



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**METABOLİK SENDROMLU SIÇANLARDA
HİPOKAMPUSUN
NÖROGENEZİNE ETKİLİ FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ**

Pınar BAYRAM

**HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Deniz BİLLUR**

**ANKARA
2018**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METABOLİK SENDROMLU SIÇANLARDA
HİPOKAMPUSUN
NÖROGENEZİNE ETKİLİ FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ**

Pınar BAYRAM

**HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Deniz BİLLUR

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
16L0230007 proje numarası ile desteklenmiştir**

ANKARA

2018

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Hipokampusun Nörogenezine Etkili Faktörlerin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Pınar Bayram

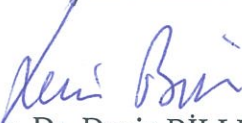
Tarih:

İmza:

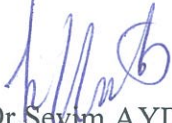
KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında
Pınar BAYRAM tarafından “Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Hipokampusun Nörogenezine
Etkili Faktörlerin İncelenmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05.01. 2018



Doç. Dr. Deniz BİLLUR
AÜTF Histoloji ve Embriyoloji ABD
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Savın AYDIN
AÜTF Histoloji ve Embriyoloji ABD
Raportör



Prof. Dr. Belma TURAN
AÜTF Biyofizik Anabilim Dalı
Üye



Prof. Dr. Emel KOPTAGEL
Yüksek İhtisas Üniversitesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD
Üye



Yard. Doç. Dr. Hilal Nakkaş
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xii
Çizelgeler	xviii

1. GİRİŞ

1.1. Hipokampusun Adlandırılması	1
1.2. Hipokampus Anatomisi	1
1.3. Hipokampusun Histolojisi	3
1.4. Hipokampus Embriyolojisi	6
1.5. Hipokampusun Fizyolojisi	7
1.6. Hipokampal Nörogenez ve İlişkili Proteinler	8
1.6.1. Tip 1 Hücreler	9
1.6.2. Tip 2 Hücreler	9
1.6.3. Tip 3 Hücreler	10
1.6.4. Tip 4 Hücreler	10
1.6.5. Tip 5 Hücreler	11
1.7. Metabolik Sendrom (MetS)	11
1.8. İnsülin	12
1.9. İnsülin Direnci	13
1.10. Beyin ve İnsülin	14
1.11. Beyin İnsülin Sinyal Yolağı	16
1.12. Beyinde Glikoz Taşıyıcı Proteinler (GLUTs)	18
1.13. Beyin İnsülin Direnci	19
1.14. İnsülin ve Öğrenme	20
1.15. Çalışmanın Amacı	21

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Deney Hayvanlarının Eldesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması	23
2.2. Sıçanlarda Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşturulması	23
2.3. Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşumunun Doğrulanması	24
2.3.1. Oral Glikoz Tolerans Testinin Ölçülmesi	25
2.3.2. Serum İnsülin Düzeyinin Belirlenmesi	25
2.3.3. Kan Basıncı Ölçümü	26
2.3.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi	26
2.4. Davranış Deneyleri	26
2.4.1. Açık Alan Testi (Open Field Test)	27
2.4.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	27
2.4.3. Vanderwolf Yüzme Testi	28

2.4.4. Aydınlık Karanlık Kutusu Testi	28
2.4.5. Harder Bezi Değerlendirmesi	29
2.5. Dokuların Elde Edilmesi	29
2.6. Işık Mikroskop İncelemeleri İçin Rutin Histolojik Takip Prosedürü	30
2.6.1. Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama Prosedürü	31
2.6.2. Krezil Viyole Boyama Prosedürü	31
2.6.3. İmmünohistokimyasal İşaretlemelemlerde Kullanılan Antikorlar ve İşaretleme Prosedürü	32
2.6.3.1. İmmünohistokimya İçin İşaretleme Prosedürü	34
2.6.3.2. TUNEL Boyama Prosedürü	35
2.7. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntülemesi İçin Yapılan Çalışmalar	35
2.7.1 İnce Kesit Boyama Protokolü	36
2.8. Western Blotlama Uygulaması	37
2.9. İmmünohistokimyasal Analizlerin Değerlendirilmesi	39
2.10. İstatistiksel Analizler	40
3. BULGULAR	
3.1. Deney Hayvanlarında MetS Deney Modelinin Doğrulanması	41
3.1.1. Deney Hayvanları OGTT Bulguları	41
3.1.2. Deney Hayvanları Vücut Ağırlığı Değişimi	42
3.1.3. Serum İnsülin Düzeyi Değişimi ve İnsülin Direnci Oluşumu	43
3.1.4. Deney Hayvanları Arteriyel Kan Basıncı Değişimi	43
3.2. Histomorfoloji Bulguları	45
3.2.1. Krezil Viyole Boyamasına Ait Bulgular	45
3.2.2. Yarı İnce Kesitlere Ait Bulgular	46
3.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları	48
3.3. İmmünohistokimya İncelemeleri ve Western Blotlama Analizleri	50
3.3.1. Nörogenez İle İlişkili Moleküllere Ait Bulgular	50
3.3.1.1 DCX Bulguları	50
3.3.1.2. Neuro D1 Bulguları	52
3.3.1.3. Ki67 Bulguları	54
3.3.1.4. NeuN Bulguları	56
3.3.2. Apoptoz Bulguları	58
3.3.3. İnsülin Sinyal Yolağı İle İlgili Bulgular	62
3.3.3.1. İnsülin Bulguları	62
3.3.3.2. İnsülin Reseptör (IR) Bulguları	64
3.3.3.3. IGF1Rα Bulguları	66
3.3.3.4. IRS1 Bulguları	67
3.3.3.5. IRS2 Bulguları	68
3.3.3.6. GLUT3 Bulguları	70
3.3.3.7. GLUT4 Bulguları	72
3.4. Davranış Testi Analizleri	75
3.4.1. Vanderwolf Yüzme Testi	75
3.4.2. Açık Alan Testi	76
3.4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	80
3.4.4. Aydınlık Karanlık Kutusu	81

