

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN DİABETİN
İNFLAMAZOM ARACILI NÖROİNFLAMASYON VE
HİPOKAMPAL ÖĞRENME ÜZERİNE ETKİSİ

Büşra ONAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK

ZONGULDAK

2019

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN DİABETİN
İNFLAMAZOM ARACILI NÖROİNFLAMASYON VE
HİPOKAMPAL ÖĞRENME ÜZERİNE ETKİSİ

Büşra ONAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK

ZONGULDAK
2019

KABUL ve ONAY :

“STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN DİABETİN İNFLAMAZOM ARACILI NÖROİNFLAMASYON VE HİPOKAMPAL ÖĞRENME ÜZERİNE ETKİSİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Fizyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Yüksek Lisans Programı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

26.06.2019

Başkan : Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK (Danışman)

Üye :Prof. Dr. Şerif DEMİR

Üye :Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK

ONAY :

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

TARİH: 26.06.2019

Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, sabrı ile beni teşvik edip çalışmama yön veren kıymetli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK'a, eğitimim süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi İnci TURAN'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmamın deney aşamasında bilgi ve emeğini paylaşan, desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım Vet. Hekim Osman CENGİL'e, Öğr. Görevlisi Birgül ALTUĞ'a ve Öğr. Görevlisi Meryem ERGENÇ'e çok teşekkür ederim.

Yalnız eğitim hayatım değil hayatım boyunca sevgisiyle, sabrıyla, anlayışıyla hep yanımda olan ve bugünlere gelmemde büyük payı olan sevgili babaanneme, dedeme, babama, tüm bu süreçte bana destek olup benimle birlikte en telaşlı günlerimde aynı tempoyu yaşayan eniştelere, halalarım ve kıymetli geniş aileme tüm kalbimle sevgilerim ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (BAP No: 2017-26259946-01)

Büşra ONAR

Haziran 2019, ZONGULDAK

ÖZET

Büşra Onar, Streptozotosin ile Oluşturulan Diabetin İnflamazom Aracılı Nöroinflamasyon ve Hipokampal Öğrenme Üzerine Etkisi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2019.

Diabetes Mellitus öğrenme ve hafıza bozukluğu ile birlikte dir. Nöroinflamasyon sitokinlerin yapımını içeren diyabetin patofizyolojik bir işaretidir. Nitratif hasarın diyabetin patofizyolojik mekanizmasında yer aldığı ileri sürülmektedir. Nod-benzeri reseptör pirin domain inflamazomlar IL-1 β ve IL-18 yapımı ile inflamatuvar cevabın gelişiminde önemlidir. Çalışmamızda diyabetin sebep olduğu öğrenme bozukluklarının oluşumunda oksidatif stresin etkisini ve inflamasyonun rolünü araştırdık. Bu amaçla diyabetik sıçanların hipokampüsünde nitrotirozin, NLRP3 ve IL-1 β düzeylerini inceledik. Çalışmamızda 24 adet yetişkin erkek Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Deneysel hayvanları; 1) normoglisemik kontrol (n:12), 2) diyabetik kontrol (n:12) şekilde 2 ana gruba ayrılmıştır. Diyabetik gruptaki hayvanlara intraperitoneal yoldan 60 mg/kg tek doz streptozotosin uygulamasıyla diyabet oluşturuldu. Hayvanlar feda edilene kadar vücut ağırlıkları ve kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Morris su labirenti sıçanların kognitif fonksiyonlarını değerlendirmek için kullanıldı. Hipokampüs dokusunda nitrotirozin, NLRP3 inflamazomu ve IL-1 β düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. İstatistiksel değerlendirme Mann Whitney U testi ile yapıldı. 4 hafta sonunda diyabetik sıçanların vücut ağırlığı anlamlı şekilde azalmış, kan glukoz düzeyleri anlamlı derecede artmış bulundu. NLRP3 ve nitrotirozin seviyelerinin diyabetik sıçanların hipokampüslerinde arttığı bulundu. Diyabet ile hipokampal IL-1 β düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmadı. Morris su labirent testinde diyabetik hayvanlar kontrollerle karşılaştırıldığında saklı platformu bulmak için daha fazla zaman harcayarak öğrenmenin anlamlı olarak bozulduğunu göstermektedir ve bu bozulma 5.günde istatistiksel olarak anlamlıydı. Sonuçlarımız streptozotosin ile oluşturulan diyabetin muhtemelen hipokampüste NLRP3 seviyesini arttırarak ve nitrozatif stres oluşumu ile sıçanlarda öğrenme bozukluğuna neden olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Nitrotirozin, NLRP3, IL-1 β , Morris su labirent testi

ABSTRACT

Büşra Onar, The Effect of Streptozotocin Induced Diabetes on Inflammasome Mediated Neuroinflammation and Hippocampal Learning, Zonguldak Bülent Ecevit University, Health Sciences Institute, Department of Physiology, Master Thesis, Zonguldak, 2019.

Diabetes mellitus is associated with impaired learning and memory. Neuroinflammation is a pathophysiological hallmark of diabetes which include production of cytokines. It was suggested that nitrate injury has been implicated in the pathophysiologic mechanism of diabetes. Nod-like receptor family pyrin domain inflammasomes are important in the development of inflammatory response through production of IL-1 β and IL-18. In our study, we investigated the effect of oxidative stress and the role of inflammation in the formation of learning disorders caused by diabetes. For this purpose, we examined the levels of nitrotyrosine, NLRP3 and IL-1 β in the hippocampus of diabetic rats. In our study, 24 adult male Wistar-Albino rats were used. The experimental animals were divided into two groups: 1) normoglycemic control (n: 12), 2) diabetic control (n: 12). The rats in diabetic model were induced by single dose streptozotocin (60 mg/kg) intraperitoneal injection. Body weight and blood glucose were measured until euthanasia. Morris water maze was used to evaluate the cognitive function in rats. Nitrotyrosine, NLRP3 inflammation and IL-1 β levels were measured by ELISA method in hippocampus tissue. Statistically analyses were performed by Mann Whitney U test. At the end of 4 weeks, the body weight of diabetic rats decreased and blood glucose levels were significantly increased. NLRP3 and nitrotyrosine levels were found to be increased in hippocampus of diabetic rats. There was no statistical significance in the hippocampal IL-1 β level with diabetes. In the Morris water maze, diabetic rats spent more time to find the submerged platform when compared with control rats, implying a significant impairment of learning, this impairment was found to be statistically significant at day 5. Our results indicate that streptozotocin induced diabetes causes learning impairment in rats probably by generating nitrosative stress and increasing NLRP3 level in the hippocampus.

Key Words: Diabetes, Nitrotyrosin, NLRP3, IL-1 β , Morris water maze test

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ KABUL VE ONAY	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TABLO DİZİNİ	xi
ŞEKİL DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes Mellitus	3
2.2. Diyabetin Komplikasyonları	4
2.3. Diyabetin Merkezi Sinir Sistemi Komplikasyonları.....	4
2.4. Hipokampus ve Bilişsel İşlevler	7
2.5. Diyabet ve Bilişsel İşlev Bozuklukları.....	8
2.5.1. Diyabetik bilişsel işlev bozukluklarının patofizyolojisi.....	8
2.6. İnflamasyon.....	10
2.6.1. İnflamasyon ve sitokinler.....	10
2.6.2. Nöroinflamasyon.....	11
2.6.3. Diyabet patogeneğinde ve komplikasyonların gelişiminde inflamasyon. 12	
2.6.4. Diyabetik bilişsel işlev bozukluklarında inflamasyonun rolü.....	13
2.7. Oksidatif Stres.....	14
2.7.1. Oksidatif stres biyobelirteçleri	15
2.7.2. Diyabet ve oksidatif stres	17
2.7.3. Diyabetik bilişsel işlev bozukluklarında oksidatif stresin rolü	19
2.8. İnflamazomlar	20
2.8.1. NLRP3 inflamazomu	21
2.8.2. Diyabet ve komplikasyonlarda inflamazomların rolü.....	22
2.9. Diyabetin Deneysel Hayvan Modelleri.....	23
2.9.1. Deneysel hayvan modellerinde davranış testleri.....	24

3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Deney Hayvanları.....	26
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	26
3.3. Deney Hayvanlarında Diyabet Oluşturulması	27
3.4. Kan Glukoz Düzeylerinin ve Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi	27
3.5. Davranış Testi	27
3.5.1. MWM testi	27
3.6. Doku Örneklerinin Alınması.....	29
3.7. Nitrotirozin, NLRP3 ve IL-1 β Düzeylerinin Belirlenmesi	29
3.7.1. Fosfat tampon solüsyonun (PBS) hazırlanması	29
3.7.2. Doku homojenatlarının hazırlanması	29
3.7.3. Nitrotirozin tayini.....	30
3.7.4. NLRP3 tayini	30
3.7.5. IL-1 β tayini	30
3.8. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları ve Kan Glukoz Düzeyleri.....	32
4.2. Deney Hayvanlarında MWMT Sonuçları	32
4.3. Diyabetik Hayvanlarda Oksidatif Stres Değişiklikleri.....	33
4.4. Diyabetik Hayvanlarda İnflamazom Değişiklikleri	34
4.5. Diyabetik Hayvanlarda Sitokin Değişiklikleri	35
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇLAR	40
7. KAYNAKLAR	41
8.EKLER.....	58
Ek 1: Etik Kurul Onayı	58
9. ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

AD	: Alzheimer hastalığı
AGE	: Advanced glycation end product
AIM2	: Absent in melanom 2
BDNF	: Beyinden kaynaklanan nörotrofik faktör
CA1	: Cornu ammonis 1
CA2	: Cornu ammonis 2
CA3	: Cornu ammonis 3
CO ₃ ⁻	: Karbonat radikali
CRP	: C reaktif protein
DG	: Dentat girus
DM	: Diyabetes Mellitus
GABA	: γ -aminobütirik asid
GSDMD	: Gasdermin D
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IFN- γ	: İnterferon gama
IL	: İnterlökin
IL-1 β	: İnterlökin 1 beta
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
i.p	: İntraperitoneal
i.v	: İntravenöz
K ⁺	: Potasyum iyonu
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojenle aktiveştirilen protein kinaz
MS	: Multiple Skleroz
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MWMT	: Morris su labirent test
NF- κ B	: Nükleer faktör kappa B
NLRP3	: Nod-benzeri reseptör pirin domain 3
NO	: Nitrik Oksit
NO ₂	: Azot dioksit radikalleri
NT	: Nitrotirozin
3-NTProt	: 3 nitrotirozin proteinleri

$O_2^{\cdot-}$: Süperoksit radikali
OH^{\cdot}	: Hidroksil radikali
$ONOO^{\cdot}$: Peroksinitrit
OxLDL	: Oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein
PD	: Parkinson hastalığı
PKC	: Protein kinaz-C
RNS	: Reaktif azot türevleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
STZ	: Streptozotosin
T1 DM	: Tip 1 Diyabetes Mellitus
T2 DM	: Tip 2 Diyabetes Mellitus
TGF- β	: Tümör büyüme faktörü beta
TRX	: Tioredoksin
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör alfa

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. Deney Gruplarına Ait Vücut Ağırlıkları ve Kan Glukoz Düzeyleri	32
2. MWMT’de Saklı Platformu Bulma Süreleri.....	32



ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Diyabetik komplikasyonların moleküler mekanizması.....	5
2. Diyabetik nöropati patogenezi	6
3. Hipokampüsün fonksiyonel anatomisi	7
4. Nöroinflamasyon oluşumunda başlıca yollar.....	12
5. Nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonda sitokin aktivasyonu.....	13
6. Başlıca oksidan kaynakları ve üretim yolları.....	15
7. Proteinlerin oksidatif modifikasyonları.....	16
8. Beyinde gerçekleşen nitro oksidatif stres.....	19
9. İnflamatuar hastalıkta inflamazom aktivasyon mekanizması	21
10. NLRP3 inflamazom aktivasyonun mekanizması	22
11. Diyabet sırasında NLRP3 inflamasyon aktivasyonu.....	23
12. Çalışmamızda kullanılan Morris su labirenti (A). Gizli platformu bulmaya çalışan sıçan (B).	28
13. Sıçanların havuza bırakıldıkları yönler	29
14. Tüm grupların MWMT’de saklı platformu bulma süresi (sn)	33
15. Hipokampüs dokusunda nitrotirozin (ng/mL) düzeyleri.....	34
16. Hipokampüs dokusunda NLRP3 (ng/mL) düzeyleri.....	34
17. Hipokampüs dokusunda IL-1 β (ng/mL) düzeyleri.....	35

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM) çok yönlü bir metabolik hastalıktır ve şu anda dünya genelinde en önemli sağlık sorunlarından biridir. Diyabetin birçok organ ve sistemi etkileyen komplikasyonları vardır. Bunun yanında merkezi sinir sisteminde (MSS) metabolik, yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olur.

Diyabet hastalarında bilişsel işlev bozuklukları ve demans yaygın olarak görülmektedir (1, 2, 3). Diyabette görülen bilişsel işlev bozukluğunun kesin patofizyolojisi tam olarak anlaşılmamıştır, ancak hiperglisemi, vasküler hastalık, inflamatuvar süreç ve insülin direncinin rol oynadığı düşünülmektedir (4).

Bilişsel işlev bozukluklarında hipokampüsteki değişikliklerin önemli bir yeri vardır. Diyabet, Alzheimer hastalığı (AD) ve Parkinson hastalığı (PD) gibi nörodejeneratif hastalıklarda hipokampüste belirgin değişiklikler gözlenmektedir (5). DM'nin neden olduğu kognitif fonksiyon bozukluklarının diyabetli deneklerde normal bireylere göre 1.5 kat daha fazla olduğu artan kanıtlarla ortaya konmuştur. Deneysel hayvan çalışmalarında, diyabetin hipokampüste yapısal ve fonksiyonel değişiklikler yaparak bilişsel işlev bozukluğuna sebep olduğu gösterilmiştir (6). Değişik faktörlerin ve mekanizmaların bu bozuklukta rol aldığı ifade edilmektedir. Bunlar arasında ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) birikmesi, oksidatif stres ve inflamasyon en çok vurgulanan sebepler arasında gözükmektedir (7, 8).

Kan glukoz seviyesinde artış ve insülin sinyal eksikliği proksidan bir ortama yol açar. Glukoz oksijen ile reaksiyona girer ve kognitif fonksiyon bozukluğunun fizyopatolojisinde yer alan serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumuna neden olur. Ayrıca artan serbest oksijen radikalleri mitokondriyal hasarı da tetikler. Bunların sonucunda nöronal dejenerasyon ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (9).

Elde edilen kanıtlar, inflamasyonun deneysel diyabet modellerinde önemli bir rol oynadığını ve ayrıca depresyon, kognitif bozukluklar ve nöropati dahil olmak üzere nöro davranışsal bozuklukların gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir (8,10). Daha önceki çalışmalar diyabetin hipokampüste interlökin 6 (IL-6), interlökin 1 beta (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinlerin yapımını arttırarak bu alandaki nöronal hasarın fazla olduğunu göstermişlerdir (11).

MSS'deki değişiklerde inflamasyonun rolü ağırlık kazanmasıyla birlikte, bu sürecin altında yatan mekanizmaları anlamaya yönelik ilgi artmıştır. Diyabet ve nörodejeneratif hastalıkların beyin hasarında inflamatuvar süreçlerin ve bu süreçlerde inflamazomların önemli bir yeri olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (12). Şu ana kadar pek çok inflamazom türü tespit edilmesine karşın en iyi karakterize edilen ve en çok çalışılan inflamazom türü pirin domain'i içeren NOD- benzeri ailesi 3 (NLRP3)'dür (14). NLRP3 mikrobiyal olmayan tehlikeyi algılar ve çeşitli hastalık koşullarında steril inflamatuvar cevaba neden olur (13). Glukoz yükseklüğünde NLRP3 inflamazom aracılığı ile steril inflamatuvar cevap oluşturduğu saptanmıştır (14). NLRP3 inflamazomun Tip 2 diyabet, obezite ve erken dönem ateroskleroz gelişimi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. NLRP3 aktivasyonu ayrıca mitokondriyal disfonksiyon ve SOR yapımı ile yakından ilgili olduğu bulunmuştur (13). SOR bağımlı NLRP3 aktivasyonu diyabetik hastalarda gösterilmiştir (14).

DM'de kognitif fonksiyon değişimleri ile hipokampal nitrozatif stres, NLRP3 ve IL-1 β arasındaki ilişki tam olarak araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda diyabetik sıçan hipokampüsünde NLRP3, IL-1 β ve nitrotirozin düzeylerinin belirlenerek diyabetin öğrenme fonksiyonuyla ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

DM, kan şekerini düzenleyen bir hormon olan insülinin eksikliği ya da etkisinin azalması nedeniyle karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında değişikliklere sebep olan kronik bozukluktur.

DM, dünya genelinde son on yıllarda görülme sıklığı katlanarak artan önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Küresel prevalansı, 1980'den bu yana neredeyse ikiye katlanmış ve yetişkinlerde %8.5'e yükselmiştir (15). Diyabetli hasta sayısının, özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, 2030 yılına kadar neredeyse iki katına çıkacağını öne süren tahminler yapılmaktadır (16). Türkiye, diyabet prevalansı %12.5 (2015'de) ile Avrupada 3. sırada yer almaktadır (17). 2016 yılında ise prevalans %13.2 olarak bildirilmiştir (18).

