the last week of the test process. Sciatic nerve and the hippocampus tissue was evaluated histologically. Markers of oxidative stress MDA, SOD, GSH , TAS , TOS levels were measured in brain tissue.

**Results:** The average blood glucose levels based on the six weeks groups; Control 130±29 mg/dl, STZ 486±120 mg/dl and STZ+MET 256±36 mg/dl. According to the findings of Hot plate in which peripheral neuropathy was evaluated, while the period of aching in the diabetes group has gotten longer, that the period aching in the metformin group has shortened ( $p < 0.05$ ). It could be seen in the MWM results that the distance the rats in the STZ group covered in order to find the platform is longer and more complicated compared to the rats in the control group and the results of the STZ+MET group are similar to the ones in the control group. The percentage of degenerated neurons that were evaluated during the histological examinations on the hippocampus tissues are as follows; Control group %15,6, STZ % 45,6 and STZ+MET group %36,5. that the degeneration in the STZ group compared to the control group was statistically significant. The recovery in the STZ+MET group were better compared to the control group ( $p < 0.001$ ). The sciatic nerve was scored histopathological , it was observed that there is a significant increase in the STZ group compared to the control

group and a significant decrease in the STZ+MET group compared to the STZ group ( $p<0.001$ ). According to the oxidative stress and antioxidant analysis results conducted on the brain tissue, STZ group compared to the control group decrease in GSH and TAS findings; MDA, TOS, SOD there were significant increases in findings. STZ + MET group compared to STZ group; There was a significant rise in the TAS, significant decrease in SOD and MDA findings ( $p<0.05$ ).

**Conclusions:** In this study, it was shown to improve that metformin, structural changes in the sciatic nerve, which reduces the number of degenerated neurons in the hippocampus and due to developing cognitive function impairment in diabetic rats.

**Key words:** Cognitive function, Diabetes Mellitus, Diabetic neuropathy, Metformin, Streptozotocin

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>°C</b>	: Santigrad Derece
<b>μmol</b>	: Mikromol
<b>O<sub>2</sub></b>	: Singlet Oksijen
<b>AGEs</b>	: İleri Derecede Glikozillenmiş Son Ürünler
<b>ATP</b>	: Adenozin Tri Fosfat
<b>CAT</b>	:Katalaz
<b>Cu</b>	: Bakır
<b>dk</b>	: Dakika
<b>DKA</b>	: Diyabetik Ketoasidoz
<b>dl</b>	: Desilitre
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DTNB</b>	: 5, 5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
<b>Fe</b>	: Demir
<b>g</b>	: Gram
<b>GDM</b>	: Gebelik Diyabeti
<b>GSH-Px</b>	: Glutatyon Peroksidaz
<b>GSH</b>	: İndirgenmiş Glutatyon
<b>GSSG</b>	: Okside Glutatyon
<b>GSSG-R</b>	: Glutatyon Redüktaz
<b>GST</b>	: Glutatyon S-transferaz
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilin ve Eosin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	: Glikozillenmiş Hemoglobin,
<b>HDL</b>	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
<b>HHS</b>	: Hiperozmolar Hiperglisemik Sendrom
<b>HO•</b>	: Hidroksil Radikali
<b>IDDM</b>	: İnsulin'e Bağımlı Diyabet I
<b>L</b>	: Litre
<b>LDL</b>	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<b>LP</b>	: Lipit Peroksidasyonu
<b>M</b>	: Molarite

<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>mg</b>	:Miliagram
<b>ml</b>	:Mililitre
<b>mmol</b>	: Milimol
<b>MWM</b>	: MorrisWaterMaze
<b>n</b>	:Denek Sayısı (Adet)
<b>NAD</b>	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>NAD<sup>+</sup></b>	:Yükseltgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>NADH</b>	: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>NBT</b>	:Nitro Blue Tetrazolium
<b>NIDDM</b>	: İnsulin'e Bağımlı Olmayan Diyabet
<b>NMDA</b>	: N-metil-D-aspartik asit
<b>nm</b>	:Nanometre
<b>nmol</b>	: Nanomol
<b>NO</b>	:Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	:Nitrik Oksit Sentaz
<b>O<sub>2</sub></b>	:Süperoksit Radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	:Peroksinitrit
<b>ROS</b>	:Reaktif Oksijen Türleri
<b>rpm</b>	: Devir/Dakika (Revolution per minute)
<b>SH</b>	:Sülfidril
<b>SOD</b>	:Süperoksit Dismutaz
<b>STZ</b>	:Streptozotosin
<b>TBA</b>	:Tiyobarbütirik Asit
<b>TCA</b>	:Trikloro Aasetik Asit
<b>U</b>	:Ünite
<b>VLDL</b>	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<b>WHO</b>	: (World Healt Organization) Dünya Sağlık Örgütü
<b>Zn</b>	:Çinko
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µmol</b>	: Mikromol

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil No</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 2.1: Metforminin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.2: Streptozotosinin kimyasal yapısı .....	20
Şekil 2.3: STZ enjeksiyonundan sonraki trifazik kan glikoz değişimi.....	21
Şekil 2.4: STZ'nin etki mekanizması.....	23
Şekil 2.5: Proteinlerin glikasyonu ve AGEs oluşumu .....	31
Şekil 2.6: Polioll yolunun DM ile aktivasyonu .....	33
Şekil 3.1: Çalışmamızda kullanılan hot plate analjezimetre.....	39
Şekil 3.2: Çalışmamızda kullanılan Morris Water Maze.....	40
Şekil 4.1: Sıçanların deney süresince haftalara göre vücut ağırlıkları.....	46
Şekil 4.2: Sıçanların deney süresince haftalara göre kan glikoz düzeyleri.....	47
Şekil 4.3: Hot Plate analjezimetre sonuçları.....	49
Şekil 4.4: MWM grupların 4 günlük ortalama platformu bulma süre sonuçları .....	52
Şekil 4.5: MWM grupların 4 günlük ortalama platformu bulmanı bulmak için katedilen mesafe (cm) bulguları.....	53
Şekil 4.6: MWM grupların 4 günlük ortalama platformun bulunduğu kadranda katedilen mesafe (cm) bulguları.....	53
Şekil 4.7: MWM grupların 5. gün platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre (sn)bulguları.....	54
Şekil 4.8: MWM grupların 5.gün platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre.....	54
Şekil 4.9: 4. Gün kuzey doğu yönünde yüzmek için bırakılan sıçanların platformu bulmak için izledikleri yolun heat map görüntüsü.....	55
Şekil 4.10: 5. Gün kuzey doğu yönünde yüzmek için bırakılan sıçanların platformsuz havuzda izledikleri yolun ısı haritası (heat map) görüntüsü.....	55
Şekil 4.11: Beyin dokusunun TAS analiz sonuçları.....	57
Şekil 4.12: Beyin dokusunun TOS analiz sonuçları.....	58
Şekil 4.13: Beyin dokusunun OSİ analiz sonuçları.....	58
Şekil 4.14: Beyin dokusunun GSH analiz sonuçları.....	59
Şekil 4.15: Beyin dokusunun SOD analiz sonuçları.....	60
Şekil 4.16: Beyin dokusunun MDA analiz sonuçları.....	60

<b>Şekil 4.17:</b> Kontrol Grubu Siyatik sinirinin histolojik görünümü.....	61
<b>Şekil 4.18:</b> STZ Grubu Siyatik sinirinin histolojik görünümü .....	62
<b>Şekil 4.19:</b> STZ + MET grubu Siyatik sinirin histolojik görünümü.....	63
<b>Şekil 4.20:</b> Kontrol Grubu hipokampüs dokusu histolojik görünümleri .....	64
<b>Şekil 4.21:</b> STZ grubu hipokampüs dokusu histolojik görünümleri .....	65
<b>Şekil 4.22:</b> STZ+MET grubu hipokampüs dokusu histolojik görünümleri .....	65

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 4.1:</b> Haftalara göre grupların ortalama sıçan canlı ağırlıkları .....	46
<b>Tablo 4.2:</b> Gruplara göre sıçanların haftalık ortalama kan glikoz düzeyleri.....	47
<b>Tablo 4.3:</b> Gruplara göre sıçanların ortalama hot plate bulguları.....	49
<b>Tablo 4.4:</b> Platformun kuzey batı kadranında bulunduğu 4 günlük alışma sürecinde gruplara göre MWM bulguları .....	51
<b>Tablo 4.5:</b> MWM platformsuz 5. gün kuzey batı kadranında geçirilen süre ve katedilen mesafe bulguları (m).....	52
<b>Tablo 4.6:</b> Sıçanların beyin dokularında oksidatif stres parametre bulguları .....	56
<b>Tablo 4.7:</b> Hipokampus dokusunda grupların histolojik skorları.....	63
<b>Tablo 4.8:</b> Hipokampus dokusunda grupların mast hücre sayısı .....	64
<b>Tablo 4.9:</b> Gruplardaki normal ve dejenere nöronların sayısı.....	66
<b>Tablo 4.10:</b> Gruplardaki normal ve dejenere nöronların yüzdeleri .....	66



# 1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), pankreasın vücudun ihtiyacı olduğu miktarda insülin üretememesi veya ürettiği insülini vücudun etkili bir şekilde kullanamaması sonucu oluşan ve yaşam boyu devam eden kronik bir hastalıktır. Hastalığın seyri, çeşitli fizyopatolojik süreçlerle ilişkilidir. Bu süreçler, pankreas beta hücrelerinin oto immün hasarından, insülin etkinliğine karşı dirence neden olan çeşitli patolojilere kadar uzanır.

DM'nin zamanla ilişkili olarak birçok doku ve organda yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olduğu bilinmektedir. Özellikle merkezi sinir sisteminde yaptığı hasar sebebiyle bilişsel fonksiyonlarda bozulmalara neden olduğu yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir. DM'nin özellikle bellek işleviyle alakalı olan hipokampus bölgesindeki nöronal yapılarda nörotransmitterlerin salgılanması ve reseptörler ile etkileşiminin kimyasal, yapısal ve fonksiyonel bozulmalar sonucu nöronal apoptozise neden olarak bilişsel fonksiyonları bozduğu bildirilmiştir.

DM araştırmalarında streptozotosin (STZ) en uygun diyabetojenik ajandır. İlk defa 1963'te Rakieta STZ'nin diyabetojenik olduğunu bildirmiştir. STZ'nin pankreas  $\beta$  hücrelerinde spesifik olarak nekroza neden olduğu ve hayvanlarda diyabet indüklemesinde tercih edildiği bildirilmiştir. STZ'nin indüklediği diyabet modelinde nöropatinin daha şiddetli olması ve STZ'nin oksidan özelliklerinden dolayı bizde çalışmamızda diyabet oluşturmak için STZ kullandık.

Metformin özellikle obez Tip II diyabetlilerde tedavide ilk seçenek olarak yerini korumaktadır. Metformin, biguanidler ailesinin üyesidir. Biguanidler, *Galega officinalis* (Fransız Leylağı) bitkisinde bulunan guanidinin deriveleridir. Günümüzde kullanımda olan tek biguanid grubu ilaç metformindir.

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. STZ sıçanlarda Tip I diyabet modeli oluşturulmasında ve komplikasyonlarının incelenmesinde sıklıkla kullanılan bir ajandır. Metformin hâlihazırda diyabet tedavisinde kan glikozunu kontrol altında tutmak ve oluşan metabolik komplikasyonları minimize etmek için kullanılan bir ilaçtır. Bunun yanısıra metformin nöroprotektif etkilere de sahiptir.

Yapılan çalışmalar ışığında biz de bu çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, Tip II diyabet tedavisinde kullanılan metforminin diyabetik nöropati ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Diabetes Mellitus (DM)

DM, pankreasın insülin üretimindeki bozukluklarından veya salgılanan insülinin yeterli derecede kullanılamamasından kaynaklanan metabolik bir hastalıktır. Kontrol altına alınmadığında hiperglisemi zamanla tüm dokulara, özellikle de sinirlere ve kardiyovasküler sisteme ciddi zararlar vermektedir (1). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2000 yılında tüm dünyada en az 171 milyon diyabet hastası (toplam dünya nüfusunun %2.8'i) bulunduğunu bildirmiştir. Tüm dünyada diyabetin görülme sıklığı hızla artmaktadır ve 2030 yılında yaklaşık 366 milyon kişinin diyabet hastası olacağı tahmin edilmektedir (toplam dünya nüfusunun %4.4'ü). Diyabet tüm dünyada görülen bir hastalıktır ancak, gelişmiş ülkelerde daha sık (özellikle Tip II diyabet) görülmektedir (2).

### 2.2. DM Sınıflandırılması

Amerikan Diyabet Birliği (ADA) 1997 yılında diyabet için yeni tanı ve sınıflandırma kriterleri yayımlamış (3) ve bu sınıflandırma üzerinde 2003 yılında bazı düzeltmeler yapılmıştı (4). Diyabet hastalığının başlıca dört tipi vardır (5).

#### 2.2.1. Tip I Diyabet (İnsüline Bağımlı Diyabet)

Genellikle çocuklarda görülür, tüm diyabet vakalarının yaklaşık %10'unu teşkil eder. Bu tip diyabette Langerhans Adacıklarındaki  $\beta$ -hücrelerinin miktar ve fonksiyon kaybına bağlı olarak, insülin sentez ve salınımı azalır veya durur (6, 7).  $\beta$ -hücrelerinin hasarından birbirine bağlı önemli üç faktör sorumludur: Genetik yatkınlık, otoimmünite ve çevresel faktörler. Glisemiye kontrol altına almak, ketozu önlemek ve hastanın hayatına devam etmesini sağlamak için dışarıdan insülin verilerek eksiklik giderilir. Bu tip diyabette, insülin dışında tedavi edici herhangi bir ilaç bulunamamıştır (8-10).

#### 2.2.2. Tip II Diyabet (İnsüline Bağımsız Gelişen Diyabet)

Genellikle ileri yaşlarda görülmeye başlar, tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90'nını teşkil eder (11). Bu tipte,  $\beta$ -hücrelerinde insülin oluşumu, salınımı, depo edilmesi ve beta hücrelerinin sayısı normaldir. Kanda insülin düzeyi biraz

azalmış, normal ya da yüksek olabilir. Önemli bozukluk, hedef hücrelerde insülin-reseptör sıklığının veya hücre içi post reseptör düzeyde insülin etkinliğinin azalması ve insüline karşı direnç gelişmesidir. Bu bozuklukların kalıtsal nedenlerle meydana geldiği öne sürülmüştür (12-14).

Tip II diyabet iki farklı gruba ayrılmaktadır: Birinci grup obez bireylerde görülen diyabet şeklidir. Bu grupta aşırı beslenme ve besin maddelerinin kandan hücrelere geçip depolanmasının azalmasına bağlı olarak, beta-hücresi stimülasyonu ile hiperinsülinizm ortaya çıkmaktadır. Sonuçta hedef hücrelerde reseptör sıklığı azalmakta ve postreseptör nitelikteki direnç artmaktadır. Diyet ile tedavi ve vücut ağırlığının azaltılması birçok semptomu ortadan kaldırır.

İkinci grup ise şişman olmayan (non-obez) bireylerde görülen diyabettir. Bu tipte  $\beta$ - hücrelerindeki fonksiyon bozukluğunun rol oynadığı düşünülmektedir. Bu tip diyabetin kontrol altında tutulmasında oral antidiyabetikler etkili olmaktadır (12).

### **2.2.3. Sekonder Diyabet**

Pankreas hastalıkları (Pankreatit, Cistik fibrosis), diyabetojenik hormonların (prolaktin, glukagon, büyüme hormonu) aşırı salgılanması ve diyabetojenik etkili ilaçlarla tedavi sırasında ortaya çıkan diyabet şeklidir (15).

### **2.2.4. Gebelik Diyabeti (GDM)**

Gebelik sırasında glikoza karşı toleransın azaldığı geçici bir diyabet durumudur. Gebelikten sonra semptomların devam etmesi ile kronikleşebilir (16).

### **2.2.5. Glikoz Toleransının Azalması**

Kişideki plazma glikoz düzeyinin normal ile diyabetik kabul edilen değerler arasında bulunması durumudur. Gebelik, şişmanlık, stres, miyokard infarktüsü ve cerrahi girişimler esnasında meydana gelmektedir. Etkenlerin ortadan kalkması ile iyileşme görülür (12).

## **2.3. Diyabetik Komplikasyonlar**

### **2.3.1. Akut Komplikasyonlar**

Diyabetik ketoasidoz (DKA); Düşük insülin seviyeleri hiperglisemiye neden olur. İhtiyacı olan glikozu yeterince kullanamayan karaciğer hücreleri enerji kaynağı olarak yağ asitlerini kullanmaya başlar. Bundan dolayı, kanda keton cisimciklerinin

miktarı artar (ketonemi) ve kanın pH'sı düşer. Kan pH'sının düşmesi DKA'nın en önemli göstergesidir. Tip I diyabetin önemli göstergelerinden birisi hasta nefesinde olan aseton kokusudur.

DKA genellikle Tip I diyabetlilerde görülen bir komplikasyon olmakla beraber nadiren Tip II diyabet hastalarında da görülebilir. DKA düşük kan pH sebebiyle her zaman acil tıbbi müdahale gerektiren akut ve tehlikeli bir komplikasyondur (17).

Hiperozmolar Hiperglisemik Sendrom (HHS); belirgin ketoasidoz durumu olmaksızın, aşırı hiperglisemi, su kaybı (dehidratasyon) ve plazma hiperozmolaritesi ile karakterize olan bir sendromdur. Kan glikoz değeri çok yüksek (16 mmol/l) olan (genellikle 300 mg/dl ve üzeri değerler) kişilerde, kanın ozmotik basıncı yükselir. Hücre içindeki su moleküllerinin kana doğru geçişine neden olur. Sonuç olarak hiperglisemi böbreklerden suyun emilimini engeller ve idrar miktarını da artırır. Bu duruma ozmotik diürez adı verilir.

Bu durumda kaybedilen sıvı miktarı vücuda geri alınmaz ise (ağızdan ya da damar yoluyla), hücrelerin sürekli su kaybetmeleri ve aşırı idrar ile suyun atılması sonucunda hastaların sıvı kaybetmelerine (dehidrasyon) neden olur. Tip II diyabet hastalarında daha sık olarak görülen HHS'te, diyabetik ketoasidozda olduğu gibi acil tıbbi müdahale edilerek kaybedilen sıvının geri verilmesi gereklidir (7).

Hipoglisemi: anormal derecede düşük kan glikoz düzeyi, diyabet tedavisinde kullanılan birçok tedavinin akut bir komplikasyonudur. Özellikle insülin tedavisi uygulanan Tip I ve Tip II diyabet hastaları, bazı oral antidiyabetik ilaç kullananlar, yaşlı ve böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda görülür. Hipoglisemi komanın en önemli sebebidir (17).

Diyabet hastalarında görülen bu duruma yanlış zamanda ve çok fazla yapılan egzersiz (egzersiz yapmak insülin gereksinimini azaltır), zamanlaması yanlış ve aşırı insülin kullanımı, yeterli besin alınmaması (özellikle glikoz içeren karbohidratlar) ya da bir öğünün kaçırılması neden olabilir. Çoğu vakada hipoglisemi şekerli gıdaların alınımıyla yeterli olurken, ciddi vakalarda tedavi için glukagon enjeksiyonu ya da intravenöz %5'lik dekstroz infüzyonu yapılır.

### **2.3.2. Kronik Komplikasyonlar**

Kan glikoz seviyesinin kronik yükselmesi kan damarlarında iki tip komplikasyona (anjyopati) sebep olur:

### **2.3.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar (Makroanjiopatiler)**

Diyabetli hastalarda sık karşılaşılan bu komplikasyonlarda periferik damar hastalığı, koroner kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalıklar görülür. Diyabetin makrovasküler komplikasyonları denildiği zaman ateroskleroz, kardiovasküler komplikasyonlar, beyin arterlerinde meydana gelen değişiklikler ve bunlara bağlı gelişen hemoraji ve trombozlar, bacaklarda ateroskleroza bağlı tromboz semptomlarına rastlanması ve sonuç olarak kangren eğiliminin artması gibi durumlar akla gelmektedir.

### **2.3.2.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar (Mikroanjiopatiler)**

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

#### **2.3.2.2.1. Diyabetik Retinopati**

Kronik diyabet hastalarının % 20'sinden fazlasında körlük gelişmektedir. Bu hastalarda görme kaybının birinci sebebi retinopatidir. Diyabetik retinopati, gözün arka kısmındaki retinayı besleyen damarlarda diyabete bağlı gelişen mikrovasküler bir hastalıktır. Retinopati proliferatif ve nonproliferatif olarak iki grup altında incelenebilir. Hastaların retinasında kanamalar, eksüdalar, venöz ve kapiller değişiklikler ile anevrizmalar görülür (18, 19).

#### **2.3.2.2.2. Diyabetik Nefropati**

Diyabetik nefropatinin patogeneğinde hemodinamik mekanizmaya ilave olarak, glikotoksisite ve anormal lipid profili gibi çeşitli mekanizmalar söz konusudur. Hemodinamik mekanizmada erken patolojik bulgular; bowman kapsülünde, glomerüler bazal membranda ve tübüler bazal membranda kalınlaşmalar şeklindedir. Bir başka mekanizmada ise glukotoksisite ve hemodinamik stres hücresel fonksiyonu değiştirerek polioll yolağında aldoz redüktaz enziminin konsantrasyonunu artırır. Böbreklerde diffüz glomerüloskleroz, noduler glomeruloskleroz ve eksüdatif lezyonlar, pyelonefritis, tübüler hücrelerde glikoz birikmesi ve yağlı değişiklikler gibi lezyonlar görülebilir (20).

### 2.3.2.2.3. Diyabetik Nöropati

Diyabet, nöropatinin en sık rastlanan nedenidir. Hastaların çoğunda duysal 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 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. Diyabet hastalarında Carpal Tunnel sendromu ve diğer sıkışma nöropatilerinin görülme sıklığı yüksektir (21).

Nöropatiler, diyabet hastalarının yaklaşık %50'sini etkileyen ve diyabetin en sık görülen geç komplikasyonlarından biridir (22,23).

Diyabetik nöropati; diyabetli hastada, tutulumu açıklayabilecek başka neden saptanamayan, periferik sinir disfonksiyonuna ait yakınma veya bulgular olarak tanımlanmıştır. Periferik sinir sisteminin somatik ve otonomik kısımlarına ait bulguları içerir. Nöropatinin oluşmasında etyopatogeneizde hiperglisemi, diyabetin süresi, ileri yaş, hipertansiyon, hipoinsülinemi, hiperinsülinemi vardır. Bunların dışında bazı bağımsız risk faktörleri de etyolojide suçlanmıştır; sigara ve alkol kullanımı, uzun boylu olmak, albuminüri, vücut kitle indeksi, trigliserit, kolesterol ve genetik faktörlerden söz edilir. Erkeklerde, kadınlara oranla diyabete bağlı nöropati siktir (24).

Diyabetik hastalarda mikroanjyopati, albümin ekstresyon oranı ve HbA1c oranı kontrol altına alınmış olsa bile nöropatisi olan hastalarda mortalite anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (24-25).

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

Diyabetik nöropatili hastalar özellikle alt ekstremitelerde distallerde duysal yakınmalar ile hekime başvururlar. Genellikle yapılan nörolojik muayenede eldiven çorap tarzı duyu kusuru, hiporefleksi veya arefleksi, vibrasyon duysusu algı eşiğinde yükselme, özellikle ayak intrensek kaslarında ılımlı atrofi ve his kaybı saptanır (24).

#### **2.3.2.2.4. Diyabetik Nöropatinin Sınıflaması**

Diyabetik nöropati tek bir nörolojik klinik tabloya değil, çeşitli dağılımda periferik sinir tutulumlarına neden olmaktadır (24). Diyabet seyri sırasında gelişen nöropati tablolarını ayırt etmek, bu nöropatilerin tedavisi açısından önem taşımaktadır. Diyabet seyrinde, nefropati ve retinopati, bunlarla birlikte diyabetin komplikasyonu olarak gelişebilen polinöropati tabloları olabildiği gibi, farklı patogenez ile de nöropatiler gelişebilmektedir. Bunlardan, diyabetin komplikasyonu olarak gelişen nöropatilerde doğrudan glisemi kontrolü önemliyken, demyelinizan polinöropatilerin veya proksimal nöropatilerin immün ve vaskülitik mekanizmalarla gelişebildiği ve bunlarda immünsüpresan ve immünmodülatör tedavi uygulanması gerektiği bildirilmiştir (25,26).

##### **A- Simetrik Jeneralize polinöropati (PNP)**

###### **1) Kronik PNP**

###### **I. Distal sensorimotor PNP**

###### **II. Otonomik PNP**

###### **III. Kronik inflamatuvar demyelinizan PNP ile kombinasyon**

###### **2) Akut PNP**

###### **I. Akut ağırlı duysal PNP**

###### **II. Hiperglisemik PNP**

###### **III. Kaşektik PNP**

###### **IV. Hiperinsülin PNP**

##### **B- Asimetrik Multifokal PNP**

###### **1) Proksimal diyabetik PNP (Diyabetik amiyotrofi-Lumbal radikülopleksopati)**

###### **2) Trunkal PNP (Torakolomber radikulopati)**

##### **C- Diyabetik Mononöropatiler**

###### **1) Kranial Nöropatiler**

###### **2) Ekstremitte Nöropatileri**

###### **3) Mononöropati Multipleks**

#### **2.3.2.2.5. Diyabetik Nöropati ve Diyabette Tuzak Nöropati Patogenezi**

Diyabetik nöropati tek bir antite değildir, hipergliseminin sonucu periferik sinirde gelişen bir dizi bozukluktur (22,23). DM'nin patogenezi oldukça karışık ve çok etmenlidir. Son yıllara kadar DM bağlı nöropatide iskemi ve metabolik kontrol

bozukluğu iki ayrı neden olarak gösterilmiştir. Sinirlerin vasa nervorumlarındaki mikroangiopati PNP’deki iskemik durumu, hipergliseminin yaptığı metabolik değişimler ve özellikle sorbitol yolu üzerindeki mekanizmalar ile açıklamaya çalışıldı. Son yıllarda metabolik ve vasküler kavramlar birleştirilerek senteze çalışılmaktadır. Diyabetik PNP’nin tüm formlarını ele alacak olursak 5 önemli patogenez üzerinde durmak gerekecektir.

- 1) Sinir lifleri üzerinde direk metabolik bozulmanın meydana gelmesi (metabolik)
- 2) Sinir liflerinin vasküler yetmezliği veya sinir kan akışının azalması (vasküler)
- 3) Birincil duysal nöron perikaryonunun hedef organ oluşu ve buraya nörotropik maddelerle olan retrograd desteğin bozulması (nörotropizm)
- 4) Genetik
- 5) İmmün mekanizma

İlk üç patogenez özellikle simetrik duysal PNP için geçerlidir. Buna karşılık proksimal asimetrik PNP ile akut pandisotonik PNP’ nin immün aracılı mekanizma ile oluştuğu öne sürülmektedir.

Diabetes mellitusta kalıcı hiperglisemi sonucu oluşan ileri glikozilasyon son ürünleri (AGE) bir yandan periferik sinirde ödem, miyelin şişmesi ve sinir dejenerasyonuna yol açarken diğer taraftan kollajenin AGE’lerle etkileşiminin artması sonucu sinir lifleri esnekliğini kaybeder ve mekanik harabiyete daha duyarlı hale gelir (27-29).