3.4.5. Harder Bezi Değerlendirmesi	82
4. TARTIŞMA	84
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	93
ÖZET	96
SUMMARY	98
KAYNAKLAR	100
EKLER	107
Ek 1. Etik Kurul Kararı	107
ÖZGEÇMİŞ	108



ÖNSÖZ

Metabolik sendrom (MetS); fizyopatolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte çağımızın sorunu olan değişen beslenme alışkanlıkları, azalan fiziksel aktivite gibi nedenlerin oluşum riskini arttırdığı bir hastalıktır. MetS'in diyabet ve Alzheimer gibi hastalıkların görülme sıklığını arttırdığı bildirilmektedir. Daha önceki çalışmalarla yetişkin nöroenezinin devam ettiği yerlerden olan hipokampusta nöroenezin diyabet, Alzheimer gibi hastalıklarda ve artan yaşla birlikte azaldığı gösterilmiştir. Sıçanlar üzerinde yaptığımız çalışmada öncelikle diyabet oluşum riskini arttırdığı bilinen MetS deney modeli oluşturuldu. Hipokampus ile ilgili olan öğrenme, bellek ve anksiyeteyi ölçmeye yönelik davranış testleri, nöroenezini belirlemeye yönelik protein oranları, insülin sinyal yolağına ait bazı proteinlerin ekspresyon oranları araştırıldı. İnsülinin nöroprotektif etkilerinden yararlanabilmek için insülin enjeksiyonu yapılan MetS oluşturulmuş sıçanlarda aynı parametrelerin yeniden incelenmesi hedeflendi. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi tarafından 16L0230007 proje numarası ile desteklenmiştir.

Gerek doktora eğitimimde gerekse tez çalışmalarımda her zaman yanımda olan, bana yol gösteren, bilgi birikimi ve deneyimlerini aktaran, yetişmemde büyük emekleri geçen çok değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Deniz BİLLUR'a,

Doktora eğitimim boyunca üzerimde çok emekleri olan, her zaman destek ve anlayışla yaklaşan Anabilim Dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Alp CAN'a; Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Sn. Prof. Dr. Nurşen SARAÇ'a, Sn. Prof. Dr. Esra ERDEMLİ'ye, Sn. Prof. Dr. Belgin CAN'a, Sn. Prof. Dr. Bizden SABUNCUOĞLU'na, Sn. Prof. Dr. Oya EVİRGEN'e, Sn. Prof. Dr. Sevim AYDIN'a, Sn. Prof. Dr. Özgür ÇINAR'a; Anabilim Dalımız emekli öğretim üyeleri Sn. Prof. Dr. Canan AKBAY'a ve Sn. Prof. Dr. Cengiz GÜVEN'e,

Tez çalışmalarım sırasında verdikleri destekten dolayı Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Sn. Prof. Dr. Belma TURAN'a, Sn. Arş. Gör. Ayşegül DURAK'a ve Sn. Arş.

Gör.Yusuf OLGAR'a; Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Sn. Prof. Dr. Nezahat ZALOĞLU'na ve Sn. Arş. Gör. Hasan ÇALIŞKAN'a; Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Sn. Prof. Dr. Fikret Şahin ve Sn. Dr. Buse TÜREGÜN ATASOY'a, Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Sn. Doç Dr. Serdal Kenan KÖSE'ye,

Gerek deney hayvanlarımın beslenmesi ve bakımında, gerekse deneylerimin gerçekleştirilmesi konusunda yardımlarını esirgemeyen Sn. Uzm. Vet. Hek. H. Attila İŞGÖREN'e, Sn. Bio. Nazlı AYDIN'a, Sn. Çelebi DEMİRCAN'a ve Sn. Nizamettin ÖZDEMİR'e,

Her zaman bana destek ve yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Ferda TOPAL ÇELİKKAN'a, Arş.Gör. İrem İNANÇ'a, Arş. Gör. Rukiye KAYA'ya, Arş. Gör. Dr. Ebru ÇELİK'e, Arş. Gör. Dr. Derya ÖZDEMİR'e, Uzm. Bio. Selda KAHVECİ'ye, Bio. Ceren MUNGAN'a, Bio. Merve SUCU'ya; Anabilim dalı çalışanlarımız Serap BATI'ya, Erdoğan ÇALIŞKAN'a, Abdülkerim DİLBAZ'a ve Remzi ATA'ya,

Doktora eğitimimden bu yana Anabilim Dalımızı evimmiş gibi hissetmemi sağlayan dostlarım Arş. Gör. Dr. Emine Nazlı HAYIRLI'ya, Dr. Şule KIZIL'a, Dr. Masoud AFSHANI'ye, ve Yrd. Doç. Dr. Hilal NAKKAŞ'a

Bu günlere gelmemde her türlü emek ve sabrı gösteren, haklarını asla ödeyemeyeceğim canım DEDEM'e, ANNEM'e, BABAM'a, kardeşlerim Şefika, Ayşe ve Bayram Okan'a,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim...