Diyabet, tip 1, tip 2, gestasyonel diyabet ve diğer nedenlere bağlı (sekonder) diyabet olarak gruplandırılır. Tip 1 diabetes mellitus (T1DM), pankreasta otoimmün β hücre yıkımı nedeniyle oluşur ve genellikle mutlak insülin eksikliği vardır (19). T1DM % 90 otoimmün, % 10 kadarında ise nonotoimmün süreçler sonucunda β - hücre yıkımı ile oluşur. Genetik yatkınlığı olan kişilerde tetikleyici faktörlerin (virüsler, toksinler, emosyonel stres) etkisiyle otoimmün süreç tetiklenir ve ilerleyici β -hücre hasarı başlar (20). β -hücre rezervi % 80-90 oranında azaldığı zaman klinik diyabet tablosu ortaya çıkar. Semptomlar ve bulgular genellikle 30 yaşından önce başlar ve aniden ortaya çıkar (21). Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) fizioopatolojisinde insülin direnci ve insülin salgılanmasında azalma olarak ayrılan iki süreç birlikte rol alır. İnsülin direncinde, hücre-reseptör bozukluğuna bağlı olarak insülinin etkisi azalır (19, 21). Özellikle kas ve yağ dokusunda olmak üzere bütün hücrelerde glukozun hücre içine girişi azalır. Genellikle uzun süre devam eden insülin direnci aşamasını insülin salgılanmasında ciddi azalma takip eder (21). Genetik yatkınlığın yanında obezite, sağlıksız beslenme ve fiziksel inaktivite gibi çevresel faktörler hastalığın oluşmasında etkili olur (19). Çoğunlukla 30 yaş sonrası ortaya çıkar, ancak son yıllarda daha erken yaşlarda da görülmeye başlamıştır (21).

2.2. Diyabetin Komplikasyonları

Diyabetin akut metabolik komplikasyonları, yüksek kan glukozundan (hiperglisemi) kaynaklanan diyabetik ketoasidoz, hiperglisemik hiperosmolar sendrom, laktik asidoz ile düşük kan glukozunun bir sonucu olarak koma görülmektedir (22).

Diyabetin kronik komplikasyonları çoğunlukla kan damarlarının zarar görmesinden kaynaklanmaktadır. Bu sebeple mikrovasküler hastalık (küçük damarların hasar görmesinden dolayı) ve makrovasküler hastalık (arterlerin zarar görmesinden dolayı) şeklinde gruplanır (23). Mikrovasküler komplikasyonlar retinopati olarak adlandırılan göz hastalığını, nefropati olarak adlandırılan böbrek hastalığını ve nöronal hasarı ifade eden nöropatiyi içerir. Başlıca makrovasküler komplikasyonlar, miyokard enfarktüsüne neden kardiyovasküler hastalığı ve felç olarak ortaya çıkan serebrovasküler hastalıkları içerir (24).

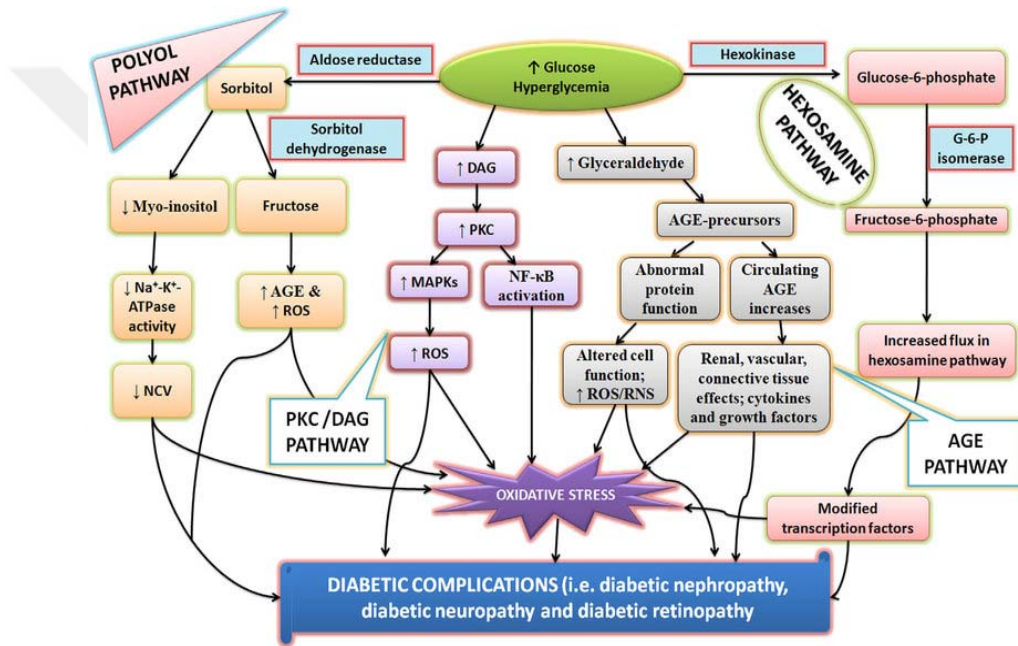
Diyabetin kronik komplikasyonları, büyük ölçüde uzun süreli hipergliseminin neden olduğu nöral ve vasküler yapıların moleküler ve hücresel bozulmasından kaynaklanır (22). DM kaynaklı nöropati ve anjiyopati hücrelerin, dokuların ve organ sistemlerinin fonksiyon bozukluğuna yol açabilir (24).

2.3. Diyabetin Merkezi Sinir Sistemi Komplikasyonları

Diyabet MSS'de metabolik, yapısal ve fonksiyonel değişikliklere sebep olur. Bu değişikliklerin klinik sonuçları bilişsel bozukluklar, demans ve serebrovasküler hastalıklar şeklinde görülür (25). T2DM, hafif bilişsel bozukluklarla güçlü bir şekilde ilişkili olmasının yanında vasküler demans ve AD gelişimi için predispozan faktör olarak kabul edilmektedir (3). Bu değişikliklerin sebepleri arasında vasküler bozukluklar, oksidatif stres, metabolik değişiklikler (hipo/hiperglisemi, hiperinsülinemi) ve inflamatuvar süreçler yer almaktadır (26). Görüntüleme ve fizyolojik ölçümler ile diyabetle ilgili beyindeki yapısal değişiklikler ortaya konulmuştur (27). Bilişsel bozulmada özellikle beynin hipokampal bölgesindeki değişikliklerin etkisi daha belirgin olduğu gösterilmiştir (28).

Diyabet komplikasyonlarının patobiyolojisi oldukça karmaşıktır ve bir dizi faktörün etkileşimi ile oluşur. Bireysel genetik faktörlerin ve diyabete eşlik eden hipertansiyon gibi hastalıkların yanısıra diyabetle oluşan hipergliseminin hücrel etkileri bu süreçte rol almaktadır (29).

Hipergliseminin hücrel hasarını izah etmek için çok sayıda mekanizma bildirilmesine rağmen, hala tam olarak anlaşılmamıştır (Şekil 1). Araştırmalarda hücre sinyal yollarında değişme, bazı metabolik yolların bozulması, oksidatif stresin artması, ileri glikasyon son ürünlerinin üretimi, sitokinlerin üretimi gibi etkenlere ait kanıtlar gösterilmiştir (30).



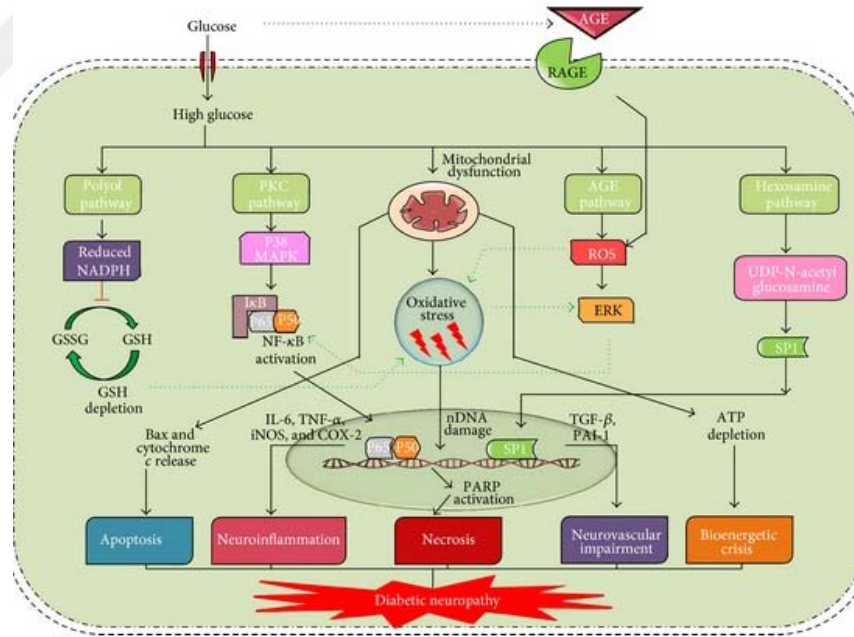
Şekil 1. Diyabetik komplikasyonların moleküler mekanizması (41).

Hiperglisemi ve artmış glukoz, protein kinaz C (PKC) yolu, AGE yolu, polioll yolu ve heksosamin yolu dahil olmak üzere metabolik yolları aktive etmektedir. Bu yollardaki değişiklikler oksidatif strese yol açarak hücrel hasar oluşturur (41).

Son zamanlarda artan kanıtlar, hipergliseminin aktive ettiği yollarla tetiklenen oksidatif stres ve inflamasyonun diyabet ve komplikasyonlarının patogeneğinde önemli rolü olduğunu göstermektedir (31, 41). Diyabet ve hiperglisemi proinflamatuvar bir mikro ortam oluşturarak nefropati, retinopati ve nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonların oluşmasında önemli rol oynar (32, 33).

Oksidatif stres değişik yollarla hücre hasara ve fonksiyonların bozulmasına katkıda bulunmaktadır (31). Oksidatif stres üretildikten sonra, IL-1 β , IL-6, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu artırarak inflamasyona yol açar. Oksidatif stres nükleer faktör kapp B (NF- κ B), p53 mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) gibi hücre içi sinyal yollarını etkileyerek patogeneze katkıda bulunur (34)

Diyabetin en önemli mikrovasküler komplikasyonu olan nöropati patofizyolojisinde de benzer süreçlerin rol aldığı inflamasyon etkili olmaktadır (35). Hiperglisemi, çok sayıda metabolik yolu aktive eder (34). Ayrıca, hiperglisemi mitokondriyal fonksiyonları bozarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır (41) (Şekil 2). Oksidatif stres ve kombinasyondaki bu klasik yollar, NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder (35). Ayrıca, disfonksiyonel mitokondri aracılı apoptoz veya biyoenerjetik tükenme ile birlikte bu yollar nöronal hasara yol açabilir (36). Bu süreçlerin etkileşmesiyle aktive olan IL-6 gibi sitokinlerin dahil olduğu inflamatuvar bir süreç ile hücre hasar veya piroptoz oluşur (35).



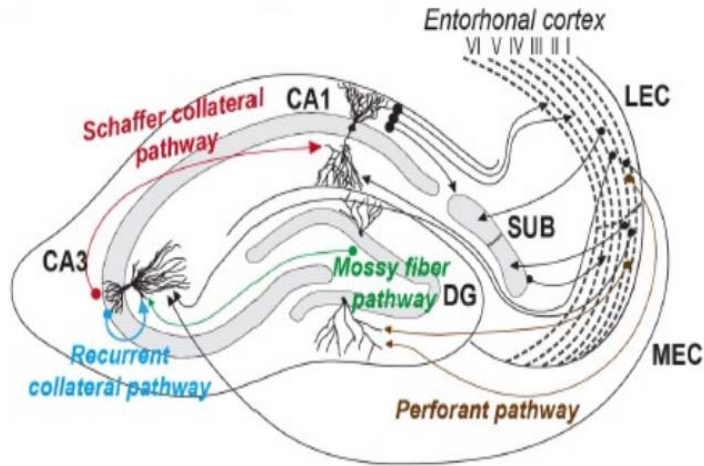
Şekil 2. Diyabetik nöropati patogenezi (35).

Klinik ve deneysel çalışmaların sonuçlarından elde edilen veriler, T2DM hastalarının doku, plazma ve serumlarında oksidatif stres biyobelirteçlerinin önemli ölçüde arttığı, buna karşılık anti-oksidan enzimatif seviyelerininin azaldığını göstermektedir (36).

2.4. Hipokampus ve Bilişsel İşlevler

Hipokampus, dentat girus (DG), subiküler kompleks ve entorhinal korteks ile birlikte hipokampal yapıyı oluşturan beyin bölgelerinden biridir. Hipokampus, cornu ammonis denenen üç ana yapıdan (CA1-CA3) oluşur (37, 38). Hipokampal yapı lateral ventrikülün temporal boynuzunun tabanında yerleşmiştir ve temporal lobların medial bölümleri ile ilişkilidir (37).

Hipokampusun alt bölgeleri nöral devrelerle birbirine bağlantılıdır (39). Hipokampal yapı entorhinal korteks vasıtasıyla beynin geri kalanı ile bilgi alışverişi yapar. Subiküler korteks, hipokampus ve entorhinal korteks arasındaki geçiş alanını temsil eder (37, 38). Hipokampal bilginin içsel akışı, kapalı bir devre şeklinde ve büyük ölçüde tek yönlü ve glutamaterjik bir yolu izler (39) (Şekil 3).



Şekil 3. Hipokampusun fonksiyonel anatomisi (39).

Hipokampus beynin değişik bölgelerinden (prefrontal korteksten, anterior cingulate gyrus, premamiller bölge) ve beyin sapındaki retiküler formasyondan gelen bilgileri alır. Bu bağlantılardan dolayı hipokampus korteks ve beyin sapındaki aktivitelere duygusal veya visseral bir etki katabilir (38). Hipokampus serotonin, norepinefrin ve dopamin nörotransmitterini kullanan sistemlerden girdi almaktadır. Ayrıca, hipokampus kendi içinde monoaminerjik, kolinerjik ve γ -aminobütirik asid (GABA) erjik afferent bağlantıları vardır (38, 39).

Hipokampus hipotalamus, amigdala ile birlikte, bazı özelleşmiş işlevlerde rol alan limbik sistemin üyesidir. Limbik sistem bazı güdüsel faaliyetlerin (yeme-içme, cinsellik, korku, öfke, hafıza gibi) yürütülmesinde görev alan, birbirine bağlı nöron

ağlarına verilen addır ve beyin sapıyla ön beyin arasında yer alır. Limbik sistemin işleyişinde görev alan diğer yapılar talamus, hipotalamus ve bazal ganglionlardır (40). Hipokampus, duyguların düzenlenmesi, motivasyon, hormonal ve otonomik aktivite ve hafıza oluşumu gibi birçok önemli işlevde rol oynar. Hipokampusün en iyi bilinen işlevi öğrenme ve hafızadaki rolüdür (38, 40). Hipokampusün uzun süreli hafızaların oluşturulmasında çeşitli kortikal alanlardan bilgi aldığı ve birleştirdiği bildirilmektedir (40). Aynı zamanda, hipokampus mekânsal bellekte rol oynar; olayların nerede olduklarını ve birbirleriyle ilişkisini takip etmeye izin verir; bu nedenle bilişsel haritaların oluşumunda etkilidir (38). Hipotalamus ile hipokampus arasındaki bağlantı sebebiyle çeşitli endokrin fonksiyonların düzenlenmesine de katkı sağlamaktadır (40).

2.5. Diyabet ve Bilişsel İşlev Bozuklukları

Diyabetin bilişsel fonksiyon bozukluklarına sebep olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Diyabetle ilişkili bilişsel işlev bozuklukları, hafif düzeyde hafıza ve öğrenme bozukluklarından vasküler veya nörodejeneratif demansa kadar bir aralığı kapsar (1, 3, 42).

2.5.1. Diyabetik bilişsel işlev bozukluklarının patofizyolojisi

Birçok araştırmada diyabetik bilişsel işlev bozukluklarına etki eden faktörler ve oluşum mekanizması ile ilgili bulgular ortaya konmuştur (43, 44). Hiperglisemi değişik yollarla bilişsel bozulmalara sebep olmaktadır. Kronik hipergliseminin klinik bir göstergesi olan hemoglobin A1c (HbA1c) seviyeleri, T2DM'li bireylerde düşük bilişsel işlevle ilişkili bir belirleyici gibi görünmektedir (45). Hipergliseminin tetiklediği AGE'lerin birikmesinin çeşitli mekanizmalarla hücrel hasara neden olarak bilişsel bozulmada etkili olduğu düşünülmektedir (46). Diyabetik bilişsel işlev bozukluklarına etki eden faktörlerden birisi de hipoglisemidir. Hipoglisemi beyindeki enerji metabolizmasını bozabilir, bu da nöronal dejenerasyona ve hipokampusün atrofisine neden olabilir. Hipoglisemi ataklarıyla oluşan beyindeki kümülatif hasar kognitif bozukluğa katkıda bulunur (47).

Diyabetik bilişsel bozukluğunda rol alan diğer bir mekanizma ise insülin direncidir. İnsülin direnci, glukoz alımının / kullanımının azalması ve bununla birlikte insülin yükselmeleri ile karakterize edilir. İnsülin direnci T2DM ve metabolik sendrom da rol oynamaktadır (48). Hiperinsülinemi ve insülin direnci olan hastalarda oryantasyon, hafıza, dikkat ve hesaplama gibi bilişsel işlevler bozulmaktadır (49). Artmış beta-amiloid protein üretimi T2DM ve AD arasında glukoz intoleransını ve insülin direncini tetikleyebilir (50). İnsülin hipokampal fonksiyonların sürdürülmesi için gereklidir. İnsülin direnci bu fonksiyonları olumsuz etkileyerek öğrenme ve hafıza bozukluğuna yol açar (51).

Diyabetin en önemli makrovasküler komplikasyonlarından biri olan arteriyoskleroz, serebral hemodinamiyi bozar. Kronik serebral iskemi ve hipoksi, enerji metabolizmasını olumsuz etkiler; bu değişiklikler T2DM hastalarında bazı bilişsel işlevlerin bozulmasına neden olur (52). Ayrıca, T2DM'li bireylerde serebral mikrovasküler hastalık, yaşla ilişkili kognitif bozuklukları hızlandırır (53). Hipergliseminin vasküler endotel fonksiyonu üzerine bozucu etkileri, vasküler akışı ve geçirgenliği değiştirmesinin yanında kan-beyin bariyerinin bütünlüğünün de bozulması ile sonuçlanabilir. Bu bozuklukların etkisiyle beynin metabolik gereksinimleri uygun şekilde karşılanamaz; özellikle nörotransmitter tedarikinin bozulması bilişsel işlev bozukluklarını ortaya çıkarır (54).