Diyabetik nöropati sınıflamasında ekstremitelerde nöropatilerinde “fokal ve multifokal nöropati” başlığı altında ele alınan fokal ekstremitelerde nöropatilerinin sıklıkla tuzaklanmaya bağlı olduğu belirtilmektedir (22,23).

Kronik kompresyon, periferik sinirin bütün yapısal komponentlerinin değişikliği ile sonuçlanan karmaşık etkiler oluşturur (30).

Tuzak nöropatilerden olan tarsal tünel sendromu etyolojisinde diyabet suçlanmıştır. Japonya’da yapılan bir araştırmada tuzak nöropati ile (tarsal tünel sendromlu ratlar oluşturularak yapılmış çalışmalarda) diyabet ilişkilendirilmeye çalışılmış; mast hücrelerinin ve tenascin-c’ nin rolü araştırılmıştır. Streptozotosin ile diyabetik ratlar oluşturulmuş, mast hücrelerinin ve tenascin-c’ nin tarsal tünel sendromu oluşmasındaki rolü elektrofizyolojik ve histolojik olarak değerlendirilmiştir. Tenascin-c akut yaralanma sonrası üretimi artan bir protein olup hem inflamatuvar hem de tamir aşamalarında görevlidir. Değişik hücresel fonksiyonları mevcuttur. Hücre büyümesini



indükler, hemaglutinasyonda ve T hücre immünsupresyonunda, anjiogenez ve akondrogeneneziste görevlidir. Kan glikoz seviyelerindeki yükselmeye diyabetik sıçanlarda distal latanslarda uzama saptanmıştır. Bu durum mast hücreleri ile ilişkilendirilmemekle birlikte diyabetik ratların tarsal tüneline endonöriumunda tenascin-c seviyelerinin arttığı saptanmış ve bu da distal latanslardaki uzama ile korele bulunmuştur. Bu da şu şekilde açıklanmıştır; sinir fasiküllerine yayılan anti alfa düz kas aktin (alfa-SMA) pozitif myofibroblastlar tenascin-c'yi salgılamakta ve bu da endonöriumdaki kollajeni kısaltarak aksonları konstrikte etmektedir. Araştırmacılar bu veriler ile endonörium ve perinöriumdaki metabolik ve fenotipik anormalliklerin diyabetik hastalarda tuzak nöropatilere yatkınlık oluşturmada olduğunu ifade etmişlerdir (31).

#### **2.4. Öğrenme ve Bellek**

Öğrenme; deneyim, eğitim ve öğretim sonucu davranışta meydana gelen uzun süreli kalıcı değişikliklerdir. Beynin en önemli işlevlerinden birisi, insanın çevresinde olanları öğrenmesi ve edindiği bilgileri, daha sonra kullanmak üzere depolamasıdır.

Bellek; yaşananları, öğrenilen konuları, bunların geçmişle ilişkisini bilinçli olarak zihinde saklama gücüdür. Çevreden gelen uyarıların değerlendirilmesi ve uygun davranışların geliştirilmesi öğrenme ile sağlanırken kullanılan bu bilginin saklanması ise bellek sağlar (32).

Öğrenme; görme, işitme, tat, koku ve dokunma duyuları ile algılanan uyarıların beyinde ilişkilendirme, tekrarlama gibi birden çok beyin işlevi sonucu gerçekleşir. Öğrenmenin doğrudan bir ölçümü yapılamaz, ancak ortaya çıkan davranış değişiklikleriyle değerlendirilebilmektedir. Öğrenme ile ilgili ortaya atılan davranışsal, duyuşsal, bilişsel, nörofizyolojik temelli öğrenme kuralları mevcuttur. Nörofizyolojik temelli öğretim ilkeleri beynin bir paralel işlemci olduğunu, öğrenmenin fizyolojik bir olay olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgular (33).

Belleğin oluşumundaki temel birimler, nöronlar ve bunların diğer nöronlar ile oluşturduğu sinapslardır. Nöron ve sinaps sayısı ne kadar fazla ise bellek o kadar güçlüdür (34). Öğrenmenin doğasını ve doğurduğu sonuçları açıklamaya yönelik ortaya atılan kuramlardan biri de nörofizyolojik ya da beyine dayalı öğrenme kuramlarıdır. Beyine dayalı öğrenme kuramına göre; öğrenme ile nöronlarda yapısal, kimyasal değişiklikler meydana gelmekte ve nöronlarda yeni akson iplikçikleri oluşarak, sinaptik

bağlantıların sayısında artma olmaktadır (35,36). Bellek türlerini sınıflandıracak olursak

A- Edinilen Bilginin Saklanması ve Geri Çağrılmasına Göre:

**1- Tanımlanabilir (deklaratif) Bellek;** çevremizde olanlar, insanlar ve yerler ile ilgili olan bilgileri, sözcüklerle ifade edilen bu bellek biçiminde saklarız. Bu belleğin oluşması, bilinçli bir düşünme sürecini gerektirir. Bu süreç içinde değerlendirme, karşılaştırma ve bir araya getirme gibi bilişsel işlemleri kullanır. Deklaratif bellekten bilgilerin çağırılma işlemi, yaratıcı bir süreç olup, yeniden sıralama yeniden yapılandırma ve orjinal olanı yoğunlaştırma işlemlerini içerir (33).

**2- Refleksif Bellek;** algı ve motor yeteneği gerektiren bazı işleri, nasıl yapılacağı konusunda sözcüklerle ifade edemediğimiz, tanımlama biçimine getirilmemiş olan bu refleks biçimini kullanırız.

Bu bellek bir işlemin farkedilmeden çok sayıda tekrarı sonucu, zaman içinde birikerek oluşur. Bilinçli düşünme ya da karşılaştırma, değerlendirme gibi kognitif işlemler gerektirmeden refleksif bellek oluşur ve genelde kelimelerle ifade edilmez. Bazı algı ve motor yeteneklerin kazanılması, gramer gibi bazı kuralların öğrenilmesi refleksif bellek ile olmaktadır.

Örneğin: Araba kullanmak başlangıçta tanımlanabilir (deklaratif) bellek ile gerçekleşirken, bir zaman sonra refleksif belleğe geçer ve artık araba kullanma kuralları her kullanışta, sözcüklerle ifade edilmez, kısaca otomatikleşir.

B-Süreye Göre Bellek:

**1- Kısa Süreli Bellek;** duyuşsal hafıza ile elde edilen bilginin bir kısmı kısa süreli hafızaya iletilir. Kısa süreli hafıza hatırlama denemesi veya prova yapmadan birkaç saniye içerisinde bazen bir dakikaya kadar geri çağırılmayı mümkün kılar. Fakat bunun da kapasitesi çok sınırlıdır. George A. Miller Bell laboratuvarlarında yaptığı deneylerde kısa süreli hafızanın depolama kapasitesinin  $7\pm 2$  rakam olduğunu göstermişlerdir (37). Örneğin ilk kez kullandığınız bir telefon numarasını ikinci kez tekrar aramak için hatırlayabilmemizi sağlayan bellektir.

**2- Orta Uzun Süreli Bellek;** bu bellek dakikalarca hatta haftalarca sürebilir. Bu bellekte saklanan anılar, bellekteki izleri daha sürekli hale getirilmezse zamanla kaybolurlar, sürekli hale getirilirlerse uzun süreli belleğe aktarılır.

**3- Uzun Süreli Bellek;** kısa süreli hafıza ve duyuşsal hafızaya zıt olarak, uzun süreli hafızada daha çok bilgi uzun süreler boyunca (bazen ömür boyu) saklanabilir. Örneğin, yedi haneli bir sayıyı okuduktan birkaç saniye içerisinde hemen unutabiliriz ve kısa

sürekli hafızada ancak bu kadar tutulmuş olur. Ancak telefon numaralarını tekrar yoluyla ezberleyip yıllar boyunca ezberde tutabiliriz ki bu da uzun süreli hafızada depolanmasından kaynaklanır. Kısa süreli hafıza şifrelemeyi akustik olarak yaparken, uzun süreli hafıza semantik olarak (anlamsal) şifreleme yapar. Baddeley yaptığı testlerde deneklerin 20 dakika sonrasında hatırlamakta zorluk çektiği sözcük gruplarının, benzer manaya gelen “büyük, kocaman, devasa, iri” gibi sözcükler olduğunu göstermiştir. Kısa süreli hafıza “Nöronal haberleşmeyi sağlayan taşıyıcı yapılarla” desteklenir ve beynin ön lobu (özellikle dorsolateral prefrontal korteks) ile parietal lobuyla bağlantılıdır. Uzun süreli hafıza ise beyne yayılmış daha sabit ve uzun süreli nöral bağlantılarla ilişkilidir. Bilginin kısa süreli uzun süreli hafızaya dönüştürülmesinde, hipokampus bölgesi rol oynar.

Uykunun başlıca fonksiyonlarından biri de bilginin pekiştirilmesini sağlamaktır. Bu yüzden hafıza eğitim ve test arasında uyku ihtiyacının yeterli olarak karşılanması ile gelişim gösterir. Bu bellek sinyal iletiminde artma veya baskılanmaya yol açan sinapslardaki kimyasal değişiklikler yerine, yapısal değişikliklerin sonucudur (38).

Başka bir sınıflandırmaya göre bellek; implisit bellek ve eksplisit bellek olmak üzere ikiye ayrılır.

**1-İmplicit Bellek;** bir kez kazanıldıktan sonra bilinçsiz ve kendiliğinden gerçekleşir. Uyanıklığı içermez, refleksif bellek olarak da adlandırılır. Beynin farklı bölgelerinde (neokorteks, striatum, serebellum, amigdala ve refleks yolları) işlenir. Habitüasyonda, canlıya uyarının sürekli verilmesi sonucunda, canlı giderek daha az yanıt oluşturmaya başlar yani canlı uyarana alışır ve artık uyarana aldırış etmez. Sensitizasyonda ise yenilenen uyarı, hoş giden ve gitmeyen türden bir uyarana beraber uygulanırsa daha büyük bir yanıt meydana gelir (39). Klasik şartlanmada canlıya, zayıf, zararsız ve koşullu bir uyarana ilişkili güçlü ve ağırlı koşulsuz bir uyarana verilir. Denemelerden sonra bu iki uyarının tekrar eden şekilde verilmesiyle canlı bu iki uyarıyı birleştirmeyi öğrenir ve şiddeti artmış bir cevapla koşullu uyarana tepkide bulunur. Örneğin, sıçanlara sesli bir uyarana elektriksel şok verilirse, bir süre sonra sadece ses duyulduğunda sıçanlarda korku davranışı olacaktır (40).

Operan şartlanmada bir ödül elde etmek veya cezadan sakınmak için gereken davranış öğrenilmektedir. Daha önce deneyimlenen olayla ilgili ses ya da koku olayın olumlu veya olumsuz yanlarını hatırlatabilir (41).

**2-Eksplisit Bellek;** bilinçli olarak öğrenilen ve hatırlama gerektiren bellektir. Eksplisit bellek bilinçli olarak ulaşılabileceğimiz bilgileri içermektedir. Anlama, muhakeme etme ve öğrenme gibi karmaşık görevler için gerekli bilgiler aktif olarak akılda tutulur. Dikkat ve müdahale gerektiren süreçler karşısındaki hedefe yönelik aktif izleme gerektiren davranışları gerektirir. Kişi, yer, nesne ve olgular hatırlanır. Epizodik (anısal) ve semantik olarak sınıflandırılır (40). Epizodik bellek duygu, duyu, kisisel ve görsel bilgi içeren olayların kodlandığı bellektir. Kişinin yaşamıyla ilgili olaylar bu türdendir. Semantik bellek ise daha çok soyut bilgi veren bilginin kodlanmasını sağlar. Öğrenme ve bellek bir bütün olarak işler. Belleğin oluşumu sırasında birçok beyin bölgesi (frontal lob, pariyetal lob, oksipital lob, temporal lob, hipokampusun da içinde bulunduğu limbik sistem) aktive olur (33).

#### **2.4.1. İmplicit ve Eksplisit Belleğin Moleküler Temelleri**

İmplicit bellekle ilgili omurgasızlar ve laboratuvar kemirgenleri üzerinde yapılan araştırmalarda, uzun süreli bellek oluşumunda çok sayıda aktif sinaptik bağlantı ve morfolojik değişimin olduğuna dair deliller elde edilmiştir (42). Memelilerde sinir devreleri oldukça karışık olduğu için daha basit olan omurgasız deniz salyongozu, *Aplysia*'de hücresele düzeyde sinir devreleri incelenmiştir. *Aplysia*, uzun süreli bellek ile ilişkilendirilebilecek, pratikle kazanılan çok özel davranışları öğrenebilmektedir. Bu canlı habitüasyon olayındaki gibi, sürekli olarak yapılan zararsız uyarılara gittiçe zayıflayan cevaplar vermeyi öğrenmiştir. Tam tersine *Aplysia*'ye, tekrarlayan zararlı bir uyarana karşı, şiddeti gittiçe artan cevap vermeyi öğrenmiş ve buna da sensitizasyon denmiştir. Hem sensitizasyonda hem de habitüasyonda duyuşal motor refleks deneyimle değişmektedir. Sensitizasyon ve habitüasyon, aksiyon potansiyeline cevap olarak kalsiyum akışındaki değişimlerle şekillenen presinaptik düzeyde bir araya getirilir. Habitüasyonda  $Ca^{+2}$  akışı, duyuşal nöron ucuna doğru azalır ve sonuç olarak glutamatın salınımı azalır. Bu olaya sinaptik baskılama denir. Buna karşın sensitizasyonda, kolaylaştırıcı bir serotonerjik ara nöronun aktivitesi, duyuşal nöron sonlanmasında cAMP konsantrasyonunu artırır, aksiyon potansiyeli ile uyarılan depolarizasyonun uzaması potasyum kanallarının fosforilasyonuna ve protein kinaz A (PKA)'nın aktivasyonuna yol açar.

$Ca^{+2}$  artması glutamat salınımını daha da artırır. Buna ise, sinaptik potansiyalizasyon (kuvvetlendirme) denir (39,43). Klasik koşullanmada hayvana, zayıf,

zararsız ve koşullu bir uyarana ilişkili güçlü ve acılı koşulsuz bir uyarana verilir. Denemelerden sonra bu iki uyarının tekrarlı eşleşmesini takiben hayvan bu iki uyarıyı birleştirmeyi öğrenir ve şiddeti artmış bir cevapla izole olmuş koşullu uyarana tepkide bulunur. Klasik koşullanmada, nöronal devrede duyu nöronu ve motor nöron arasındaki girdi bağlantılarının sinaptik gücü oldukça artmıştır. Koşullanma gerçekleşmesinin oluşan öğrenmedeki değişkenliğe bakıldığında bu potansiyasyon hem presinaptik hem de postsinaptik mekanizmaları içermektedir. Bu iki uyarın arasındaki çakışma, sinapsın her iki tarafında yerleşik olan özel çakışma belirleyiciler tarafından ortaya çıkarılır. Presinaptik düzeyde çakışma belirleyici, adenil siklazdır. Adenil siklazın G proteini tarafından sağlanan aktivasyona verdiği cevap, koşullu yolun aktivasyonu tarafından hızlandırılan  $Ca^{+2}$  akışındaki artışı takiben Ca-kalmodulin bağlanması aracılığıyla aktive edilir. Post sinaptik kısımda ise çakışma belirleyici, ligand ve voltaj bağımlı glutamat NMDA reseptörüdür.  $Ca^{+2}$  kanalı yalnız glutamat tarafından açılmaz. Çünkü post sinaptik nöron dinlenme durumunda iken  $Mg^{+2}$  iyonları tarafından bloke edilir. Bununla beraber glutamat salınımı, koşulsuz ve koşullu uyarınların eşleştirildiği zamanda olduğu gibi, post sinaptik depolarizasyonla bağlantılı olduğu zaman,  $Mg^{+2}$  bloğu kaldırılır ve kanal açılabilir. Bu şartlar altında  $Ca^{+2}$  akışı protein kinazların aktivasyonuna, reseptörlerin fosforilasyonuna ve çoklu enzim kaskadlarının aktivasyonuna neden olan sinyal artırımı serilerini başlatır (41). Eksplicit bellek üzerinde yapılan çalışmalar daha kompleksdir. Çünkü explicit bellek çoklu duyu girişlerin entegrasyonu ve bilinçli bir hatırlama sürecini içermektedir. Bu yüzden, bu çalışmalar omurgasızlar ve daha düşük omurgalılarda anlamlı değildir ve memeli sinir sisteminin kompleksliğini gerektirmektedir. Memelilerde explicit belleğin moleküler mekanizmasını açıklayan çalışmalar, hipokampal parçalardaki ağlar üzerindeki, sinaptik plastisite çalışmalarından yararlanılmıştır. Uzamsal bellek ve cismin farkına varabilme testleriyle explicit bellek değerlendirilmiştir. Kemirgenlerde ve insanda bu tip bilinçli öğrenmede merkezi bir rol oynayan beyin alanı hipokampüstür. Doğrudan deneysel kanıtlar hipokampüsün tüm explicit bellek türlerinde, özellikle uzamsal bellekte yer aldığını göstermektedir (39).

Deneklerin bir harita veya bir yol üzerinde zihinsel olarak çalışmalarını içeren tüm görevlerde orta temporal lobun aktivasyonunu gösteren fMRI (fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme) çalışmaları, bilinçli belleğin çeşitli formlarında hipokampüsün önemini göstermektedir. Hipokampüs, sinaptik plastisitenin en çok çalışılan ve en çok bilinen beyin bölgesidir. Canlıların deneyimi ile hipokampal LTP (Long Term

Potentiation: uzun süreli potansiyel artışı) teşvik edilir ve tersine LTP'nin bozulduğu veya kaybolduğu durumunda ise öğrenme bozulur (41).

LTP, eksplisit belleğin hücresel mekanizmalarına ilişkin tüm özelliklere sahiptir ve omurgasızlarda tanımlanan öğrenme mekanizmalarıyla benzerlik göstermektedir (44). Hem presinaptik hemde postsinaptik mekanizmalar, LTP oluşumunun erken fazlarına katılmaktadır. NMDA glutamat reseptörlerinin işlevi retrograd habercilerin oluşumu ve Ca<sup>+2</sup>/kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII)'yi içeren çoklu kinaz yollarının aktivasyonunu başlatmaktadır (42). LTP'nin geç safhaları ise CREB aktivasyonunu ve CREB hedef genlerinin transkripsiyonunun düzenlenmesini içermektedir. Bu olay protein ya da mRNA sentezini önleyen ilaçlarla bloke edilmektedir (39).

#### **2.4.2. Belleğin Pekiştirilmesi**

Kısa süreli belleğin haftalar veya yıllar sonra hatırlanabilecek uzun süreli belleğe dönüştürülmesi için pekiştirilmesi gerekir. Yani bellek sinapslarda uzun süreli tipte bir bellek için gerekli kimyasal, fiziksel ve anatomik değişikliklerin gerçekleşmesini bir şekilde başlatmalıdır. Bu süreç minimum bir pekiştirme için 5-10 dakika, güçlü bir pekiştirme için ise 1 saat veya daha uzun bir süreyi gerektirir. Uzamsal bellek ölçümleri için insanlar, maymunlar ve kemirgenler için çeşitli testler geliştirilmiştir (38).

##### **1- Pasif Sakınma Testi :**

Önde aydınlık kısmı, arkada ızgara tabanlı karanlık kısım vardır. İki kısım bir kapı ile ayrılmıştır. Her hayvana öğrenme denemesinden 1 saat önce, tek bir ön deneme uygulanır. Hayvan ön kısma konur, arka kısma geçtiği an kapı kapanır, bu kısımda 10 saniye kalmasına müsaade edilir.

**2-Aktif Sakınma Testi:** Bu cihaz temelde birbirinin aynı 2 kompartmandan oluşmaktadır. Herbir kompartman birbirinden metal bir bölme ile ayrılmıştır. Bölmenin zemine yakın bölümünde, 2 kompartman arasında geçişi sağlayan, yuvarlak bir delik yer almaktadır.

**3-Üç Panelli Pist Testi:** Cihaz bir başlangıç kutusu, bir hedef kutusu ve 4 birbirini takip eden seçim noktasından oluşur. Her bir seçim noktasında 3 panelli kapı mevcuttur. Sıçanlar 3 panelli kapının sadece 1 tanesinden geçebilirler, diğerlerinden geçmemeleri ve geçenlerin tekrar geri dönmeleri için ön ve arka durdurucular vardır. Hayvanlar hedef kutuya ulaştıklarında yiyecek parçalarıyla beslenirler.

4-Morris Su Labirenti (MWM): Dairesel bir havuzdur ve dipten 25 cm yüksekliğe kadar su ile doldurulur. Suyun sıcaklığı 22-26 C° arasındadır. Su, zehirli olmayan toz bir boya eklenerek opak hale getirilerek sıçanların platformu görmemeleri sağlanır. Sıçanlar görünmeyen platformu havuzun dışındaki işaretleri öğrenerek bulmaya çalışır.

### **2.4.3. DM ve Bilişsel Fonksiyonlar Üzerine Etkisi**

DM seyirinde bilişsel fonksiyonlarda bozulma izlenmektedir. DM hastaları diyabeti olmayanlarla karşılaştırıldıklarında, özellikle hafıza ve yönetsel fonksiyonları içerecek şekilde bilişsel fonksiyon kaybına uğrarlar. Bozulma paterni Tip I ve Tip II DM'de genellikle farklıdır. Tip I DM'de psikomotor yavaşlama ve mental yetkinlikte azalma izlenirken, Tip II DM'de psikomotor yeterlilik, dikkat, öğrenme ve hafızada azalma görülmektedir. Bu durumdan; diyabetin başlangıç yaşı, kötü glisemik kontrol ve ilerleyen yaş, eşlik eden insülin direnci ve metabolik sendrom varlığı gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır (35,40). Diyabetten etkilenen olgularda vasküler demans riski 2-4 kat, Alzheimer hastalığı (AH) riski 1,5-2 kat artmıştır. Özellikle Tip II DM'de beyin; vasküler bozukluklardan, glikoz toksisitesinden, hipoglisemik toksisiteden, hipoglisemik epitozlardan ve serebral insülin sinyalizasyon bozukluklarından etkilenmektedir. Tip II DM ile AH gelişimi arasında bağlantı olduğu ileri sürülmektedir. Bu hipotezi destekler şekilde, diyabeti olan olgularda AH geliştirme riskinin %65 oranında artmış olduğu izlenmiştir. Ek olarak, eşlik eden Tip II DM, AH sürecini de hızlandırabilmektedir (44-47).

Postmortem incelemelerde, serebral korteks, hipokampus ve diğer temporal lob yapılarında gözlenen nörotik plak ve nörofibriler düğüm varlığı ve sinaptik yapıların kaybolmuş olması gibi mikroskobik benzerliklere dayanarak, Tip II DM-AH ilişkisinin insülin direnci üzerinden olabileceği ileri sürülmektedir. Bir diyabet hastasında bilişsel fonksiyon değerlendirmesinin ilk hedefi; tedavisini sürdürebilmek için yardıma ihtiyacı olup olmadığını anlamaktır. İnsülin sinyalizasyon yolağındaki bozuklukların düzeltilmesi ile sorunlar geriletebilecek gibi görünmektedir (45).

## **2.5. DM Tedavisinde Kullanılan İlaçlar**

### **2.5.1. İnsülin**

Tedavide kullanılan insülinin önemli bir kısmı, mezbahanelerde yan ürün

olarak elde edilen domuz veya sığır pankreaslarından elde edilmekteydi. Domuz insülini, sığır insüline göre insanlarda daha az allerji yaptığı için tercih edilmiştir, ancak son yıllarda insan insülini yapmak için iki farklı yöntem kullanılmaktadır:

1- Domuz insülinindeki bazı amino asitleri değiştirmek suretiyle insan insülini yapılmaktadır. Bu yöntemle elde edilen insüline yarı sentetik insan insülini veya enzim modifiye insan insülini adı verilmektedir.

2- Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak insan insülini elde edilmektedir. Biyoteknolojik olarak üretildiğinde, *E. coli*, A ve B zincirlerinin sentezini yapar. Sonra bu iki zincir, kimyasal yolla birbirine bağlanarak rekombinant insan insülini elde edilir (12).

İnsülinin, merkezi sinir sisteminde enerji homeostazisi, üreme, nöronal canlılık ile öğrenme ve bellek gibi anahtar süreçler üzerine etki ettiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (44-46). Beynin özel bölgelerinde, insülin reseptörlerinin bulunması, insülinin merkezi sinir sisteminde de rol oynadığını düşündürmüştür (47). İnsülin reseptörleri ilk kez 1978'de ligand otoradyografi yöntemiyle merkezi sinir sisteminde belirlenmiştir. Beyinde çok geniş bir alana yayılan insülin reseptörleri, olfaktor siskinlik, hipotalamus, serebral korteks, serebellum ve hipokampüste yoğunlaşmıştır (48).

Merkezi sinir sisteminde, insülin reseptörünün alfa ve beta alt ünitelerinin molekül ağırlıkları, periferdekinden farklı olarak daha düşük bulunmuştur (49).

Merkezi sinir sisteminde sinyal iletiminin başlaması için, kan beyin bariyerindeki kan akımından ayrılan insülinin, reseptörüne ulaşması gerekmektedir. 1960'larda Margolis ve arkadaşları, periferal insülinin uygulanması sonucunda, serebrospinal sıvıda, insülin düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Bunun sonucunda da insülinin kan-beyin bariyerini geçebildiğini iddaa etmişlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, periferal olarak uygulanan insülinin %1'inden daha azının kemirgenlerin merkezi sinir sistemine ulaşabildiğini göstermektedir. Kan beyin bariyerini geçen insülin miktarı türler arasında çok büyük farklılıklar ve değişkenlikler göstermektedir. Diyabet durumunda, dışardan insülin alınması sonucu, merkezi sinir sistemine ulaşan insülin miktarı artmaktadır.

Sonuç olarak; insülin, reseptör aracılı taşıma mekanizması yardımıyla, kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine ulaşmaktadır. Merkezi sinir sisteminde de, öğrenme ve belleğin olduğu beyin bölgelerinden biri olan hipokampüste, nöronların glikoz ihtiyacını sağlamaktadır (50).

Yetişkin memeli beyninde iki çeşit insülin reseptörü bulunmuştur. Bu reseptörler



sinyal iletimi bakımından benzer olmakla birlikte moleküler ağırlıkları bakımından farklıdırlar. Glial hücrelerde periferel tipteki insulin reseptörü (IR) bulunurken, nöronlardaise daha düşük ağırlıklı IR bulunmaktadır (45). Bu beyine özgü IR, farklı glikolizasyonun sonucu oluşan düşük molekül ağırlıklı IR-A izoformudur. Beyindeki insülin reseptörlerinin bilişsel fonksiyonları düzenlediği ve insülinin eksikliği ya da insülin direncinin oluştuğu durumlarda, zihinsel performansta azalmaya sebep olduğu belirtilmektedir (51).

### **2.5.1.1. İnsülin Analogları**

Rekombinant DNA teknolojisi insan insülininin anahtar pozisyonundaki bazı amino asitlerin yer değiştirilmesi veya eklenip çıkartılması ile insülin analogları elde edilirler. İnsülinin kimyasal ve fiziksel özellikleri amino asit sekansındaki yapılan düzenlemeler ile değişsede biyolojik etkileri değiştirilmez.

İnsülin analogları kısa ve uzun etkili analoglar olarak ikiye ayrılır.