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde
Σ	Toplam
μl	Mikro litre
μm	Mikro metre
μm^2	Mikro metre kare
Ab	Antikor
BLBP	Beyin lipid bağlayıcı protein
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CA	Kornu Ammonis
CA1	Kornu Ammonis 1
CA2	Kornu Ammonis 2
CA3	Kornu Ammonis 3
CA4	Kornu Ammonis 4
cm	Santimetre
DAB	3, 3 -diaminobenzidine
DCX	Doublecortin
DG	Dentat girus
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
gr	Gram
GFAP	Glial fibriler asidik protein
GLUT 1-13	Glukoz taşıyıcı 1-13
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HE	Hematoksilen Eozin
HRP	Horseradish peroxidase
IGF1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IGF1R	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü

IGF1R α	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü α
IHC	İmmünohistokimya
IR	İnsülin reseptörü
IRS	İnsülin reseptör substratı
IRS1	İnsülin reseptör substratı 1
IRS2	İnsülin reseptör substratı 2
İns	İnsülin
KBB	Kan beyin bariyeri
kg/m ²	Kilogram/metrekare
KW	Kruskal Wallis
LTD	Uzun dönem depresyon
LTP	Uzun dönem potensiasyon
M	Molar
MAPK/ERK	Mitojen aktive protein kinaz
MetS	Metabolik sendrom
MetS+İns	İnsülin enjeksiyonu yapılan metabolik sendrom grubu
mg/dl	Miligram/desilitre
mm ³	Milimetreküp
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MSS	Merkezi sinir sistemi
NaOH	Sodyum hidroksit
NeuN	Nöronal nükleer antijen
NMDA	N-methyl-D-aspartate
OsO ₄	Osmiyum tetroksit
OGGT	Oral glukoz tolerans testi
PBS	Phosphate buffer saline
pH	Power of hidrojen
PI3K	Fosfotidil inositol 3 kinaz
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PSA-NCAM	Polysialylated nöral hücre adezyon molekülü
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SGZ	Subgranüler zon

Sox2	SRY ilişkili HMG-box gene2
SVZ	Subventriküler zon
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
T2DM	Tip 2 diabetes mellitus
WB	Western blotlama



ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Hipokampal anatominin karşılaştırılması. a) sıçan ve insanlardaki hipokampal uzun eksen yöneliminin şematik gösterimleri. b) Hipokampusun (kırmızı) ve entorhinal korteks [(EC), mavi] tam uzun ekseninin sıçanlar ve insanlardaki görüntüsü. c) Sıçan ve insan hipokampusunun Nissl boyalı kesitlerinin çizimleri. . C: kaudal, D: dorsal, DG: dentat girus, L: lateral, M: medial, R: rostral, V: ventral (Strange et al., 2014). 2
- Şekil 1.2.** Krezil viyole boyalı mikrografta hipokampal oluşumun bölümlerine ait adlandırma 4
- Şekil 1.3.** Hipokampusun dentat girus bölgesine ait bölümlerin adlandırılması. 5
- Şekil 1.4.** Sol temporal lobda hipokampus bileşenlerinin katlanma safhalarının koronal düzlemdeki diyagramı. A: Erken fetal gelişimi göstermektedir. Dentat girus (D), kornu Ammonis (C), subikulum (S) ve parahipokampal girus (P), temporal boynuzun (T) medial duvarı ve tabanı boyunca dizi şeklinde düzenlenmiştir. B ve C: Neokorteksin belirgin şekilde genişlemesi ve hipokampusun bileşenlerinin farklı düzeyde büyümesinin bir sonucu olarak, bileşenler temporal boynuzda kademeli olarak katlanır. Katlanma ilk olarak dentat girus ile kornu Ammonis arasında yer alan hipokampal sulkus (kalın ok) çevresinde oluşur. Hipokampal sulkus (ince ok) dentat girus ve subikulum arasına doğru yer değiştirir ve sonunda kaybolur (Kier et al., 1997). 6
- Şekil 1.5.** Dentat girus nörogenez evreleri. DG'nin granüler tabakasındaki yeni nöronların oluşumu beş aşamaya bölünür. Yetişkin nörogenezi radial glia ve astrositik özelliklere sahip olan kök hücrelerden (Tip 1 hücreler, 1.evre) köken alır. Çeşitli belirteçlerin ekspresyonlarına dayanarak, birinci evreden sonra üç farklı tip öncü hücre (tip 2a, tip 2b ve tip 3) tanımlanabilir. Bu fazda (2. ve 3. evre) çoğalan hücreler farklıdır, nöronal belirteçleri eksprese etmeye başlar ve DG'nin granüler hücre tabakasına ulaşmak için kısa mesafe göç ederler. Yeni oluşan hücreler postmitotik olur ve geçici olarak kalretinin salgılamaya başlarlar (4. evre). Yeni hücreler aksonlarını CA3 yönüne uzatır, dentritlerini moleküler tabakaya doğru gönderir, hipokampal ağa işlevsel olarak entegre olurlar (5. evre), entorhinal korteksten inputları alır, outputları CA3 ve hilusa gönderirler (von Bohlen und Halbach, 2011). 9
- Şekil 1.6.** Merkezi Sinir Sisteminde İnsülin Sinyal Yolağı (Kim ve Feldman, 2012). 17