Diyabetik bilişsel bozuklukların oluşum mekanizmasında yer alan bir diğer faktör ise oksidatif strestir (31). Oksidatif stresle ilişkili serbest radikaller proteinlerin, lipidlerin ve genetik moleküllerin yapısını değiştirerek nöronların işlevsel ve yapısal bütünlüğünü bozabilir (55). Ayrıca, değişik yollar ve mekanizmalar ile sitokinlerin de dâhil olduğu bir inflamasyon sürecini başlatır.

Birçok metabolik hastalık ile inflamasyonun yakın ilişkisi ortaya konmuştur (56). İnflamasyon MSS'de yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin altında yer alan önemli etkenlerden biridir. Diyabet ve bazı nörodejeneratif hastalıklarda sitokinlerin ve glial hücrelerin aktive olduğu nöroinflamasyon rol almaktadır (57, 58). Bilişsel değerlendirmesi bozuk diyabetik hastalarda bazı inflamatuvar belirteçler yüksek bulunmuştur (59). Demans hastalarının beyinlerinde ve plazma örneklerinde artmış inflamatuvar protein seviyeleri bulunmuştur. Bunlar, proinflamatuvar sitokinleri serbest bırakan ve nöronal dejenerasyona katkıda bulunan toksik bir uyarıcı olarak hareket

ettiği görünen mikroglia hücrelerini aktive eder. C reaktif protein (CRP), TNF- α ve IL-1 β ve IL-6 gibi inflamatuvar proteinlerin plazma seviyelerinin, artan bilişsel bozulma riski ve düşük öğrenme yeteneği ile ilişkili olduğu bulunmuştur (60).

Hiperglisemi ile oluşan AGE'ler ve onların reseptörleri (RAGE) kognitif fonksiyon bozukluğu olan yaşlı diyabetik hastaların dolaşımında artmıştır (61, 62). RAGE, immünoglobulin ailesine ait bir transmembran reseptörüdür (62) ve damar duvarında inflamatuvar tepkilere neden olarak diyabet komplikasyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. Son çalışmalar AGE ve RAGE seviyeleri ve bilişsel bozulma arasındaki ilişkiyi göstermiştir (63).

2.6. İnflamasyon

2.6.1. İnflamasyon ve sitokinler

Sitokinler, çok geniş bir biyolojik fonksiyon aralığında rol alan, küçük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Başta bağışıklık sistemi olmak üzere hücrelerin aktivasyonu, farklılaşması, çoğalması ve hücreler arası iletişimde rol oynarlar (64). Sitokinler, kendilerini salgılayan hücrelere (otokrin etki), yakındaki hücrelere (parakrin etki) veya bazı durumlarda uzak hücrelere (endokrin etki) etki edebilir. Sitokin genel bir isimdir; diğer isimler arasında lenfokin (lenfositler tarafından yapılan sitokinler), monokin (monositler tarafından yapılan sitokinler), kemokin (kemotaktik aktiviteye sahip sitokinler) ve interlökin (bir lökosit tarafından yapılan ve diğer lökositler üzerinde etkili sitokinler) bulunur (65).

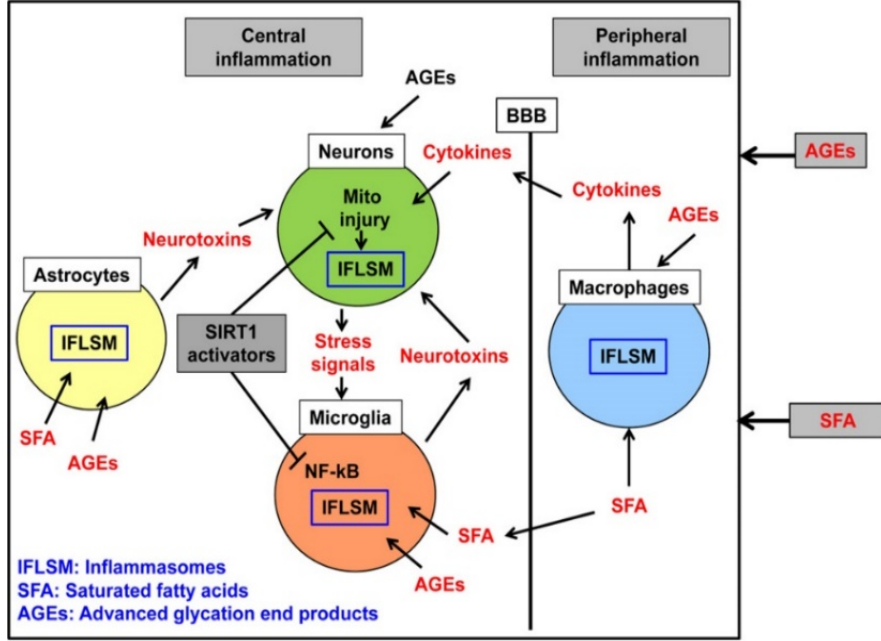
Sitokinler birçok hücre tipi tarafından salgılanırlar; bunlar arasında makrofajlar, B lenfositleri, T lenfositleri, mast hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar ve çeşitli stromal hücreler gibi immün hücreleri sayılabilir (64). Farklı hücre tipleri aynı sitokin salgılayabilir veya tek bir sitokin birkaç farklı hücre tipinde etki edebilir. Ayrıca benzer işlevler farklı sitokinler tarafından uyarılabilir (64, 65). Bir sitokin, hedef hücrelerine ilave sitokinler yapmak için genellikle bir kaskadda üretilirler. Sitokinler aynı zamanda sinerjistik veya antagonistik olarak da hareket edebilirler (64).

Proinflamatuvar sitokinler, inflamasyonda rol alan immüno-regülatör sitokinler için genel bir terimdir. Bir inflamatuvar yanıtın net etkisi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki denge ile belirlenir. Proinflamatuvar sitokinler ağırlıklı olarak aktive edilmiş makrofajlar tarafından üretilir ve inflamatuvar reaksiyonların yukarı regülasyonunda rol oynar (66). IL-1 β , IL-6 ve TNF- α en bilinen proinflamatuvar sitokinlerdir. Diğer proinflamatuvar mediatörler olarak diğer interlökin ailesi (IL8, IL18, IL20, IL33 ve diğerleri), interferon (IFN)- γ , tümör büyüme faktörü (TGF)- β , koloni stimule edici faktör (GM-CSF) ve çeşitli diğer kemokinler sayılabilir (67). Enfeksiyon, travma, iskemi, aktive olmuş T hücreleri veya toksinler tarafından uyarılan IL-1 β ve TNF, inflamatuvar aracılardan kaskadını başlatır. Bu sitokinler ya endojen pirojenler gibi davranarak sekonder mediatörlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezini yükseltir ya da inflamatuvar hücreleri çeker (68).

2.6.2. Nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon, MSS'nin normal yapısını ve fonksiyonlarını, çeşitli bozucu etkilere karşı korumak için kullanılan bir savunma mekanizmasıdır (69). Aynı zamanda, nöroinflamasyon iki ucu keskin bir kılıç gibi davranır. Bir tarafta nörodejenerasyonu şiddetlendirir, diğer taraftan ise nöronların iyileşmesini kolaylaştırır (71). Nöroinflamasyonun yaşa bağlı ve nörodejeneratif hastalıklara bağlı nöronal hasar için önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir (69, 70).

Nöroinflamasyon oluşumunda immün hücrelerin, glial hücrelerin ve nöronal hücrelerin dahil olduğu bir inflamatuvar süreç oluşmaktadır (72). Ek olarak, periferik inflamasyon çeşitli mekanizmalar yoluyla beyin inflamatuvar tepkilerini artırır (73). MSS inflamasyonu ile ilişkili bazı hastalıkların oluşumunda sitokinler önemli rol oynamaktadır (11, 74). Bu çalışmalarda değişik bulgular elde edilmesine rağmen, mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Nöroinflamasyon sürecinde çeşitli mediatörleri, sitokinlerin ve inflamazomların da önemli bir yeri vardır (75) (Şekil 4).

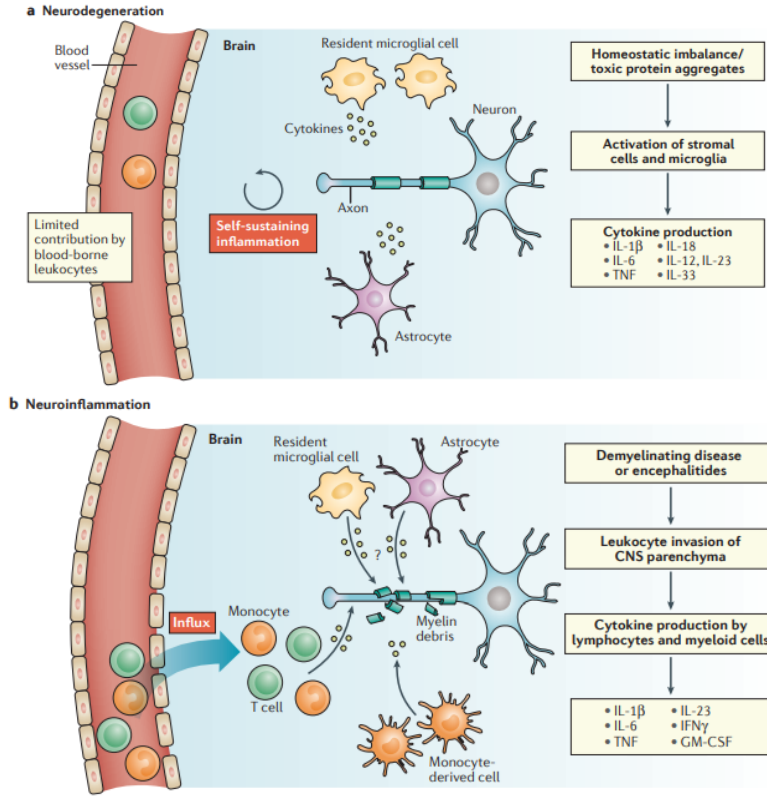


Şekil 4. Nöroinflamasyon oluşumunda başlıca yollar (74).

Hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular, diyabetteki artmış sitokinlerin beyinde özellikle hipokampüste nörojenezi etkileyebileceği ve nöronal hasara sebep olabileceğini göstermektedir (76, 77).

2.6.3. Diyabet patogenezinde ve komplikasyonların gelişiminde inflamasyon

MSS'nin gelişmesi ve fizyolojisinde sitokin ağlarının önemli rolü vardır (78). MSS inflamasyonunda, kanla taşınan hücrelerin kısmi etkisi olmakla beraber, ağırlıklı olarak mikroçevrede anormal değişikliklere lokal bir doku tepkisi etkili olur (11, 79). AD gibi dejeneratif hastalıklarda, MSS'de yerleşik hücreler tarafından üretilen proinflamatuvar sitokinler etkili olurken, Multiple Skleroz (MS) ve ensefalitler gibi nöroinflamatuvar hastalıklarda istilacı lökositler rol alır (80, 81) (Şekil 5). Bazı nörolojik hastalıklarda inflamazomun aracılık ettiği kaspaz 1'i aktivasyonu sonucu IL-1 β ve IL-18 sitokinlerin üretimi artar ve piroptotik hücre ölümü gerçekleşir (81).



Şekil 5. Nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonda sitokin aktivasyonu (11).

T2DM gelişimi ve ilerlemesinde inflamatuvar süreçlerin etkin rolünü gösteren çok sayıda araştırma yapılmıştır. IL-1 ve IL-6, inflamatuvar süreçlerde görev alarak, T2DM ve insülin direncinin gelişimi ile ilişkili proinflamatuvar sitokinlerdir (83, 84). Obezitenin, insülin direnci ve T2DM'nin bir arada olduğu ve metabolik sendrom olarak bilinen metabolik patolojilerin, kronik inflamasyon ile yakın ilişkisi tanımlanmıştır (82). İnflamasyonun T2DM ve insülin direncinin gelişiminde rolü ortaya konmuştur (83, 84).

2.6.4. Diyabetik bilişsel işlev bozukluklarında inflamasyonun rolü

Diyabetik hayvan çalışmasında, kimyasal bir ajanla indüklenen oksidatif stres aracılı inflamasyonun diyabetle ilişkili bilişsel bozuklukları arttırdığı gösterilmiştir (85). Başka bir çalışmada, gestasyonel diyabetin nöroinflamasyona; hipokampal nöronları da fonksiyonel bozukluğa ve sıçan yavrularında bilişsel değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (86). STZ verilen hayvanların plazmasında ve dokularında IL-6 ve TNF- α düzeyleri artmış, BDNF düzeyleri ise azalmış bulunmuştur (87). Bu çalışmanın sonucu, STZ'nin sadece pankreas beta hücrelerine

sitotoksik değil, aynı zamanda oksidatif stresi indükleyerek hipotalamik ve hipokampal nöronları etkileyerek bilişsel işlev bozukluğuna sebep olabileceğini göstermiştir. Diyabetin neden olduğu bilişsel bozukluklara karşı değişik ajanların koruyucu etkilerinin incelendiği çalışmalarda, bu ajanların TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi proinlamatuvar sitokinleri azalttığı bulunmuştur. Aynı zamanda, oksidatif stresi de azaltarak ve inflamasyonu düzelterek koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir (88, 89).

2.7. Oksidatif Stres

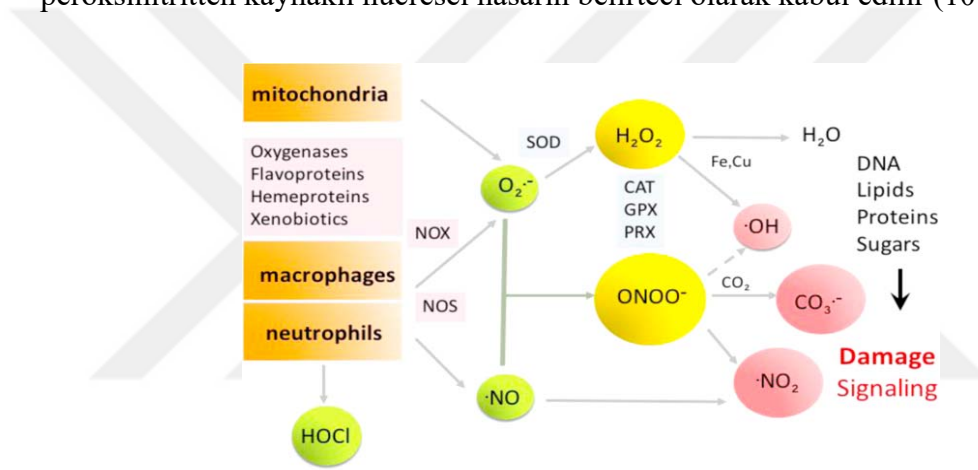
Oksidatif stres, hücrede zararlı etkilere sahip reaktif türlerin artması, bunları etkisiz hale getirecek mekanizmaların yetersiz kalması şeklinde ifade edilebilir. Reaktif türler fizyolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynar (90). ROS ve reaktif azot türlerinin (RNS) aşırı üretilmesi, lipidler ve proteinler gibi hücrenel yapılar ile DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin hasarlanmasına neden olur (91). Ayrıca, reaktif türler metabolik süreçleri ve mitokondri fonksiyonunu bozar (92). Bunun yanında, oksidatif stres hücre içi sinyalizasyonu etkileyerek fizyolojik fonksiyonları da etkiler. Serbest radikaller diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, kanser gibi birçok patolojik durumda rol oynar (93).

Serbest radikaller normal hücrenel metabolizmanın ürünleridir. ROS ve RNS olan serbest radikaller, hem endojen hem de eksojen kaynaklardan oluşabilir (94). Orta ve ya düşük seviyelerde serbest radikaller faydalı etkilere sahiptir; immün fonksiyonunda, çeşitli hücrenel sinyal yollarında, mitojenik cevapta ve redoks düzenlemesinde olduğu gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda bulunur (95). Fakat daha yüksek konsantrasyonda ROS ve RNS oksidatif stres ve nitrozatif stres oluşturur, bu da biyomoleküllerde potansiyel hasara neden olur (94). Oksidatif stres ve nitrozatif stres bir tarafta aşırı serbest radikal üretimi, diğer tarafta enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar eksikliği olduğunda gelişir (95).

Oksitleyiciler ve serbest radikal türleri, hücrelerde fizyolojik ve sürekli olarak oluşur ve redoks sinyalleşmesine katılabilir. Ancak, patolojik koşullar altında, bu türlerin oluşumu lipidler, şekerler, proteinler ve DNA gibi farklı biyomoleküllerin oksidatif hasarını arttırabilir ve ya bunlara aracılık edebilir (96). Enzimatik ve enzimatik olmayan yolların etkisiyle birkaç biyolojik oksidan oluşur (Şekil 6).

Bunlar arasında süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorit, moleküler oksijen, hidroksil radikal (OH^{\cdot}), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), azot dioksit (NO_2), karbonat radikal ($CO_3^{\cdot-}$) ve diğerleri sayılabilir (97).

Süperoksit iyon radikali değişik yollarla ve genellikle mitokondride üretilir. Nitrik oksit (NO) farklı dokularda, farklı nitrik oksit sentazları (NOS) tarafından üretilen küçük bir moleküldür (35). Kan basıncı düzenleme, düz kas gevşeme, nörotransmisyon, savunma mekanizmaları ve immün düzenleme gibi birçok biyolojik aktivitede yer alır. Peroksinitrit ($OONO^{\cdot}$), süperoksit ve nitrik oksit (NO^{\cdot}) arasındaki reaksiyondan oluşur. Oldukça toksiktir; lipidleri, proteinleri ve DNA'yı okside eder (97). Tirozin amino asidi oksidasyonundan oluşan nitrotirozin kalıntıları, peroksinitritten kaynaklı hücre hasarının belirteci olarak kabul edilir (101).



Şekil 6. Başlıca oksidan kaynakları ve üretim yolları (97).