#### **2.5.1.1.1. Kısa Etkili İnsülin Analogları**

İnsülin aspart, insülin lispro ve insülin glulisin kristalize insüline göre daha çabuk etkili, daha yüksek kan glikoz konsantrasyonu düzenleyen ve etkisi daha kısa süren (2-3 saat) insülinlerdir.

#### **2.5.1.1.2. Uzun Etkili İnsülin Analogları**

İnsülin glargine, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen bir insan insülini analogudur. Nötral pH'de düşük çözünürlük göstermekte ve etki süresi 24 saate kadar uzamaktadır. NPH (Neutral Protamine Hagedorn) insüline göre daha düşük kan seviyesi oluşturmaktadır ve bazal insülin salgısını taklit etmektedir. Bu analogların dezavatajı ise bazı yeni araştırmalara göre kanserojenik etkisinin olabileceği (özellikle insülin glargine) yönündedir, ancak günümüzde böyle bir etki kesin olarak kanıtlanamamıştır (52).

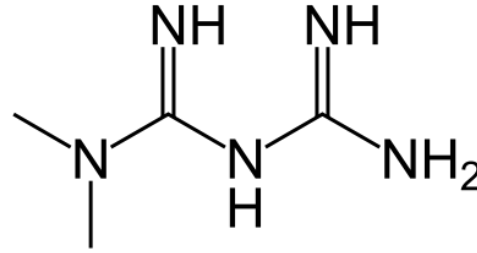
### **2.5.2. Oral Antidiyabetikler**

İnsülinin diyabet tedavisindeki güçlü etkinliğine rağmen, oral olarak alındığında proteolitik enzimlerle parçalanması sonucunda etkisiz kalmaktadır. Yaşamboyu insülinin subkutan kullanımı bazı komplikasyonlara neden olduğu ve dezavantajlarından dolayı ilk aşamada tercih edilmez. Bu nedenle oral antidiyabetik

ilaçlar geliştirilmiştir. Günümüzde kullanılan oral antidiyabetik ilaçlardan bazıları; sülfonilüreler, alfa-glikozidaz inhibitörleri, tiazolidinler (glitazonler), miglitinidler, biguanidlerdir.

### 2.5.2.1. Metformin

Biguanid grubu bir oral antihyperglisemik ajandır ve Tip II diabet tedavisinde kullanılır. Metformin, moleküler seviyede adozin monofosfatla aktif protein kinaz aktivitesini artırır. Hepatik glikoz çıkışını baskılar, glikozun intestinal emilimini azaltır, periferel dokularda insülin aracılı glikoz kullanımını artırır, yağ asitlerinin konsantrasyonlarını düşürerek ve glikoneogenezi azaltarak antilipolitik etki gösterir (53-58).



Şekil 2.1: Metforminin Kimyasal Yapısı

Metformin, oral olarak alındıktan sonra ince barsaklardan hızla emilir ve iki saat sonra plazma pik konsantrasyonuna ulaşır. Yemek, metforminin emilimini ve pik konsantrasyonunu azaltır. Metformin metabolize edilmez ve büyük oranda böbreklerden atılır. Metforminin renal klirensi, kreatin klirensinin yaklaşık üç buçuk katıdır. Bu da metforminin asıl atılım yolunun tübüler sekresyon olduğunu gösterir. Plazma eliminasyon yarı ömrü 6 saattir. Hedef dozu 1500 mg'dan 2550 mg'a kadar değişebilir (36,53). Günlük 1000 mg'ın altında düzenli bir klinik cevap gözlenmez. En sık yan etkileri; diyare, bulantı, kusma, şişkinlik, hazımsızlık ve karında rahatsızlık hissidir. Gastrointestinal sistem (GİS) yan etkilerinin, barsaklarda metformin konsantrasyonunun artmasının barsak duvarında laktik asit yapımını artırmasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir (58). Metformin, GİS yan etkilerini azaltmak için, yemeklerle birlikte verilir. Birçok hekim metforminin GİS yan etkilerini azaltmak için tedaviye yemeklerle birlikte ve 500 mg/gün dozunda başlar, tedavi tolere edilebilirse dozu öğle ve akşam yemeklerinde de 500'er mg alınacak şekilde artırır. Maksimum doz günde üç kere 850 mg'dır (2550 mg). Metformin kullananlarda nadir görülen bir yan etki de

laktik asidozdur. Ortaya çıkması halinde %30-50 mortaldır. Metformin böbreklerden atılır ve metformine bağlı laktik asidoz genellikle böbrek yetmezliği olan ve plazma kreatinini > 1.4 mg/dl olan hastalarda görülür. Ayrıca konjestif kalp yetmezliği ve sepsis gibi durumlarda laktik asidoz gelişme ihtimali artar. Aktif karaciğer hastalığı olanlarda ve daha önce laktik asidoz geçirenlerde metformin kontrendikedir. Metformin tedavisi, sıvı alımının kısıtlanması gereken bütün major cerrahi girişimlerde durdurulmalıdır ve normal sıvı alımı sağlanıncaya kadar ya da böbrek fonksiyonları normale dönünceye kadar tekrar başlanmamalıdır. Metformin kullanan hastalar simetidin almamalıdır. Çünkü simetidin renal klirens için metforminle yarışır ve kan metformin düzeyleri yükselebilir. Metforminle renal klirens için yarışan diğer katyonik ilaçlar: Digoksin, amilorid, kinidin, ranitidin, triamteran, trimetoprim ve vankomisinidir. Metformine bağlı laktik asidoz vakalarının yaklaşık % 10'u hastalara intravenöz iyotlu kontrast madde uygulamasını takiben gelişmiştir (54).

Metforminle yapılan kontrollü klinik çalışmalarda %10-30 hastada B12 vitamini malabsorpsiyonu geliştiği gözlenmiştir. Metformin muhtemelen intestinal intrasellüler kalsiyum metabolizmasını etkileyerek ve ileumda kalsiyum bağımlı B12 Vitamininin absorpsiyonunu önleyerek B12 Vitamin emilimini azaltır. Ancak anemi gelişimi nadirdir (54,58).

Metformin FDA'ye göre B kategorisi bir ilaçtır. Bazı hekimler gebelerdeki diyabetin tedavisinde rutin olarak metformin kullanmaktadır. Ancak birçok klinik deneyim gebelikte kan şekeri regülasyonu için en uygun ajanın insülin olduğu yönündedir. Hiperinsülinemi endometrial fonksiyonları ve endometrial çevreyi etkileyerek erken gebelik kayıplarına yol açabilir. Serum glikodelin düzeyi, endometrium fonksiyonunu gösteren bir biyobelirteçtir ve erken gebelik kayıpları olan kadınlarda serum glikodelin düzeyi düşüktür. IGFBP-1 ise feto-maternal adezyon oluşumunu kolaylaştırarak implantasyonda ve gebeliğin devamında önemli rol oynar.

## **2.6. Deneysel Diyabet Modelleri**

Diyabet çeşitli hayvan türlerinde farmakolojik, cerrahi veya genetik manipülasyon yolları ile indüklenebilir. Diyabet konusunda deneylerin çoğu kemirgenler üzerinde yapılır, buna rağmen bazı deneyler büyük hayvanlar da yapılmaktadır. 1920 yılında Best ve Banting de köpeklerde pankreatektomi yöntemi ile diyabet oluşturmuşlardır (59). Ayrıca bazı araştırmalarda diyabete duyarlı olan farklı deney hayvanları kullanılmıştır (60-62).

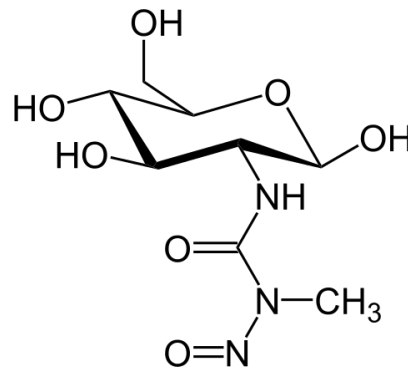
### 2.6.1. Diyabetin Farmakolojik İndüksiyonu

Etnofarmakoloji alanında 1996-2006 yılları arasında yayınlanan araştırmaların çoğunda farmakolojik indüksiyon modeli kullanılmıştır (63). STZ (%69) ve alloksan (%31) en sık kullanılan kimyasallardır ve bu model diyabetin farklı yönlerinin araştırılmasında oldukça faydalı olmuştur. Bu maddelerin her ikisi de diyabetojenik etkisini enjekte edildikleri zaman (intravenöz, intraperitoneal veya subkutan) gösterirler. Diyabetin indüklenmesinde kullanılan bu ajanların dozu, hayvan türlerine, maddeleri hayvanlara verme yoluna ve hayvanların beslenmesine bağlıdır. Verilen doza göre Tip I, Tip II diyabet veya glikoz intoleransa benzer bir sendrom indüklenebilir (64).

Vakor (rodentisit), dithizone (diphenylthiocarbazone) ve 8-Hydroxyquinolone gibi maddelerle deneysel diyabet oluşturabilir, ancak toksik etki düzeyleri yüksek olduğu için araştırmalarda kullanılmaları sınırlıdır (65).

#### 2.6.1.1. Streptozotosin

Açık ismi 2-Deoksi-2 - ([metil (nitrozo) amino] karbonil) amino) - $\beta$ - D - glucopyranose olan streptozotosin 1950'li yıllarda toprakta keşfedilmiş bir antibiyotiktir (Şekil 2.2). STZ antimikrobiyal, aynı zamanda kemoterapötik alkilleyici ajan olarak da kullanılmaktadır (66, 67). İlk defa Rakieten ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar ile 1963 yılında STZ'nin diyabetojenik olduğunu bildirmiştir. Diyabet araştırmalarında STZ en uygun diyabetojenik ajandır. STZ'nin neden olduğu insülinopenya (hipoinsülinizm) sendromuna STZ diyabeti adı verilmektedir (67). STZ pankreas  $\beta$ -hücrelerinde spesifik olarak nekroz oluşturur ve hayvanlarda diyabet indüklemesinde tercih edilmektedir (68,64).



Şekil 2.2: Streptozotosin'in Kimyasal Yapısı

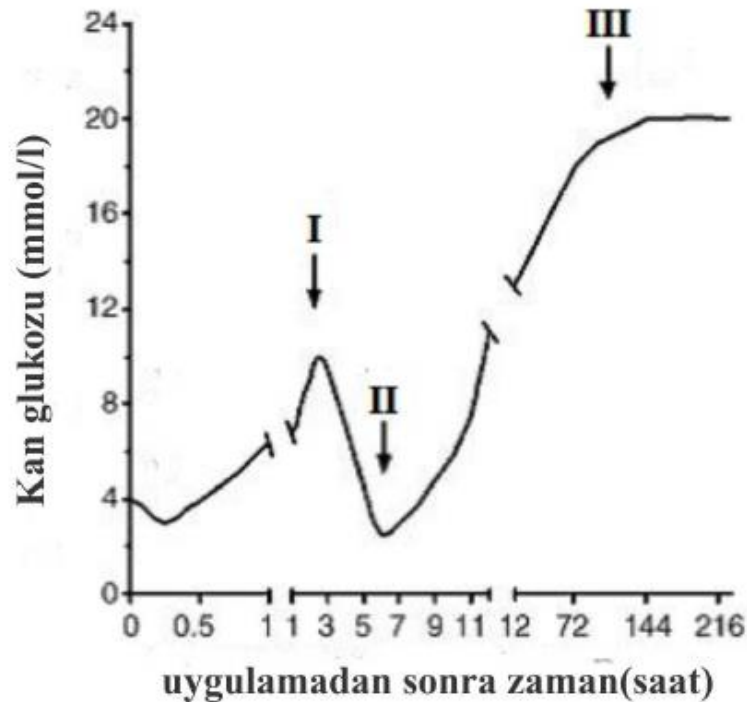
### 2.6.1.2 Streptozotosinle Diyabet Oluşturma Fazları

STZ ile indüklenen trifazik kan glikozunun yanıtları şekil 2.3'te gösterilmektedir (69). STZ'ye yanıtlar STZ'ye tepki olarak organizmada plazma insülini seviyesinde ve pankreasın ince yapısında değişikliklerin meydana geldiği ve sonuçta nekrotik  $\beta$  hücre ölümünün gerçekleştiği bildirilmiştir (64).

Birinci faz, kan glikoz konsantrasyonunun artışı (1 saat STZ verildikten sonra) ve plazma insülinin azalması ile başlar. Bu faz genellikle 2-4 saat süren hiperglisemi ile karakteristiktir ve bunun nedeni insülin salgısının inhibisyonu (hipoinsülinemi) dur. Bu fazda beta hücrelerinde intraselüler vakuolizasyon, GER dilatasyonu, golgi alanının azalması, salgı granüllerinin ve içerdiği insülinin azalması ve mitokondri şişmesi gibi bazı morfolojik özellikler ortaya çıkar (60).

İkinci faz, (hipoglisemik faz) genellikle STZ enjeksiyonundan 4-8 saat sonra görülür ve birkaç saat sürer. STZ'nin hücre membranı ve salgı granüllerinin zarlarını parçalanmasını indüklemesi sonucunda dolaşım sistemine yüksek miktarda insülin girer, böylece şiddetli geçici hipoglisemi ortaya çıkar. Bu faz sonunda  $\beta$ -hücrelerinde birtakım ciddi morfolojik değişiklikler görülür (60-62).

Üçüncü faz, kalıcı diyabetik hiperglisemi fazıdır. Morfolojik olarak,  $\beta$ -hücrelerinin granülerini tamamen boşaltmaları ve ölmeleri 12-48 saat içinde gerçekleşir.

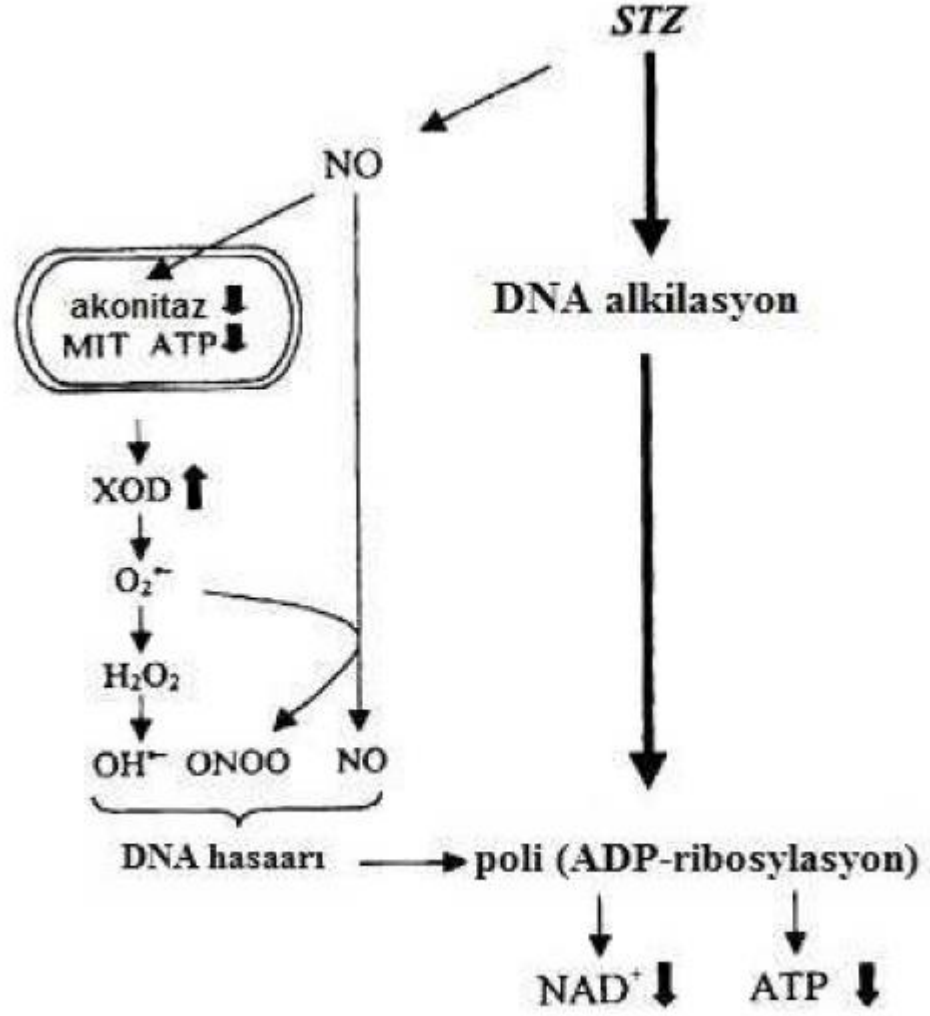


Şekil 2.3: STZ enjeksiyonundan sonraki kan glikoz değişimi (64)

### 2.6.1.3. STZ'nin Etki Mekanizması

STZ insülin salgılanmasını inhibe eder ve insüline bağımlı diyabete neden olur. Bu etkiler kimyasal özelliklerine (alkilleyici potansiyeline) bağlı olabilir. Alloksanda olduğu gibi, STZ de  $\beta$ -hücreleri tarafında spesifik olarak hücre içine alınır ve biriktirilir. STZ pankreatik  $\beta$ -hücrelerinin plazma membranlarında bulunan GLUT2 (Glukoz Transporter-insüline duyarlı) ile seçici olarak hücreye taşınır (70, 71).

GLUT2 sentezlemeyen hücrelerin STZ'ye dayanıklı olduğu rapor edilmiştir (72,73). STZ'nin metilnitrozüre kısmının (Şekil 2.2) toksisitesi DNA alkilleme aktivitesine bağlıdır (metil grubunu nükleik asit nükleobazlarına transfer etmekle toksisitesini gösterir) (74). STZ'den DNA'ya metil grubunun transferi hasara neden olur ve DNA fragmentasyonu ile sonuçlanır (75). 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 beta hücreleri nekroza uğrar (76). STZ aynı zamanda proteinleri de metiller (77). Sonuçta DNA metilasyonu beta hücrelerinin ölümünden sorumludur, STZ'den kaynaklanan protein metilasyonu da muhtemelen beta hücrelerinde fonksiyonel bozukluklara neden olur. Alternatif hipoteze göre STZ'nin diyabetojenik etkisinin bir kısmı intraselüler nitrik oksit (NO) donör potansiyeline bağlıdır (78). 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 (79). Son olarak, az miktarda reaktif oksijen türleri (ROS) ( $O_2^{\bullet-}$  ve  $HO^{\bullet}$ ) jenerasyonu (80), STZ etkisiyle birlikte  $\beta$ -hücrelerinin yıkımını hızlandırabilir fakat burada ROS'un önemli bir rolü yoktur (Şekil 2.4) (69).



**Şekil 2.4:** Sıçan pankreasının  $\beta$  hücrelerinde STZ ile indüklenen toksisitenin mekanizması (69)

### 2.6.2. Deneysel Diyabette Cerrahi Modeller

Diyabetin indüklenmesi için başka bir teknik ise, pankreasın tamamen kaldırılmasıdır. Son yıllarda bazı araştırmacılar doğal ürünlerin etkilerini araştırmak için sıçan, domuz, köpek ve primatlar gibi hayvan türlerini model olarak kullanmaktadır (59,60,81,82).

Bu tekniğin çeşitli sakıncaları mevcuttur:

- 1- Yüksek seviyede teknik uzmanlık ve yeterli ameliyat donanımı gereklidir.
- 2- Büyük bir ameliyat gerektirdiği için hayvanda enfeksiyon riski yüksektir.
- 3- Yeterli postoperatif analjezi ve antibiyotik kullanımı gerekmektedir.
- 4- Malabsorbsiyonu önlemek için pankreas enzim takviyesi gereklidir.
- 5- Hipoglisemiye karşı pankreasın antagonistik regülasyonu kaybolmaktadır.

Son zamanlarda, kısmi pankreatektomi kullanılmaktadır fakat orta seviyedeki hiperglisemiye elde etmek için pankreasın büyük bir kısmının alınması (%80 den fazla sıçanlarda) gereklidir. Bu yöntemde hedeflenenin dışında pankreasın rezeksiyonu önemli hipoinsülinemiye neden olabilir (60).

### **2.6.3. Deneysel Diyabetin Genetik Modelleri**

#### **2.6.3.1. Spontan Diyabet Geliştiren Hayvan Modelleri**

Bu modellerde 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 (60,61). Bu tip deney hayvanlarının kullanılması insan Tip II diyabetinde gözlemlenen bazı olayları araştırmak için oldukça önemlidir. Ob/Ob faresi gibi bazı modeller pankreatik  $\beta$ -hücre yanıtında sağlam ve devamlı telafi nedeniyle öglisemiye koruyabilirler. Bu nedenle insülin direnci ile hiperinsülinemi durumu ortaya çıkmaktadır. Diğer taraftan, db/db faresinde hiperglisemi hızla gelişir çünkü, pankreatik  $\beta$ -hücreleri hayat boyunca gerekli olan yüksek seviyede insülin salgılanmasını sağlayamaz. Böylece yem alımı diyabetik fenotip şiddetinin belirlenmesinde önemlidir ve enerji alımında kısıtlama bu tür farelerde görülen obezite ve hiperglisemiye azaltır. Başka bir örnek ise, kendiliğinden diyabetik olan Goto-Kakizaki (GK) sıçanı, glikoz intolerant nondiyabetik *Wistar albino* sıçanlarının nesiller boyunca seçici çoğalmadan kaynaklanan Tip II diyabetin genetik eğilimli bir modelidir (58). Tip I diyabet modelleri ile ilgili non-obeze diyabetik (NOD) fareler tipik olarak 12. ve 30. haftalar arasında hiperglisemi gözlenirken BB sıçanlarda 12. hafta civarında hiperglisemi gerçekleşir. Aynı zamanda bu modellerin büyük bir avantajı, ateroskleroz modeli olarak kullanılmasıdır ve birçok doğal ürün karşısında test edilmesidir (61). Doğal ürünler ile yapılan araştırmalarda en fazla kullanılan modellerden birisi NOD fareleridir, diğeri ise GK sıçanlarıdır. Diğer Tip I diyabete yatkın deney hayvanları suşları ise, Yeni Zellanda beyaz tavşanı, Kreesbond köpeği, Çin hamsteri ve Celebes siyah maymunudur. (59).

#### **2.6.3.2. Genetik Mühendisliği ile Üretilen Diyabetik Fareler**

Bu model için, glikoz metabolizmasında önemli rolü olan proteinleri aşırı (transjenik) ya da az (knockout) sentezleyen deney hayvanları (kemirgenler) üretilir (60). Son yıllarda bu alanda önemli gelişmelerin (özellikle transjenik fareler) ortaya



çıkmasına rağmen, bu modellerde doğal ürünlerle ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Çünkü bu modeller yüksek maliyetlidir ve potansiyel terapötik ajanların etki mekanizmalarının (ya pankreatik  $\beta$ -hücrelerinin büyümesini stimüle eder ya da  $\beta$ - hücrelerinin ölümünü inhibe eder) sofistike protokollerle araştırılması kısıtlıdır (62).

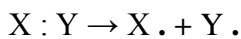
## 2.7. Serbest Radikaller

Doğada bulunan moleküllerin çoğu son yörüngelerinde çift elektron taşımaya rağmen bazı moleküller bir ya da birkaç eksik elektron taşır. Böyle moleküllere serbest radikal denilmektedir. Serbest radikaller son yörüngelerindeki eşleşmemiş elektronlardan dolayı kararsız yapıdadır. Dolayısıyla elektron alışverişine ve başka bir molekül ile reaksiyona girme eğilimindedirler. Girdikleri bu reaksiyonlar sonucunda ise karşısındaki moleküllerin yapısını bozarlar. Başlıca serbest radikaller; serbest oksijen radikalleri (reaktif oksijen partikülleri ), süper oksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijendir. Bunlar dışında karboksi, peroksil, alkoksil ve sülfür radikalleri de vardır (63,64).

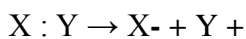
Organizmada fagositer sistemin elemanları olan nötrofil, monosit, makrofaj ve eozinofillerin yaptıkları fagositoz sonucunda, bir takım kemoterapötiklerin ve antibiyotiklerin kullanımı, iyonize ve non-iyonize radyasyona maruz kalma, sıcak ve soğuğa maruziyet, travma, sigara kullanımı, fizyolojik yaşlanma, hava kirliliği, solventler, anestezi uygulamaları ve aromatik hidrokarbon içeren yiyeceklerin tüketilmesi sonucu serbest radikaller oluşur. Ayrıca hücre içinde gerçekleşen küçük moleküllerin (katekolamin, flavinler) oksidasyonunda ksantin oksidaz gibi çözünebilir enzim ve proteinlerle, peroksizomlarla, mitokondrial elektron transpor sistemi, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemi ile de serbest radikaller oluşur (65).

Serbest radikaller 3 yolla ortaya çıkabilir (83-84).

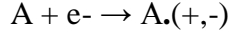
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (84,85).

Serbest radikaller; hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmasına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri, süperoksit anyonu ( $2O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $HO\cdot$ ), nitrik oksit ( $NO\cdot$ ), peroksil radikali ( $ROO\cdot$ ) ve radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar (84,86).

### **2.7.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri**

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ( $L\cdot$ ) ve lipid peroksit radikallerinin ( $LOO\cdot$ ) oluşması, ROS'un neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir (83).

Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar.

Lipid radikali ( $L\cdot$ ) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ( $L\cdot$ ) moleküler oksijenle ( $O_2$ ) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ( $LOO\cdot$ ) oluşur. Lipid peroksit radikalleri ( $LOO\cdot$ ), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ( $LOOH$ ) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin ( $LOOH$ ) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar.

Lokal olarak hidrojen peroksitten ( $H_2O_2$ ) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ( $OH\bullet$ ) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir. Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. Malondialdehit kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (84,85).

### **2.7.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri**

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur (83).

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin ROS üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) veya hidrojen peroksitle ( $H_2O_2$ ) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (86).

### **2.7.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri**

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali ( $OH\bullet$ ) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden

kaynaklanan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperokside ( $O_2^{\cdot-}$ ) maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir, çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta ve romatoid artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikorlar bulunur.

#### **2.7.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri**

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir.

#### **2.8. Antioksidanlar**

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşın vücutta pek çok savunma sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sistemlere antioksidan savunma sistemleri, bu sistemde kullanılan moleküllere ise antioksidanlar denilmektedir.

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobun, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler. Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

**Enzim olan endojen antioksidanlar** şunlardır: 1) Süperoksit dismutaz (SOD) 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST) 4) Katalaz (CAT) 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi 6) Hidroperoksidaz.

**Enzim olmayan endojen antioksidanlar** şunlardır: 1) Melatonin. 2) Seruloplazmin. 3) Transferrin. 4) Miyoglobin. 5) Hemoglobin. 6) Ferritin. 7) Bilirubin. 8) Glutasyon. 9) Sistein. 10) Metiyonin. 11) Ürat. 12) Laktoferrin. 13) Albümin.

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

**Vitamin eksojen antioksidanlar** : 1)  $\alpha$ - tokoferol (vitamin E). 2)  $\beta$ -karoten. 3) Askorbik asit (vitamin C). 4) Folik asit (folat).

**İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar**: 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten). 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenylene idonium). 3) Rekombinant süperoksit dismutaz. 4) Trolox-C (vitamin E analoğu). 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein). 6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin). 7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin). 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri. 9) Sitokinler (TNF ve IL-1). 10) Barbitüratlar. 11) Demir şelatörleri.

**Gıdalardaki eksojen antioksidanlar**: 1) Butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) 2) Butillendirilmiş hidroksianisol (BHA) 3) Sodyum benzoat. 4) Ethoksiquin. 5) Propilglat. 6) Fe-süperoksit dismutaz.