- Şekil 1.7.** Nöronal insülin direncinin gelişimi. a) İnsülin sinyal yolağı Akt'yi aktive ederek, normal nöronal fonksiyonu korur. b) MetS varlığında, insülin bağımlı dokularda olduğu gibi nöronlarda insülin direnci oluşur ve insülinin nörotrofik özelliklerine cevap veremez. Nöronlar nörotoksik uyarılara daha yatkın hale gelir (Kim ve Feldman, 2012). 20
- Şekil 2.1.** Hipokampus dentat girus nöronlarının Image j programında sayılması. 40
- Şekil 3.1.** OGTT sonuçları. 42
- Şekil 3.2.** Gruplar arasında vücut ağırlığı değişimine ait Ort±SEM (standart error of mean), *p<0,05. 42
- Şekil 3.3.** Sistolik kan basıncı değişimini gösteren çubuk grafik, Ort±SEM, *p<0,05 (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arasındaki karşılaştırma). 44
- Şekil 3.4.** Diyastolik kan basıncı değişimini gösteren çubuk grafik, Ort±SEM, *p<0,05 (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arasındaki karşılaştırma). 44
- Şekil 3.5.** Hipokampus dentat girus bölgesine ait mikrograflar. Boya: Krezil Viyole Bar: 100 µm 46
- Şekil 3.6.** Toluidin mavisi-azur II ile boyalı hipokampus dentat girus nöronları. Bar: 100 µm 47
- Şekil 3.7.** Kontrol, Mets ve MetS+İns gruplarına ait elektron mikrograflar. Ç: çekirdek, Yıldız: Elektron yoğun çekirdek ve sitoplazmaya sahip nöronlar, Ok: Lizozom, İnce ok: Genişlemiş granüllü endoplazma retikulumu. Bar: 1000 nm 49
- Şekil 3.8.** Hipokampus dokusunda DCX antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort±SEM, *p<0,05 (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 50
- Şekil 3.9.** Hipokampus SGZ'de 1000 µm² alanda DCX pozitif hücreler çubuk grafikte (Ort ±Std) gösterilmektedir. *p<0,05 (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma). 51
- Şekil 3.10.** Dentat girus DCX primer antikor işaretlemeleri. DCX pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ'de izlenmektedir. Bar: 100 µm 51
- Şekil 3.11.** Hipokampus dokusunda NeuroD1 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort ±SEM, *p<0,05 (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma). 52

- Şekil 3.12.** Çubuk grafikte hipokampus SGZ’de 1000 μm^2 alanda NeuroD1 pozitif hücreler (Ort $\pm$ Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma). 53
- Şekil 3.13.** Dentat girus NeuroD1 primer antikor işaretlemeleri. NeuroD1 pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ’de izlenmektedir. Bar: 100 μm 53
- Şekil 3.14.** Çubuk grafikte hipokampus SGZ’de 1000 μm^2 alandaki Ki67 pozitif hücreler (Ort $\pm$ Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma). 54
- Şekil 3.15.** Dentat girus Ki67 primer antikor işaretlemeleri. Ki67 pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ’de izlenmektedir. Bar: 100 μm 55
- Şekil 3.16.** Hipokampus dokusunda NeuN antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik Ort $\pm$ SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma). 56
- Şekil 3.17.** Çubuk grafikte hipokampus dentat girusta 1000 μm^2 alandaki NeuN pozitif hücreler (Ort $\pm$ Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma). 57
- Şekil 3.18.** Dentat girus NeuN primer antikor işaretlemeleri. NeuroD1 pozitif hücreler koyu boyalı olarak izlenmektedir. Bar: 100 μm 57
- Şekil 3.19.** Bar grafikte hipokampus SGZ ve DG’de 1000 μm^2 alanda TUNEL pozitif hücreler gösterilmektedir, (Ort $\pm$ Std), * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma), + $p<0,005$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 58
- Şekil 3.20.** Dentat girus TUNEL antikor işaretlemeleri. TUNEL pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ’de izlenmektedir. Bar: 100 μm 59
- Şekil 3.21.** Hipokampus dokusunda Cleaved Caspase 3 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort $\pm$ SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 60
- Şekil 3.22.** Çubuk grafikte hipokampus SGZ’deki Cleaved caspase 3 pozitif hücreler (Ort $\pm$ Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma), + $p<0,005$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 61
- Şekil 3.23.** Dentat girus Cleaved Caspase3 primer antikor işaretlemeleri. Caspase3 pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ’de izlenmektedir. Bar: 100 μm 61

- Şekil 3.24.** Hipokampus dokusunda insülin antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort±SEM, *p<0,05 (Kontrol ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma), +p<0,005 (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 62
- Şekil 3.25.** Hipokampusun dentat girus bölgesinde insülin primer antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelerin H-skor ortalamaları çubuk grafikte (Ort±Std) gösterilmektedir. *p<0,05 (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 63
- Şekil 3.26.** Dentat girus insülin primer antikor işaretlemeleri. Bar: 100 µm 63
- Şekil 3.27.** Hipokampus dokusunda IR antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort ±SEM, *p<0,05 (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 64
- Şekil 3.28.** Hipokampusun dentat girus bölgesinde insülin reseptör primer antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelerin H-skor ortalamaları çubuk grafikte (Ort±Std) gösterilmektedir. *p<0,05 (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), +p<0,005 (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma) 65
- Şekil 3.29.** Dentat girus IR primer antikor işaretlemeleri. Bar: 100 µm 65
- Şekil 3.30.** Hipokampus dokusunda IGF1Rα antikorunun western blot analizi ve çubuk grafik, Ort±SEM, *p<0,05 (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 66
- Şekil 3.31.** Hipokampus dokusunda IRS1 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort±SEM. p>0,05. 67
- Şekil 3.32.** Hipokampus dokusunda IRS2 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort±SEM, p<0,05 (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma). 68
- Şekil 3.33.** Hipokampusun dentat girus bölgesinde IRS2 antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelerin H-skor ortalamaları çubuk grafikte (Ort±Std) gösterilmektedir. +p<0,005 (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 69
- Şekil 3.34.** Dentat girus insülin primer antikor işaretlemeleri. Bar: 100 µm 69
- Şekil 3.35.** Hipokampus dokusunda GLUT3 antikorunun western blot analizi ve çubuk grafik, Ort±SEM, *p<0,05 (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma). 70