Özetle, oksidatif stres ile artmış serbest radikaller hücrel proteinlere, lipitlere, nükleik asitlere zarar vererek enerji metabolizmasını ve hücre sinyallemesini bozar (94). Ayrıca, genetik mutasyonlara sebep olarak, immün aktivasyonu ve inflamatuvar oluşum sürecini tetikleyerek birçok hücrel fonksiyon bozukluğuna yol açar (96).

2.7.1. Oksidatif stres biyobelirteçleri

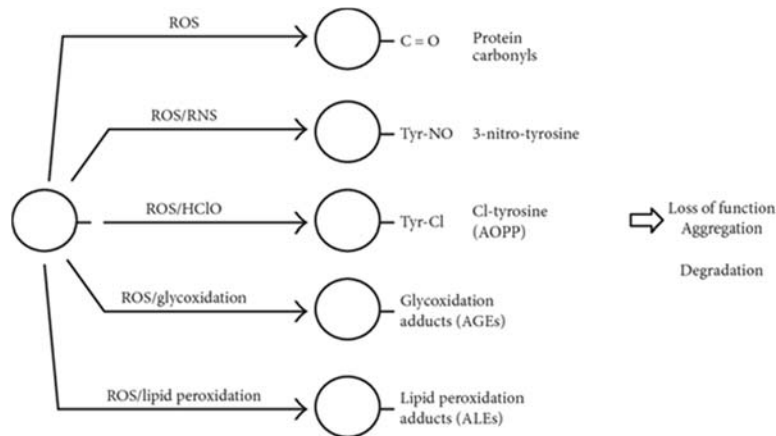
Oksidatif stresin değerlendirilmesinde değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar dört ana grupta toplanır: Kan hücrelerinde akım sitometrisi ile ROS ölçümü, lipitler, DNA ve proteinlerin ROS kaynaklı modifikasyonlarına dayalı markerler, redoks durumunun enzimatik elemanları ve insan vücut sıvılarının toplam antioksidan kapasitesidir (98).

ROS tarafından oluşturulmuş değişikliklere dayalı işaretleyiciler, mikroçevrede ROS ile etkileşime girerek modifiye edilir, sistemik ve ya dokuya özgü oksidatif stresi yansıtabilecek belirteçlerdir (99). Lipitler, DNA ve proteinler in vivo olarak aşırı ROS ile modifiye edilebilecek molekül örnekleridir (98). Lipid oksidasyonunun son ürün tespiti yaygın olarak kullanılan bir oksidatif stres belirteçidir. Malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) lipid oksidasyonunun en çok araştırılan son ürünü temsil eder (99).

DNA bileşenlerinin ROS/RNS ile oksidasyonu, çeşitli DNA modifikasyonlarına yol açan başlıca DNA hasar kaynağıdır. HO radikal tüm pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girerek çeşitli ürünler üretir; en yaygın olanı 7,8-dihidroksi-8-okso-2'-deoksiguanoz (8oxodG) idir (100). Proteinler, normal ve ya oksidatif stres koşulları altında oluşturulan ROS ve RNS için geniş bir hedefi temsil eder. En yaygın kullanılan protein oksidasyon ürünleri; nitrotirozin, gelişmiş oksidasyon protein ürünleri, okside LDL ve iskemi modifiye albümin sayılır (98).

Nitrotirozin

3-nitro-tirozin (3-NT), bir polipeptit içinde ve ya serbest tirozin tortularından meydana gelebilecek tirozin oksidasyon ürünüdür. 3 NT, peroksinitrit ROS ve RNS ile reaksiyon sonucu oluşmaktadır (101) (Şekil 7).



Şekil 7. Proteinlerin oksidatif modifikasyonları (101).

Peroksinitrit, $O_2^{\cdot-}$ ve nitrik oksit (NO) arasındaki difüzyon kontrollü reaksiyonun ürünüdür. Peroksinitrit doğrudan ve dolaylı (sekonder radikal ara maddeler yoluyla) oksidasyon reaksiyonlarına katılabilir. Peroksinitrit, in vitro ve in

vivo olarak protein tirozin nitrasyonuna neden olabilir (97, 102). Tirozin nitrasyon, hücrelerde ve dokularda NO türevli oksidanların reaksiyonlarının bir özelliğidir ve oksidatif hasarın bir biyobelirteçi olarak işlev görür (102). Protein tirozin nitrasyonu, protein yapısındaki değişikliklere ve hücre homeostazını etkileyen fonksiyonlara aracılık edebilir. Biyolojik sistemlerdeki tirozin nitrasyonu, ya peroksinitritten türemiş radikallerle ya da diğer NO bağımlı oksidatif süreçlerle desteklenebilen serbest bir radikaldir (97). Proteinlerdeki tirozin ve tirozin kalıntılarına reaktif oksijen ve azot türleri peroksinitrit ile reaksiyona girerek 3-NT ve 3-nitrotirosin-proteinleri (3-NTProt) üretirler. 3-NT ve 3-NTProt, nitrozatif stresin biyobelirteçleri olarak yaygın şekilde kabul edilir (102).

Genel olarak, tirozin oksidasyonu farklı oksidatif adımlarla oluşturulan ve ardından NO₂ ile reaksiyona giren bir tirozin radikalinin oluşumu ile iki aşamalı bir işlemdir. Biyolojik numunelerdeki 3-NT'nin belirlenmesi için kütle spektrometresi, ELISA, gaz ve ya sıvı kromatografi teknikleri geliştirilmiştir (103).

3-NT, inflamatuvar hastalıklarda stabil bir oksidatif/nitratif stres belirteci olarak tanımlanmıştır, ancak klinik biyobelirteç olarak kullanımı halen sorgulanmaktadır. Bazı çalışmalar, 3-NT plazma seviyelerinin astım, diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklarda arttığını göstermiştir (110).

2.7.2. Diyabet ve oksidatif stres

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, diyabet patogenezinde ve komplikasyonlarının gelişiminde oksidatif stresin rolü daha belirgin hale gelmiştir (34). Klinik çalışmaların sonuçlarından elde edilen kanıtlar, oksidatif stresin T2DM ile ilişkili olduğunu göstermektedir. T2DM hastalarında pro-oksidanların ve oksidatif stresin neden olduğu dokuya zarar veren biyolojik düzeylerin arttığı bildirilmiştir (36, 104).

T2DM'nin patofizyolojisi hakkında elde edilen bulgular, insülin direncinde, bozulmuş insülin sekresyonunda, anormal hepatik glukoz üretiminde ve sonuçta belirgin T2DM gelişiminde ROS ve oksidatif stresin sorumlu ana faktörler arasında yer aldığını ortaya koymuştur (105). ROS ve oksidatif stres çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin, transkripsiyonel aracılı moleküler ve metabolik yolların aktifleştirilmesi yoluyla diyabet oluşumuna yol açar (108).

Birçok deney çalışmasında, hipergliseminin pankreas β hücrelerinde oksidatif stresi indükleyerek hasar oluşturduğu araştırılmıştır (106). Glukoz kaynaklı oksidatif stres oluşumunu açıklamak için çeşitli yollar önerilmiştir, ancak en önemli potansiyel yollar ROS'un üretildiği, glukozamin, otoksidasyon, oksidatif fosforilasyon ve glikozilasyon yollarıdır (107). İnsan çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre de hiperglisemi, oksidatif stres üretimiyle sonuçlanan ROS'u indüklemekten sorumlu en önemli nedensel faktörlerden biri olarak kabul edilmiştir (36).

Oksidatif stres inflamasyonu tetikleyerek diyabet ve komplikasyonlarının patogenezinde rol oynar. Oksidatif stres üretildikten sonra, özellikle IL- β , IL-6, TNF- α ve IL-1 β 'ye bağlı sayısız başka sitokin ve kemokinler gibi çeşitli proinflamatuvar araçların oluşumunu kuvvetlendirir (105). Oksidatif stres NF- κ B ve p53 MAPK gibi transkripsiyonel aracılı stres sinyal yollarını etkileyerek T2DM'nin patogenezinde katkıda bulunur (106).

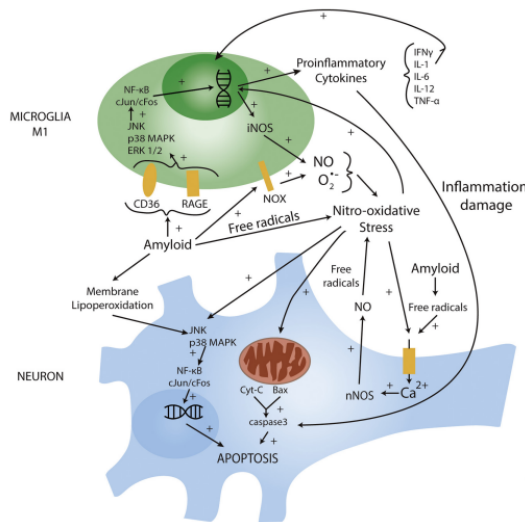
Oksidatif stress endotel disfonksiyonuna yol açarak diyabetin vasküler komplikasyonlarının gelişmesine katkıda bulunur. Uzun süreli hipergliseminin diyabetik hastaların kan damarlarında endotel disfonksiyonu gelişmesine yol açan oksidatif stresi tetiklemekte sorumlu olduğu anlaşılmıştır (34, 102).

Hipergliseminin indüklediği oksidatif stres hücre içinde ROS üretimini artırır (41). Çeşitli yollarla transkripsiyon faktörlerini aktive ederek büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinleri, kemokinleri, hücre döngüsü düzenleyici molekülleri ve antiinflamatuvar molekülleri dâhil olmak üzere çok sayıda genin ekspresyonuna yol açabilir (108, 109). ROS üretimi arttıkça, poliyol yolağının akışı, hücre içi ileri glikozilasyon son ürün oluşumu, PKC aktivasyonu ve heksozamin yolağının akışı gibi metabolik süreçler etkilenir (108). Ayrıca hiperglisemi Krebs döngüsünü bozulmasına, mitokondri zarında elektron transferinin inhibisyonu ve serbest radikallerin birikmesine yol açar (36). Bu bozulmalar, doğal antioksidan moleküllerin tükenmesi ve vasküler hücrelere zararın yanı sıra, gen ve protein ifadesinde, kan akışında ve endotel hücre geçirgenliğindeki değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler T2DM'nin patogenezi ve ilerlemesinde etkili olmaktadır (106, 108).

Diyabetin oluşumunda ve seyrinde yer alan patofizyolojik mekanizmaları daha iyi anlamak için çok sayıda araştırma yapılmıştır (34). Son zamanlarda, çok sayıda araştırmacı aşırı ROS ve RNS oluşmasının, hiperglisemi tarafından başlatılan komplikasyonların gelişiminde kilit bir bileşen olduğunu öne sürmektedir. Bu reaktif türlerin aşırı üretimi ve ya yetersiz şekilde uzaklaştırılması vasküler disfonksiyona, hücrel proteinlere, membran lipidlerine ve nükleik asitlere zarar vererek diyabet ve komplikasyonlarının oluşmasında etkili olur (109).

2.7.3. Diyabetik bilişsel işlev bozukluklarında oksidatif stresin rolü

Beyin çok yoğun oksijen tükettiği için oksidatif metabolizması yüksektir; ayrıca beyinde yüksek miktarda bulunan doymamış yağ asitleri nedeniyle oksidasyona ve peroksidasyona duyarlıdır (110). Yaşlanma ile ortaya çıkan bazı değişiklikler, bazı nörodejeneratif hastalıklar oksidatif stres ve nitratif hasarlar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (7). Hafıza ve öğrenmeden sorumlu merkez olan hipokampus, nitratif hasara son derece duyarlıdır. Aynı zamanda, daha önceki çalışmalarda hiperglisemiye bağlı olarak nitrotirozin hipokampüste arttığı gösterilmiştir. Bu artışın oksidatif stres ve diyabet ile oluşan endotelial disfonksiyonundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. MSS’de monosit/makrofaj sisteminin bir temsilcisi olan mikroglia hücrelerinde oksidatif stresin etkisiyle süperoksit ve aşırı indüklenebilir iNOS yapımı ile NO sentezinin arttığı gösterilmiştir (110) (Şekil 8).



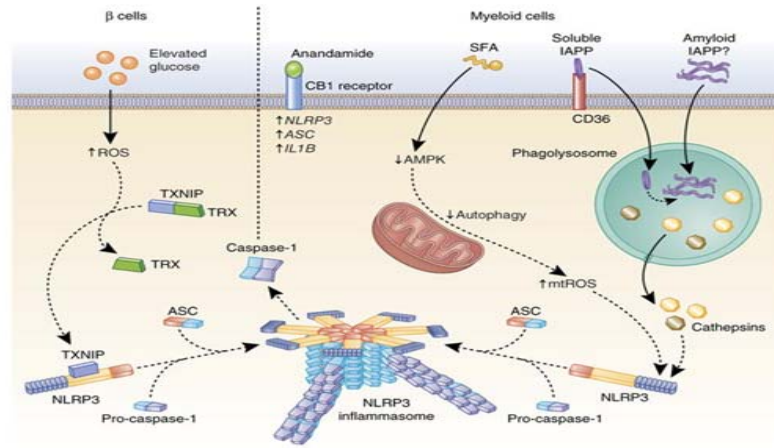
Şekil 8. Beyinde gerçekleşen nitro oksidatif stres (110).

2.8. İnflamazomlar

İnflamazomlar, enfeksiyon ya da stresin etkisiyle aktive olan hücrel moleküler platformlarıdır ve doğuştan gelen bağışıklık savunması için proinflamatuvar sitokinlerin olgunlaşmasını tetikler (111). Birçok inflamatuvar hastalık ile bozulmuş bağışıklık yanıtların uyarlanmasında ve bu yolun önemini vurgulayan çok sayıda araştırma yapılmıştır (112).

İnflamazomlar, NLRP3, NLRC4, absent in melanoma 2 (AIM2) ve NLRP6 dâhil olmak üzere çeşitli proteinler etrafında oluşturulan bir grup protein kompleksidir (111). İnflamazomlar, patojen ile ilişkili ve hasarla ilişkili tehlike sinyallerinin tespit edilmesini takiben örüntü tanıma reseptörleri tarafından aktive edilir (113). İnflamazom aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinler olan interlökin IL-1 β ve IL-18'in kaspaz-1'e bağlı olgunlaşmasını teşvik ederek piroptotik hücre ölümüne neden olur (115, 116). İnflamazom aracılı işlemler, mikrobiyal enfeksiyonlar sırasında, metabolik süreçlerde ve mukozal immün yanıtları düzenlemede önemlidir (112).

İnflamazomlar enfeksiyöz hastalıkların ötesinde düzensiz inflamatuvar aktivite ile ilişkili birçok inflamatuvar bozuklukta rol alırlar (116). İnflamatuvar süreçteki rolüne ek olarak, inflamazom reseptör bileşenleri ayrıca hücrel proliferasyon, gen transkripsiyonu ve tümörögenезis gibi çeşitli biyolojik olayları düzenleyebilir (113). Son gelişmeler, farklı inflamazomların aktif hale geldiği moleküler mekanizmalar hakkındaki anlayışı büyük ölçüde arttırdı. İnsan verilerinin desteklediği fare modellerinde inflamazomların, metabolik bozukluk ve nörodejeneratif hastalıkların başlatılmasında ve ya ilerlemesinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (114).



Şekil 9. İnflamatuar hastalıkta inflamazom aktivasyon mekanizması (114).

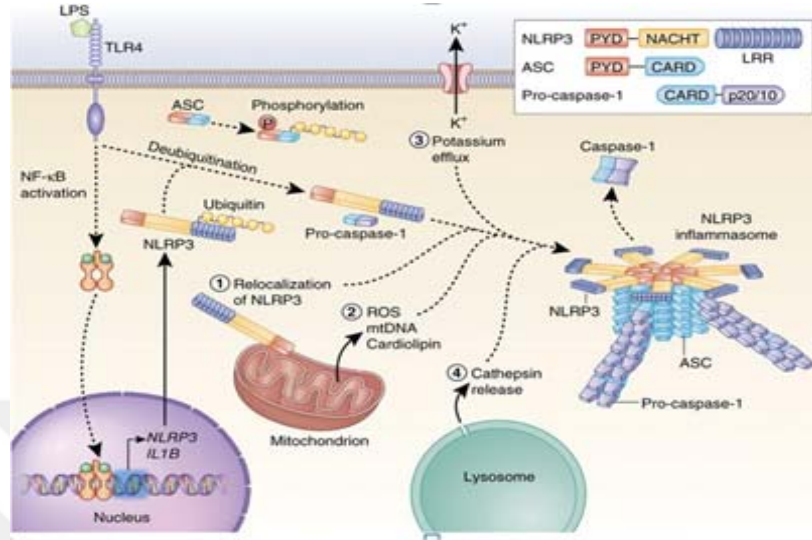
T2DM'de, NLRP3 inflamazomu hem adacık β hücrelerinde hem de miyeloid hücrelerinde aktive edilir (Şekil 9). β hücrelerinde yüksek glukoz, tioredoksin (TRX) ile etkileşime giren proteini (TXNIP) artırır (114). Hücre içi ROS ayrıca TXNIP'de TRX'den ayrışmasına yol açan bir konformasyonel değişikliğe neden olur. TXNIP daha sonra NLRP3'ü bağlar ve onun aktivasyonunu teşvik eder (115). Mieloid hücrelerde, CB1 reseptörü NLRP3, adaptör protein ASC ve IL-1 β ekspresyonunu artırır. Doymuş yağ asidi (SFA), hücre içi AMP-aktifleştirilmiş protein kinazı (AMPK) inhibe eder. Bu, mitokondriyal ROS'ta artışa yol açan otofajiyi azaltır. CD36, hücre içi olarak amiloid formuna dönüştürülen çözünür adacık amiloid polipeptidinin (IAPP) içselleştirilmesini kolaylaştırır. Bu fagolizozomu bozar ve katepsin salınımına bağlı olarak NLRP3 inflamazomunu aktive eder (114, 115).

İnsan ve hayvan çalışmalarından elde edilen kanıtlar, infalamtuar olayların metabolik bozukluk ve nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıkların başlatılmasında ve ya ilerlemesinde etkili olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır (112, 116).