## 2.9. Oksidatif Stres

Fizyolojik koşullarda serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir. Bu dengenin serbest radikal tarafına kaymasıyla hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısı bozulur, hücre içi enzimler inaktifleşir, DNA hasarı oluşur, mitokondrilerdeki aerobik solunum bozulur, litik enzimler aktive olur, hücreden  $K^+$  kaybı artar, damar geçirgenliği bozulur, ekstraselüler kollajen doku komponentleri yıkılır, trombosit agregasyonu ve dokulara fagositlerin göçü artar. Organizmadaki tüm bu fonksiyonel ve yapısal değişikliklere oksidatif stres denilir. Oksidatif stresin kanser ve ateroskleroz başta olmak üzere pek çok hastalığa yol açmasının yanında pek çok hastalık ve fizyolojik durum da oksidatif strese yol açabilir. Hipertansiyon, diabetes mellitus ve osteoporoz gibi patolojilerde oksidatif stresin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca son zamanlarda hamilelik gibi fizyolojik durumlarda da

oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir. Hamileliğin özellikle meme, uterus ve over kanserlerine karşı koruyucu özelliğinin bilinmesinin yanında bir takım hormonal değişiklikler ile oksidatif strese yol açabileceği de düşünülmektedir (84,87,88).

### **2.10. 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, sorbitol yolağının aktivitesinin, hipoksi ve iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarı sonucu arttığı ve antioksidan savunma duvarının aşıldığı diyabette bu tablonun diyabetik komplikasyonlara yol açtığı vurgulanmaktadır (84).

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 ürünlerin, karşılıklı olarak birbirlerini aktive ederek, lipid peroksidasyonunu artırdıkları bildirilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, plazma lipid peroksidlerindeki artışın, diyabetten çok, vasküler hastalığın kendisi ve hipertrigliseridemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Araştırmacıların bulguları, vasküler komplikasyonları olan diyabetli hastalarda, hem LDL oksidasyonunda hem de nonenzimatik glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışlar olduğunu göstermektedir (84).

Diyabet olgularında, lipid peroksidasyonunun yanı sıra ilave olarak protein oksidasyonu da artmaktadır ve 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 literatürde bildirilmektedir (88).

Oksidatif stresin vücutta diğer bir hedefi ise insülin sentezi ve salınımından sorumlu olan pankreas  $\beta$  hücreleridir. Yüksek kan glikoz düzeyi veya serbest yağ asitlerinin artması ya da ikisinin aynı zamanda görülmesi pankreas  $\beta$  hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (89). Pankreas  $\beta$  hücrelerinin serbest radikallere karşı duyarlı olmalarının nedeni SOD, GSH-Px, CAT gibi önemli antioksidan enzimler bakımından yetersiz olmalarıdır. Serbest radikallerin artması ve artan lipid peroksidasyonu sonucu Langerhans adacık hücrelerindeki glikozun

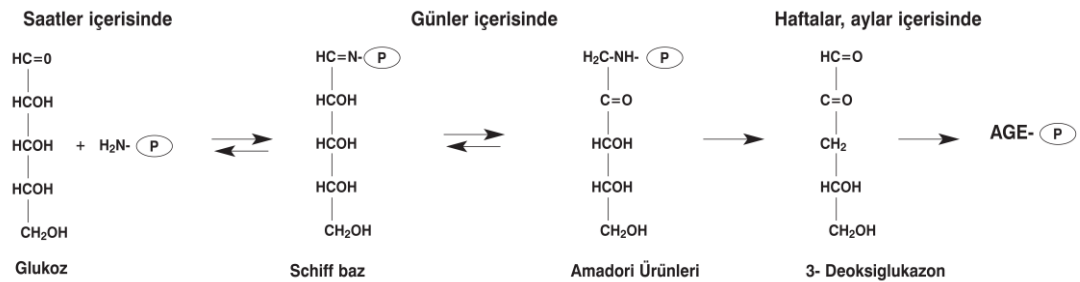
oksidasyonu artar ve insülin salgılanması inhibe edilir (89). Hiperglisemi aracılı serbest radikal oluşumu başlıca üç temel mekanizma ile açıklanmaktadır (84).

### 2.10.1. Glikozun Otoksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Bir geçiş elementinin varlığında glikoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalının  $H_2O_2$  üzerinden  $HO^\bullet$  oluşturması ile sonuçlanır. Hücre içi glikoz oksidasyonu solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılan NADH'ın açığa çıkmasına neden olur. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında ara metabolit olarak  $O_2^{\bullet-}$  açığa çıkar. Bu nedenle mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi radikal türlerin üretim kaynağıdır. Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak  $O_2^{\bullet-}$  oluştuğu düşünülmektedir. Hiperglisemi bu yolla  $O_2^{\bullet-}$  üretimini artırır (84, 90).

### 2.10.2.2. Proteinlerin Glikasyonu

Hiperglisemide, glikoz non-enzimatik olarak ortamdaki proteinlere bağlanır ve istenmeyen glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest radikal oluşum reaksiyonlarını artırır (91).



Şekil 2.5: Proteinlerin glikasyonu ve AGE oluşumu

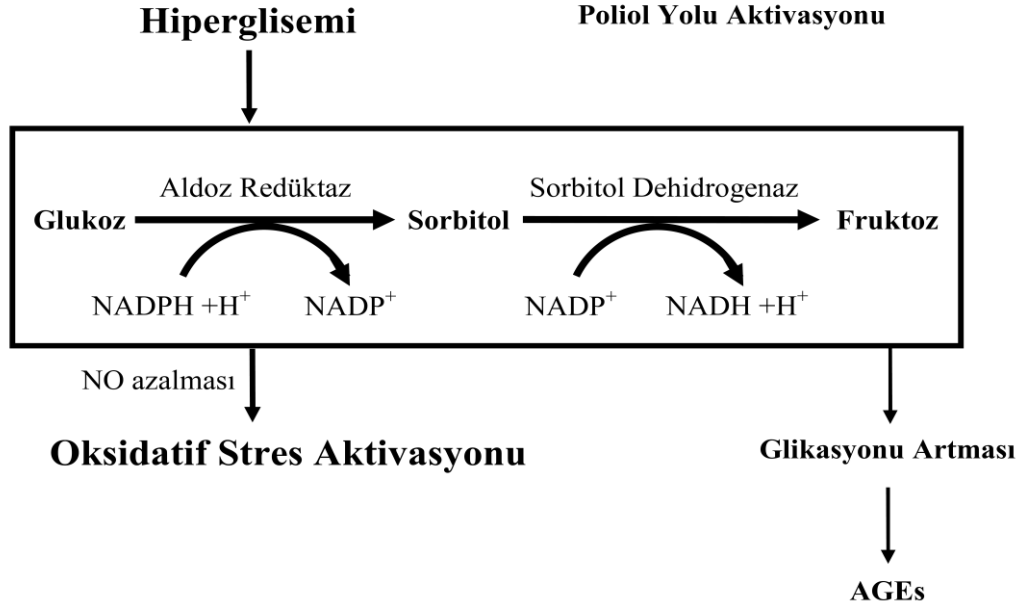
AGE'ler, endotelin aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına ve kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal artışına yol açar. AGE'ler proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirerek oksidatif stres oluşturabilirler (92). Yapılan çalışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)'yi

aktive ettiği ve dolayısıyla aşırı ve sürekli aktive olmuş PKC'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonlar da rol aldığı düşünölmektedir (93). İnsanda non-enzimatik protein glikozillenmesinin en önemli örneği hemoglobinin glikozillenmesidir (HbA1c). Hemoglobin glikozillenme derecesi, hipergliseminin süresi ve düzeyine bağlıdır. Hiperglisemide, glikozun 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 senil katarakt gelişir (91). Bağ doku komponentlerinin glikozillenmesindeki artışın bir diğer önemi, lipoproteinlerin arter duvarında tutulması ile gelişebilen aterogenezisdir. Glikozillenmiş damar duvarı proteinleri LDL kolesterolü, normal kolestrole göre 3 kat daha fazla bağlayarak, lipit birikmesi ve lipit plakların oluşması, makrofajların devreye girmesi, foam (köpük) hücre formasyonuna bağlı makrofaj orijinli büyüme faktörü sekresyonunun stimölasyonu, düz kas hücresi mitogenezi veya diğer makrofaj ürünlerinin retinada, glomerüller, koroner arter, beyin arteriolleri ve periferik damarların daralmasına yol açar. AGE'lerin DNA proteininin, özellikle lizin varlığında, glikoz ile reaksiyona girmesi ile oluşan reaksiyonları kromozomal değişiklikler, DNA zincirinde kırılmalar, DNA'nın tamiri, replikasyon ve transkripsiyonda bozukluklara neden olabilir. Diyabetik hiperglisemilerde bu olayların artması erken hücre yaşlanmasına sebep olmaktadır (85,98).

### **2.10.2.3. Poliöl (Sorbitol) Yolağının Aktivitesinin Artması**

Hiperglisemi, poliöl yolu ile sorbitol üretimine neden olur (Şekil 2.6). Sorbitol, glikozdan fruktoz oluşumu sırasında meydana gelen, glikozun bir alkolüdür. Hücre içi sorbitol metabolik yolu aktif olunca, sorbitol hücre içinde birikmeye başlar. Hiperglisemi ile birlikte lens, sinir, retina, böbrek, kan damarları, iskelet hücreleri gibi diyabetik komplikasyonlar için öncül risk alanlarında glikozun hücre içine girmesi için insüline ihtiyaç olmadığından hücre içi glikoz kandaki seviyeye ulaşır. Hücre içi glikoz miktarı fizyolojik düzeyleri aşınca glikoz için yüksek Km değerine sahip olan aldoz redüktaz enzimi aktifleşir ve poliöl (sorbitol) yolu açılır (17,91).





**Şekil 2.6:** Poliöl yolunun DM ile aktivasyonu

Glikozun metabolizmasına ait üç metabolik yoldan biri olan poliöl (sorbitol) yolağı çalışmaya başladığında, artan fruktozla ortamdaki hekzokinaz yetersiz olmaya başlar. Fruktozdan meydana gelen gliseraldehitin gliserole dönüşmesi ve gliserolün de lipid sentezinde kullanılması diyabetiklerdeki hiperlipidemiye meydana getirmektedir (17,91). Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanılarak tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve NO sentezi için de NADPH gerekli olduğundan, sorbitol yolunun aktif olması NADPH yetmezliğine ve böylece glutatyon üzerinden antioksidan etkinliğin azalmasına yol açar. Redükte glutatyonun ve vazodilatör olan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarını ortaya çıkartır (84). Vazodilatör mediatörlerin kaybı, endonöronal kan akımı ve endonöronal hipoksi veya iskemi sonucu nöronların hasarında etkilidir. Glikozun sorbitol yolu ile fruktoz ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak, hücre miyoinozitol düzeyleri azalır ve sinir iletim hızı için önem taşıyan Na,K-ATPaz enzim aktivitesi azalır (84). Ağır diyabette göz merceğinde sorbitol gibi şeker alkollerinin birikmesi, suyun tutulmasına neden olur. Böylece göz merceği osmotik basınçtan dolayı şişmeye başlar dolayısıyla lentiküler opasiteler ve katarakt meydana gelir (91). Miyoinozitol, insan ve hayvan organizmasında böbrek dışı dokuda, reversibl olarak membran fosfolipidlerinin ve fosfoinozitidlerinin yapısına girer. Hücre dışı olayların hücre içi mesajlar olarak iletiminde etkin olan fosfoinozitid metabolitlerinin azalışı Na,K-ATPaz

aktivitesindeki azalış ile paralel olarak sinir iletim hızında bir azalmaya sebep olmaktadır. Hiperglisemide miyoinozitol miktarı ya sorbitol metabolik yolu aktivitesi artışına bağlı olarak ya da glikozun hücrelere miyoinozitol girişi hiperglisemi nedeniyle inhibe edilmektedir (91). DM'daki uzun süreli hiperglisemi, açıklanan mekanizmalar ile sürekli ve şiddetli olarak oksidatif stresi tetiklemektedir.

Özetle DM 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. STZ sıçanlarda oluşturulan diyabet modelinde komplikasyonların incelenmesi yönünde iyi bir ajandır. Metformin halihazırda diyabet tedavisinde kan glikozunu kontrol altında tutmak ve oluşan metabolik komplikasyonları minimize etmek için kullanılan bir ilaçtır. Yapılan çalışmalar ışığında biz de bu çalışmada, STZ ile diyabetin indüklendiği sıçanlarda, Tip II diyabet tedavisinde kullanılan metforminin diyabetik nöropati ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

### 3. MATERYAL VE METOD

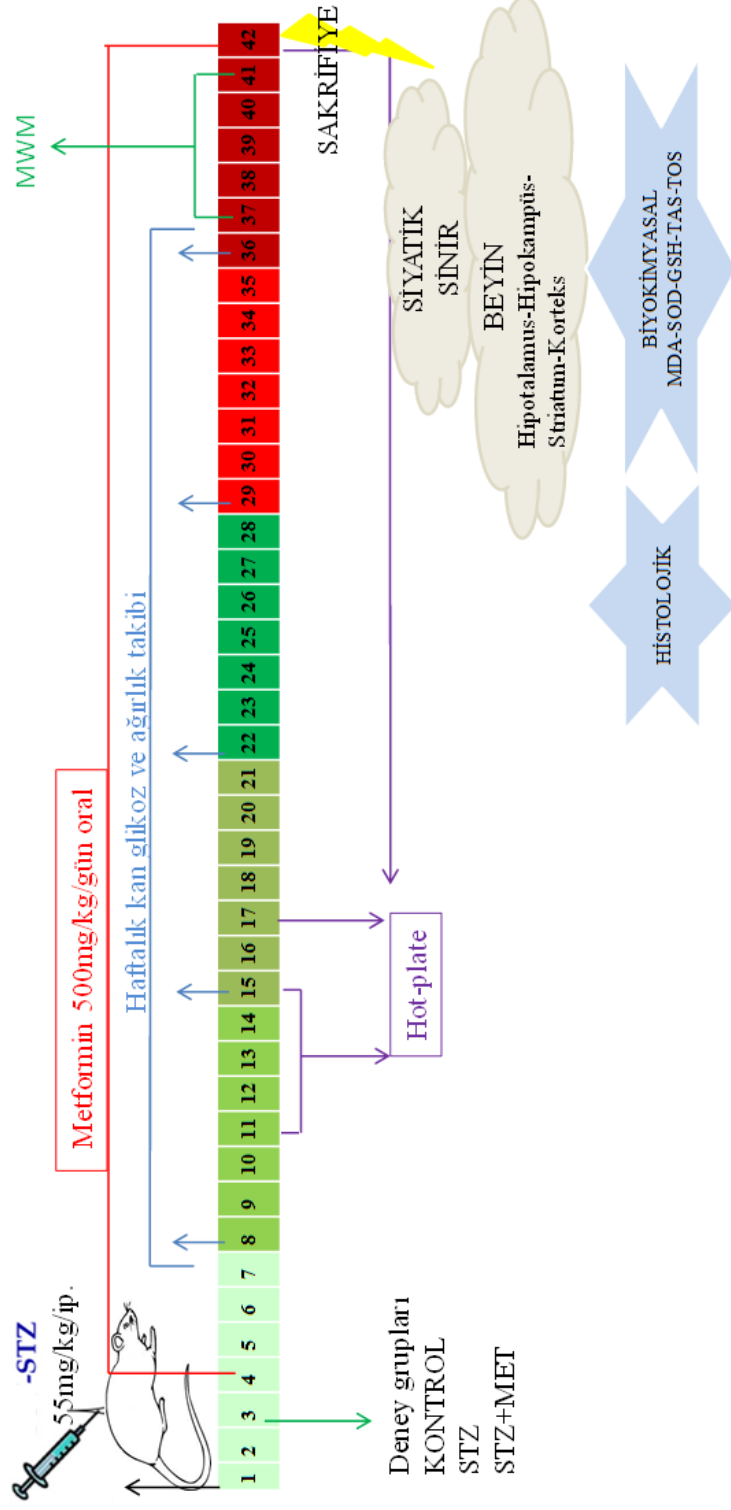
#### 3.1. Deney Hayvanlarının Temini

Çalışmamızda kullanılan *Wistar albino* türü erkek sıçanlar, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışmanın tüm aşamalarında İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu esaslarına uygun çalışıldı. Çalışmada kullanılan 15 haftalık 200 - 250 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 gruplara bölündü. Sıçanlar 3 gruba ayrıldı. İstatistiki açıdan anlamlı sonuçların elde edilebilecek en az sayıda sıçan kullanılarak her gruba 10 sıçan alındı; STZ uygulanan gruplarda kayıp olabileceği olasılığı düşünüldüğünden 1-2 adet fazla sıçan ayrıldı. 1. grup kontrol grubu; 10 adet sıçan, 2. grup STZ grubu; 10 adet sıçan, 3. grup STZ+MET 10 adet olacak şekilde toplam 30 adet sıçan gruplandırıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara hiçbir müdahale yapılmadan diğer gruplarla eşit koşullarda tutuldu.

#### 3.2. Deney Hayvanlarında Diyabet Oluşturulması

Deneylerde diyabet oluşturmak için 12 saat aç bırakılmış sıçanlara vücut ağırlıkları dikkate alınarak 0.1 M sodyum sitrat tamponu (pH 4.5) ile taze hazırlanmış 55 mg/kg STZ intraperitoneal olarak enjekte edildi. Ani ve şiddetli hipoglisemiye önlemek için, STZ enjeksiyonundan sonraki 24 saat boyunca %5' lik glikoz solüsyonu içme suyu olarak sıçanlara verildi. STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra kan glikoz seviyeleri 200 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar deneylere alındı (94-95).

## ÇALIŞMA PLANI



### **3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması**

#### **1. Kontrol Grubu (n=10):**

Bu gruptaki sıçanlara hiçbir müdahale ve tedavi yapılmadı diğer sıçanlarla aynı süre, aynı laboratuvar koşullarına tabii tutularak ağırlık ve kuyruk kanlarından kan glikoz takibi yapıldı.

#### **2.STZ Grubu (n=10):**

STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra kan glikoz seviyeleri 200 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlardan oluşturulan bu grupta çalışma boyunca hiçbir tedavi uygulanmadı.

#### **3. STZ+MET Grubu (n=10):**

STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra kan glikoz seviyeleri 200 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlardan oluşturulan bu grupta çalışma boyunca hergün aynı saatlerde (10:00-11:00) distile suda çözümlenerek (1ml/kg) günlük taze hazırlanmış metformin 500 mg/kg/gün gavajla verildi.

Tüm gruptaki sıçanlara deney protokolünde belirtilen günlerde ağrı ve öğrenme testleri yapıldı. 6.haftanın sonunda kalpten kan alınarak sakrifiye edildi.Siyatik sinir ve beyin dokuları çıkarıldı.

### **3.4. STZ ve Metformin Uygulaması**

STZ uygulaması 100 ünitelik (1 mililitrelik) insülin enjektörü ile intra peritoneal yapıldı. Enfeksiyona karşı korumak amacıyla her enjeksiyon işleminin öncesi sıçanların karın altı kısımları antiseptik betadin solüsyonu ile silindi.

Metformin uygulamasında sıçanlar baş ve boyunlarından tutularak gavajla oral olarak yapıldı.

### **3.5. Hot Plate Analjezimetre**

İlk olarak 1953 yılında Eddy ve Leimback tarafından tanımlanmış ve kullanıma girmiştir (96). Hot plate testi rodentlerin ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde halen en çok kullanılan yöntemlerdendir. Temel olarak 50-56 °C'ye kadar ısıtılmış bir yüzeyden (bakır veya alüminyum) oluşur. Hayvanın ısıtılan yüzey üzerinde belli bir bölge sınırlarında kalması için hareket kabiliyetini sınırlamayacak büyüklükte cam veya pleksiglas silindirler kullanılır. Yüzeye bırakılmasından hayvanın arka ayağını çekmesine kadar olan süre hesap edilir. Literatürde en çok kullanılan yöntemlerden biri olmasına rağmen hayvanın ağrıyı algıladığı gözlemlene kriteri çeşitlilik gösterir, hangi davranışın ağrı belirtisi olarak kabul edileceği konusunda sorunlar vardır ve zor bir

deney metodudur. Davranış sadece arka ayağın çekilmesi olabileceği gibi ayak çekme ve yalama, sallama veya sıçrama şeklinde olabilir. Nadiren hayvan sadece ön ayaklarını yalayabilir veya ön ayaklarla başlayan reaksiyon arka ayağın yalanmasıyla sonlanabilir. Bir sıçanın normal reaksiyon süresi ortalama 10 ile 40 saniye arasında değişir. Doku hasarına neden olacağı için test 60 sn'den fazla uygulanmamalıdır.



**Şekil 3.1:** Çalışmamızda kullanılan hot plate analgezimetre

Bu metotta, denekler sıcaklığı  $50\pm 0.5$  °C ayarlanmış ve yanları hayvanların dışarı çıkmalarını engelleyecek plastik saydam silindir şeklinde bir bariyerle kapatılmış tabla bölümüne sıçanlar bırakılarak deneyler yapıldı. Sıçanların tablaya bırakıldıkları andan itibaren, ekstremitelerini hızla çekmeleri veya yalamalarına kadar geçen süre saniye cinsinden kronometre kullanılarak kaydedildi. Bu testin uygulanması esnasında ortamın sessizliğine büyük önem verildi ve hayvan 60 sn içerisinde cevap vermediği takdirde doku hasarını önlemek amacıyla bu sıcak tabla üzerinden alındı ve çalışmaya dahil edilmedi. Deneylerden önce hem normal hem de diyabetik sıçanlara 5 gün boyunca günde 1 kez ve aynı saatlerde olmasına dikkat edilerek hot plate testi uygulanarak, bütün hayvanların deney ortamına alışmaları sağlandı. Alıştırma sürecinden sonra bütün hayvanlar bir gün dinlendirildi ve sonrasında hot plate testi uygulandı.

### **3.6. Morris Su Labirenti Testi**

Morris su labirenti testi kemirgenlerde görsel mekansal öğrenme ve hafıza gelişimini anlayabilmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu çalışmada deneysel diyabet

oluşturulan sıçanlarda metforminin uzun süreli hafıza üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kullanıldı.



**şekil 3.2:** Çalışmamızda kullanılan Morris Water Maze Testi

Çalışmamızda odanın paravanlarla çevrili kısmına yerleştirilen 120 cm genişliğinde ve 60 cm boyunda içi yarısına kadar su dolu siyaha boyanmış polikarbon bir tank kullanıldı. Tanktaki suyun sıcaklığı 22 °C’de sabit tutuldu. Doğu, batı ve güney yönlerinin lokalize edilebilmesi amacıyla duvarlara hayvanların dikkatini çekebilecek renk ve şekilde ipuçları yerleştirildi ve deney sonuna kadar yerleri değiştirilmedi. Kuzey duvarı boş bırakıldı. Odanın tavanına havuzu ortalıyacak şekilde kamera yerleştirildi ve bu 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 bir kumaşla kaplandı.

Deneye başlamadan önce hayvanlar havuza bırakılarak 120 sn süreyle yüzmelerine izin verildi. Bu alıştırma yüzüşü sonrasında testin görsel mekânsal öğrenme bölümüne başlandı. Ratlar hergün aynı sıralamayla yüzleri duvara dönük şekilde doğu, batı, kuzey ve güney yönlerinden havuza bırakılarak görüntüleri kaydedildi. 120 sn içinde platformu bulamayan hayvanlar platforma yerleştirilerek 60 sn dinlendirildi ve latansları 120 sn olarak kabul edildi. Ardışık 4 gün boyunca deney

tekrarlandı ve veriler kaydedildi. Her gün hayvanların havuza bırakılma sıraları ve bırakıldıkları kadran düzenli bir sıra içerisinde yapıldı. Mekânsal öğrenmeden 5 gün sonra yani deneyin 42. gününde (retansiyon günü) uzun süreli hafızanın değerlendirilmesi amacıyla yine havuza bırakılarak yüzdürüldü ve görüntüleri kaydedildi. 120 sn içinde platformun bulunduğu kadranda hayvanların geçirdikleri süre hesaplanarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Veriler otomatik takip sistemi tarafından kaydedildi ( Ethovision , Nodulus , Leesburg , VA).

### **3.7. Beyin Dokularının ve Siyatik Sinir Dokularının Çıkarılması**

Çalışmamızda hot plate ve yüzdürme testleri bittikten sonra 5 mg/kg xylazine ile 50 mg/kg ketamin kokteyli ip uygulanarak genel anestezi altında sıçanların karın derisi bistüri yardımıyla açıldı. Kalpten alınan kan örnekleri 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen plazma tüplere aktarıldı. Sonrasında sıçanların kafa tasları açılarak beyin dokuları çıkarıldı ve korteks, hipokampus, hipotalamus ve striatum bölgelerine ayrıldı . Beynin hipokampus bölgesi ve siyatik sinir dokusunun bir parçası histopatolojik incelemeler için %10 formaldehid içerisinde fikse edilerek saklandı. Diğer parçalar ise hemen alüminyum folyoya sarılıp grup numaraları belirtilerek plastik kaplara konuldu. Sonra tüm numuneler -80 °C ayarlı derin dondurucuda biyokimyasal testlerin yapılacağı güne kadar saklandı.

### **3.8. Beyin Dokularının ve Siyatik Sinirin Analizlere Hazırlanması**

Deneylerin yapılacağı gün derin dondurucudan çıkarılan beyin dokuları +4°C bekletilerek buzlarının çözülmesi sağlandı ve sonrasında tartılarak her bir örneğin yaş doku ağırlığı kayıt edildi. Homojenizasyon öncesi doku örnekleri, içi buz dolu taşıma kaplarına yerleştirilmiş cam tüplere aktarılarak soğukluğu muhafaza edildi. Daha önce ikiye ayrılmış olan dokuların bir bölümünün üzerine soğuk 2 mL Tris-HCl tamponu (pH 7,4 - 0,2 mM) eklenerek homojenizatörde 16000 devir/dakika hızda 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat üzerine 1 mL daha tampon ilave edildi ve 1 dakika süreyle tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenat vortekslendikten sonra eppendorf tüplere aktarıldı ve bu homojenatlarda MDA ve protein tayinleri yapıldı. Homojenatların bir bölümü, 1 saat süreyle 2200xg'de +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlar TAS, TOS, SOD, GSH ve protein tayinlerinde kullanıldı.



Deney sonunda alınan siyatik sinir dokuları ve hipokampüs dokuları %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Tespit sonunda çeşme suyunda yıkanan dokular, dehidrasyon ve parlatma işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen sinir doku kesitlerine hematoksilin-eozin (H-E) ve toluidin mavisi (TM) boyama, hipokampüs kesitlerine krezil viyoleto (KV) boyama metodları uygulandı. Boyanan preparatlar Leica DFC-280 araştırma mikroskobu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd. Cambridge, UK) kullanılarak incelendi.

H-E boyama metodu uygulanan siyatik sinir kesitleri, 100'lük büyütmede, akson ve miyelin kılıfta dejenerasyon ve endonöryumda ödem varlığına göre değerlendirildi. Siyatik sinirdeki histolojik değişiklikler; yok (0), hafif (1), orta (2), şiddetli (3) olarak skorlandı. TB boyama metodu uygulanan kesitlerde mast hücresi sayımı yapıldı. Sayımlar X40'lık büyütmede, tüm alan incelenerek gerçekleştirildi.