- Şekil 3.36.** Hipokampusun dentat girus bölgesinde GLUT3 antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelerin H-skor ortalamaları çubuk grafikte (Ort±Std) gösterilmektedir. $p>0,05$. 71
- Şekil 3.37.** Dentat girus GLUT3 primer antikor işaretlemeleri. Bar: 100 µm 71
- Şekil 3.38.** Hipokampus dokusunda GLUT4 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort±SEM, $*p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 72
- Şekil 3.39.** Hipokampusun dentat girus bölgesinde GLUT4 antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelerin H-skor ortalamalarına ait çubuk grafik (Ort±Std) gösterilmektedir. $*p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), $+p<0,005$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 73
- Şekil 3.40.** Dentat girus GLUT4 antikor işaretlemeleri. Bar: 100 µm 73
- Şekil 3.41.** Vanderwolf testi antrenman yüzmesi geçiş sürelerini gösteren çubuk grafik, Ort±Std, $*p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), $+p<0,005$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 75
- Şekil 3.42.** Vanderwolf testi geçiş gecikmesini gösteren çubuk grafik, Ort±Std, $*p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), $+p<0,005$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 76
- Şekil 3.43.** Açık alan testi geçiş süresini gösteren çubuk grafik, Ort±Std, $*p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), $+p<0,005$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 77
- Şekil 3.44.** Açık alan testi merkez bölgede geçen süreyi gösteren çubuk grafik, Ort±Std, $*p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), $+p<0,005$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma) ve açık alan testi deney düzeneği. 77
- Şekil 3.45.** Açık alan testi periferde geçen süreyi gösteren çubuk grafik, Ort±Std, $*p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), $+p<0,005$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma) ve açık alan testi deney düzeneği. 78
- Şekil 3.46.** Açık alan testi toplam katedilen mesafeyi gösteren çubuk grafik, Ort±Std, $*p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), $+p<0,005$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 78

- Şekil 3.47.** Açık alan testi iki ayak üzerine kalkma sayısını gösteren çubuk grafik, Ort $\pm$ Std, *p<0,05 (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma) ve açık alan testi deney düzeneği. 79
- Şekil 3.48.** Açık alan testi merkez bölgeye girme sayısını gösteren çubuk grafik, Ort $\pm$ Std, *p<0,05 (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma). 79
- Şekil 3.49.** Yükseltilmiş artı labirent testi açık kolda geçen süreyi gösteren çubuk grafik, Ort $\pm$ Std, *p<0,05 (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma), +p<0,005 (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma) ve yükseltilmiş artı labirent testi deney düzeneği. 80
- Şekil 3.50.** Yükseltilmiş artı labirent testi geçiş sürelerini gösteren çubuk grafik, Ort $\pm$ Std, *p<0,05 (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma), +p<0,005 (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 81
- Şekil 3.51.** Aydınlik karanlık kutusu testi aydınlık alanda geçen süreleri gösteren çubuk grafik, Ort $\pm$ Std, *p<0,05 (Kontrol ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma). 82
- Şekil 3.52.** Aydınlik karanlık kutusu testi aydınlık karanlık bölgeler arası geçiş sürelerini gösteren çubuk grafik, Ort $\pm$ Std, p>0,05 ve aydınlık karanlık kutusu deney düzeneği. 82
- Şekil 3.53.** Aydınlik karanlık kutusu testi aydınlık alanda iki ayak üzerine kalkma sayılarını gösteren çubuk grafik, Ort $\pm$ Std, p>0,05 ve aydınlık karanlık kutusu deney düzeneği. 83

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Sıçanların Harder bezi sekresyonunun değerlendirildiği kanlı gözyaşı skalası (Burn et al., 2006).	29
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primer antikorların bilgileri, WB ve IHC sulandırma oranları ile proteinlerin lokalizasyonları.	33
Çizelge 3.1. Tüm gruplara ait IHC analizlerine ait verilerin ortalama ve standart sapmaları.	74
Çizelge 3.2. Tüm gruplara ait davranış deneyi analizlerine ait verilerin ortalama ve standart sapmaları.	84