2.8.1. NLRP3 inflamazomu

NLRP3, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi benzeri reseptör (NLR) içeren bir protein ailesinin üyesidir (118). Araştırmalarda, NLRP3 aktivasyonu ile ilgili değişik mekanizmalar bildirilmesine rağmen tamamen anlaşılmış değildir. NLRP3 inflamazomu çok sayıda uyarıcı dizisine cevap olarak aktive olur, ardından birçok aşağı akış olaylarını indükler (117). Hücreden potasyum (K^+) akışı,

mitokondriyal ROS oluşması, NLRP3'ün mitokondriye translokasyonu, mitokondriyal DNA ve ya kardiyolipin salınımı ve lizozomal katepsinlerin sitozole salınması NLRP3 aktivasyonunda rol alır (118) (Şekil 10).



Şekil 10. NLRP3 inflamazom aktivasyonun mekanizması (117).

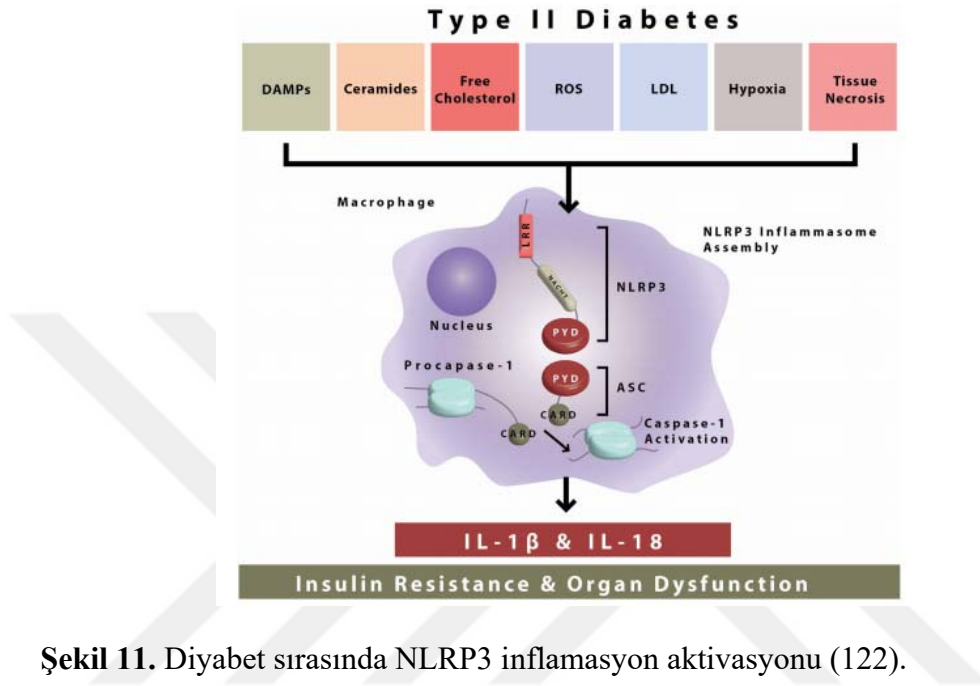
Ayrıca, lipopolisakkarit (LPS), oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) gibi çeşitli maddeler, NF-κB yolu ile NLRP3 aktivasyonuna yol açar (118). Olası mekanizmaların tetiklemeyle NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu, pro-kaspaz-1'in oto parçalanmasıyla aktif kaspaz-1'e dönüşümü ile sonuçlanır. Aktif kaspaz-1, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i uygun formlarına ayırır, bunlar daha sonra gasdermin-D'nin (GSDMD) N-terminal fragmanı tarafından oluşturulan porlardan salınır (117, 118).

NLRP3 inflamazomu PH, AH gibi nörodejeneratif, MS gibi nöroinflamatuvar hastalıklarla birlikte ateroskleroz, diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar ile yakından ilişkisi olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur (119, 120).

2.8.2. Diyabet ve komplikasyonlarında inflamazomların rolü

Doğal immün sistemin aktivasyonunun neden olduğu kronik, düşük dereceli inflamasyonun, tip 2 diyabetin patogenezinde ve başlıca komplikasyonlarında önemli bir rol oynadığına dair önemli kanıtlar vardır (12). Hipergliseminin neden olduğu inflamasyonun kilit mekanizmaları arasında proinflamatuvar sitokinlerin üretimi, artan oksidatif stres ve inflamazom aktivasyonu bulunur (121) (Şekil 11). NLRP3, bugüne

kadarki en iyi karakterize edilmiş inflamazomdur ve IL-1 β ve IL-18 sekresyonu için moleküler bir platform görevi görür (122). Tip 2 diyabet hastalarında pankreatik adacıklarda amiloid birikimi, lizozomların bozulması, ROS artışı, oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) ve NLRP3 inflamazom aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (126).



Şekil 11. Diyabet sırasında NLRP3 inflamasyon aktivasyonu (122).

Ortaya çıkan kanıtlar, NLRP3 inflamazom aktivasyonunun, sitokinlerin olgunlaşmasına ve salgılanmasına yol açtığı ve bu yolla obeziteye bağlı inflamasyon, insülin direnci ve tip 2 diyabet gelişiminin patojenik mekanizmalarında rol oynadığını göstermiştir (123). Son zamanlarda yapılan bir çok çalışma, NLRP3 inflamazomun dahil olduğu inflamasyonun obezite, ateroskleroz ve tip 2 diyabet dahil olmak üzere çeşitli metabolik hastalıklarda rol aldığını göstermiştir (124, 125).

2.9. Diyabetin Deneysel Hayvan Modelleri

Hayvan modelleri, hastalık patofizyolojisinin araştırılmasında ve tanımlanmasında; yeni tedavilerin ve tedavi ajanların değerlendirilmesinde önemli katkılar sunmaktadır (127). Hayvan çalışmaları, hastalığın oluşumunu etkileyebilecek genetik ve çevresel faktörleri in vivo olarak kontrol etme fırsatı verir. Diyabetin patofizyolojisi ve moleküler mekanizmalarını araştırmak için değişik modeller tanımlanmıştır. Bu modeller başlıca iki gruba ayrılır; genetik modeller ve kimyasalla indüklenmiş modellerdir (127, 128).

Tip 1 diyabetin temel özelliği, pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımıdır ve insülin üretimi eksikliğine neden olmaktadır (19). Hayvan modellerinde, insülin üretimindeki bu eksiklik, çeşitli farklı mekanizmalarla sağlanır; beta hücrelerinin kimyasal ablasyonundan, kendiliğinden otoimmün diyabet gelişen kemirgenlere kadar değişebilir (129). Kimyasal olarak indüklenen tip 1 diyabetli modellerde, beta hücrelerinin büyük bir kısmı tahrip olur ve hiperglisemi oluşur.

Diyabet, genellikle stabil hiperglisemi sağlamak için deneyin başlamasından 5-7 gün önce indüklenir (130). Diyabeti tetiklemek için iki ana bileşik kullanılır: STZ veya alloxan (129). Kimyasal olarak indüklenen diyabetin bir dezavantajı, kimyasalların vücudun diğer organlarına zarar verebilmesidir (130). STZ ve ya alloxan uygulamasından sonra karaciğer, böbrek, akciğer, bağırsaklar, testis ve beyindeki P450 izoenzimlerindeki değişikliklerin rapor edildiği görülmüştür (129). STZ [2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrosoüreido) -d-glikopiranoz], streptomycetes achromogenes tarafından sentezlenir, intraperitoneal (ip) veya intravenöz (iv) uygulamasından sonra, pankreas beta hücresine Glut-2 taşıyıcıdan girer (131). DNA'nın alkilasyonu ile hücre ölümüne neden olur; ayrıca diğer etkileşimler ile hücre ATP'de bir azalmaya ve ardından insülin üretiminin inhibe edilmesine yol açar (129).

Tip 2 diyabet, insülin direnci ve insülinin yeterince üretilmemesi ile karakterize edilir (21). Bu nedenle, tip 2 diyabetli hayvan modelleri, insülin direnci modellerini ve / veya beta hücre yetersizliği modellerini içermeye eğilimindedir (128). Tip 2 diyabet obezite ile yakından bağlantılı olduğundan, tip 2 diyabetin mevcut hayvan modellerinin çoğu obezdir. Obezite, doğal olarak oluşan mutasyonların ve ya genetik manipülasyonun sonucu olabilir (130). Alternatif olarak, obezite yüksek yağ beslemesi ile tetiklenebilir. Tip 2 diyabet için kullanılan birçok model geliştirilmiştir (127, 128).

2.9.1. Deneysel hayvan modellerinde davranış testleri

Öğrenme ve hafıza süreçlerini motive etmenin bir aracı olarak sudan kaçmayı kullanan hayvanlar için çeşitli deneysel prosedürler geliştirilmiştir (132). Öncelikle mekânsal öğrenmeyi ve hafızayı ölçmek için tasarlanan su labirenti görevleri, özellikle kemirgenlerde yaşlanmanın, deneysel lezyonların ve ilaç etkilerinin

değerlendirilmesinde oldukça faydalı olmuştur (133). 25 yıldan fazla bir süredir Morris su labirent (MWM) testi araştırmacılar tarafından en yaygın kullanılan ve kabul edilen yöntem olmuştur (134).

DeneySEL bellek modelleri arasında ise 3 panelli pist düzeneği, modifiye artı labirent testi, ışımsal kollu labirent testi, Morris su labirenti testi, yeni obje tanıma testi, pasif sakınma testi, korku koşullanması testi ve yiyecek tercihi testleri bulunmaktadır (135). MWM testi, kemirgenlerde bilişsel fonksiyonu değerlendiren diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında bir takım avantajlar sahiptir (136). Küçük bir laboratuvarda kurulması oldukça kolaydır, nispeten ucuz ve uygulaması kolaydır. Ayrıca kuru ortamda uygulanan bellek testlerine göre avantajı deney hayvanlarının kokuyu takip ederek yol alma olasılığını en aza indirmesidir (135, 136).

MWM, saklı bir kaçış platformunu bulmak ve açık yüzme arenasının çevresindeki başlangıç noktalarından dolaşmak için uzak işaretlere dayanan kemirgenler için mekansal öğrenmenin bir testidir (135). Mekansal öğrenme, tekrarlanan denemeler arasında değerlendirilir ve referans hafızası, platform bulunmadığında platform alanı tercihi ile belirlenir (132). Su tankı, içi su ile doldurulmuş geniş bir havuz ve havuz içinde bulunan bir kaçış platformundan oluşmaktadır. Su bir boya ile opaklaştırılarak platform gizlenmiş olur; su içine konan deney hayvanları saklı platformu bularak havuzdan kaçmayı öğrenirler (137). Hayvanlara platformu bulmaları için 60 sn süre tanınır ve platformu bulma süreleri kaydedilir. Bu süre, saklı platformu bulma süresi (kaçış latansı) olarak tanımlanır (138). Bu çalışmada, deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların öğrenme fonksiyonundaki değişiklikleri incelemek amacıyla MWM testi kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 7.09.2017 tarihli ve 2017-15-07/09 numaralı onayı ile çalışmamız gerçekleştirilmiştir (Ek-1). Çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2017-26259946-01 nolu proje olarak desteklenmiştir.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen ağırlıkları 275-350 gr arasında değişen 24 adet yetişkin erkek Wistar-Albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Hayvanların bakımları deney süresince Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yapılmıştır. Tüm sıçanlar rahat hareket edebilecekleri büyüklükte, üstü kapalı tel kafeslerde, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsüyle, sıcaklığın 20-25°C ve nemin %50-60 olduğu aynı ortamda tutulmuşlardır. Hayvanlar bir kafeste 6 sıçan olacak şekilde barındırılmışlardır. Gün aşırı kafes temizliği yapılmış, sıçanların günlük olarak içme suları değiştirilmiş ve standart pelet yem ile beslenmiştir.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

4 haftalık çalışma süresi boyunca birebir takip için sıçanların başına ve kuyruklarına işaret konularak kimliklendirilmiştir. Deney hayvanları, normoglisemik kontrol (NK), diyabetik kontrol (DK), olmak üzere her grupta 12 hayvan olacak şekilde 2 ana gruba ayrılmıştır. Deney grupları;

- a) NK grubu: 12 tane hayvandan oluşmaktadır. Diğer sıçanlarla aynı süre, aynı laboratuvar koşullarına tabi tutularak ağırlık ve kuyruk kanlarından kan glukoz takibi yapıldı.
- b) DK grubu: STZ enjeksiyonundan sonra diyabet olarak kabul edilen 12 tane hayvandan oluşmaktadır. Bu hayvanlara çalışma boyunca hiçbir tedavi uygulamadan kan glukoz ve vücut ağırlık takibi yapılmıştır. Diyabetik gruptaki hayvanlardan 4 tanesi diyabet oluşturulduktan 28 gün içinde ölmüşlerdir.

3.3. Deney Hayvanlarında Diyabet Oluşturulması

DK grubundaki sıçanlara 0.1 M sitrat tamponu (pH:4,5) içinde çözülen STZ (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) 60mg/kg dozunda i.p. olarak uygulanmıştır. Bu gruptaki sıçanların içme suyuna, muhtemel hipoglisemiye bağlı ölüm ve konvülsiyon gibi komplikasyonları engellemek için, ilk 48 saat %5 glukoz eklendi. STZ uygulamasından 72 saat sonra ölçülen açlık kan şeker değeri 250 mg/dL'nin üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilip çalışmaya bu hayvanlarla devam edilmiştir.

3.4. Kan Glukoz Düzeylerinin ve Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi

Bir gece öncesinden aç bırakılan hayvanların başlangıç kan glukoz düzeyleri ve ağırlıkları ölçülmüştür. 4 hafta boyunca açlık kan glukoz ölçümü öncesi bütün sıçanların günlük ağırlık takibi yapılmıştır. Kan glukoz ölçümü kuyruk veninden enjektör yardımıyla alınan kan örnekleri ile glukometre cihazı (Vivachek/Almanya) kullanılarak yapıldı. Ölçümler 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerde tekrarlandı.

3.5. Davranış Testi

MWM testi Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi. Davranış testi, sabit aydınlatma ve sıcaklık kontrollü bir ortamda, saat 10-15 arasında yapıldı. Yüzdürme eğitimlerine başlamadan önce hayvanların ağırlıkları tartıldı.

3.5.1. MWM testi

Bu çalışmada hipokampüse bağlı öğrenme fonksiyonlarının değerlendirilmesi için MWM testi kullanılmıştır. Deney hayvanları deneyin 23.gününde saklı platformu bulmak için eğitilmişlerdir. MWM düzeneği; çapı 150 cm, derinliği 60 cm olan daire şeklinde bir havuz ve su yüzeyinin 2 cm altında kalacak şekilde 10x10 cm boyutunda bir platformdan oluşur (Şekil 12).

Deney öncesi MWM tankı 45 cm yüksekliğinde, süt tozu ile opaklaştırılmış ve 24 ± 1 °C’de ısıtılmış çeşme suyu ile doldurmuştur. Deneyin yapıldığı odanın duvarlarına, sıçanlar için ipucu oluşturabilecek farklı şekiller asıldı ve deney süresince aynı giysilerin giyilmesine, odada sessiz olunmasına ve denekler için ekstra bir uyarı oluşturmamaya dikkat edildi. Su tankının dış yüzü üzerinde kuzey (K), batı (B), güney (G) ve doğu (D) olmak üzere olmak dört farklı sanal kadrana ayrılmıştır.

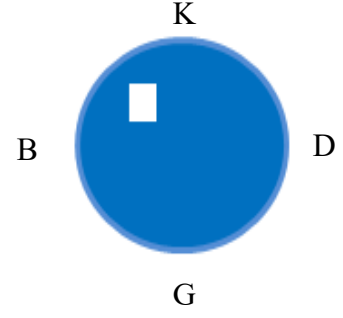


Şekil 12. Çalışmamızda kullanılan Morris su labirenti (A). Gizli platformu bulmaya çalışan sıçan (B).

Eğitim yüzdürmelerinde sıçanlar her gün, günde 4 kez farklı yönlerden havuza bırakıldılar (Şekil 13). Eğitim yüzdürmelerinin yapıldığı günlerde platform kuzeybatı (KB) kadrınının ortasında tutulmuştur.

Her bir sıçana saklı platformu bulmaları için 60 saniye verildi. 60 saniye içinde platformu bulamayan sıçanlara yardım edilerek platformu bulmaları sağlandı ve yaklaşık 15 saniye platform üzerinde kaldıktan sonra havuzun dışına alındılar. Ve böylece hayvanlar platformun yerini öğrenmiş olacaktır. Her bir denek 5 gün boyunca günde 4 defa eğitime alınacaktır. Her bir yüzdürme esnasında hayvanların saklı platformu bulma süreleri kaydedilmiştir.

Gün	Eğitim 1	Eğitim 2	Eğitim 3	Eğitim 4
1	G	B	K	D
2	B	K	D	G
3	K	D	G	B
4	D	G	B	K
5	G	B	K	D
Probe	KB			



Şekil 13. Sıçanların havuza bırakıldıkları yönler (K: kuzey, D:doğu, G: güney, B: batı).

3.6. Doku Örneklerinin Alınması

Davranış testlerinin bitiminden sonra tüm sıçanlara i.p şekilde yüksek doz anestezi (sodyum tiyopental) verilerek feda edildi. Beyin dokuları çıkarılarak hipokampusler buz üstünde hızlıca izole edilerek çalışmanın yapılacağı güne $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de derin dondurucuda saklandı.

3.7. Nitrotirozin, NLRP3 ve IL-1 β Düzeylerinin Belirlenmesi

3.7.1. Fosfat tampon solüsyonun (PBS) hazırlanması

0.8g NaCl (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany), 0.144g Na₂HPO₄ (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany), 0.02g KCl (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, US), ve 0.024g KH₂PO₄ (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) balon jöjeye konuldu ve distile su ile hacmi 100ml'ye tamamlanarak çözünmesi sağlandı. Çözeltiye 1N HCl eklenerek pH'sı 7.2-7.4 olması sağlandı.