Hipokampüs dokusunun CA1 bölgesinde, rastgele seçilen 5 alandaki nöronlar, normal ve dejenere olarak değerlendirildi ve sayıldı. Buna göre; yuvarlak ve açık renkli nükleuslara sahip nöronlar normal olarak değerlendirilirken, piknotik nükleuslara sahip, büzüşmüş nöronlar ise dejenere olarak kabul edildi.

### **3.9. Beyin Dokusunda Yapılan Analizler**

#### **3.9.1. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini**

**Kullanılan Reaktifler:** Substrat solüsyonu [0,3 mmol/L ksantin, 0,6 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 g/L sığır serum albümini (BSA)], ksantin oksidaz (XO:167 Ü/L), 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8 mmol/L CuCl<sub>2</sub>.

**Deneyin prensibi:** Süperoksit dismutaz aktivitesi Sun ve arkadaşları tarafından tanımlanan, Durak ve arkadaşları tarafından modifiye edilen 115 NBT indirgeme yöntemiyle çalışıldı (97). Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorpsiyon verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmakta, buradan aktivite hesabı yapılabilmektedir.

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

SOD aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{AK} - \text{AN}) / \text{AK} \times 100$$

AK: Kör absorbansı

AN: Numune absorbansı

%50'lik inhibisyona 1 Ü denildiği için

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

Spesifik aktivite (Ü/mg protein) = [Ü/mL/mg/mL protein]. Sonuçlar, Ü/mg protein olarak ifade edildi.

**Deneyin yapılışı:** Daha önce elde edilen homojenat süpernatantının bir kısmı 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı içinde vortekslenip 1 saat süreyle 2200xg'de 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 <sub>2</sub>	1 mL	1 mL
-------------------	------	------

Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm'de okundu

### 3.9.2. GSH Analizi

**Kullanılan reaktifler:** 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellmann's solüsyonu)

**Prensibi:** GSH konsantrasyonu Beutler ve ark. metoduna göre ölçüldü (98). 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.

### 3.9.3. MDA miktarının tayini

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

**Prensibi:** Esterbauer ve Cheeseman'nin metodu ile çalışıldı (99). En çok kullanılan lipit peroksidasyon tayin yöntemidir. Asidik ortamdaki tiobarbitürik 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 absorbanları 532 nm de spektrofotometrik olarak okundu.

#### **Deneyin Yapılışı:**

	<b>NUMUNE</b>	<b>KÖR</b>
<b>Homojenat</b>	<b>0.5 ml</b>	<b>-</b>
<b>TCA %10</b>	<b>2.5 ml</b>	<b>2.5 ml</b>
<b>Deiyonize su</b>	<b>-</b>	<b>0.5 ml</b>

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

<b>Süpernatant</b>	<b>2 ml</b>	<b>2 ml</b>
<b>TBA %675</b>	<b>1 ml</b>	<b>1 ml</b>

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 çalışılı 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.

#### **3.9.4. Doku Homojenat ve Süpernatant Ekstraktlarında Protein Tayini**

**Kullanılan reaktifler:** A reaktifi: 20 mmol CuSO<sub>4</sub>, 34 mmol Na<sub>3</sub>Sitrat, B reaktifi: 0.19 mmol Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 mol NaOH ve Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) reaktifleri kullanıldı.

**Deneyin prensibi:** Protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi (100). 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:** 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.

	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.

**Hesabı:** Protein (mg/mL) = (Kst/Ast) x AN

Kst: Standardın konsantrasyonu

Ast: Standardın absorpsiyonu

AN: Numunenin absorpsiyonu

### 3.9.5. Beyin Doku Süpernetantından TAS –TOS ve OSI Analizi

Toplam Antioksidan Durumölçümü (TAS) Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader ve TAS kit seti (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<sup>•+</sup> okside forma dönüşür. Asetat buffer solüsyonundaki konsantre (koyu yeşil) ABTS<sup>•+</sup> 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 toplam antioksidan kapasitesi ile (TAC) orantılıdır. Mikroplate reader da 660 nm’de okunan absorbans değişimindeki deney sonuçları TAC ölçüm testleri için kullanılan standart antioksidan ve bir vitamin E analogu olan trolox solüsyonunıyla kalibre edilir. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent /M biriminde ifade edilir (101,102).

Toplam Oksidan Durum (TOS) ölçümü Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader ve TOS kit seti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit ile örnek mevcut oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksi

ferrik iyonu oksitler. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon mediumunda bulunan gliserol moleküller tarafından gerçekleştirilir. asidik ortamda ferrik iyonlar xylenol 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 (102).

Oksidatif stres indeksi (OSI) oksidatif stres derecesinin bir indikatif parametresi olup, hesaplanması formüldeki gibidir. Total Antioxidant Status ve Total Oxidant Status Kitlerini kullanarak OSI hesaplanabilmektedir.

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

### 3.10 İstatistik Analizler

Gruplar arası en büyük farklılık 2.7, standart sapma 1.8, grup sayısı 3,  $\alpha=0.05, \beta=0.20$  olduğunda her bir grupta en az 10 deneğin alınması güç analiziyle belirlendi (103). İstatistiksel değerlendirmelerde değişkenlerin gruplar arası farklılığının incelenmesinde tek yönlü varyans analizi, çoklu karşılaştırmalarda tukey testi kullanıldı. Öğrenme fazı için her bir gündeki öğrenme performanslarının grup içi farklılığın belirlenmesinde tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanıldı. Test fazında gruplar arası çoklu karşılaştırmalar Born Ferroni testi ile değerlendirildi.  $p<0.05$  değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

Histolojik incelemelerin istatistiksel analizleri, SPSS istatistiksel yazılım programı (SPSS for Windows version 17) ile yapıldı. Bütün veriler med (min – max) olarak ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hesaplamalar  $p<0.05$  değeri için anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

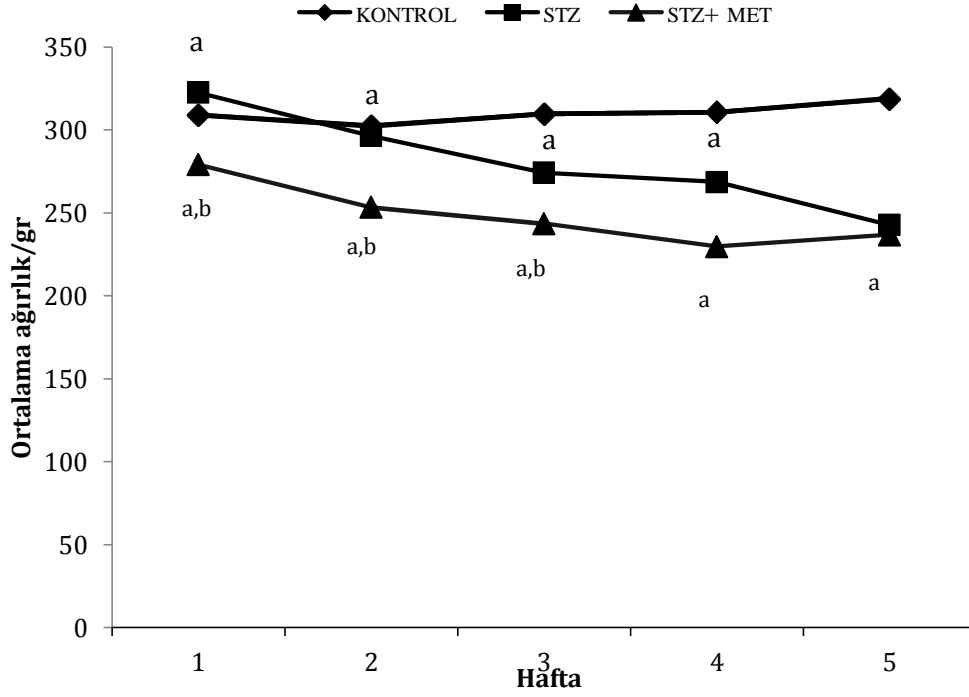
### 4.1. Sıçanların Deney Süresince Vücut Ağırlıkları

Deneyde kullanılan tüm sıçanların haftalık vücut ağırlıkları ölçülerek gruplardaki sıçanların ortalama ağırlıkları arasındaki değişim şekil 4.1 ve tablo 4.1’de verildi. Çalışmamızın ilk haftasında STZ ve STZ+MET gruplarında kontrol grubuna göre ciddi kilo kaybı olduğu tespit edildi ( $p<0.05$ ). Gruplar arasındaki farklılık çalışmanın ilerleyen haftalarında da devam etti. Çalışmamızda grupların ortalama canlı ağırlıklarının beş haftalık takibi sonucunda STZ ve STZ+MET gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğunu ve STZ+MET grubunun vücut ağırlığındaki değişimin STZ grubuna göre daha yavaş olduğunu gözlemledik .

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

	1.Hafta	2.Hafta	3.Hafta	4.Hafta	5.Hafta
<b>KONTROL</b>	309,2±16,65	302,8 ±18,50	309,9±20,80	310,8± 22,0	318,9± 21,6
<b>STZ</b>	322,55 <sup>a</sup> ±19,06	296,44±16,67	274,33 <sup>a</sup> ±15,22	268,6 <sup>a</sup> ±14,4	242,7 <sup>a</sup> ±11,2
<b>STZ+MET</b>	279,1 <sup>a,b</sup> ±9,70	253,44 <sup>a,b</sup> ±7,89	243,6 <sup>a,b</sup> ±9,0	229,8 <sup>a</sup> ±8,50	236,8 <sup>a</sup> ±9,8
<b>P değeri</b>	0,043	0,012	0,008	0,002	0,003

Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiş ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapılmış a; kontrol, b; STZ grubundan istatistiksel olarak farklı  $p<0.05$  STZ için n=9 diğer gruplarda n=10



**Şekil 4.1:** Deney gruplarındaki sıçanların deney süresince haftalara göre vücut ağırlıkları (g/hafta) a; kontrol, b; STZ grubundan istatistiksel olarak farklı  $p<0.05$

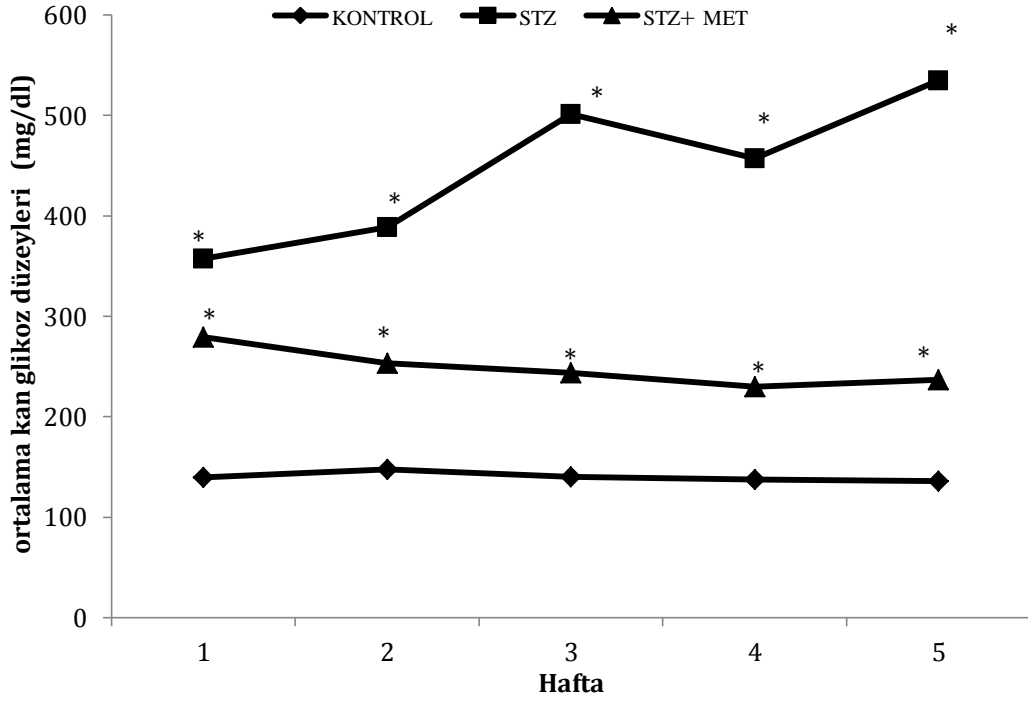
#### 4.2. Sıçanların Deney Süresince Kan Glikoz Düzeyleri

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

**Tablo 4.2:** Gruplara göre sıçanların haftalık ortalama kan glikoz düzeyleri (mg/dl)

	1.Hafta	2.Hafta	3.Hafta	4.Hafta	5.Hafta
<b>KONTROL</b>	139.7 ±6.0	147.5 ±6.7	140 ±6.50	137.3 ±7,20	136 ±5.50
<b>STZ</b>	357.11 <sup>a</sup> ±17.22	388.8 <sup>a</sup> ±16.44	501.3 <sup>a</sup> ±20.33	457 <sup>a</sup> ±19.06	534.5 <sup>a</sup> ±20.3
<b>STZ+MET</b>	279.1 <sup>a</sup> ±21.50	253.4 <sup>a</sup> ±21.22	243.6 <sup>a</sup> ±19.15	229.8 <sup>a</sup> ±18.65	236.8 <sup>a</sup> ±18.6
<b>P değeri</b>	0.0002	0.0004	0.0002	0.003	0.00005

Veriler ortalama ± SD olarak verilmiş ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapılmış a kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı  $p<0.05$  STZ için n=9 diğer gruplarda n=10



**Şekil 4.2:** Deney gruplarındaki sıçanların deney süresince haftalara göre kan glikoz düzeyleri(mg/dl) \*; kontrol grubuna göre farklı p<0.05

### 4.3. Hot Plate Analjezimetre Bulguları

Çalışmamızda STZ ile oluşturulan diyabet modelinde periferik sinirlerde oluşan hasarın ölçümü için hot plate analjezimetri ile ağrı eşığının ölçümü yapıldı. Çalışmamızda sıçanların ilk beş günlük alışma süresindeki ortalama, altıncı gündeki ve son olarak sakrifiye edilecekleri 42. gün ısıya karşı verdikleri tepki süreleri sn olarak ölçülerek grup ortalama süreleri tablo 4.3 ve şekil 4.3’de verildi.

Alışma süresinde sıçanların günlük ortalama hot plate bulguları STZ grubu ile kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. STZ+MET grubu STZ grubu ile kıyaslandığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak STZ+MET grubunun verileri kontrol grubuna yakındı ve kontrol grubu ile aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi .

Test günü olarak değerlendirilen altıncı gün gruplara göre ortalama hot plate verilerine göre STZ grubunun ağrıya cevap verme süresi kontrol grubuna göre uzamıştı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. STZ+MET grubunun ise ağrıya cevap verme süresi azaldı. Kontrol grubuna göre daha kısa olmasına rağmen kontrol ve STZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

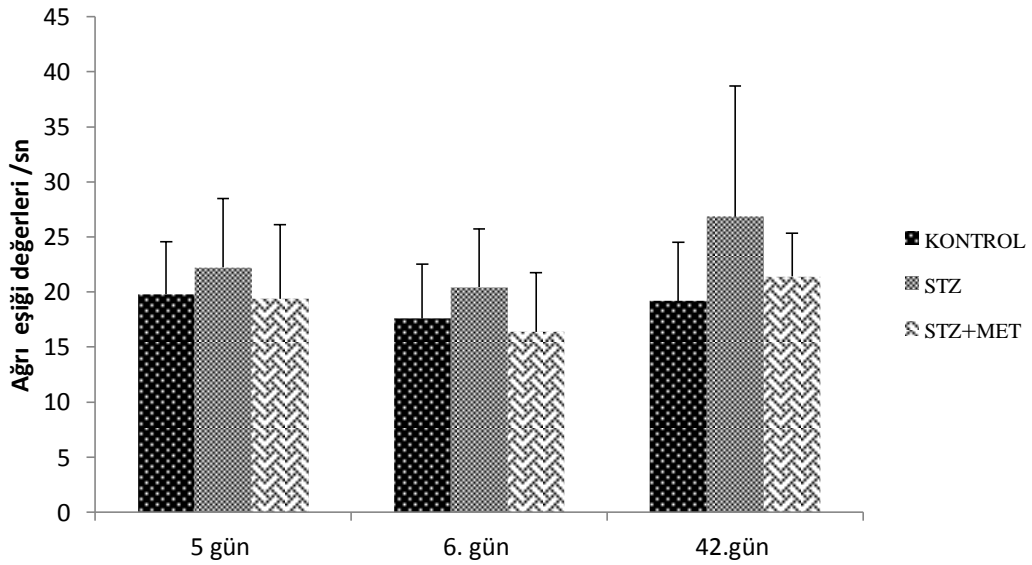


Çalışmamızın son günü (42. Gün) hot plate test sonuçlarımızda STZ grubunda ısı hissetme süresi kontrol grubuna göre uzamasına rağmen gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. STZ+MET grubunun ağrı eşiği süresi STZ grubuna göre azaldı, kontrol grubu verilerine yakın değerlerde ölçülmüş ise de tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

**Tablo 4.3:** Deney gruplarındaki sıçanların 5 günlük ortalama, 6. Gün ve 42. Gün ölçülen hot plate bulguları (sn)

	5 günlük ortalama	6.gün ortalama	42.gün ortalama
<b>KONTROL</b>	19,82 ±6,33	17,61 ±3,83	19,21 ±4,13
<b>STZ</b>	22,21± 5,75	20,44 ±2,63	26,84± 6,34
<b>STZ+MET</b>	19,4 ±7,00	16,38± 9,9	21,41 ±5,14
<b>P değeri</b>	0,174	0,210	0,465

Veriler ortalama ± standart sapma ile verildi. Verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkili karşılaştırılmalarda Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı.  $p < 0.05$  ve değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. STZ için  $n=9$  diğer gruplarda  $n=10$



**Şekil 4.3:**Hot Plate analgezimetre sonuçları (sn) veriler ortalama ± SD. Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p < 0.05$ ). STZ için  $n=9$  diğer gruplarda  $n=10$

#### 4.4. Morris Water Maze Sonuçları

Morris Water Maze testi ile sıçanlarda bilişsel fonksiyon değerlendirilmesi yapıldı. Sıçanlar dört farklı kadrandan havuza bırakılarak 4 günlük öğrenme denemeleri yapıldı ve sonuçlar Tablo 4.4 gösterildi. Platformu bulmak için gruplar arasında kat edilen yollar cm, zaman sn olarak lld.

MWM sonuçlarında STZ grubundaki sıçanların dört günlük platformu bulma süresi kontrol grubuna göre uzadı ve istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ). STZ+MET grubunun platformu bulma süresi STZ grubuna göre azaldı ve kontrol grubu verilerine yakın değerlerde bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.4).

MWM sonuçlarında sıçanların 4 günlük ortalama platformu bulmak için katettikleri mesafe kıyaslandığında STZ grubundaki sıçanların platformu bulmak için izledikleri yol kontrol grubuna göre uzamıştı ve istatistiksel olarak anlamlıydı. Metformin uygulanan grupta katedilen mesafe kontrol grubuna yakın olacak şekilde kısaldı ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ( $p<0.05$ ) (şekil 4.5).

Çalışmamızda 4 günlük alışma sürecinde sıçanların platformun bulunduğu kadranda aldıkları yol lld. STZ grubunun platformun bulunduğu kadranda katettiği mesafe kontrol grubuna göre kısa ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). STZ+MET grubunun platformun bulunduğu kadranda aldığı yol STZ grubundan uzun ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p<0.05$ ). Grupların platformun bulunduğu kadranda aldıkları toplam mesafenin, platformu bulmak için katedilen mesafeye yüzde oranı hesaplandığında kontrol grubu % 1.476, STZ grubu % 0.934 ve STZ+MET grubu % 1.271 şeklinde hesaplandı.

Şekil 4.9 vücut ısı haritası incelendiğinde kontrol grubunun en kısa yolla platformun bulunduğu kadrana yneldeği görülmektedir. STZ grubunun izlemiş olduğu yol karışık ve yoğunlaşmalar platformun bulunmadığı kadrarlarda yaygındır. STZ+MET grubunu görüntülerinde ise yoğunlaşmanın platformun bulunduğu kadranda olduğu ve izlenen yolun daha kısa olduğu görülmektedir.

MWM testinin uygulandığı beşinci günde platform çıkartılarak sıçanlar yüzdürüldü ve beşinci gün sıçanların platformun bulunduğu kuzey batı kadranda aldıkları toplam yol ve geçirilen toplam süreler Tablo 4.5 gösterildi. STZ grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında sredeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). STZ+MET grubunun verileri kontrol grubu verilerine yakın değerdeydi ve aralarındaki

fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak STZ+MET grubu STZ grubu ile kıyaslandığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Kadransız platformda katedilen mesafe ölçüldüğünde tüm gruplar arasındaki farklılık anlamlı değildi ( $p<0.05$ ).

Şekil 4.10 vücut ısı haritası incelendiğinde kontrol grubunda yoğunlaşmanın platformun bulunduğu kadranda olduğu görülmektedir. STZ grubunun izlemiş olduğu yol karışık ve yoğunlaşmalar platformun bulunmadığı kadranda yaygındır. STZ+MET grubunu görüntülerinde ise yoğunlaşmanın platformun bulunduğu kadranda olduğu görülmektedir.

**Tablo 4.4:** Platformun kuzey batı kadranda bulunduğu 4 günlük alışma sürecinde gruplara göre MWM bulguları

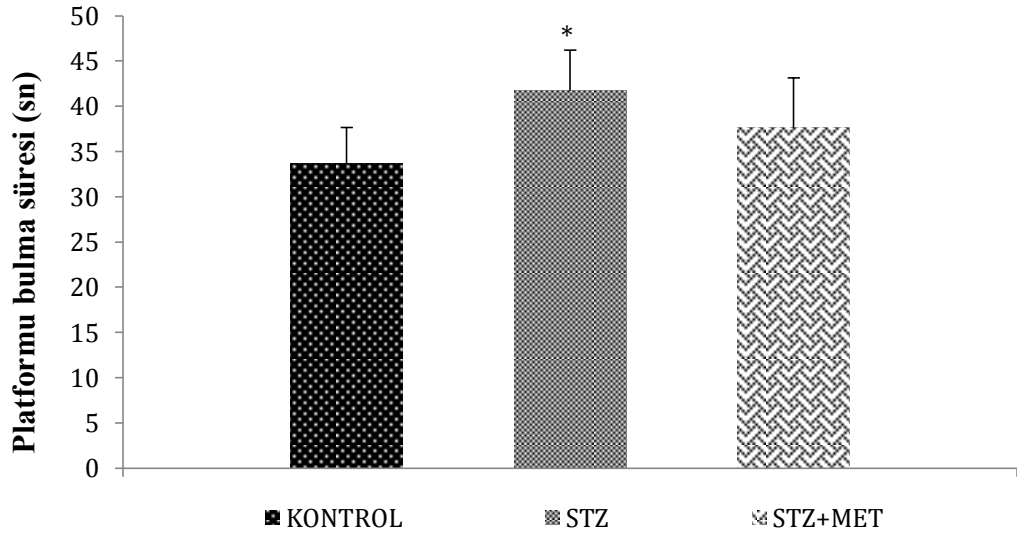
	Platformu bulmak için geçen sürenin 4 günlük ortalaması (sn)	Platformu bulmak için toplam günlük ortalaması (cm)	Platformun bulunduğu kadranda alınan toplam yolun günlük ortalaması (cm)	Platformun bulunduğu kadranda alınan platformu bulmak için toplam katedilen yola oranı (%)
<b>KONTROL</b>	33,71±3,93	3698,2±380,114	54,5898±15,1453	1.476
<b>STZ</b>	41,74±4,42 <sup>a</sup>	4552,1±424,545 <sup>a</sup>	42,5247±6,43951 <sup>a</sup>	0.934
<b>STZ+MET</b>	37,61±5,53	3949,04±330,693	50,2162±15,0854	1.271

Veriler ortalama  $\pm$  standart hata ile verildi. Verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. yapılmış a kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı  $p<0.05$

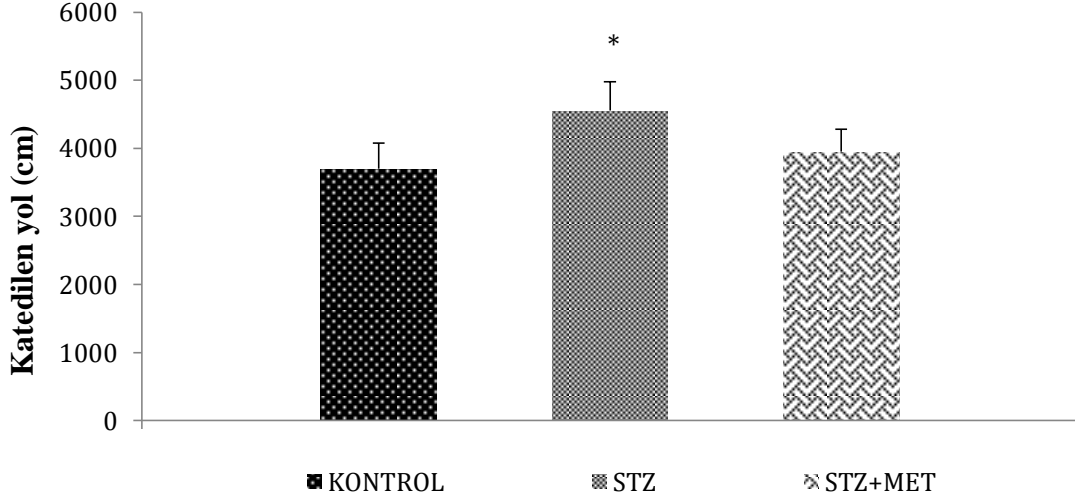
**Tablo 4.5:** MWM platformuz 5. gün kuzey batı kadrında geçirilen süre (sn) ve katedilen mesafe(m)

	5.gün platformuz denemede platformun bulunduğu alanda geçirilen süre (sn)	5.gün platformuz denemede platformun bulunduğu alanda geçirilen toplam yol (cm)
<b>KONTROL</b>	53,4±6,6	60430,8±2894,0
<b>STZ</b>	41,4±5,8 <sup>a</sup>	60789,7±2917,0
<b>STZ+MET</b>	55,9±8,0 <sup>b</sup>	59609,9±2353,9

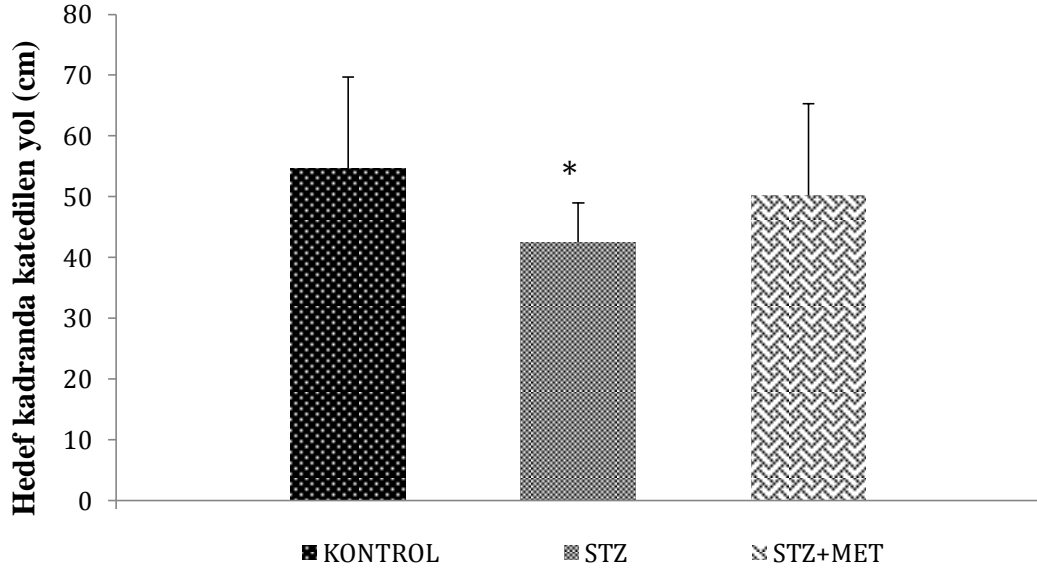
Veriler ortalama ± standart hata ile verildi. Verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkili karşılaştırılmalarda Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. a kontrol, b STZ grubundan istatistiksel olarak farklı p<0.05