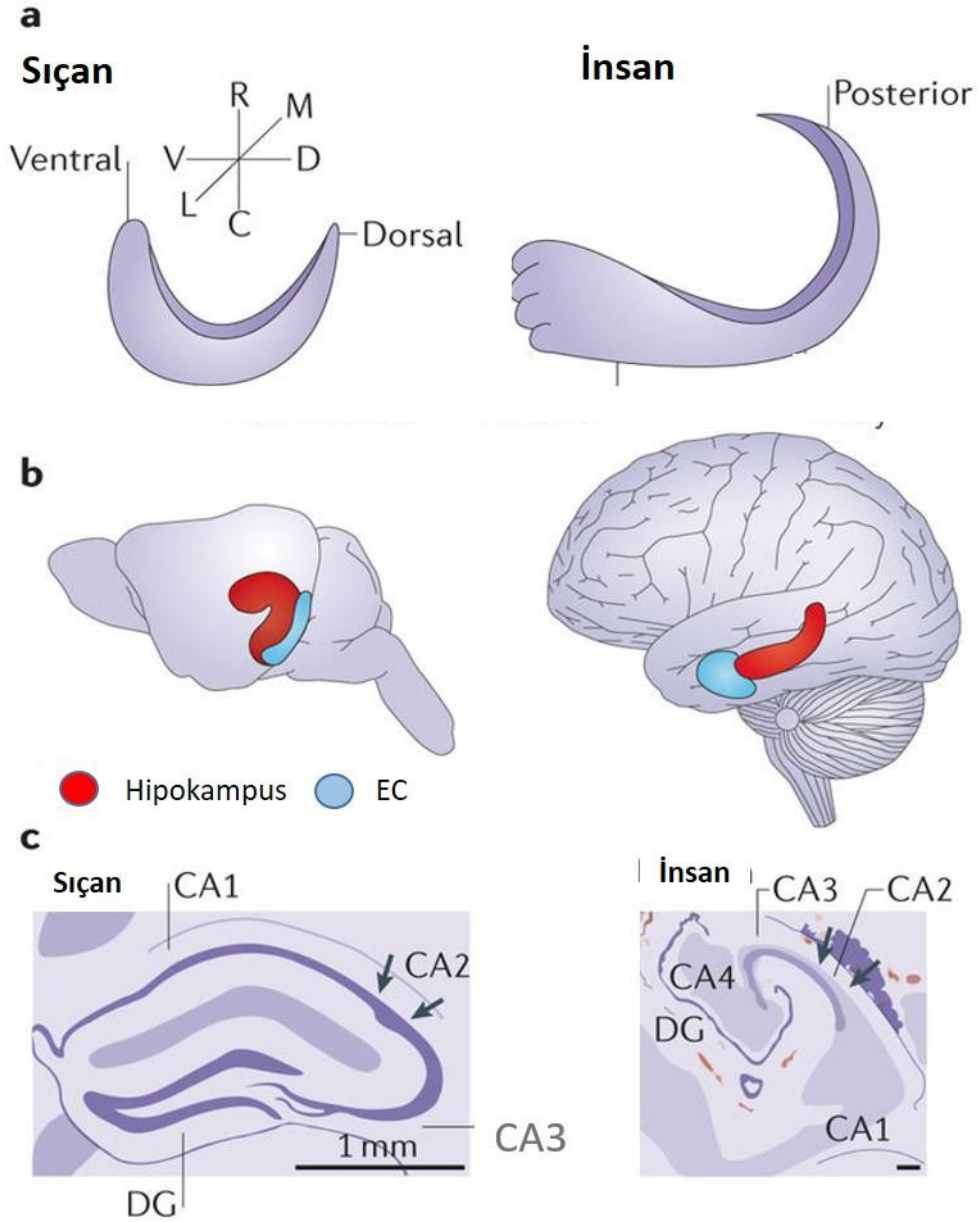
1. GİRİŞ

1.1. Hipokampusun Adlandırılması

Hipokampusla ilişkin en erken tanımlama 1587 yılında Venedikli anatomist Julius Caesar Aranzi tarafından *Anatomicarum Observationum Liber* (Book of Anatomical Observations) adlı kitapta “lateral ventrikülün temporal lobunun tabanındaki çıkıntı” şeklinde yapılmıştır. Adlandırması yapılırken denizati (ya da hipokampus, Yunanca: hipokampus [hippos = At, kampus = deniz canavarı]) veya beyaz ipekböceği (*Bombycini vermis candidi*) (*Bombyx*'in beyaz tırtılları) tarifleri ve terimleri kullanılmıştır. Çoğu yazara göre hipokampusu ilk resmeden kişi Georg Duvernoy olarak kabul edilmektedir. Duvernoy'un 1729 yılında konuyla ilgili yazılmış kısa bir makalesi bulunmaktadır. Adlandırma yaparken Duvernoy da denizati ve ipekböceği arasında gidip gelmiştir (Best ve White, 1999). 1732 yılında Danimarkalı anatomist Jacob Winsløw tarafından "koç boynuzu (Ram's horn)" kelimesi ve Garengeot adlı Parisli bir cerrah tarafından ise Mısır tanrısı Amun'un boynuzu anlamına gelen "cornu Ammonis" terimleri kullanılmıştır (Silva, 2014).

1.2. Hipokampus Anatomisi

Hipokampus iki taraflı simetrik, kaju fıstığı şeklinde ve gerçek hipokampus (kornu Ammonis) ile dentat girus (*fasia dentata*)'un birbirine kenetlenmesiyle oluşmuş yapıdır. Hem kornu Ammonis ve hem de dentat girus “C” harfini anımsatacak şekilde kıvrılırlar (Şekil1.1) (Teyler ve DiScenna, 1984). Kornu Ammonis ve dentat girus birbirinden hipokampal sulkus ile ayrılırlar. Hipokampal oluşum genellikle, kornu Ammonis, dentat girus ve subikulumu içerir (Tien ve ark., 1992). Hipokampus, uzun seyri nedeniyle yüzeyi üzerinde anastomozlar oluşturan birçok damar tarafından beslenir. Arteriyel beslenmesinin en önemli damarları a. cerebri posterior ve a. choroidea anterior'dur (Paulsen ve ark., 2016).



Şekil 1.1. Hipokampal anatomisinin karşılaştırılması. a) Sıçan ve insanlardaki hipokampal uzun eksen yöneliminin şematik gösterimleri. b) Hipokampusun (kırmızı) ve entorhinal korteksin [(EC), mavi] tam uzun ekseninin sıçanlar ve insanlardaki görüntüsü. c) Sıçan ve insan hipokampusunun Nissl boyalı kesitlerinin çizimleri. C, kaudal; D, dorsal; DG, dentat girus; L, lateral; M, medial; R, rostral; V, ventral. (Strange ve ark., 2014).