3.7.2. Doku homojenizatlarının hazırlanması

Doku örnekleri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ saklanan dondurucudan çıkarıldıktan sonra buz üstünde çözünmesi sağlandı. Ardından doku örnekleri tartılıp 1/9 oranında PBS eklenilerek mekanik homojenizatörde homojenize edildi. Homojenize edilen dokular $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika süreyle 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden elde edilen süpernatantlar çalışmada kullanıldı. Nitrotirozin, NLRP3 ve IL-1 β düzeyleri enzyeme-linked immün sorbent assay (ELISA) yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.7.3. Nitrotirozin tayini

Nitrotirozin ölçümü, 3-NT (3-Nitrotyrosine) ELISA kiti (Elabscience Biotechnology, Çin, katalog no: E-EL-0040) kullanılarak gerçekleştirildi. Standartlar hazırlanıp kitin her kuyucuğuna sırasıyla 50 µl standart, 50 µl örnek, 50 µl biotinylated detection antibody, 100 µl HRP conjugate eklenip inkübasyonu takiben 5 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi. Her kuyucuğa 90 µl substrate reagent, 50 µl stop solüsyonu eklenip ELISA (Awareness, Chromate 4300, USA) cihazında 450 nm dalga boyunda okutularak ölçüm yapılmıştır.

3.7.4. NLRP3 tayini

Hipokampus NLRP3 düzeyeri, Rat NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3) ELISA kiti (SinoGeneClon Biotechnology, Çin, katalog no: SG-21234) kullanılarak gerçekleştirildi. İlk önce kitin kullanım klavuzuna göre standartlar hazırlandı. Elisa kitin her kuyucuğuna sırasıyla 50 µl standart, 40 µl örnek solüsyon, 10 µl örnek, 50 µl HRP conjugate eklenip 37°C'de 30 dakika boyunca inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından her kuyucuğa 50 µl kromojen A solüsyon, 50 µl kromojen B solüsyon, 50 µl stop solüsyonu eklendi ve plate ELISA cihazında 450nm dalga boyunda okutularak ölçüm yapıldı.

3.7.5. IL-1β tayini

IL-1β ölçümü, Rat IL-1β (Interleukin 1 Beta) ELISA kiti (Elabscience Biotechnology, Çin, katalog no: E-EL-R0012) kullanılarak ölçüldü. Kitin kullanım klavuzuna uygun olarak standartlar hazırlandı. Kitin her kuyucuğuna sırasıyla 100 µl standart, 100 µl örnek, 1000 µl biotinylated detection antibody, 100 µl HRP conjugate ve 90 µl substrate reagent konuldu ve 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. Son olarak her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenip ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda okutularak ölçüm yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS 22 istatistik paketi kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arası farklılıklar Mann whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlara ait p değeri 0.05'den küçük olması durumunda değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. Deney parametreleri ortalama \pm standart hata (SE) olarak sunulmuştur.



4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları ve Kan Glukoz Düzeyleri

Kontrol ve diyabet hayvanlarının vücut ağırlığı başlangıçta farklı değilken, 4 hafta sonunda diyabet grubunda anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$) (Tablo 1). Diyabetik gruba ait kan glukoz düzeylerinin normoglisemik kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo 1).

Tablo 1. Deney Gruplarına Ait Vücut Ağırlıkları ve Kan Glukoz Düzeyleri

Deney hayvanları	Vücut ağırlığı (g)	Kan glukoz (mg/dL)
Kontrol (n=12)	361.7±4.15	134.7±4.35 ^{&}
Diyabet (n=8)	257.7±9.7	427±34.9 ^{&}

[&] Kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.2. Deney Hayvanlarında MWMT Sonuçları

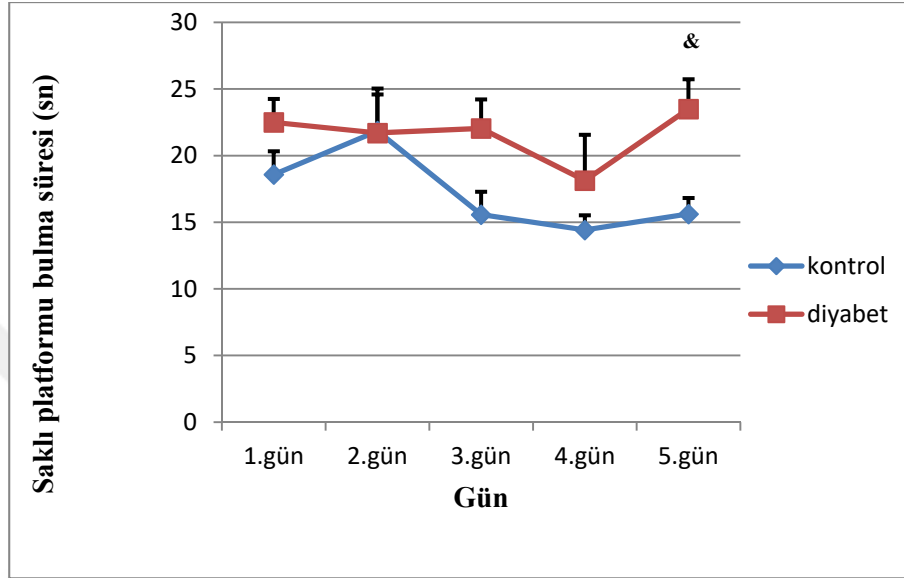
5 günlük eğitim süresinde kontrol ve diyabet hayvanlarının saklı platformu bulma sürelerine ait bulgular Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. MWMT’de Saklı Platformu Bulma Süreleri

Deney hayvanları	Saklı platformu bulma süreleri (sn)				
	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
Kontrol (n=12)	18.58±1.74	21.85±3.18	15.57±1.71	14.42±1.10	15.62±1.19
Diyabet (n=8)	22.50±1.75	21.70±2.88	22.04±2.17	18.13±3.43	23.50±2.23 ^{&}

[&]Saklı platformu bulma süreleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Değerler ortalama ± SE şeklinde verilmiştir. n= kullanılan hayvan sayısı

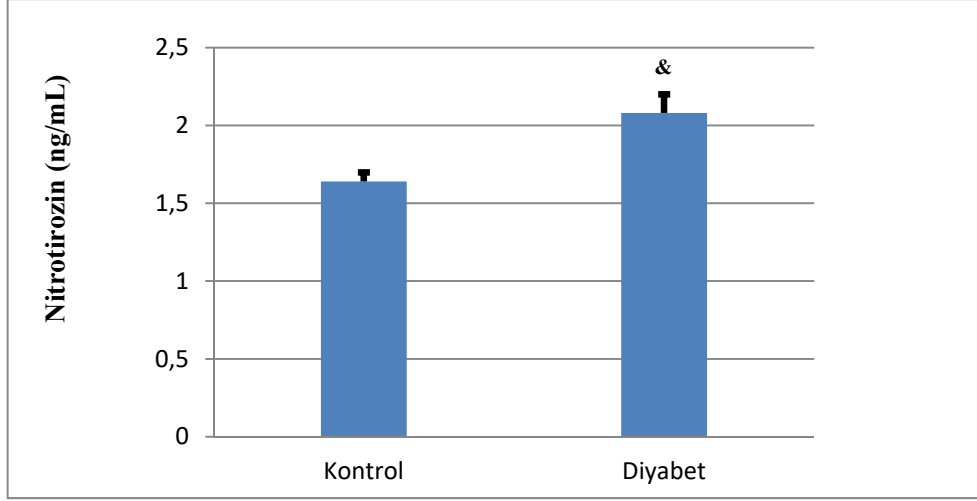
Diyabet grubunun MWMT’de saklı platformu bulma süresinin 1. 3. ve 4. günlerinde kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p>0.05$). Normoglisemik kontrol ve diyabetik gruplar arasında saklı platformu bulma süreleri açısından 5. günde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Saklı platformu bulma süresi diyabetik hayvanlarda kontrol grubuna göre 5. günde daha uzun olduğu saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 14).



Şekil 14. Tüm grupların MWMT’de saklı platformu bulma süresi (sn). Değerler ortalama \pm SE şeklinde ifade edilmiştir. & Kontrol grubuna göre ($p=0.008$) anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.3. Diyabetik Hayvanlarda Oksidatif Stres Değişiklikleri

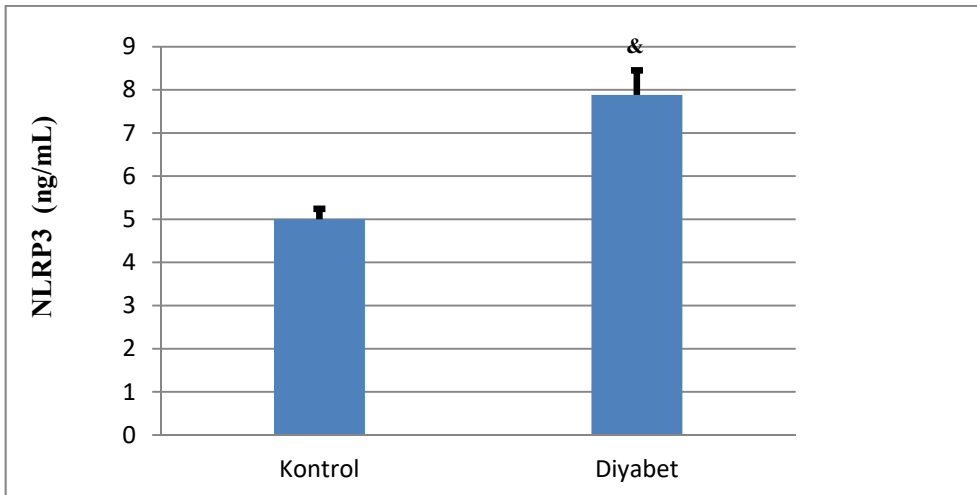
Hipokampal dokuda ölçülen nitrotirozin değerleri, kontrol grubunda 1.64 ± 0.05 ng/mL, diyabetik hayvanlarda 2.08 ± 0.12 ng/mL bulunmuştur. Diyabetik hayvan grubunun, oksidatif stresi yansıtan hipokampal nitrotirozin değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 15).



Şekil 15. Hipokampus dokusunda nitrotyrosin (ng/mL) düzeyleri. Değerler ortalama \pm SE olarak verilmiştir. & Kontrol grubuna göre ($p=0.007$) anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.4. Diyabetik Hayvanlarda İnflamazom Değişiklikleri

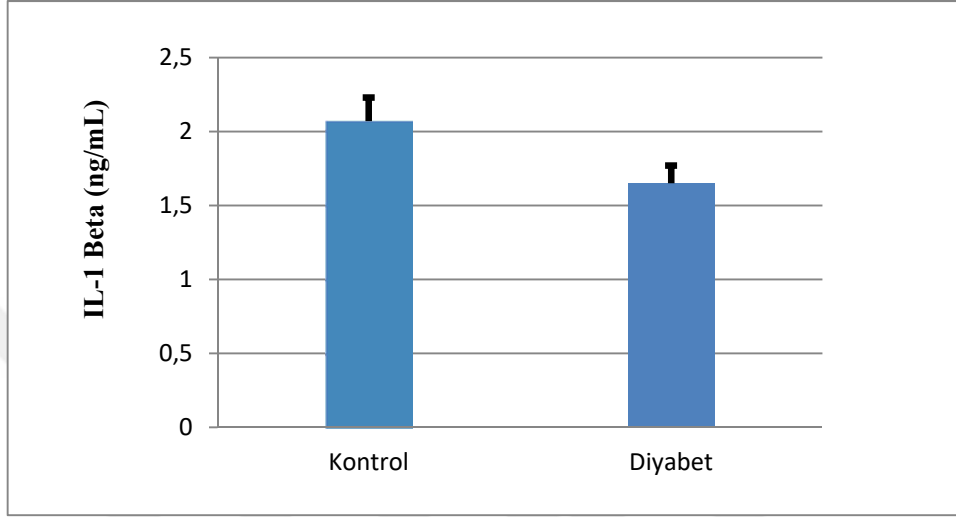
Hipokampal dokuda ölçülen NLRP3 değerleri, kontrol grubunda 5.0 ± 0.24 ng/mL, diyabet hayvanlarında 7.88 ± 0.57 ng/mL bulunmuştur. Diyabetik hayvan grubunda, inflamasyon aracısı olarak hipokampal NLRP3 değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 16).



Şekil 16. Hipokampus dokusunda NLRP3 (ng/mL) düzeyleri. Değerler ortalama \pm SE olarak verilmiştir. & Kontrol grubuna göre ($p=0.000$) anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.5. Diyabetik Hayvanlarda Sitokin Değişiklikleri

Hipokampal bölgede IL-1 β değerleri kontrol grubunda 2.07 ± 0.16 ng/mL bulunmuşken, diyabetik hayvan grubunda 1.65 ± 0.12 ng/mL idi. İki grup arasında fark anlamlı değildi ($p > 0.05$). 28 günlük diyabetin hipokampal alanda IL-1 β düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmadığı saptanmıştır (Şekil 17).



Şekil 17. Hipokampus dokusunda IL-1 β (ng/mL) düzeyleri. Değerler ortalama \pm SE şeklinde olarak verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda STZ enjeksiyonu sonrası kan glukoz düzeylerinin 300 mg/dl üzerinde seyrettiği gözlenmiştir. Kan glukoz düzeylerine paralel olarak 28 günlük deney süresince diyabetik hayvan grubun vücut ağırlığı kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. 28 günlük diyabet sonrasında MWM ile değerlendirilen kognitif fonksiyonların bozulduğu da belirlenmiştir. Özellikle MWM eğitiminin 5.gününde istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde saklı platformu bulma süreleri diyabet ile uzamıştır. Uzamış saklı platformu bulma süresi diyabetle öğrenmenin yavaşladığını göstermektedir. MWM’de elde edilen bu sonuçlar literatürdeki diğer yayımlarla benzerlik göstermektedir (6, 9, 139, 143, 147). Bunun yanı sıra çalışmamızda hipokampüste nitrotirozin ve NLRP3 seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır. Deneysel çalışmalarda DM’nin kognitif işlemlerle ilgili temel alan olan hipokampüste negatif etkilerinin olduğunu ve bu etkinin oksidatif stres aktivasyonu, antioksidan enzim azalması ve apoptotik süreçlerin aktive olması ile gerçekleştiği bildirilmektedir (6, 9, 139, 143).

DM kronik kompleks bir hastalıktır ve MSS üzerine bir takım olumsuz yan etkileri bulunmaktadır. Diyabetik hastaların azalmış kognitif performans gösterdikleri ve normal sağlıklı bireylere göre beyin görüntüleme çalışmalarında hacim azalması gibi anormalliklerin gözlemlendiği bildirilmektedir (146). 2006 yılında Mijnhout ve arkadaşları bu alanda araştırma yapmayı kolaylaştırmak ve bu hastalığın tanınmasını güçlendirmek için yeni bir “diyabetle ilişkili kognitif azalma” yani ‘‘diyabetik ensefalopati’’ kavramını ortaya koymuşlardır (153).

Diyabetik ensefalopati nöropsikiyatrik hastalıklar ve kognitif fonksiyon bozuklukları ile karakterize olan diyabetin komplikasyonlarından biridir. Çeşitli çalışmalar DM’nin vasküler demans ve AD’nin gelişiminde bir risk faktörü olduğu göstermiştir. Vasküler disfonksiyon, anormal glukoz metabolizması, bozulmuş insülin sinyali, SOR ve inflamasyon diyabetik ensefalopatinin patolojik sürecinde rol oynar (141, 154). Deneysel tip 1 diyabet modellerinde çok geniş çeşitlilikte nöronal değişikliklerin olduğu saptanmıştır. Bu patolojik anormallikler; sinaptik değişiklikler, dejenerasyon, artmış serebral mikrovasküler permeabilite, nöronal kayıpları içermektedir ve bu etkiler kognitif bozukluklara ve demans gelişimindeki risk artışına yol açmaktadır (144).

Hipokampus kısa ve uzun dönem hafıza ile ilişkili beyin alanıdır ve DM gibi metabolik hastalıklara son derece duyarlıdır (155). Çeşitli çalışmalar hipokampus üzerinde diyabetin negatif etkilere sahip olduğunu ve hipokampal nöronlarda apoptoza neden olduğunu göstermiştir. Hipokampus, uzun süreli depolama için serebral hemisferlerin uygun kısmına anı göndererek ve gerektiğinde bunları toplayarak bir hafıza göstergesi olarak işlev görür (144). Hipokampus striatum ve kortekse göre daha az kapiller yoğunluğa sahiptir ve bu nedenle vasküler disfonksiyona daha duyarlıdır. Diyabetle birlikte nöronal hasar, kayıp, serebral mikrovasküler hasarın yanısıra glial hücre aktivasyonu ve inflamatuvar cevabın gelişimi kognitif fonksiyon bozukluklarının gelişiminde önemli rol oynamaktadır (156).

MWM hipokampal lezyon modellerinde kognitif fonksiyonları değerlendirmek için sıklıkla tercih edilen bir testtir. Bu testte problem çözme, gelişmiş seçicilik, dikkat, dış dünyanın iç temsillerinin oluşturulması ve ilgili bilgilerin depolanması ve alınması gibi çok sayıda kognitif bileşeni içerir (144). STZ ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda MWM testi ile değerlendirilen kognitif performans azalmasının 10 hafta sonra başladığı bildirilmektedir (157). Diğer bazı çalışmalarda ise 30 günlük diyabet süresi sonrasında MWM testinde öğrenme ve hafıza bozukluklarının olduğu gösterilmiştir (139, 158, 159). Bizim çalışmamızda bu çalışmalara benzer şekilde diyabet oluşturulmasından 4 hafta sonra daha erken dönemde öğrenme bozukluklarının geliştiği saptanmıştır.