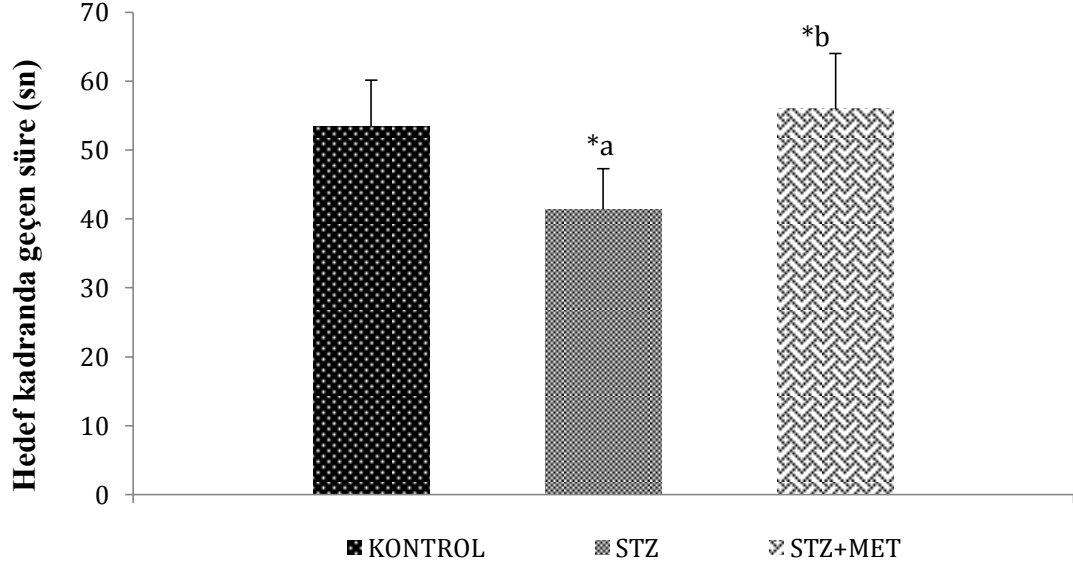
**Şekil 4.4:** MWM grupların 4 günlük ortalama platformu bulma süre sonuçları (sn). Veriler ortalama ± SD \* kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



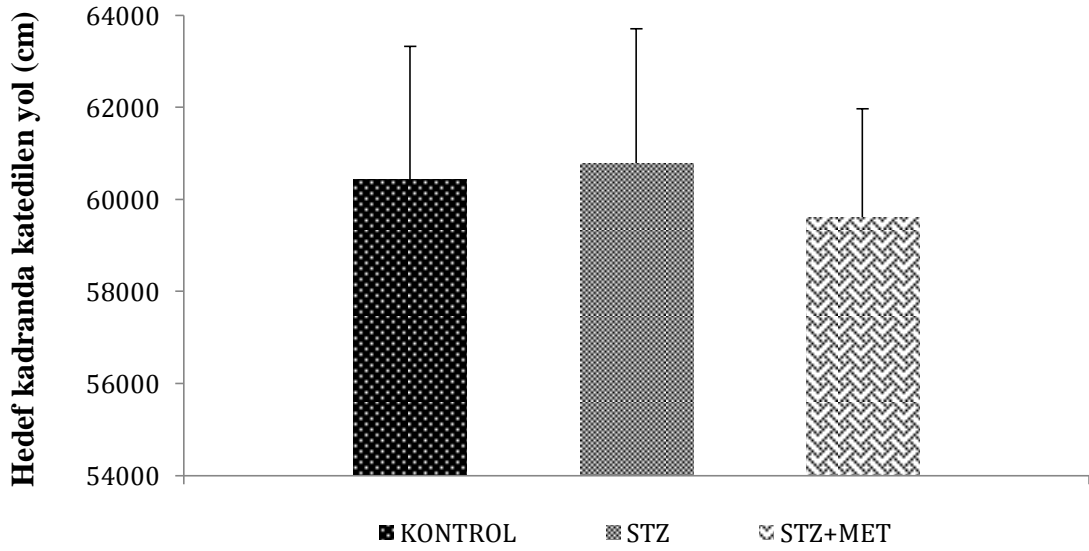
**Şekil 4.5:** MWM grupların 4 günlük ortalama platformu bulmanı bulmak için katedilen mesafe (cm)bulguları. Veriler ortalama  $\pm$  SD.\* kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ).



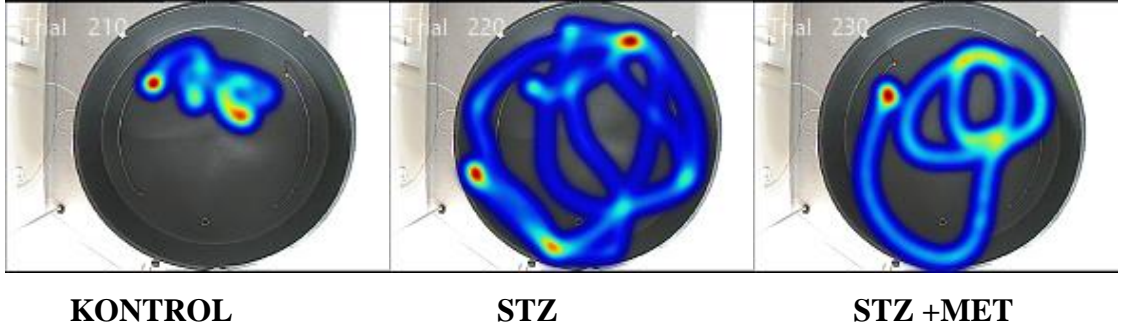
**Şekil 4.6:** : MWM grupların 4 günlük ortalama platformun bulunduğu kadranda katedilen mesafe (cm) bulguları veriler ortalama  $\pm$  SD.\* kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ).



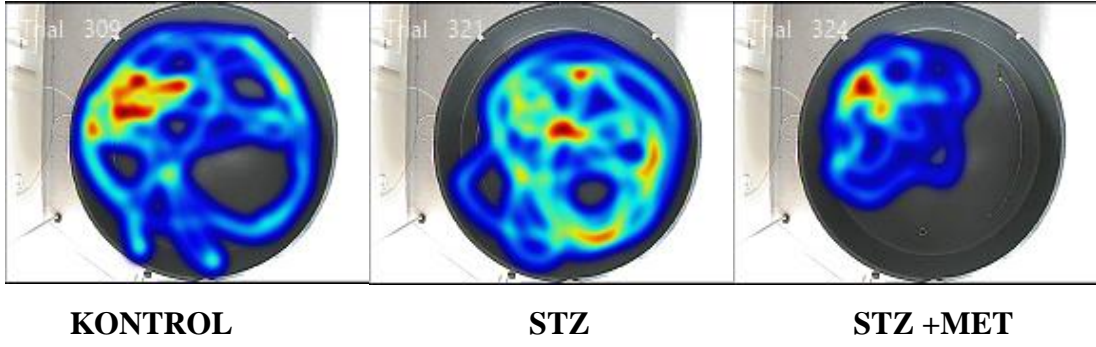
**Şekil 4.7:** MWM grupların 5. gün platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre (sn) bulguları veriler ortalama  $\pm$  SD. \*a kontrol ,\*b STZ grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.8:** MWM grupların 5.gün platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre (sn). Veriler ortalama  $\pm$  SD. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.9:** 4. Gün kuzey doğu yönünde yüzmek için bırakılan sıçanların platformu bulmak için izledikleri yolun heat map görüntüsü



**Şekil 4.10:** 5. Gün kuzey doğu yönünde yüzmek için bırakılan sıçanların platformsuz havuzda izledikleri yolun ısı haritası (heat map) görüntüsü

#### 4.5. Sıçanların Beyin Dokularında Oksidatif Stres Parametre Bulguları

**Tablo 4.6:** Sıçanların beyin dokularında oksidatif stres parametre bulguları

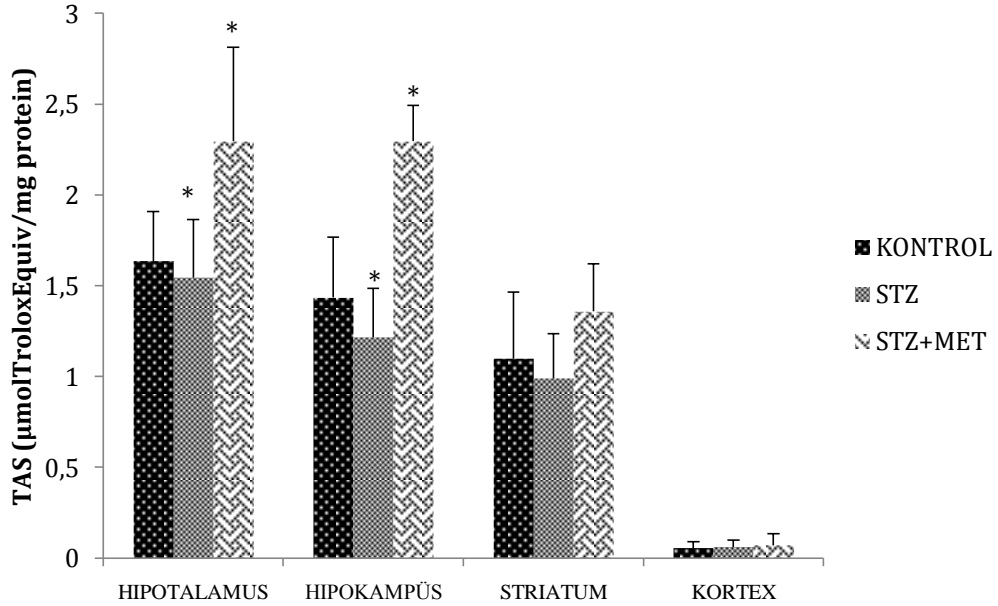
		SOD (U/mg protein)	GSH( $\mu$ mol/g doku)	MDA (nmol/g protein)
<b>Hipotalamus</b>	<b>KONTROL</b>	0.49 (0.00-0.94)	0.6 (0.47-6.65)	5.9 (2.9-12.2)
	<b>STZ</b>	0.37 <sup>a</sup> (0.09-0.46)	0.62 (0.51-0.75)	10.5 <sup>a</sup> (9.1-21.2)
	<b>STZ+MET</b>	0.31 <sup>a</sup> (0.21-0.67)	0.52 (0.4-0.88)	9.3 <sup>b</sup> (5.7-11.4)
<b>Hipokampus</b>	<b>KONTROL</b>	0.05 (0.02-0.08)	0.52 (0.45-0.56)	6.15 (3.34-16.26)
	<b>STZ</b>	0.17 <sup>a</sup> (0.00-0.35)	0.54 (0.49-0.72)	7.1 (4.98-9.74)
	<b>STZ+MET</b>	0.17 <sup>a</sup> (0.01-0.29)	0.43 (0.34-0.66)	6.67 (4.49-9.17)
<b>Striatum</b>	<b>KONTROL</b>	0.04 (0.00-0.05)	0.46 (0.05-0.72)	5.4 (2.56-9.16)
	<b>STZ</b>	0.21 <sup>a</sup> (0.07-0.37)	0.43 (0.38-0.56)	7.26 <sup>a</sup> (5.5-10.5)
	<b>STZ+MET</b>	0.15 (0.00-0.40)	0.48 (0.42-1.61)	6.76 (4.5-11.85)
<b>Kortex</b>	<b>KONTROL</b>	0.01 (0.00-0.05)	0.35 (0.28-0.49)	3.17 (2.52- 4.9)
	<b>STZ</b>	0.05 <sup>a</sup> (0.00-0.09)	0.35 (0.22-0.37)	3.75 (3.09-4.31)
	<b>STZ+MET</b>	0.07 <sup>a</sup> (0.06-0.09)	0.3 (0.2-0.56)	3.84 (3.42-5.1)
<b>Hipotalamus</b>	<b>KONTROL</b>		<b>TAS(mmol Trolox Eq/mg prot)</b>	<b>TOS (<math>\mu</math>molH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Eq/ mg prot)</b>
	<b>STZ</b>	1.27(0.64-1.85)	24 (14.9-33.6)	<b>OSI (arbitrary units)</b>
	<b>STZ+MET</b>	2.10 <sup>a</sup> (1.10-2.9)	27.4 (9.1-47.1)	25.4(11.7-31.5)
<b>Hipokampus</b>	<b>KONTROL</b>	2.52 <sup>a</sup> (1.23-2.76)	22.82 (13.7-33.8)	11.9 <sup>a</sup> (7.7-21.5)
	<b>STZ</b>	0.99 <sup>a</sup> (0.72-1.21)	26.4 (19.16-38)	11.26 <sup>a</sup> (7.3-18.6)
	<b>STZ+MET</b>	1.5 (0.98-1.95)	22.92 (19.8-28.9)	15.2 (13.5-21.7)
<b>Striatum</b>	<b>KONTROL</b>	1.32 <sup>a</sup> (0.83-1.56)	21.33 (1.9-44.53)	23.2 <sup>a</sup> (12.5-28.7)
	<b>STZ</b>	0.99 <sup>a</sup> (0.72-1.21)	22.63 (13.42-35.79)	28.4 <sup>a</sup> (17.1-32.6)
	<b>STZ+MET</b>	1.13 (0.6-1.67)	23.99 (12.56-33.74)	23.1 (15.2-26.5)
<b>Kortex</b>	<b>KONTROL</b>	0.93 (0.6-1.39)	7.38 (3.09-11.3)	24.5 (16.8-33.4)
	<b>STZ</b>	1.2 (0.18-2.5)	7.32 (5.74-11.8)	123.0 (66.3-560.7)
	<b>STZ+MET</b>	0.05 (0.01-0.12)	9.14 (6.77-22.98)	127.6 (56.5-608.5)
		0.05 (0.001-0.12)		320.0 (48.6-1001)

a: Kontrol e göre farklıdır; b: STZ e göre farklıdır. Veriler medyan (min-maks) veya ortalama (standart sapma) ile verildi. Verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. p<0,05 ve p<0,017 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



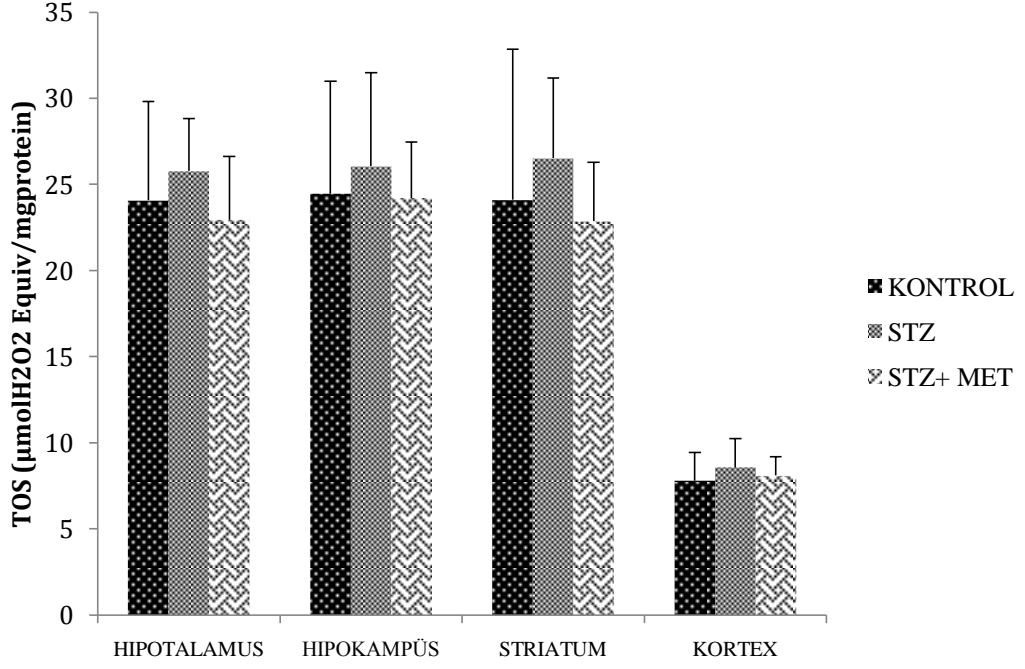
#### 4.5.1. Sıçanların Beyin Dokularında TAS –TOS- OSI Seviyesi

Beyin dokusunun farklı bölgelerinde değerlendirilen TAS değerleri şekil 4.11’de verildi. Hipotalamus hipokampüs ve striatum bölgelerinde STZ grubundaki azalış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmaz iken STZ+MET grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ).

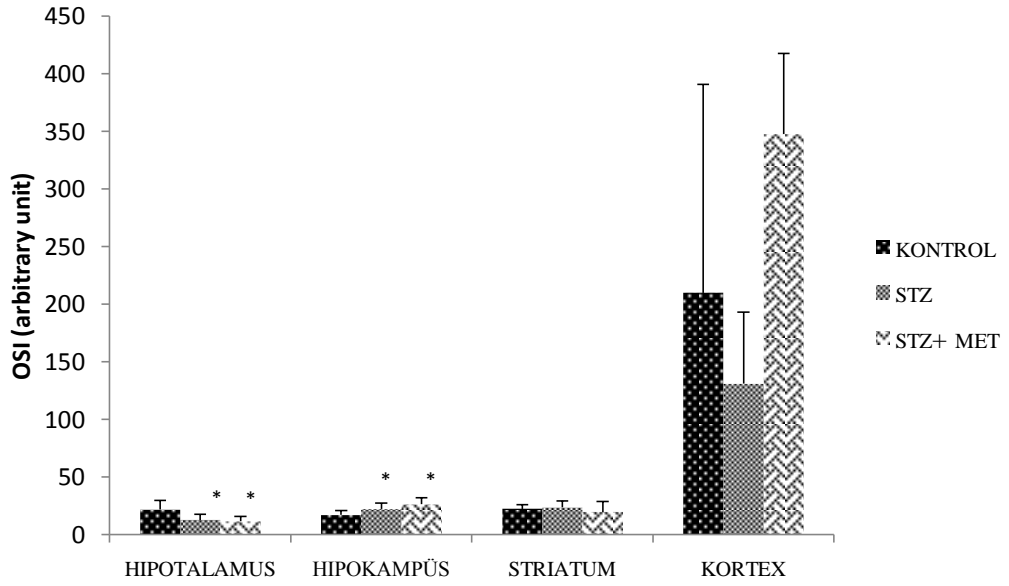


Şekil 4.11: Beyin dokusunun TAS analiz sonuçları. \*: Kontrol e göre farklıdır ( $p<0.05$ )

Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan TOS değerleri Şekil 4.12’de verildi. Hipotalamus, hipokampüs, striatum ve korteks bölgelerinde STZ grubundaki artış kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı bulunmaz iken STZ+MET grubundaki veriler kontrol grubu verilerine yakın değerlerde bulundu ve istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ).



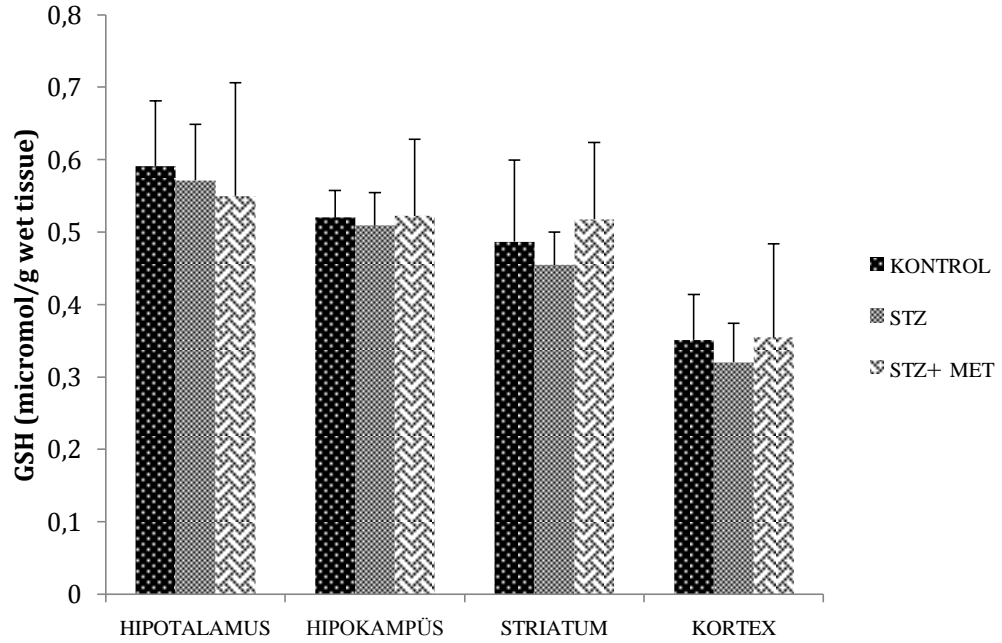
Şekil 4.12: Beyin dokusunun TOS analiz sonuçları



Şekil 4.13: Beyin dokusunun OSI analiz sonuçları\*: Kontrol e göre farklıdır (p<0.05)

#### 4.5.2. Sıçanların Beyin Dokularında GSH Seyiyesi

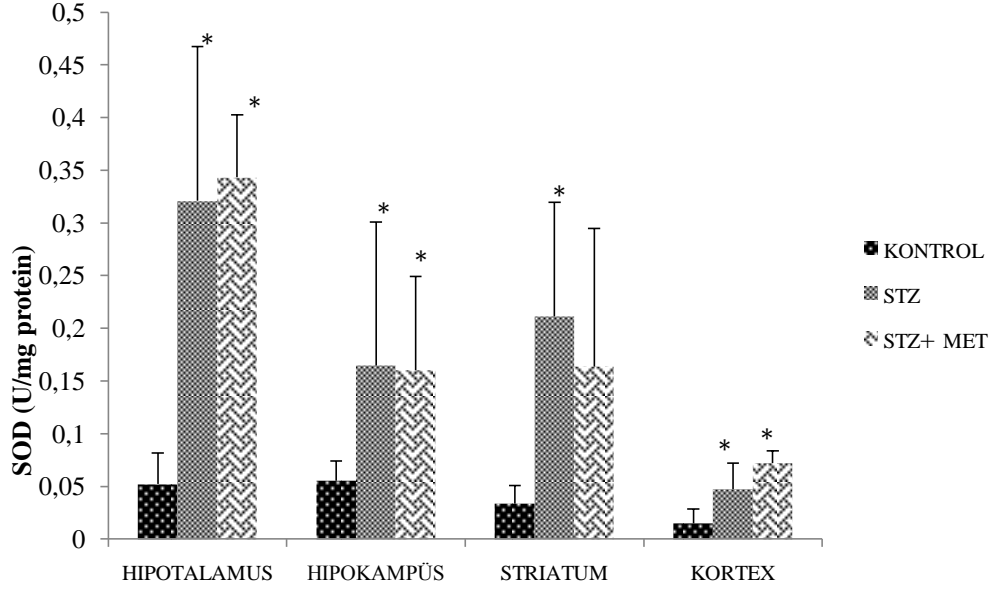
Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan GSH değerleri Şekil 4.14’de verildi. Hipotalamus, hipokampüs, striatum ve korteks bölgelerinde STZ grubundaki azalış kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı bulunmaz iken STZ+MET grubundaki veriler kontrol grubu verilerine yakın değerlerde bulundu ancak farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p<0.05$ ).



Şekil 4.14: Beyin dokusunun GSH analiz sonuçları

#### 4.5.3. Sıçanların Beyin Dokularında SOD Aktivitesi

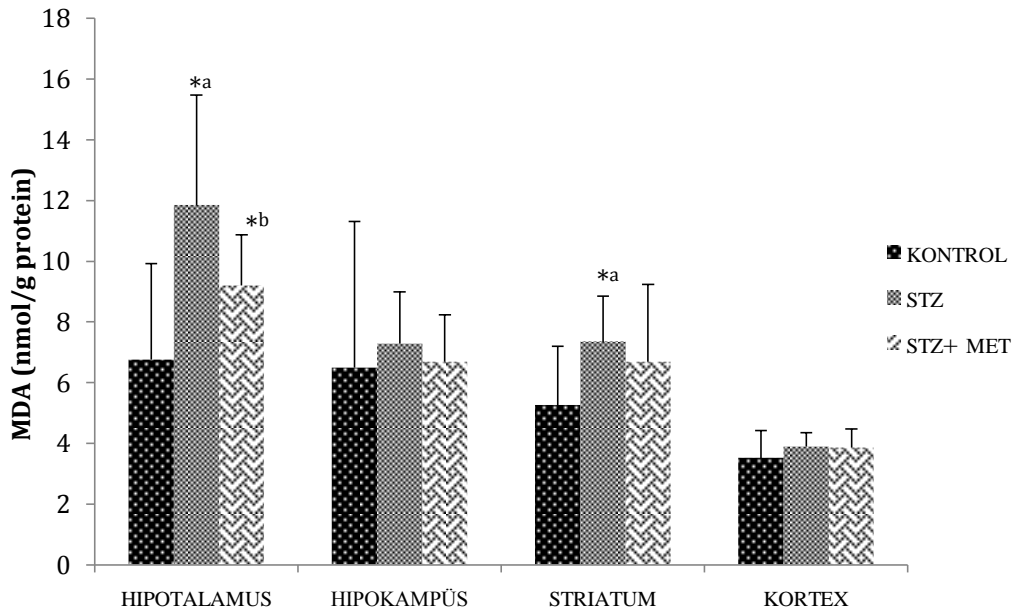
Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan SOD değerleri Şekil 4.15’de verildi. STZ ve STZ+MET gruplarında ki sıçanların hipotalamus, hipokampüs, striatum ve korteks bölgelerinde SOD enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0.05$ ).



Şekil 4.15: Beyin dokusunun SOD analiz sonuçları. \*: Kontrol e göre farklıdır (p<0.05)

#### 4.5.4. Sıçanların Beyin Dokularında MDA Seviyesi

Beyin dokusunun farklı bölgelerinde yapılan MDA değerleri Şekil 4.16'de verildi. MDA değerindeki artış STZ grubundaki hipotalamus dokuları hariç hipokampüs, striatum ve korteks bölgelerinde kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı değildi. STZ+MET grubundaki veriler kontrol grubu verilerine yakın değerlerde bulundu ve istatistik olarak anlamlı bulunmadı (p<0.05).