Kornu Ammonis (CA) piramidal hücrelerin farklı görüntüleri ve farklı bağlantıları sebebiyle; CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört farklı alt bölgeye ayrılır (Schultz ve Engelhardt, 2014). İnsanlarda CA1; küçük, üçgen şekilli dağınık halde bulunan piramidal nöronları içeren geniş bir bölgedir. Kemirgenlerde CA1'deki piramidal nöronlar yoğun paketlenmiştir. İnsanlarda CA2; CA1 ve CA3 arasında bulunan, ovoid şekilli yoğun paketlenmiş piramidal nöronlardan oluşurken,

kemirgenlerde daha küçük ve daha az belirgindir. CA3 hipokampus eğrisinin üzerinde bulunur ki bu alan dentat girusa girdiği alandır. CA3'ün piramidal nöronları CA2'ye benzer ancak daha az yoğundur. CA4 dentat girus kavitesinde bulunur ve dentat hilus olarak adlandırılmaya başlanmıştır (Knowles, 1992).

Dentat girus; serebral korteks mediyalinin büyük kısmını oluşturur (Schultz ve Engelhardt, 2014). Dentat girus 5-10 hücre kalınlığında tek bir tabakadan oluşur ve burada bulunan granül hücrelerinin dendritleri dentat hilustan dışarıya doğru uzaklaşır (Teyler ve DiScenna, 1984). Geometrisinden ötürü alt ve üst kolları bulunur, CA1'e komşu olan kola 'suprapiramidal blade', diğer kola ise 'infrapiramidal blade' ismi verilir (Scharfman ve ark., 2002). Dentat girus kornu Ammonis'in üzerine şapka gibi oturmaktadır. Dentat girusun sinir hücreleri olan granüler hücreler sıkıştırılmış hücre öbeği şeklinde dizilim gösterirler ve traktus perforansın aksonları granüler hücrelerin dendritlerine ulaşır. Aksonları ise yosunsu lifler olarak kornu Ammonis'in CA3 bölgesindeki piramidal hücrelerin dendritlerinde sonlanır (Paulsen ve ark., 2016).

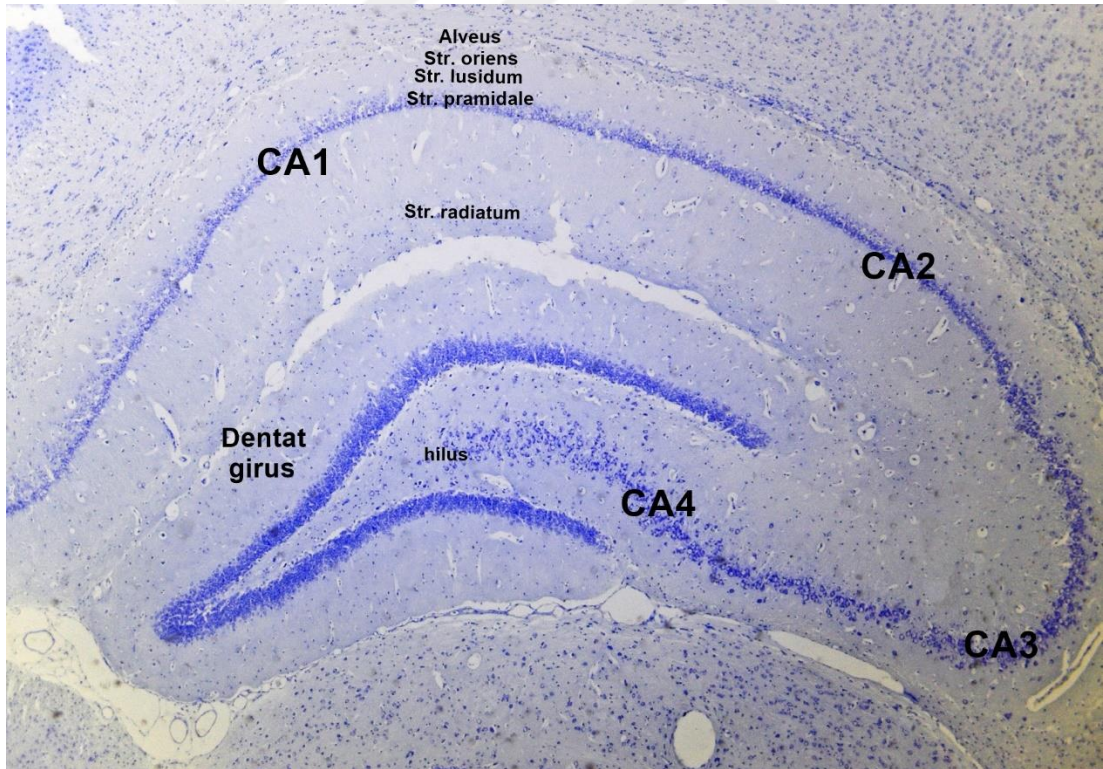
Subikulum, presubikulum ve parasubikulum sırasıyla CA1 bölgesini takip ederler. Subikulum histolojik açıdan daha geniş, yelpaze biçimli hücre öbeğine sahip olması nedeniyle tanınabilir. Bu bölgenin sinir hücreleri, hipokampus formasyonundan dışarı entorhinal kortekse doğru geri projeksiyon yapar. Bu bölgenin fonksiyonu henüz bilinmemektedir (Paulsen ve ark., 2016).

1.3. Hipokampusun Histolojisi

Kornu Ammonis; alveus, stratum oriens, stratum lusidum, stratum pyramidale, stratum radiatum ve stratum lakunosum olmak üzere 6 tabaka içerir. **Alveus**; hipokampusun lateral ventrikülün temporal boynuzu içine çıkıntı yapan bölümünü kaplar ve subiküler ve hipokampal aksonların takip ettiği ana efferent yoldur. Alveus, mediyalde hipokampusun fimbriasını oluşturmak için devam eder ve fornikse katılır (Tien ve ark., 1992).