Hiperglisemi diyabetik komplikasyonların oluşumunda temel patofizyolojik faktördür. İntrasellüler hiperglisemi mitokondriyal SOR'un yapımına neden olarak proinflamatuvar sitokinlerin yapımında artışa, resiprokal olarak sitokinlerin yapımının artışı SOR yapımını arttırmaktadır. Bu döngüden dolayı oksidatif stres ve inflamatuvar süreçler diyabette kognitif bozuklukların gelişiminde temel rol oynamaktadır. Deneysel diabetik sıçan beyinlerinde IL-6, IL1- β (146, 147, 148) ve TNF- α (6,11) gibi sitokinlerin artışının MWM testinde performans azalması ile ilişkili olduğunu saptanmıştır.

NLRP3, IL1- β oluşumunda temel mediatördür. Aktivasyon sonrasında NLRP3 adaptör protein ASC ile etkileşir, pro-kaspaz-1'i aktive ederek NLRP3 inflamazomu oluşur. NLRP3 inflamazomu, kaspaz-1 aktivasyonu ile pro-IL- β 'nın biyolojik olarak aktif IL-1 β 'ya dönüşümünü sağlar (154). Çalışmamızda diyabetik sıçan hipokampusunda NLRP3 düzeylerinin normoglisemik kontrol grubuna göre

yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu ile birlikte MWM testinde saptanan öğrenme performansında azalma NLRP3'ün diyabetle oluşan kognitif fonksiyon bozukluklarının gelişiminde rol oynadığını göstermektedir. Zhai ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada diyabetik farelerin hipokampuslerinde NLRP3 ve IL- β düzeylerinin artarken kognitif fonksiyonların azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada NLRP3 inhibitörünün kullanımının diyabetik farelerde bu etkileri tersine çevirdiği gözlenmiştir (154). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu çalışmada saptanan diyabetik farelerde hipokampal NLRP3 düzeylerinin artışı ile benzerlik göstermektedir. Ancak biz çalışmamızda IL- β düzeylerinde diyabetik sıçanlarda nomoglisemik kontrollere göre anlamlı bir artış tespit edemedik.

Zhou ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada 12 haftalık diyabet sonrasında hipokampal dokuda IL-6, IL-1 β sitokinlerin artışı tespit etmişlerdir (148). Li ve arkadaşları da (2014) 26 günlük diyabet sonrasında IL-1 β seviyesinde artışın olduğu bulmuşlardır (146). Bu bilgilere ek olarak literatürde 7 günlük diyabet sonrası IL-1 β artışının olduğunu gösteren bulgular yer almaktadır (160). Çalışmamızda STZ uygulamasından 28 gün sonra hipokampüste IL-1 β seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu durumun diyabetin süresi, kullanılan hayvan türü ve ölçüm metoduna bağlı olarak değişebileceğini düşünmekteyiz.

NLRP3 diyabette önemli inflamatuvar hedef olarak görülmektedir. Hipokampüste NLRP3 yapımının olmadığı farelerde kognitif fonksiyonların korunduğu gösterilmiştir (161). İskemik beyin hasarı sonrasında NLRP3 inhibitörünün kullanımının diyabetik sıçanlarda nörovasküler yeniden şekillenme ve kognitif fonksiyonların korunmasında etkili olduğu görülmüştür (162). NLRP3 aktivasyonu ve diyabete bağlı komplikasyonlar arasında yakından ilişki olduğu saptanmıştır (163). Menu ve Vince (2011) diyabet ve komplikasyonlarının gelişiminde NLRP3 anormal aktivasyon ve IL-1 β 'nin yapımının artışının etkisini tanımlamışlardır (164). NLRP3'ün diyabetik retinopatinin gelişiminde retinal hücrelerde permeabilite ve apoptozu artırarak etkili olduğu bildirilmektedir (150, 165). Zhang ve arkadaşları (2017) retinal hücre kültüründe NLRP3 inhibitörü uygulaması ile yüksek glukoz ortamında IL-1 β salınımının ve retinal hücre apoptozunun azaldığını göstermişlerdir. NLRP3'ün diyabetik kardiyomiyopati (152) ve nefropati (166) gelişiminde rol oynadığı çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. NLRP3 inflamazom inhibitörü tip 2 diyabet ve ateroskleroz gibi inflamatuvar hastalıklarda

potansiyel bir tedavi ajanı olarak önerilmektedir (167). Bu bilgiyi destekleyecek şekilde NLRP3 inhibisyonunun diyabete bağlı olarak gelişen nefropati (163), kognitif fonksiyon bozuklukları ile anksiyete ve depresyon benzeri davranışı (154), retinal hücre hasarını (152) ve serebral iskemik hasarı (168) azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir.

Diyabetle ortaya çıkan nörodejenerasyonda inflamatuvar cevap, SOR'un üretimi ve reaktif nitrojen türlerinin oluşumu arasında yakından bir ilişki bulunmaktadır (149). Ayrıca son çalışmalarda diyabetin SOR üretimindeki artışa neden olarak apoptotik nöronal ölümle sonuçlandığı ortaya konmuştur. Beyin katalaz enziminin bulunmaması ve glutatyon düzeyinin düşüklüğü nedeniyle oksidatif hasara son derece duyarlıdır (156). Nitrik oksit, superoksit radikali ile peroksiniti oluşturarak nitrozatif stresin oluşumuna neden olur. Nitrozatif stres nitrik oksit sentaz yapımının ve nitrit seviyesinde artışa, astrosit aktivasyonu ve protein nitrasyonuna yol açarak kognitif bozukluklara ve nörodejenerasyona neden olmaktadır (140). Çalışmamızda oksidatif stresin bir göstergesi olarak hipokampal alanda ölçülen peroksinitirle tirozin reaksiyon ürünü olan nitrotirozin düzeyleri diyabetik grupta normoglisemik kontrollere göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Nitrotirozin seviyesinin diyabetik grupta artışının MWM ile değerlendirilen öğrenme bozukluklarında etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Sadraie ve arkadaşları (2019) nitrotirozin seviyesindeki artışın kognitif fonksiyon bozuklukların gelişiminde etkili olduğunu göstermişlerdir (140). Benzer şekilde Alzheimer hastalığı modellerinde de nitrotirozin seviyesinin arttığı bulunmuştur. Tirozinlerin nitrasyonu hafıza bozukluğunu proteinlerin fosforilasyonu ve konformasyonel değişimini inhibe etmesiyle ortaya çıkarmaktadır (142). Kelly-Cobbs ve arkadaşları (2012) diyabetik sıçanlarda hem plazma hem de orta serebral arterde nitrotirozin düzeylerinde artışların oluşunu göstermişlerdir (145). Bu bulgular da gözönüne alınırsa çalışmamızda elde ettiğimiz diyabetik koşullarda hipokampal alanda artan nitrotirozin düzeyinin öğrenme bozukluklarının oluşumunda rol oynayabildiğini göstermektedir.

Sonuçlarımız STZ ile oluşturulan diyabetik koşullarda hipokampal alanda NLRP3 ve nitrotirozin düzeylerinin artışının diyabete bağlı olarak gözlenen öğrenme bozukluklarının fizyopatolojisinde yer aldığını göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Kronik hiperglisemi ile karakterize olan DM'nin öğrenme ve hafıza kayıpları ile karakterize kognitif fonksiyon bozukluklarını içeren MSS'de çeşitli komplikasyonlara neden olmaktadır. Artan kan glukozunun, öğrenme ve hafızadan sorumlu beyin bölgesi olan hipokampüste oluşturduğu oksidatif stresin tetiklediği inflamatuvar sürecin kognitif bozuklukların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bu inflamasyon sürecinde inflamazomlar rol alır ve bunların karmaşık etkileşimleri neticesinde hücre hasarına sebep olan proinflamatuvar sitokinlerin üretimi artar.

Çalışmamızın sonuçları diyabetik sıçanlarda MWM testi ile değerlendirilen öğrenme fonksiyonların bozulduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra çalışmamızda diyabetik koşullarda hipokampüste nitrotirozin ve NLRP3 seviyelerinde artış olduğu saptanmış ve bunların diyabete bağlı olarak gözlenen öğrenme bozukluklarının fizyopatolojisinde yer almaktadır. Diyabet ile hipokampal IL-1 β düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı. DM'de kognitif fonksiyon değişimleri ile hipokampal nitrozatif stres, NLRP3 ve IL-1 β arasındaki ilişki tam olarak araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda diyabetik sıçan hipokampüsünde NLRP3, IL-1 β ve nitrotirozin düzeylerinin belirlenmesi ve bunun bilişsel işlev bozukluklarında rol alan mekanizmaları aydınlatmaya çalıştık.

7. KAYNAKLAR

1. Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29(4):494–511, 2008.
2. Mc Crimmon JR, Ryan MC, Frier MB. Diabetes and cognitive dysfunction. *Lancet* 379:2291–99, 2012.
3. Cheng G, Huang C, Deng H, Wang H. Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Intern Med J* 42(5):484-91, 2012.
4. Mayeda ER, Whitmer RA, Yaffe K. Diabetes and cognition. *Clin Geriatr Med* 31(1):101-15, 2015.
5. Wang JQ, Yin J, Song YF, Zhang L, Ren YX, Wang DG, Gao LP, Jing YH. Brain aging and AD-like pathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Res* 2014:1-2, 2014.
6. Wang XP, Ye P, Lv J, Zhou L, Qian ZY, Huang YJ, Mu ZH, Wang X, Liu XJ, Wan Q, Yang ZH, Wang F, Zou YY. Expression changes of NMDA and AMPA receptor subunits in the hippocampus in rats with diabetes induced by streptozotocin coupled with memory impairment. *Neurochem Res* 44(4):978-993, 2019.
7. Tian X, Liu Y, Ren G, Yin L, Liang X, Geng T, Dang H, An R. Resveratrol limits Diabetes-associated cognitive decline in rats by preventing oxidative stress and inflammation and modulating hippocampal structural synaptic plasticity. *Brain Res* 1650:1-9, 2016.
8. Baluchnejadmojarad T, Kiasalari Z, Afshin-Majd S, Ghasemi Z, Roghani M. S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. *Eur J Pharmacol* 794:69-76, 2017.
9. Omidi G, Karimi SA, Rezvani-Kamran A, Monsef A, Shahidi S, Komaki A. Effect of coenzyme Q10 supplementation on diabetes induced memory deficits in rats. *Metab Brain Dis* 34(3):833-840, 2019.

10. Amor S, Peferoen LA, Vogel DY, Breur M, Van der Valk P, Baker D, Van Noort JM. Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. *Immunology* 142(2):151-166, 2013.
11. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat Rev Immunol* 17(1):49-59, 2017.
12. Sepehri Z, Kiani Z, Afshari M, Kohan F, Dalvand A, Ghavami S. Inflammasomes and type 2 diabetes; an updated systematic review. *Immunol Lett* 192:97-103, 2017.
13. Rovira-Llopis S, Apostolova N, Bañuls C, Muntané J, Rocha M, Victor VM. Mitochondria, the NLRP3 Inflammasome, and Sirtuins in Type 2 Diabetes: New Therapeutic Targets. *Antioxid Redox Signal* 29(8):749-791, 2018.
14. Qiu YY, Tang LQ. Roles of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Pharmacol Res* 114:251-264, 2016.
15. World Health Organization. Global Report On Diabetes. 2016. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (10.03.2019).
16. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87:4-14, 2010.
17. International Diabetes Federation. 7th ed. International Diabetes Federation; Brussels, Belgium: 17-19, 2015. IDF Diabetes Atlas. <http://www.idf.org/diabetesatlas> (25.02.2019).
18. World Health Organization. Diabetes country profiles, 2016. <http://www.who.int> (25.02.2019).
19. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 41(1):13-27, 2018.
20. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464(7293):1293-1300, 2010.
21. Satman İ, Salman S, Deyneli O, Özdemir D, Yazıcı D, Mert M, Türker F, İmamoğlu Ş, Yılmaz C, Akalın S, Dinççağ N, Özer E. Diabetes Mellitus Ve

Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji Ve Metabolizma Derneği.10. baskı, 24-26, 2018.

22. Radenković K, Banach M, Bekiari E, Rizzo M, Edmonds M. Complications of diabetes 2017. *J Diabetes Res* 2018:3086167, 2018.

23. Wharam JF, Lu CY, Zhang F, Callahan M, Xu X, Wallace J, Soumerai S, Ross-Degnan D, Newhouse JP. High-Deductible insurance and delay in care for the macrovascular complications of diabetes. *Annals of Internal Medicine* 169(12):845-854, 2018.

24. Lotfy M, Adeghate J, Kalasz H, Singh J, Adeghate E. Chronic complications of diabetes mellitus: A Mini Review. *Curr Diabetes Rev* 13(1):3-10, 2017.

25. Ertörer ME. Diabetes mellitus ve bilişsel fonksiyonlar. *Türkiye Klinikleri J Endokrin* 9(1):6-12, 2014.

26. Tsuruta R, Fujita M, Ono T, Koda Y, Koga Y. Hyperglycemia enhances excessive superoxide anion radical generation, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats. *Brain Res* 1309:155-163, 2010.

27. Hernández-Fonseca JP, Rincón J, Pedrañez A, Viera N, Arcaya JL, Viera N, Arcaya JL, Carrizo E, Mosquera J. Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex, cerebellum, and hypothalamus from diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 329632, 2009.

28. Zhou H, Lu W, Shi Y, Bai F, Chang J, Yuan Y, Teng G, Zhang Z. Impairments in cognition and resting-state connectivity of the hippocampus in elderly subjects with type 2 diabetes. *Neurosci Lett* 31;473(1):5-10, 2010.

29. Kawanami D, Matoba K, Sango K, Utsunomiya K. Incretin-based therapies for diabetic complications: basic mechanisms and clinical evidence. *Int J Mol Sci* 17(8), 2016.

30. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93(1):137-88, 2013.

31. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107(9): 1058-70, 2010.
32. Nguyen DV, Shaw LC, Grant MB. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Frontiers in Endocrinology* 3:170, 2012.
33. Akash MSH, Rehman K, Chen S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem* 114:525-31, 2013.
34. Rehman K, Akash MSH. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? *J Cell Biochem* 118(11):3577-3585, 2017.
35. Sandireddy R, Yerra VG, Areti A, Komirishetty P, Kumar A. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. *Int J Endocrinol* 2014:674987, 2014.
36. Demircan N, Gurel A, Armutcu F, Unalacak M, Aktunc E, Atmaca H. The evaluation of serum cystatin C, malondialdehyde, and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit* 14:97-101, 2008.
37. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci* 34:6-17, 2014.
38. İzci Y, Erbaş CY. Hippocampus: Its structure and functions. *Türk Nöroşir Derg* 25(3):287-295, 2015.
39. Park D, Bae S, Yoon TH, Ko J. Molecular mechanisms of synaptic specificity: spotlight on hippocampal and cerebellar synapse organizers. *Mol Cells* 41(5):373-380, 2018.
40. Catani M, Dell'acqua F, Thiebaut de Schotten M. A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 37(8):1724-37, 2013.
41. Singh R, Kaur N, Kishore L, Gupta GK. Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach. *J Ethnopharmacol* 150(1):51-70, 2013.
42. Zheng F, Yan L, Yang Z, Zhong B, Xie W. HbA1c, diabetes and cognitive decline: the english longitudinal study of ageing. *Diabetologia* 61:839-848, 2018.

43. Luchsinger JA. Type 2 diabetes and cognitive impairment: linking mechanisms. *J. Alzheimers Dis* 30: 185-198, 2012.
44. Yuan XY, Wang XG. Mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus and related risk factors: a review. *Rev Neurosci* 26;28(7):715-723, 2017.
45. Gupta A, Singh A, Deka RC, Gupta R, Jha R. To investigate role of glycosylated hemoglobin (HbA1c) as a biomarker for prediction of dementia and cognitive dysfunction in type 2 diabetic patients. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 8:437, 2018.
46. Spauwen PJJ, van Eupen MGA, Köhler S, Stehouwer CDA, Verhey FRJ. Associations of advanced glycation end-products with cognitive functions in individuals with and without type 2 diabetes: The Maastricht Study *J Clin Endocrinol Metab* 100:951-960, 2015.
47. Sheen YJ, Sheu WH. Association between hypoglycemia and dementia in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 116:279-287, 2016.
48. Zhong Y, Zhang XY, Miao Y, Zhu JH, Yan H, Wang BY, Jin J, Hu TJ, Jia W.P. The relationship between glucose excursion and cognitive function in aged type 2 diabetes patients. *Biomed Environ Sci* 25:1-7, 2012.
49. Su F, Shu H, Ye Q, Wang Z, Xie C, Yuan B, Zhang Z, Bai F. Brain insulin resistance deteriorates cognition by altering the topological features of brain networks *Neuroimage Clin* 13:280-287, 2016.
50. Jiménez-Palomares M, Ramos-Rodríguez JJ, López-Acosta JF, Pacheco-Herrero M, Lechuga-Sancho AM, Perdomo G, García-Alloza M, Cózar-Castellano I. Increased A β production prompts the onset of glucose intolerance and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1;302(11):1373-80, 2012.
51. Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, Wrighten SA, Green AJ. Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. *Diabetes* 64:3927-3936, 2015.
52. Mehrabian S, Raycheva M, Gateva A, Todorova G, Angelova P, Traykova M, Stankova T, Kamenov Z, Traykov L. Cognitive dysfunction profile and arterial stiffness in type 2 diabetes. *J Neurol Sci* 322:152-156, 2012.

53. Crosby-Nwaobi R, Sivaprasad S, Forbes A. A systematic review of the association of diabetic retinopathy and cognitive impairment in people with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 96:101-110, 2012.
54. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, Iadecola C, Launer LJ, Laurent S, Lopez OL, Nyenhuis D. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association *Stroke* 42(9):2672-713, 2011.
55. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4(8):118-26, 2010.
56. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29:415-445, 2011.
57. Sawada M, Sawada H, Nagatsu T. Effects of aging on neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis* 5(3-4):254-6, 2008.
58. Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, Muniz A, Mendiola AS, Tsin AT, Allen DM, Cardona AE. The role of microglia in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol* 2014:705783, 2014.
59. Gorska-Ciebiada M, Saryusz-Wolska M, Borkowska A, Ciebiada M, Loba J. Serum levels of inflammatory markers in depressed elderly patients with diabetes and mild cognitive impairment. *PLoS ONE* 10(3): e0120433, 2015.
60. Gorska-Ciebiada M, Saryusz-Wolska M, Borkowska A, Ciebiada M, Loba J. Adiponectin, leptin and IL-1 β in elderly diabetic patients with mild cognitive impairment. *Metab Brain Dis* 31(2):257-266, 2016.
61. Gorska-Ciebiada M, Saryuszwolska M, Borkowska A, Ciebiada M, Loba J. C-Reactive protein, advanced glycation end products, and their receptor in type 2 diabetic, elderly patients with mild cognitive impairment. *Front Aging Neurosci* 7:209, 2015.