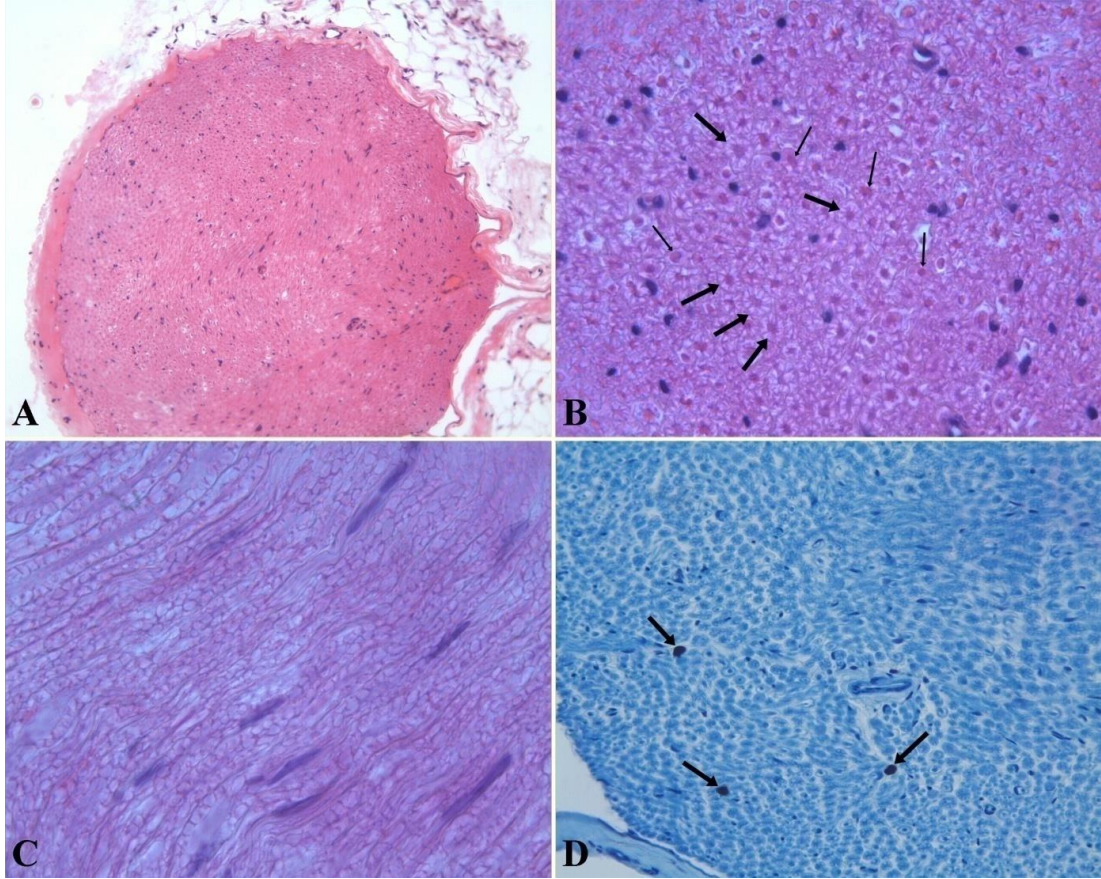


Şekil 4.16: Beyin dokusunun MDA analiz sonuçları. a: Kontrol ; b: STZ'den farklıdır. (p<0.05)

## 4.6. Histolojik Bulgular

### 4.6.1. Siyatik Sinir

Kontrol grubuna ait kesitlerde sinir tellerinin çoğunun normal histolojik görünümde olduğu (Şekil 4.17. A), her bir miyelinli sinir telinin, eozinofilik boyanan akson ve aksonu çevreleyen düzenli bir miyelin kılıftan oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.17. B ve C). Ayrıca, en yüksek mast hücre sayısı, bu grupta saptandı (Şekil 4.17. D).

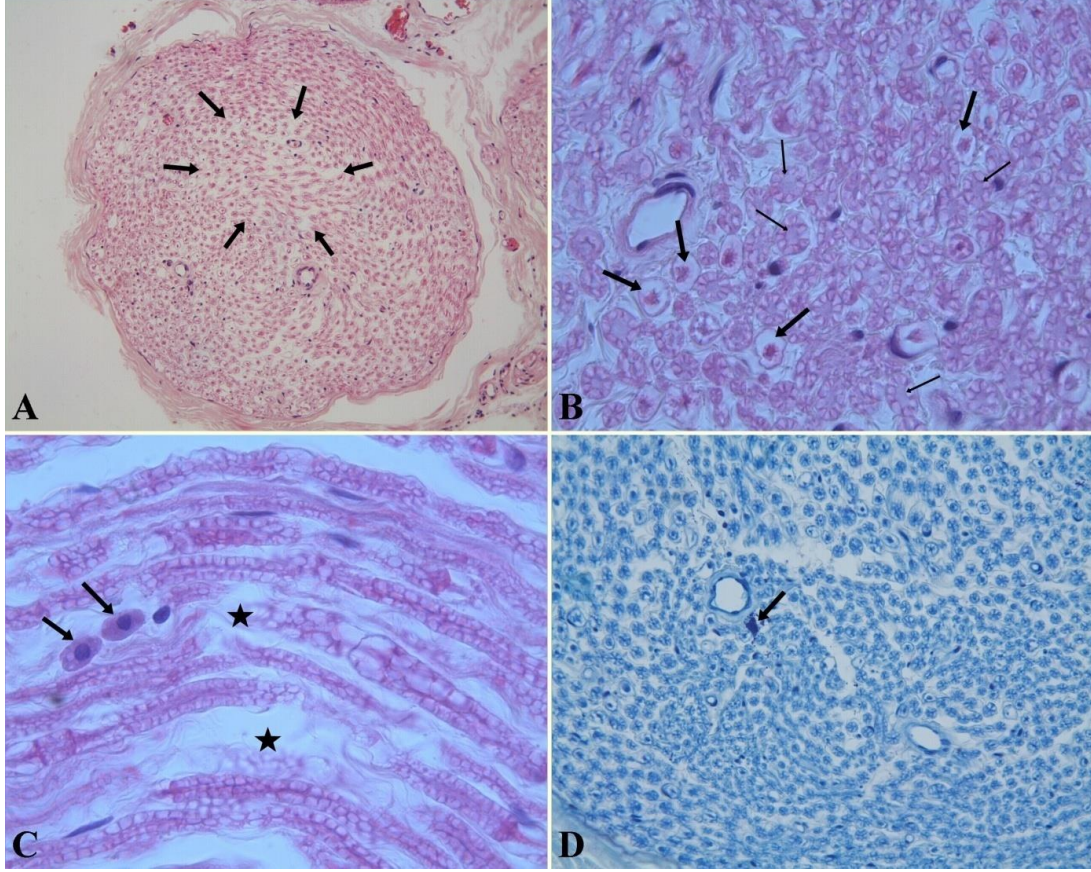


**Şekil 4.17:** (Kontrol Grubu) **A.** Siyatik sinirinin normal histolojik görünümü; H-E X20, **B.** Transvers kesit düzleminde, miyelinli bir sinir telinde akson (ince oklar) ve aksonu kuşatan düzenli myelin kılıf (kalın oklar); H-EX100, **C.** Longitudinal kesit düzleminde, miyelinli sinir telleri; H-EX100, **D.** Endonöriumda izlenen mast hücreleri (oklar), TM X40.

STZ grubunda incelenen kesitlerde, dejeneratif değişiklikler tespit edildi. Bu grupta, endonöriumda izlenen ödem nedeniyle sinir tellerinin birbirinden uzaklaştığı gözlemlendi (Şekil 4.18. A). Çok sayıda miyelinli sinir telinin normal histolojik görünümünün bozulduğu, aksonların dejenerasyona uğrayarak soluklaştığı ve miyelin

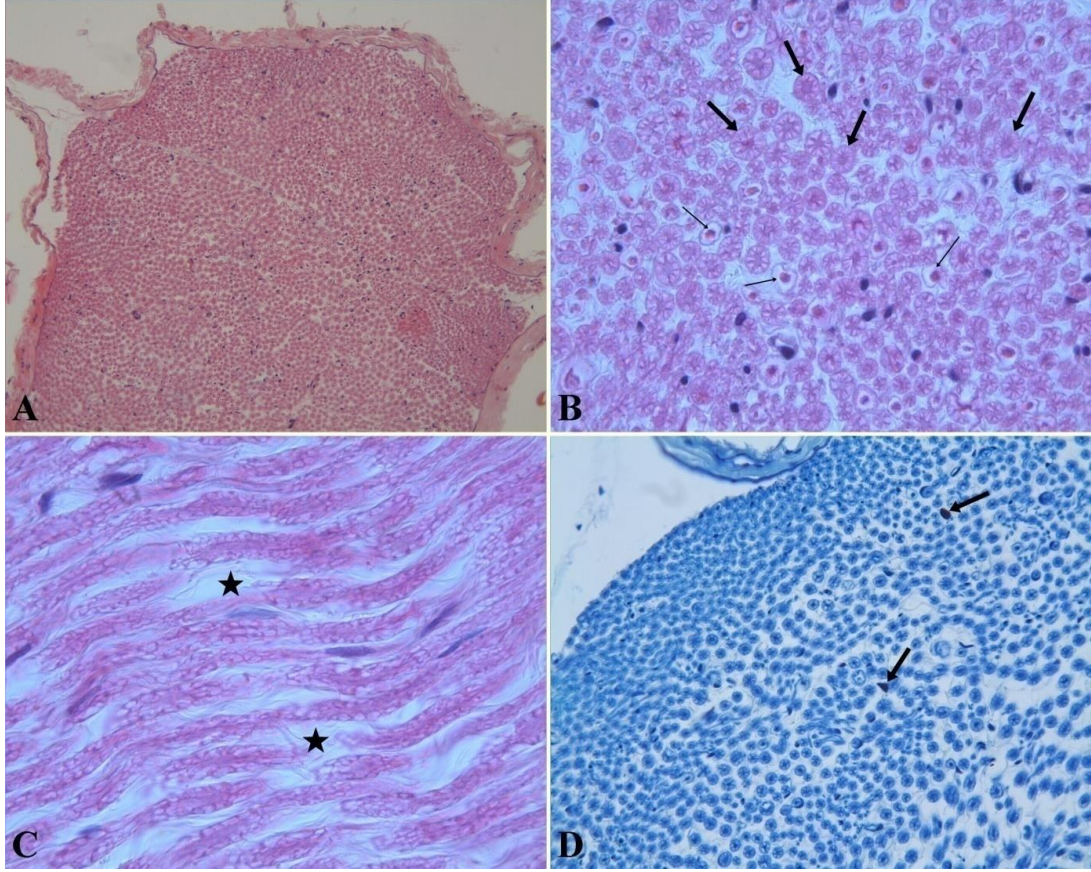


kılıf yapısının bozulduğu izlendi (Şekil 4.18. B ve C). Diğer yandan bu grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mast hücre sayısının (Şekil 4.18. D) istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ( $p=0.004$ ).



**Şekil 4.18:** STZ Grubu **A.** Endonöriumda ödem izlenmekte (oklar); H-E X20, **B.** Transvers kesit düzleminde, akson (ince oklar) ve miyelin kılıf (kalın oklar) dejenerasyonu izlenmekte; H-EX100, **C.** Longitudinal kesit düzleminde, endonöriumda ödem (yıldızlar) ve makrofajlar dikkati çekmekte; H-EX100, **D.** Endonöriumda izlenen mast hücreleri (oklar), TM X40.

STZ+MET grubu, STZ grubu ile karşılaştırıldığında histolojik hasar skoru, istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmasına rağmen ( $p=0.001$ ), miyelin kılıf hasarı ve ödem gibi değişiklikler devam etmekteydi.



**Şekil 4.19:** STZ + MET grubu **A.** Siyatik sinirin genel görünümü (oklar); H-E X20, **B.** Transvers kesit düzleminde, normal görünümdeki sinir telleri (kalın oklar) arasında izlenen dejenere sinir telleri (ince oklar); H-EX100. **C.** Longitudinal kesit düzleminde, endonöral ödemde azalma (yıldızlar) H-EX100, **D.** Endonöriyumda izlenen mast hücreleri (oklar), TM X40.

Grupların siyatik sinir histolojik skorları Tablo 4.7’de, mast hücre sayıları Tablo 4.8’de verildi.

**Tablo 4.7:** Grupların histolojik skorları.

Gruplar	Kontrol	STZ	STZ + MET
<b>Histolojik Skor</b>	0.0 (0.0 – 1.0)	2.0 (0.0 – 3.0) <sup>a</sup>	1.0 (0.0 – 3.0) <sup>b</sup>

a; Kontrol grubuna göre anlamlı artış (p=0.001), b; STZ grubuna göre anlamlı azalma (p=0.001)



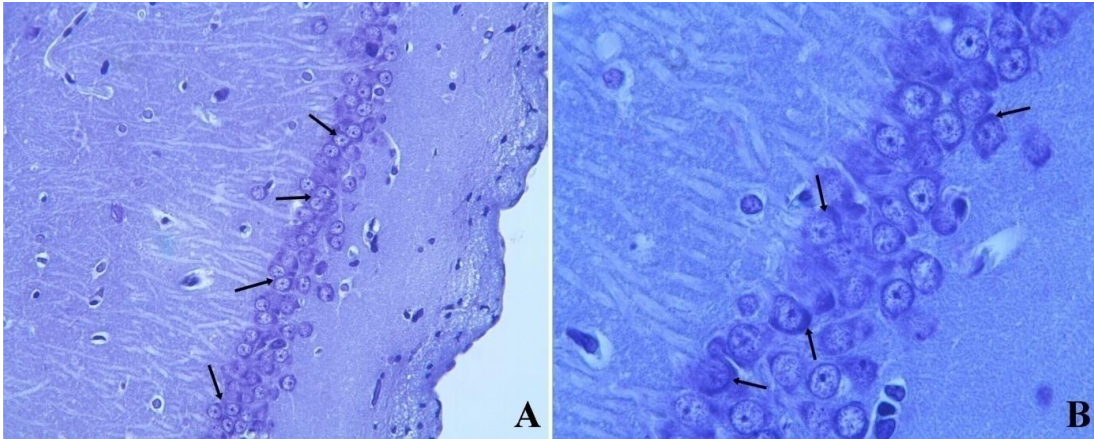
**Tablo 4.8:** Grupların mast hücre sayısı

Gruplar	Kontrol	STZ	STZ + MET
Mast Hücre Sayısı	2.0 (0.0 – 7.0)	1.0 (0.0 – 5.0) <sup>a</sup>	1.0 (0.0 – 6.0) <sup>b</sup>

a; Kontrol grubuna göre anlamlı azalma ( $p=0.004$ ).b; STZ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel fark yok ( $p=0.132$ )

#### 4.6.2. Hipokampus Dokusu

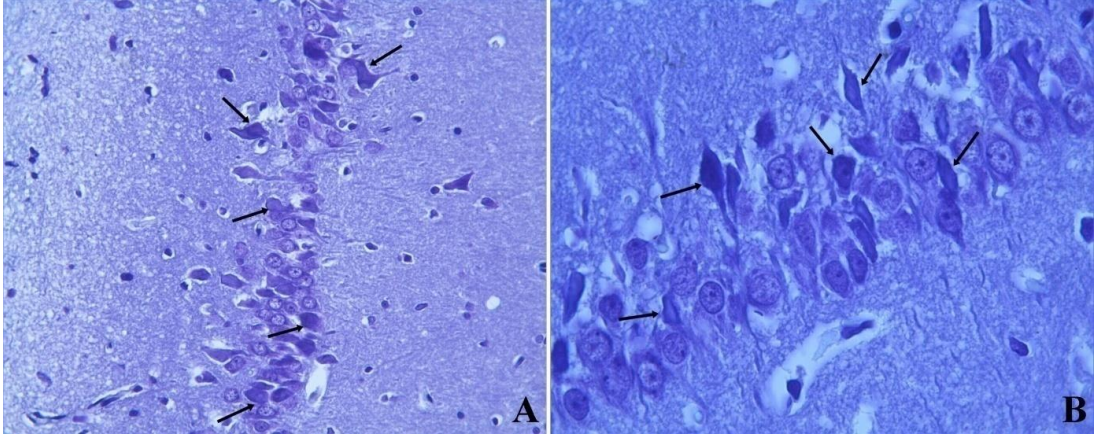
Kontrol grubuna ait kesitlerde, incelenen nöronların %80.4'ünün normal histolojik özelliklere sahip olduğu izlendi. Yuvarlak, büyük ve ökromatik nükleuslu olan bu nöronların sitoplazmalarında perinükleer yerleşimli belirgin Nissl granülleri gözlemlendi (Şekil 4.20; A ve B).



**Şekil 4.20:** Kontrol Grubu histolojik görünümüleri normal olarak izlenen piramidal nöronlar (oklar). A; KV X40, B; KV X100.

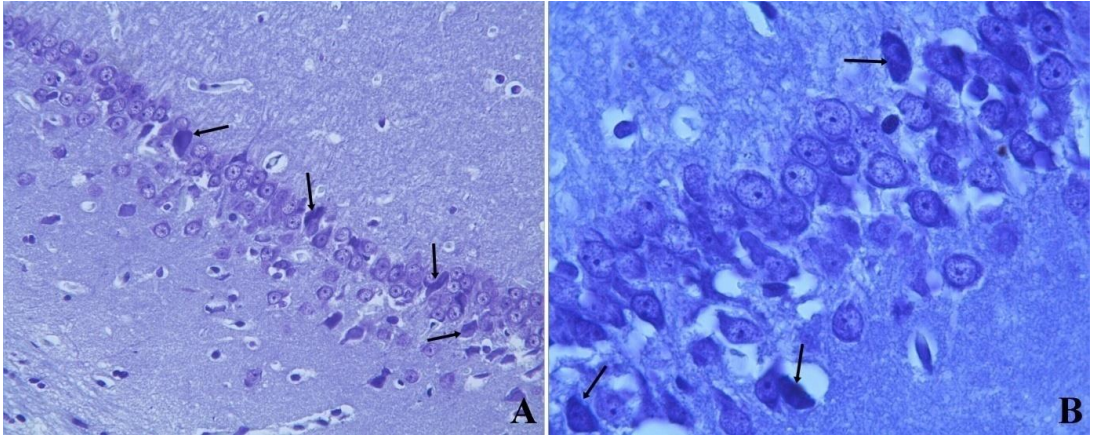
STZ grubuna ait kesitlerde nöron kaybı ve nöronal değişiklikler izlendi. İncelenen kesitlerde, nöronların % 45.6'sının dejeneratif değişikliklere sahip olduğu tespit edildi. Dejenere nöronlar, piknotik nükleusları ve büzülmüş sitoplazmaları ile ayırt edildi (Şekil 4.21; A ve B). Bu gruptaki dejenere nöron sayısının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı ( $P=0.000$ ).





**Şekil 4.21:** Büzülmüş sitoplazması ve piknotik nükleusları ile ayırt edilen dejenere nöronlar (oklar). A; KV X40, B; KV X100.

STZ + MET grubuna ait kesitlerde, nöronların %36.5'inin dejenere olduğu tespit edildi (Şekil 4.22; A ve B). Diğer yandan bu grupta normal histolojik özelliklere sahip nöron sayısının, STZ grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı ( $P=0.000$ ).



**Şekil 4.22:** Dejenere nöron yoğunluğunun STZ grubuna göre azaldığı dikkati çekmekte (oklar). A; KV X40, B; KV X100.

Gruplardaki normal ve dejenere nöronların sayıları Tablo 4.9'da, yüzdeleri Tablo 4.10'da verilmiştir.

**Tablo 4.9:** Hipokampus bölgesinde gruptaki normal ve dejenere nöronların sayısı.

<b>Gruplar</b>	<b>Kontrol</b>	<b>STZ</b>	<b>STZ + MET</b>
<b>Normal Nöron</b>	61.0(25.0– 105.0)	32.0 (9.0 – 57.0) <sup>a</sup>	53.0(34.0– 80.0) <sup>b</sup>
<b>Dejenere Nöron</b>	4.0 (0.0 – 30.0)	25.0 (4.0 – 42.0) <sup>c</sup>	31.0 (7.0 – 56.0)

a; Kontrol grubuna göre anlamlı azalma (p=0.001).b; STZ grubuna göre anlamlı artış (p=0.001). c Kontrol grubuna göre anlamlı artış (p=0.001).

**Tablo 4.10:** Gruptaki normal ve dejenere nöronların yüzdeleri (%).

<b>Gruplar</b>	<b>Kontrol (%)</b>	<b>STZ (%)</b>	<b>STZ + MET (%)</b>
<b>Normal Nöron</b>	84,4	54,4	63,5
<b>Dejenere Nöron</b>	15,6	45,6	36,5

a; Kontrol grubuna göre anlamlı azalma (p=0.001).b; STZ grubuna göre anlamlı artış (p=0.001). c; Kontrol grubuna göre anlamlı artış (p=0.001).

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında; diyabetle gelişen nöropati ve bilişsel fonksiyonlardaki bozulmaları ve metforminin etkisini araştırmayı amaçladık. STZ ile oluşturulan diyabet modeli ile merkezi ve periferik sinirlerde oluşan yapısal ve fonksiyonel bozulmalar altında yatan mekanizmaları fizyolojik, biyokimyasal ve histolojik olarak inceledik.

Çalışmamızda kontrol grubu ile kıyaslandığında diyabetik sıçanların vücut ağırlıklarındaki anlamlı azalma ilk haftadan itibaren çalışmamız boyunca devam etti. Diyabette kilo kaybının vücut hücrelerinin enerji için glikozu kullanamamasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Altı hafta boyunca kilo takibinde STZ+MET grubunda haftalık kilo değişimi STZ grubuna göre daha ılımlı ve kontrollüdür. Çalışmamızdaki bulgular literatürdeki çalışma sonuçlarını destekler yöndedir.

Çalışmamızda tüm sıçanların haftalık kan glikoz düzeyleri ölçüldü. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda çalışma boyunca kan glikoz düzeyi 200 mg/dl üzerindeydi. STZ+MET grubunda ortalama glikoz düzeyi kontrol grubuna göre yüksek, STZ grubuna göre daha düşük düzeylerde ölçüldü. Böylece STZ+MET grubunda devam eden diyabetle beraber gelişen komplikasyonlara karşı metforminin koruyuculuğunu araştırmak için çalışmamızın modelinin oluşumunu sağlandı.

Diyabetli hastalarda glikoz kullanımı bozulmaktadır. Bu durum, başta kan damarları ve sinirler olmak üzere çoğu vücut sistemlerini ciddi biçimde hasara uğratan kan glikoz düzeyinin artmasına neden olur (104-106). Diyabet tedavisinde asıl amaç kan glikoz düzeyini normal aralıklarda tutarak hastanın yaşam süresini arttırmak ve gelişen komplikasyonları azaltmaktır. Klasik tedaviye ve mikro-makrovasküler hastalıkları önlemeye yönelik yaklaşımlar iyileştikçe bu hastalıkla yaşam süresi uzamaktadır. Bu eğilim Tip II DM'in mevcut tedavi stratejileri ile hedef alınamayan yeni komplikasyonlarının ortaya çıkabileceği anlamına gelmektedir. Bilişsel bozulma ve demans bu yeni komplikasyonlara örnektir. Son yıllarda diyabet ile bilişsel bozukluklar arasındaki ilişki çok daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır.

Bizimde çalışmamızın Morris Water Maze bulgularına göre diyabet grubundaki hayvanların platformu bulma süreleri uzarken platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre azalmıştır. Ayrıca yol haritaları incelendiğinde yine diyabetli gruptaki hayvanların platformu bulmak için katettiği yollar karışık ve daha uzun bulunmuştur. Bu bulgular literatürdeki bilişsel fonksiyonlara ilgi elde edilen verilerle uyumlu bulunmuştur.

Diyabetin hipokampüsdeki nöronal yapılarda nörotransmitter salgılanması ve nörotransmitterlerin reseptörlerle kombinasyonu düzeyinde kimyasal, yapısal ve fonksiyonel çeşitli bozulmalara ve nöronal apoptozise neden olarak bilişsel fonksiyonları bozduğu bildirilmiştir (106-109).

Literatürde diyabetik sıçanlarda serebral kan akımının azaldığı ve serebral disfonksiyon gelişmesinde vaskülopatinin etkili olduğu bildirilmiş ve sıçanlarda MWM öğrenme performansında görülen bozulma bu durum ile ilişkilendirilmiştir (110). Ancak Tip I ve Tip II diyabetin öğrenme ve hafıza işlevleri üzerine olan etkileri konusunda ılımlı bazı çelişkiler de rapor edilmiştir. Özellikle dikkat ve kısa süreli hafızanın diyabetten etkilenmediği bildirilmektedir. Sıçanlarda diyabetin bilişsel fonksiyonlara etkisini araştıran Papovic ve ark. (111) STZ enjeksiyonunu takiben 1., 8. ve 14. günlerde gelişen diyabetin öğrenme performansını azalttığı yönünde sonuçlar elde etmişler ve öğrenme performansındaki azalmanın zamana bağlı olarak hipokampüsdeki nöronal ve sinaptik bozulmaya paralel geliştiğini, insülin tedavisi ile ilişkili olarak geri döndüğünü bildirmişlerdir.

Çalışmamızda beynin hipokampus bölgesinde yapılan histolojik incelemelerde dejenere nöronlar sayıldı ve bunların dejenere olmayan nöronlara yüzdeleri hesaplanarak değerlendirildi. Kontrol grubundaki dejenere nöron oranı % 15,6 iken, STZ grubundaki oran % 45,6'dır. Bu histolojik bulgular diyabetle gelişen yapısal bozukluğu destekler niteliktedir. STZ+MET grubundaki %36,5 dejenere nöron oranı STZ grubuyla kıyaslandığında yapısal hasar devam etmekle beraber, anlamlı derecede iyileşme gözlemlenmiştir. Bu bulgular metforminin beyin dokusunda nöroprotektif etkisinin olduğunu ve diyabetle beraber gelişen nöron hasarını azaltmaya yardımcı olduğunu göstermektedir. Literatürdeki diğer birçok araştırma da diyabete bağlı olarak öğrenme ve belleğin komponentleri üzerinde ortaya çıkan zayıflamanın, beynin öğrenmede rol alan hipokampus vb. bölgelerinde zamana bağlı olarak oluşan nörokimyasal değişikliklerle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (112,113). Ayrıca, araştırmalar periferik glikoz düzeylerinin bilgi depolanması işlemleri üzerinde önemli bir rolü olduğunu, beyin hücrelerinin insülden bağımsız olarak glikoz alımı yapmaları nedeni ile kan glikoz düzeyindeki artışın öğrenme performansında da artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Glikozun hayvanlarda ve insanlarda hafızayı geliştirdiği, hafızayı geliştirici etkisinin santral kolinerjik sistem üzerinde gerçekleştiği kabul gören bir düşüncedir. Çünkü santral etkili kolinerjik antagonistler uygulandığında glikozun bu etkisi oluşmamıştır (114,115)

Diyabetik nöropati sinir ileti hızının, ağrı eşiğinin ve kan akımının azalmasıyla karakterizedir. Bu nedenle bu çalışmada STZ ile oluşturulan diyabetin periferik sinire etkilerinin yapısal değişiklikleri de incelenmiştir. STZ ile oluşturulmuş deneysel diyabette termal analjezi gelişmesi konusunda farklı görüşler mevcuttur. Bazı araştırmacılar geliştiğini savunurken bazı araştırmacılar gelişmediği şeklinde görüş bildirmişlerdir (116-119). Çalışmamızda da diyabetik sıçanlarda termal hipoaljezinin geliştiği hot-plate cihazı kullanılarak belirlendi. Diyabet gelişimini takiben yedi gün sonra ölçülen hayvanların hot plate testine beş gün öğrenmeleri sağlanan ve altıncı gün yapılan hot plate test değerlerine göre; diyabetli sıçanların hot plate bulguları kontrol grubundaki hayvanların değerleri ile kıyaslandığında ısıyı hissetme zamanları anlamlı olarak uzamış bulundu. Metformin tedavisinin diyabetli sıçanlarda bu süreyi kontrol grubuna yakınlaştırdığını gözlemlendi. Deneyin son günü sıçanlar sakrifiye edilmeden önce son kez hot plate testi yapıldı ve bulgular altıncı gündeki bulgulara paralellik göstermekle beraber STZ grubundaki ağrı hissetme süresi daha geç olurken, metformin uygulanan tedavi grubu arasındaki farkın daha fazla olduğu izlendi.