62. Wang P, Huang R, Lu S, Xia W, Cai R, Sun H, Wang S. RAGE and AGEs in mild cognitive impairment of diabetic patients: a cross-sectional study. *PLoS One* 11(1):e0145521, 2016.
63. Tian S, Han J, Huang R, Xia W, Sun J, Cai R, Dong X, Shen Y, Wang S. Association of increased serum ACE activity with logical memory ability in type 2 diabetic patients with mild cognitive impairment. *Front Behav Neurosci* 10:239, 2016.
64. Yong-Jun Liu, et al. TSLP: An epithelial cell cytokine that regulates t cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* 25:193-219, 2007.
65. Charo IF, Romsdoff RM. The many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation. *NEJM* 354:610-621, 2006.
66. Xie WR, Deng H, Li H, et al. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience* 142:809-822, 2006.
67. Heijmans-Antonissen C, Wesseldijk F, Munnikes RJ, et al. Multiplex bead array assay for detection of 25 soluble cytokines in blister fluid of patients with complex regional pain syndrome type 1. *Mediators Inflamm* 2006:28398, 2006.
68. Ozaktay AC, Kallakuri S, Takebayashi T, et al. Effects of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats. *Eur Spine J* 1-9, 2006.
69. Niranjan R. Recent advances in the mechanisms of neuroinflammation and their roles in neurodegeneration. *Neurochem Int* 120:13-20 2018. 70.
70. McManus RM, Heneka MT. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights. *Alzheimers Res Ther* 4;9(1):14, 2017.
71. Kielian T. Multifaceted roles of neuroinflammation: the need to consider both sides of the coin. *J Neurochem* 136 (1):5-9, 2016.
72. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6(4):193-201, 2010.

73. Duraisamy Kempuraj, Ramasamy Thangavel, Govindhasamy P. Selvakumar, Smita Zaheer, Mohammad E. Ahmed, Sudhanshu P. Raikwar, Haris Zahoor, Daniyal Saeed, Prashant A. Natteru, Shankar Iyer, Asgar Zaheer. Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 11:216, 2017.
74. Pugazhenthii S, Qin L, Reddy PH. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(5):1037-1045, 2017.
75. Tohidpour A, Morgun AV, Boitsova EB, Malinovskaya NA, Martynova GP, Khilazheva ED, Kopylevich NV, Gertsog GE, Salmina AB. Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 276, 2017.
76. Guo J, Yu C, Li H, Liu F, Feng R, Wang H, Meng Y, Li Z, Ju G, Wang J. Impaired neural stem/progenitor cell proliferation in streptozotocin-induced and spontaneous diabetic mice. *Neurosci Res* 68(4):329-36, 2010.
77. Hein AM, Zarcone TJ, Parfitt DB, Matousek SB, Carbonari DM, Olschowka JA, O'Banion MK. Behavioral, structural and molecular changes following long-term hippocampal IL-1 β overexpression in transgenic mice. *J Neuroimmune Pharmacol* 7(1):145-55, 2012.
78. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron* 64:61-78, 2009.
79. Waisman A, Liblau RS, Becher B. Innate and adaptive immune responses in the CNS. *Lancet Neurol* 14(9):945-55, 2015.
80. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 16:358-372, 2015.
81. Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 15(2):84-97, 2014.
82. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867, 2006.

83. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116(7):1793-801, 2006.
84. Rehman K, Akash MSH, Liaqat A, Kamal S, Qadir MI, Rasul A. Role of interleukin-6 in development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 27(3):229-236, 2017.
85. Dhananjayan K, Gunawardena D, Hearn N, Sonntag T, Moran C, Gyengesi E, Srikanth V, Münch G. Activation of macrophages and microglia by interferon- γ and lipopolysaccharide increases methylglyoxal production: a new mechanism in the development of vascular complications and cognitive decline in type 2 diabetes mellitus? *J Alzheimers Dis* 59(2):467-479, 2017.
86. Vuong B, Odero G, Rozbacher S, Stevenson M, Kereliuk SM, Pereira TJ, Dolinsky VW, Kauppinen TM. Exposure to gestational diabetes mellitus induces neuroinflammation, derangement of hippocampal neurons, and cognitive changes in rat offspring. *J Neuroinflammation* 7;14(1):80, 2017.
87. Bathina S, Srinivas N, Das UN. Streptozotocin produces oxidative stress, inflammation and decreases BDNF concentrations to induce apoptosis of RIN5F cells and type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. *Biochem Biophys Res Commun* 29;486(2):406-413, 2017.
88. Rajput MS, Sarkar PD. Modulation of neuro-inflammatory condition, acetylcholinesterase and antioxidant levels by genistein attenuates diabetes associated cognitive decline in mice. *Chem Biol Interact* 25;268:93-102, 2017.
89. Ma C, Long H. Protective effect of betulin on cognitive decline in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Neurotoxicology* 57:104-111, 2016.
90. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24(10):453-62, 2014.
91. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem* 86:715-748, 2017.

92. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(11):4405-9, 2014.
93. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39(1):73-82, 2017.
94. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4(2):89-96, 2008.
95. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84, 2007.
96. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biol* 11:613-619, 2017.
97. Bartsaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol* 14:618-625, 2018.
98. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid Med Cell Longev* 2017:6501046, 2017.
99. Sousa BC, Pitt AR, Spickett CM. Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds. *Free Radic Biol Med* 111:294-308, 2017.
100. Cadet JI, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 531(1-2):5-23, 2003.
101. Souza JM, Peluffo G, Radi R. Protein tyrosine nitration-functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med* 45(4):357-66, 2008.
102. Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M, Bartsaghi S, Carballal S, Romero N, Alvarez B, Radi R. biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chem Rev.* 14;118(3):1338-1408, 2018.

103. Batthyány C, Bartesaghi S, Mastrogiovanni M, Lima A, Demicheli V, Radi R. Tyrosine-Nitrated proteins: proteomic and bioanalytical aspects. *Antioxid Redox Signal* 26(7):313-328, 2017.
104. Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S. Reduced betacell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45:85-96, 2002.
105. Rehman K, Akash MSH. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? *J Biomed Sci* 23(1):87, 2016.
106. Akash MS, Rehman K, Chen S. Goto-Kakizaki rats: its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 9:387-96, 2013.
107. Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, Weir GC. Involvement of c-Jun N terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J Biol Chem* 277:30010-8, 2002.
108. Ceriello A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr Pract* 12 Suppl 1:60-2, 2006.
109. de M Bandeira S, da Fonseca LJ, da S Guedes G, Rabelo LA, Goulart MO, Vasconcelos SM. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. *Int J Mol Sci* 14(2):3265-84, 2013.
110. Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Muñoz FJ. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 4439(18)30452-6, 2018.
111. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 19; 140(6):821-32, 2010.
112. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481: 278-286, 2012.
113. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13(6):397-411, 2013.

114. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* 21(7): 677-687, 2015.
115. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 16(7):407-20, 2016.
116. Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell* 165(4):792-800, 2016.
117. Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat. Immunol* 13: 333–342, 2012.
118. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of nlrp3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci* 41(12):1012-1021, 2016.
119. Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* 16, 229–236, 2015.
120. Robbins GR, Wen H, Ting JP. Inflammasomes and metabolic disorders: old genes in modern diseases. *Mol Cell* 54:297-308, 2014.
121. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11(2):136-40, 2010.
122. Stutz A, Golenbock DT, Latz E. Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest* 119(12):3502-11, 2009.
123. De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol* 32(8):373-9, 2011.
124. Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 62(1):194-204, 2013.
125. Rheinheimer J, de Souza BM, Cardoso NS, Bauer AC, Crispim D. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. *Metabolism* 74:1-9, 2017.

126. Grant RW, Dixit VD. Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front Immunol* 4:50, 2013.
127. Al-Awar A, Kupai K, Veszeka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, Török S, Pósa A, Varga C. Experimental diabetes mellitus in different animal models. *J Diabetes Res* 2016:9051426, 2016.
128. King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 166(3):877-94, 2012.
129. Lee JH, Yang SH, Oh JM, Lee MG. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus. *J Pharm Pharmacol* 62(1):1-23, 2010.
130. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* (2):245-58, 2009.
131. Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact* 244:49-63, 2016.
132. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36:60-90, 2001.
133. McDonald RJ, Hong NS, Devan BD. The challenges of understanding mammalian cognition and memory-based behaviours: an interactive learning and memory systems approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28:719-745, 2004.
134. Mutlu O. Experimental animal models related with depression, anxiety and memory studies. *Turkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topic* 4(1):48-52, 2016.
135. Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice. *PLoS One* 17;10(4), 2015.
136. Quillfeldt JA. Behavioral methods to study learning and memory in rats. *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research* 271-311, 2006.

137. Palleria C, Leo A, Andreozzi F, Citraro R, Iannone M, Spiga R, Sesti G, Constanti A, De Sarro G, Arturi F, Russo E. Liraglutide prevents cognitive decline in a rat model of streptozotocin-induced diabetes independently from its peripheral metabolic effects. *Behav Brain Res* 321:157-169, 2017.
138. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *Journal of Visualized Experiments* (53), 2011.
139. Rababa'h AM, Mardini AN, Alzoubi KH, Ababneh MA, Athamneh RY. The effect of cilostazol on hippocampal memory and oxidative stress biomarkers in rat model of diabetes mellitus. *Brain Res* 1715:182-187, 2019.
140. Sadraie S, Kiasalari Z, Razavian M, Azimi S, Sedighnejad L, Afshin-Majd S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Berberine ameliorates lipopolysaccharide-induced learning and memory deficit in the rat: Insights into underlying molecular mechanisms. *Metab Brain Dis* 34(1):245-255, 2019.
141. Ahshin-Majd S, Zamani S, Kiamari T, Kiasalari Z, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Carnosine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats: Possible involved mechanisms. *Peptides* 86:102-111, 2016.
142. Lu P, Mamiya T, Lu L, Mouri A, Ikejima T, Kim HC, Zou LB, Nabeshima T. Xanthoceraside attenuates amyloid β peptide₂₅₋₃₅-induced learning and memory impairments in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 219(1):181-90, 2012.
143. Delkhosh-Kasmaie F, Farshid AA, Tamaddonfard E, Imani M. The effects of safranal, a constituent of saffron, and metformin on spatial learning and memory impairments in type-1 diabetic rats: behavioral and hippocampal histopathological and biochemical evaluations. *Biomed Pharmacother* 107:203-211, 2018.
144. Sadeghi A, Hami J, Razavi S, Esfandiary E, Hejazi Z. The effect of diabetes mellitus on apoptosis in hippocampus: Cellular and molecular aspects. *Int J Prev Med* 7: 1-17, 2016.

145. Kelly-Cobbs AI, Prakash R, Coucha M, Knight RA, Li W, Ogbi SN, Johnson M, Ergul A. Cerebral myogenic reactivity and blood flow in type 2 diabetic rats: Role of peroxynitrite in hypoxia-mediated loss of myogenic tone. *J Pharmacol Exp Ther* 342(2):407-15, 2012.
146. Li R, Zang A, Zhang L, Zhang H, Zhao L, Qi Z, Wang H. Chrysin ameliorates diabetes-associated cognitive deficits in Wistar rats. *Neurol Sci* 35(10):1527-32, 2014.
147. Datusalia AK, Sharma SS. Amelioration of diabetes-induced cognitive deficits by GSK-3 β inhibition is attributed to modulation of neurotransmitters and neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 50(2):390-405, 2014.
148. Zhou XY, Zhang F, Hu XT, Chen J, Tang RX, Zheng KY, Song YJ. Depression can be prevented by astaxanthin through inhibition of hippocampal inflammation in diabetic mice. *Brain Res* 1657:262-268, 2017.
149. Oliveira WH, Nunes AK, França ME, Santos LA, Lós DB, Rocha SW, Barbosa KP, Rodrigues GB, Peixoto CA. Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Res* 1644:149-60, 2016.
150. Chen W, Zhao M, Zhao S, Lu Q, Ni L, Zou C, Lu L, Xu X, Guan H, Zheng Z, Qiu Q. Activation of the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: a novel inhibitory effect of minocycline. *Inflamm Res* 66(2):157-166, 2017.
151. Liu D, Zeng X, Li X, Mehta JL, Wang X. Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Basic Res Cardiol* 113(1):5, 2017.
152. Zhang Y, Lv X, Hu Z, Ye X, Zheng X, Ding Y, Xie P, Liu Q. Protection of Mcc950 against high-glucose-induced human retinal endothelial cell dysfunction. *Cell Death Dis* 8(7):803-805, 2017.
153. Mijnhout GS, Scheltens P, Diamant M, Biessels GJ, Wessels AM, Simsek S, Snoek FJ, Heine RJ. Diabetic encephalopathy: A concept in need of a definition. *Diabetologia* 49(6):1447-8, 2006.

154. Zhai Y, Meng X, Ye T, Xie W, Sun G, Sun X. Inhibiting the NLRP3 inflammasome activation with MCC950 ameliorates diabetic encephalopathy in db/db mice. *Molecules* 23(3): 1-14, 2018.
155. Chesnokova V, Pechnick RN, Wawrowsky K. Chronic peripheral inflammation, hippocampal neurogenesis, and behavior. *Brain Behav Immun* 58:1-8, 2016.
156. Hardigan T, Ward R, Ergul A. Cerebrovascular complications of diabetes: Focus on cognitive dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 130(20):1807-22, 2016.
157. Biessels GJ, Kamal A, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: Effects of insulin treatment. *Brain Res* 800:125–35, 1998.
158. Yön B, Belviranlı M, Okudan N. The effect of silymarin supplementation on cognitive impairment induced by diabetes in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 20180109, 2019.
159. Gocmez SS, Şahin TD, Yazir Y, Duruksu G, Eraldemir FC, Polat S, Utkan T. Resveratrol prevents cognitive deficits by attenuating oxidative damage and inflammation in rat model of streptozotocin diabetes induced vascular dementia. *Physiol Behav* 201:198-207, 2019.
160. Liu X, Liu M, Mo Y, Peng H, Gong J, Li Z, Chen J, Xie J. Naringin ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iran J Basic Med Sci* 19(4):417-22, 2016.
161. Zhuang J, Wen X, Zhang YQ, Shan Q, Zhang ZF, Zheng GH. TDP-43 upregulation mediated by the NLRP3 inflammasome induces cognitive impairment in 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)-treated mice. *Brain Behav Immun* 65:99-110, 2017.
162. Ward R, Li W, Abdul Y, Jackson L, Dong G, Jamil S, Filosa J, Fagan SC, Ergul A. NLRP3 inflammasome inhibition with MCC950 improves diabetes-mediated cognitive impairment and vasoneuronal remodeling after ischemia. *Pharmacol Res* 142:237-250, 2019.

163. Song W, Wei L, Du Y, Wang Y, Jiang S. Protective effect of ginsenoside metabolite compound K against diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and NF- κ B/p38 signaling pathway in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice. *Int Immunopharmacol* 63:227-238, 2018.
164. Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol* 166:1–15, 2011.
165. Loukovaara S, Piippo N, Kinnunen K, Hytti M, Kaarniranta K, Kauppinen A. NLRP3 inflammasome activation is associated with proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 95(8):803-808, 2017.
166. Lu M, Yin N, Liu W, Cui X, Chen S, Wang E. Curcumin ameliorates diabetic nephropathy by suppressing nlrp3 inflammasome signaling. *Biomed Res Int* 2017:1-10, 2017.
167. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inerra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Nunez G, Latz E, Kastner DL, Mills KH, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, O'Neill LA. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* 21:248–255, 2015.
168. Hong P, Li FX, Gu RN, Fang YY, Lai LY, Wang YW, Tao T, Xu SY, You ZJ, Zhang HF. inhibition of nlrp3 inflammasome ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in diabetic mice. *Neural Plast* 2018:1-8, 2018.

8.EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 07.09.2017
TOPLANTI NO : 2017/05

- 1- Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2017-15-07/09 Protokol no'lu "Streptozotosin İle Oluşturulan Diabetin İnflamazom Aracılı Nöroinflamasyon ve Hipokampal Öğrenme Üzerine Etkisi" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR
Emine Yılmaz Sıpa

Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkan Vekili

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Büşra ONAR
Mail : busraonar26@gmail.com
Doğum Tarihi ve Yeri : 26.05.1990/ Trabzon

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm	Üniversite	Yıl
Yüksek Lisans	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Bölümü	Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi	2019
Lisans	Genetik ve Biyomühendislik	Fatih Üniversitesi	2013

Poster sunumları:

1. Turan İ, Cengil O, Onar B, Altuğ B, Sayan Özaçmak H, Özaçmak V. H. Bilateral Karotid Arter Oklüzyonu ile Oluşturulan Retinal Oksidatif Stresin Çevresel Zenginleştirme İle Azaltılması, Sakarya Üniversitesi 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 07-10.05.2017, Sakarya, Türkiye.
2. Altuğ B, Turan İ, Onar B, Sayan Özaçmak H. Deneysel Diyabetin Serebellar Oksidatif Stres ve Motor Fonksiyona Etkisi, Karadeniz Teknik Üniversitesi 17. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 04-07.04.2019, Trabzon, Türkiye.
3. Onar B, Sayan Özaçmak H, Turan İ, Özaçmak V. H. Diabetes Induced Cognitive Impairment is Associated with Increase of NLRP3 and Nitrotyrosine Levels in the Hippocampus of Rats, Federation of European Neuroscience Societies Regional Meeting, 10-13.07.2019, Belgrat, Sırbistan.

Sertifikalar:

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2017.