Çalışmamızda yapılan histolojik incelemeler de STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda diyabetin kronik etkisi sonucu siyatik sinirde birtakım yapısal değişiklikler saptanmıştır. Bu değişikliklerin belirlenmesinde akson ve miyelin kılıfta dejenerasyon ve endonöriyumda ödem varlığı değerlendirilmiştir. Diyabetli gruplarda miyelin kılıfdaki dejenerasyon artarken mast hücre sayısında istatistiksel azalmalar bulunmuştur. STZ+MET grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında siyatik sinirdeki diyabetik hasar devam etmekle birlikte iyileşme olduğu gözlemlenmiştir. STZ+MET grubu STZ grubu ile kıyaslandığında ise anlamlı bir şekilde iyileşme olduğu belirlenmiştir. Bu bulgulara göre diyabetin erken dönemlerinde görülen sinir işlev bozukluklarının, intrinsik ve akson zarındaki fizyolojik anormalliklerden kaynaklandığı düşünülebilir. Çalışma bulgularımız ışığında metforminin diyabetik nöropatinin gelişimini engellemede yararlı olabileceğini ve böylece hastaların yaşam kalitesini arttırabileceğini önerebiliriz.

Diyabetin tedavisine yönelik yapılan araştırmaların diğer bir kısmı da hastalıkta bozulan oksidan/antioksidan dengenin düzeltilmesine yönelik çalışmalardır. Bu çalışmalar ya antioksidan savunma sistemini güçlendirmeye ya da oksidatif strese bağlı hasarı azaltmaya yöneliktir (107). Diyabette, serbest radikallerin fazlaca yükselişi ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin zayıflaması, yalnızca hücrenel

organellerin ve enzimlerin hasarına değil, lipit peroksidasyonunun artmasına ve insülin reseptörlerinin insüline karşı duyarlılıklarının azalmasına neden olmaktadır (108).

Serbest radikallerin lipitler üzerine yaptığı etki lipit peroksidasyonu (LP) olarak adlandırılır. Diyabetteki hiperglisemi, serbest radikal oluşumuna ve antioksidan sistemin yetersiz kalmasına yol açarak oksidatif stresi artırmaktadır (114). Bizim çalışma bulgularımızda da benzer etki gösterdi. Çalışma sonuçlarına göre STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların beyin dokularında lipit peroksidasyonu arttı ve bu artış kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Yine STZ+MET tedavi grubundaki MDA düzeyi diyabet grubuyla kıyaslandığında azalma olduğu ve kontrol grubuyla kıyaslandığında gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Bu da metforminin beyin dokusunda lipit peroksidasyonunu engelleyerek koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

DM'tan dolayı poliols (sorbitol) yolu aktivitesindeki artış NADPH ve NAD<sup>+</sup> azalması ve hücrel redoks potansiyelinde değişiklikler ile sonuçlanır. Bu durum hücre içi GSH eksikliğine yol açar ve antioksidatif etkinin engellenmesi ile hücrelerin artmış oksidatif stres ile mücadelesini azaltır (120). Çalışmamızda metformin uygulanan grupların GSH düzeylerinin artması, metforminin güçlü antioksidan aktivitesinden kaynaklandığını düşündürmektedir (121-123).

Hücreyi serbest radikallerin toksik etkilerine karşı koruyan SOD enzim aktivitesinin diyabette değişmediği, azaldığı ya da arttığı konusunda çalışmalarda farklı sonuçlar saptanmıştır (124-126). Bizim çalışma bulgularımıza göre de STZ uygulanan diyabetik gruplarda normal kontrol gruplarına göre beyin dokusunda SOD aktivitesi yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda SOD enzim aktivitelerinde saptanan artışın, diyabette artmış lipit peroksidasyonuna karşı gelişmiş bir cevap olarak düşünülebilir.

Çalışma bulgularımızda diyabet grubunda TOS sonuçları kontrol grubuna göre aşırı artış gösterirken metformin grubunda sonuçlar kontrol grubuna yakındır. TOS düzeyindeki artışa karşın diyabetli sıçanlarda TAS düzeyindeki azalma, tüm deney gruplarına göre çok daha fazladır. Çalışmamızın bu bulgularına göre; metforminin diyabet kaynaklı oluşabilecek oksidatif strese bağlı olarak gelişen  $\beta$  hücre disfonksiyonunu azaltarak diyabetik tedavi açısından yararlı olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres hipotezinde reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan savunma kapasitesi arasındaki dengesizlik diyabetin kronik komplikasyonlarına neden olmaktadır. Bir başka deyişle hiperglisemi oksidatif strese yol açmaktadır.

Çalışmamızdaki bulgulara göre; anti diyabetik olarak kullanılan ve aynı zamanda antioksidan özelliği olan metforminin, diyabet tedavisinin yanı sıra sekonder gelişen bilişsel fonksiyonlar ve nöropati üzerinde de etkili olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; metformin antidiyabetik ve antioksidan etkisiyle, STZ ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde periferik nöropati üzerine etkisini siyatik sinir üzerinde koruyuculuğu ile merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisini de bilişsel fonksiyonları düzenleyerek göstermiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışma sonuçlarımıza göre STZ uygulaması sıçanlarda ortalama glikoz düzeyinin 200mg/dl üzerine çıkmasına neden oldu.
- STZ ile diyabet gelişen sıçanlarda haftalık ortalama canlı ağırlıklarında kontrol grubundaki sıçanlara göre düşüş gözlemlendi.
- Metformin tedavisi uygulanan sıçanlarda ise kilo kaybı tedavi görmeyen gruba göre daha yavaş görüldü.
- Periferik nöropatinin değerlendirildiği ısı duyarlılık testinde diyabetli sıçanlarda kontrol grubuna göre ısı hissetme süresi uzarken metformin tedavisinin bu süreyi kısalttığını gözlemledik.
- Histolojik incelemeler ile metforminin STZ uygulanarak diyabet gelişen sıçanlardaki siyatik sinir hasarını onarmada faydalı olabildiğini gözlemledik.
- Mevcut literatür kapsamında diyabetik sıçanlardaki bozulan bilişsel fonksiyonlar üzerine metforminin koruyuculuğu ilk kez bu çalışma ile gösterildi.
- MWM ile değerlendirmiş olduğumuz bilişsel fonksiyon test sonuçlarına göre diyabetli sıçanlarda platformu bulma süreleri ve kat edilen mesafe uzarken metformin tedavisi uygulanan grupta platformu bulma süresi ve katedilen mesafe azaldı.
- Beynin öğrenme ve hafızayla daha yoğun olarak ilgili olduğu bilinen hipotalamus, hipokampus, striatum ve korteks bölgelerinde yapmış olduğumuz biyokimyasal incelemeler ile diyabetle birlikte gelişen oksidatif stresin etkilerini azaltmada metforminin anti oksidan etkisi ile faydalı olmuş olabileceği kanaatindeyiz.
- Hipokampus bölgesinde yapılan histolojik incelemeler ile metforminin dejenere nöron sayısını azaltarak nöroprotektif etki gösterdiğini gözlemledik.
- STZ ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde periferik ve merkezi sinir sistemi yapısal ve fonksiyonel olarak bozulmaktadır. Günümüzde diyabet tedavisinde kullanılmakta olan metformin çalışma bulgularımıza göre antioksidan ve nöroprotektif etkisi ile nöropatinin ve bilişsel fonksiyon bozukluklarının gelişimini engellemeye yardımcı olabilir.



## KAYNAKLAR

- 1- Anonymous. Web sitesi( <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014>) Erisim Tarihi:27.05.2014
- 2- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R. and King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004, Vol. 27, pp. 1047-53
- 3- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183–97
- 4- Anonymous. 2003. Follow- up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, Vol. 26, pp. 3160-7
- 5- Anonymous. 2008. Report Standards of Medical Care in Diabetes-2008. American Diabetes Association, *Diabetes Care*, Vol. 31, pp. 12-54
- 6- Hatemi H., Biyal F. ve Korugan Ü. *Diabetes Mellitus*. 1983,1.baskı. Dergah Yayınları,İstanbul
- 7- Bishop M., Duben-Engelkirk J. and Fody E. *Clinical Chemistry*. 4th ed.,Lippincott Williams and Wilkins, pp. 220-1. Philadelphia, USA.2000
- 8- Foulis A.K. and Clark A. 1994. Pathology of the pancreas in diabetes mellitus, In: Joslin's diabetes mellitus.
- 9- Kahn C.R and Weir, G.C. 13th ed. Lea&Febiger,pp. 265-266, Philadelphia.
- 10- Özata, M. ve Yöner, A. 2006. *Endokrinoloji Metabolizma ve Diabet*. Medikal Yayıncılık, 1. Baskı: 275-343 s., istanbul
- 11- Luxton R. *Clinical Biochemistry* 1999..Butterworth-Heinemann Company, pp.111-112, Oxford.
- 12- Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji* 1993. Feryal Matbacılık, Ankara,
- 13- Aguirre V. and White M. 2000. Dysregulation of IRS-proteins causes insulin resistance and diabetes. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes.*, Vol.7, pp. 1-7
- 14- Kelley D. and Goodpaster B. 2001. Effects of exercise on glucose homeostasis in type 2 diabetes mellitus. *Medicine and Science in Sports and Exercise.*, Vol. 33, s.495-501
- 15- Belfiore F. and Iannello S. Etiological classification, pathophysiology and

- diagnosis, In: New concepts in diabetes and its treatment. 2000. pp. 3-19, Switzerland
- 16-Bühling, K. and Dudenhausen, J. *Diabetes and pregnancy* 2001.Ernähr.-Umsch.,pp.48
- 17-Murray RK., Granner D.K., Maye, PA. and Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. 2000 25th ed. Appleton & Lange Stamford, Connecticut, pp.611-7
- 18-Mentes J. Diabetik Retinopati.(<http://www.thehealthnews.org/tr/special/GOZ.HASTALIKLARI/index.html>.) Erisim Tarihi: 13.10.2009
- 19-Gücükoglu A. Diabetik Retinopati (<http://www.vizyongoz.com/diabetret.html>.) Erisim Tarihi: 10.08.2009
- 20-Kurt M., Atmaca A. ve Gürlek A. Diyabetik Nefropati 2004. *Hacettepe Tıp Dergisi*, Cilt 35, s. 12-17
- 21- Çeliker A., 2009. Periferik Nöropati ([www.farma.hacettepe.edu.tr/hizbim/perifnoro.html](http://www.farma.hacettepe.edu.tr/hizbim/perifnoro.html).) Erisim Tarihi: 23.09.2009.
- 22-Boulton AJM., Arezzo JC., Malik RA, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies.*Diabetes Care* 2004; 27: 1458-86
- 23- Çelik M, Barkut K, Pazarcı NK, Taşpınar Ş. Karpal tünel sendromu klinik tanıli diabetik hastalarda elektrofizyolojik bulgular. *İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi* 2006, cilt 69, sayı 3: 70- 741,2
- 24-Ertekin C. Diyabetik nöropatiler. *Santral ve Periferik EMG Anatomi- Fizyoloji-Klinik*, Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, Türkiye 2006 :211- 28
- 25-Dyck PJ., Thomas PK. *Pathology- Symmetric Polyneuropathy. Peripheral Neuropathy*, 3th edition, W.B- Saunders Company, USA 1993: 1230
- 26-Ropper AH., Brown RH.. Diabetic neuropathy, *Adam's and Victor's Principles of Neurology*, 8th edition, The McGraw Hill Companies, inc, USA 2006: 1134-6, 20,21
- 27-Lindström P, Lindblom U, Brismar T. Delayed recovery of nerve conduction and vibratory sensibility after ischaemic block in patients with diabetes mellitus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63: 346-50
- 28-Stevens JC. The electrodiagnosis of carpal tunnel syndrome. *Muscle Nerve* 1997; 20: 1477- 87
- 29-Vinik Al. Diabetic Neuropathy. Pathogenesis and therapy. *Diabetes Care* 1992, 15: 1926-75
- 30-Steward JD. Pathological processes producing focal peripheral neuropathies. *Focal*

- Peripheral Neuropathies*. Elsevier, New York ,USA, 1987: 8- 29
- 31-Nishimura T, Hirata H, Tsujii M. Pathomechanism of entrapment neuropathy in diabetic and nondiabetic rats teared in wire cages .*Histol Histopathol*, 2008 Feb; 23(2): 157- 66
- 32-Berne RM., Levy MN., Koepfen BM., Stanton BA. *Fizyoloji* (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Çevirisi). Ankara- Güneş Tıp Kitabevi (2008).
- 33-Korkmaz Ö., Mahiroğlu A. Beyin, Bellek ve Öğrenme. *Kastamonu Eğitim Dergisi* - 2007., 15 (1), 93–104
- 34-Karadeniz , Bayrak B., Sinir Hücrelerinde İletim ve Bunun Öğrenme Sürecine Etkisi. *Ahmet Kelesoğlu Eğitim Fakültesi Dergisi* -2008, 25, 101-13
- 35-Keles E., Çepni S., Beyin ve Öğrenme. *Türk Fen Eğitimi Dergisi* -2006, 3 (2),66–82
- 36-Ganong WF., *Tıbbi Fizyoloji* -2002 (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. (2001).
- 37-Johnson E., Adamo-Villani N.A Study of the effects of immersion on shortterm spatial memory. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 2010;71,582–587.
- 38- Baddeley AD. The episodic buffer: a new component of working memory .*Trends in Cognitive Science* 2000; 4, 417-23.
- 39-Benfenati F. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed* 2007; 78,1, 58–66
- 40-Erdoğan S. İleriye Dönük Bellek Bozukluğu. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*; 2010- 2(2), 174–89
- 41-Demirci S., Esel E.. Öğrenme ve hafızanın hücrenel düzenekleri ve psikiyatrik hastalıklarla ilişkisi. *Anadolu Psikiyatri Dergisi* 2004;5,239–48
- 42-Miyamoto E. Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity: Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *J Pharmacol Sci* 2006; 100, 433–42
- 43-Kurt İ. Glikozile Hemoglobin (HbA1c) Ölçümü ve Diabetes Mellitusun Uzun Dönem Glisemik Kontrolünde Kullanılması. *Gülhane Tıp Dergisi*-2003; 45 (4), 387–95
- 44-Bailey CH., Bartsch D., Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 93,13445–52
- 45-Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001, 25, 311–23

- 46-Plum L., Belgardt BF., Brüning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation* 2006, 116 (7), 1761-6
- 47-Gerozissis K. Brain Insulin: Regulation, Mechanisms of Action and Functions. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2003, 23,(1),1–25
- 48-Hörsch D., Kahn R. Region Specific mRNA Expression of Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulatory Isoforms in the Central Nervous System of C57BL/6J Mice. *The Journal of Comparative Neurology* 1999, 415,105–20.
- 49-Zhao W., Chen H., Xu H., Moore E., Meiri N., Quon MJ., Alkon D. Brain Insulin Receptors and Spatial Memory. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274(49), 34893–902
- 50-Plum L., Schubert M., Brüning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2005,16,(2),59–65
- 51-Brands A., Biessels GJ., Haan EHF., Kappelle LJ., Roy PC., Kessels RPC. The Effects of Type 1 Diabetes on Cognitive Performance. *Diabetes Care* 2005, 28, 726–35
- 52-Jonasson JM., Ljung R., Talback M., Haglund B., Gudbjörnsdottir S. and Steineck G. Insulin glargine use and short-term incidence of malignancies-a population-based follow-up study in Sweden. *Diabetologia* 2009, Vol. 52(9), pp.1745-54
- 53-Parving H., Gall M. and Skott P. Prevalence and causes of albuminuria in noninsulin-dependent diabetic patients. *Kidney International* 1992, Vol. 41, pp. 758-62
- 54-Day C. and Bailey CJ. Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* 1988 , Vol. 15, pp. 755-72
- 55-Melander A. Oral antidiabetic drugs: andoreview. *DiabeticMedicine* 1996, Vol.13,pp. 143-7
- 56-Balasubramanyam M. and Mohan V. Orally active insulin mimics: where do we stand now ?. *Journal of Biosciences* 2001, Vol. 26, pp. 383-90
- 57-Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007;100(3):328–41. doi:10.1161/01. PMID 17307971
- 58-Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman M, Goodyear L, Moller D. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001,108(8):1167–74. doi:10.1172/JCI13505. PMID 11602624
- 59-Bliss, M. The Discovery of Insulin. *University of Chicago Press* 2000., pp. 321-418,Chicago, USA

- 60-Chen D. and Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2005., Vol. 7, pp. 307-17
- 61-Rees DA. and Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 2005., Vol. 22, pp. 359-70
- 62-Masiello P. Animal models of type-2 diabetes with reduced pancreatic O-cell mass. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2006, Vol. 38, pp. 873-93
- 63-Fröde TS. and Medeiros YS. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2008, Vol. 115, pp. 173-83
- 64-Lenzen S., Tiedge M., Jörn, A. and Munday R. Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. In: Shafrir E Lessons from animal diabetes, 1996; pp 113-22 Birkhäuser, Boston
- 65-Clark SA., Borland KM., Sherman SD., Rusack TC. and Chick WL. Staining and in vitro toxicity of dithizone with canine, porcine, and bovine islets. *Cell Transplant* 1994, Vol. 3, pp. 299-306
- 66-White FR.. Streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Reports* 1963, Vol. 30, pp. 49-53
- 67-Schein PS., Cooney DA. and Vernon ML. The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Research* 1967, Vol. 27, pp. 2324-32
- 68-Arison RN., Ciaccio EI., Glitzer MS., Cassaro JA. and Pruss MP. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes* 1967, Vol. 16, pp. 51-56
- 69-Lenzen S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced Diabetes. *Diabetologia* 2008, Vol. 51, pp. 216-26
- 70-Tjalve H., Wilander E. and Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *Journal of Endocrinology* 1976, Vol. 69, pp. 455,456
- 71-Karunanayake EH., Baker JR., Christian RA., Hearse DJ. and Mellows G. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (14C) streptozotocin in the rat. *Diabetologia* 1976, Vol. 12, pp. 123-8
- 72-Schnedl WJ., Ferber S., Johnson JH. and Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2- expressing cells. *Diabetes* 1994, Vol. 43, pp. 1326-33
- 73-Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R. and Lenzen S. Relative importance

- of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000, Vol. 43, pp. 1528-33
- 74-Murata M., Takahashi A., Saito I. and Kawanishi S. Sitespecific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochemical Pharmacology* 1999, Vol. 57, pp.881-7
- 75-Yamamoto H., Uchigata Y. and Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981, Vol. 294, pp. 284-6
- 76-Sandler S. and Swenne I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia* 1983, Vol. 25, pp. 444-7
- 77-Wilson GL., Hartig PC., Patton NJ. and Le Doux SP. Mechanisms of nitrosourea-induced beta cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes* 1988., Vol. 37, pp. 213-6
- 78-Turk J., Corbett JA., Ramanadham S., Bohrer A. and Mc Daniel ML. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993, Vol. 197, pp. 1458-64
- 79-Delaney CA., Dunger A., DiMatteo M., Cunningham JM., Green MH. and 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. *Biochemical Pharmacology* 1995, Vol. 50, pp. 2015-20
- 80-Nukatsuka M., Yoshimura Y., Nishida M. and Kawada J. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *Journal of pharmacobiodynamics* 1990, Vol. 13, pp. 259-62
- 81-Choi SB., Park CH., Choi MK., Jun DW. and Park S. Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2004., Vol.68, pp. 2257-64
- 82- Liu JP., Zhang M., Wang WY. and Grimsgaard S. Chinese herbal medicines for type-2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004, Vol.3, pp. 3642-5
- 83-Halliwell B., Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, *Oxford Science Publications* ,3th edition, 2001, 22-24

- 84-Altan N., Dinçel AS., Koca C. Diabetes mellitus and oksidatif stress. *Turk J Biochem* 2006, 31 (2), 51-6
- 85-Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri* 1995, 1.baskı, Konya: Mimoza Yayınları
- 86-Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 2000, 109 (1), 33-44
- 87-Verit FF, Erel O, Sav M, et al. Oxidative stress is associated with clinical severity of nausea and vomiting of pregnancy. *Am J Perinat* 2007, 24:545-8
- 88-Serafini M., Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report* 2004, 9 (3), 145-52
- 89-Evans JL., Goldfine ID., Maddux BA., Grodsky GM. Are oxidative stress activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. *Diabetes*, 2003, 52, 1-8
- 90-Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001, Vol. 414(6865), pp. 813-20
- 91-Türkmen F., Akkus M., Büyükbaş S. ve Çılgı A. Diabetes Mellitus'da biyokimyasal değişimler ve komplikasyonlar. *Türkiye Klinikleri* 1990, Cilt 10(1),s. 1-10
- 92-Eidland A., Sebekova K. and Schinzel R. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *American Journal of Kidney Diseases* 2001., Vol. 38(4), pp. 100-6
- 93-Way KJ., Katai N. and King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine* 2001, Vol. 18(12), pp. 945-59
- 94-Adiga S., Bairy KL., Meharban A. and Punita ISR. Hypoglycemic effect of aqueous extract of *Trichosanthes dioica* in normal and diabetic rats. *International Journal of Diabetes in Developing Countries* 2010, Vol. 30, pp. 38-42.
- 95-Arulmozhi S., Mazumder PM., Lohidasan S. and Thakurdesai P. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of leaves of *Alstonia scholaris* Linn. R.Br. *European Journal of Integrative Medicine* 2010, Vol. 2, pp. 23-32
- 96-Eddy NB, Leimback D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutenylamines. *J Pharmacol Exp Therapy* 1953, 107:385-93
- 97-Sun Y., Oberley LW., Li YA. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988, 34, 497-500

- 98-Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-8
- 99-Esterbauer H., Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology* 1990;V 186 ,oxygen radicals in biological systems. California:Academic Press, 16,407-21
- 100-Lowry OH., Rosenbrough NJ., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193, 265-75
- 101-Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 2005, 38: 1103-11
- 102-Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry* 2004, 37: 277-85
- 103-Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats hiranya pintana et al. *Life sciences* 2012, 91(2012) 409-14
- 104- Avcı A. Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Antioksidan Savunma Sistemi ve E Vitaminin Etkileri. Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2001
- 105- Sharma RD, Sarkar A, Hazra DK, Mishra B, Singh JB, Sharma SK, Maheshwari BB, Maheshwari PK. Use of Fenugreek seed powder in the management of noninsulin dependent diabetes mellitus. *Nutrition Research* 1996, 16: 1331-9
- 106-Phillips M., Cataneo RN., Cheema T., Greenberg J. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clinica Chemica Acta* 2004, 344, 189-194
- 107-Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AAF. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* 2002, 946 (2): 221-31
- 108-Gardoni F, Kamal A, Belone C, et al. Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats. *J Neurochem* 2002, 80(3): 438-47
- 109-McEwen BS, Magariños AM, Reagan LP. Studies of hormone action in the hippocampal formation possible relevanceto depression and diabetes. *J Psychosoma Res* 2002, 53(4): 883-90
- 110-Pilkis SJ, el-Maghrabi MR, Claus TH. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Review of Biochemistry*,1988, 57: 7557-83
- 111-Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, Kaneto H, Watada H, Kuroda A,



- Kawamori D, Yasuda T, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. Probuocol preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 2002, 57: 1-10
- 112- Woods JR., Plessinger MA., Miller RK. Vitamins C and E: missing links in preventing premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2001, 185, 5-10
- 113-Aragno M., Tamagno E., Gatto V., Brignardello E., Parola S., Danni O. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 1999, 26(11/12), 1467-74
- 114-Karasu Ç. Increased activity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in aorta isolated from chronically streptozotocin-diabetic rats: Effects of antioxidant enzymes and enzyme inhibitors. *Free Radical Biology and Medicine* 1999 , Vol. 27, pp. 16-27
- 115-Altan N., Yigit S., Elmalı E., Malhatun E., Rota S. and Kılıç N. Effects of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase in streptozotocine-induced diabetic rat muscle. *General Pharmacology* 1997, Vol. 28, pp. 795,796
- 116-Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MT., Mazur M. and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007, Vol. 39, pp.44-84
- 117-Lubin BH., Shohet SB. and Nathan DG. Changes in fatty acid metabolism after erythrocyte peroxidation: stimulation of a membrane repair process. *Journal of Clinical Investigation* 1972, Vol. 51, pp. 338-44
- 118-Burton GW. Antioxidant action of carotenoids. *Journal of Nutrition* 1989, Vol. 119, pp. 109-11
- 119-Mead JF. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins synthesis. *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease* 1984, Raven Press, pp. 53-66, New York
- 120-Güzel S., Seven A., Civelek S., Salman S., Satman Burçak G. Tip 1 diyabetiklerin erken ve geç döneminde antioksidan statüsü, *Cerrahpasa Tıp Dergisi* 2001, Cilt 32(4), s. 243-8
- 121-Chakraborty U. and Das H. Antidiabetic and antioxidant activities of Cinnamomum tamala leaf extracts in stz-treated diabetic rats. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 2010, Vol. 5, pp. 12-8
- 122-Karthikesan K., Pari L. and Menon VP. Protective effect of tetrahydrocurcumin and

chlorogenic acid against streptozotocin nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *Journal of Functional Foods* 2010, Vol. 2, pp. 134-42

123-Saravanan G. and Ponmurugan P. Ameliorative potential of S-allyl cysteine on oxidative stress in STZ induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* 2011, Vol. 189, pp. 100-6

124-Huang C., Yin M. and Chiu L. Antihyperglycemic and antioxidative potential of Psidium guajava fruit in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* 2011, Vol. 49, pp. 2189-95

125-Qi MY., Kai-Chen Liu, HR., Su YH. and Yu SQ. Protective effect of Icariin on the early stage of experimental diabetic nephropathy induced by streptozotocin via modulating transforming growth factor O1 and type IV collagen expression in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2011, Vol. 138, pp. 731-6

126-Volpato GT., Calderon IM., Sinzato S., Campos KE., Rudge MV. and Damasceno DC. Effect of Morus nigra aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2011, Vol. 138, pp. 691-6

## EKLER

### Ek 1: Etik Kurul Belgesi



#### İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

#### DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 14-10-2014  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol no.su : 2014/A-77  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : *Rat*  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : *Wistar albino*  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 30 Adet  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 180-220 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Ergül ALÇİN'in yürütücüsü olduğu "Streptozotosin İle İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Modelinde Metforminin Diyabetik Nöropati Ve Bilişsel Fonksiyonlar Üzerine Etkisinin Araştırılması" isimli 2014/A-77 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara 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

Katılmadı  
Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ  
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ  
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN  
Üye

Salih AVCI  
Sivil Üye

Katılmadı  
Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU  
Sivil Üye

## **Ek 2: 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 Ünv Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı'nda başlamış olduğum lisansüstü eğitimime devam etmekteyim.2012 yılından beri İnönü Ünv Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilimdalı'nda asistanım ve Fizyoloji Anabilimdalı'nda lisansüstü eğitimim devam etmektedir.