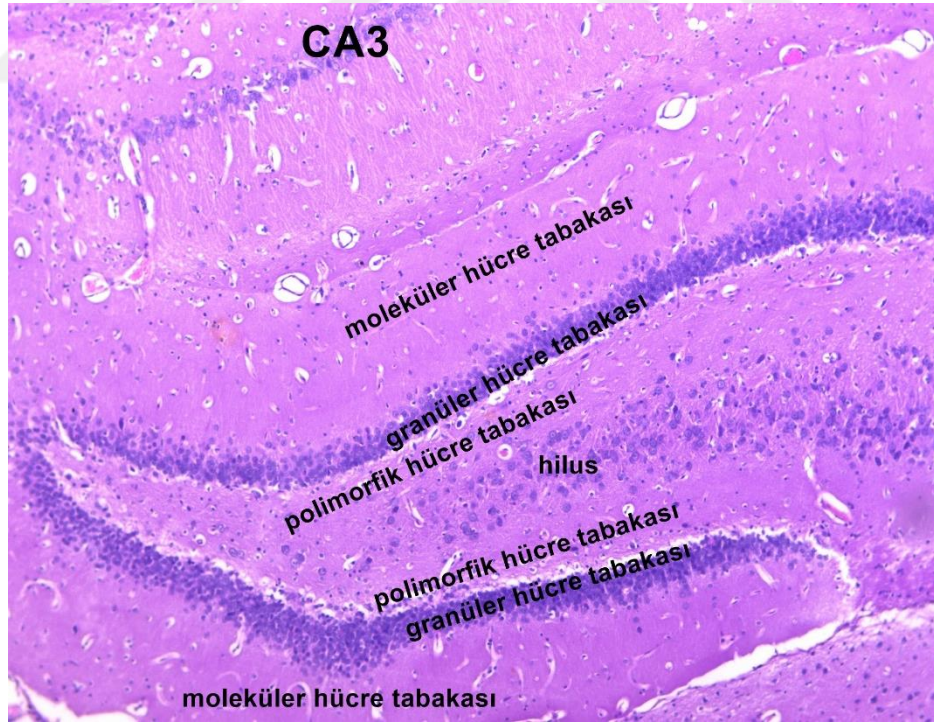
Piramidal hücre tabakasıyla alveus arasında bulunan **stratum oriens**; çoğunlukla piramidal hücrelerin bazal dendritlerini ve çeşitli internöron türlerini içerir (Schultz ve Engelhardt, 2014). **Stratum lusidum**; en ince tabakasıdır ve sadece CA3 bölgesinde bulunur. CA3 alanındaki piramidal hücreler ile dentat girusun granüler hücreleri arasında bağlantı sağlayan yosunsu (mossy) lifleri içerir.

Diğer primatlara göre insanlarda daha belirgin olup CA1 ile CA2 alanlarında bulunmaz (İzci ve Erbaş, 2015). **Stratum pyramidale**; çoğunlukla büyük piramidal ve Golgi tip II hücrelerinin bulunduğu tabakadır. Piramidal hücrelerin tabanı hipokampusun ventriküler yüzeyine dönüktür. Bazal-apikal dendritleri komşu tabakalara kadar uzanırken, aksonları stratum oriens'ten geçerek alveus liflerine katılır. Bu tabakadaki piramidal hücrelerin dizilimi sayesinde hipokampus asıl şeklini alır. **Stratum radiatum ve stratum lakunosum**; ince sinir lifleri ve az sayıda nöron içeren bölgelerdir (Songur ve ark., 2001) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Krezil viyole boyalı mikroygıfta hipokampal oluşumun bölümlerine ait adlandırılma.

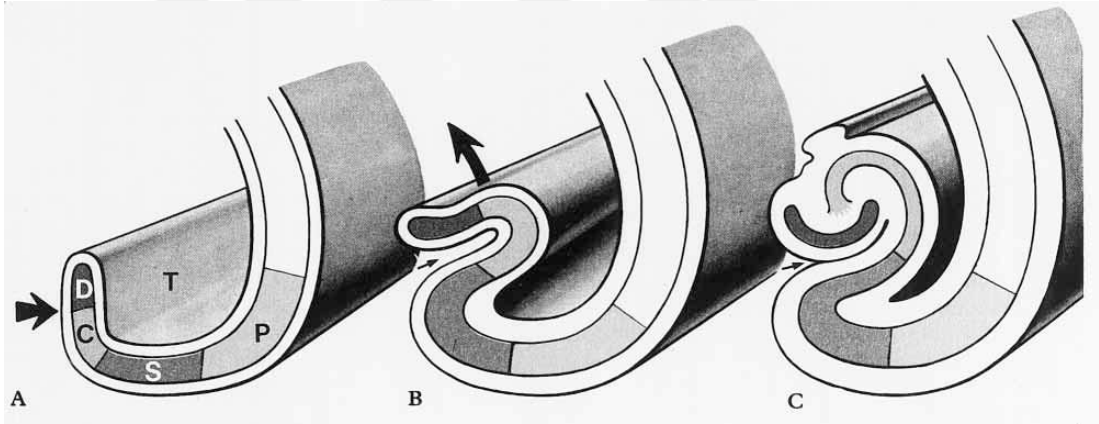
Dentat girusun temel hücreleri granüler nöronlardır. Granüler hücrelerin aksonları için, şekli ve izlediği yoldan dolayı yosunsu lifler (mossy fiber) terimi kullanılır. Dentat girusun hilusunda 21 çeşit nöron tanımlanmıştır (El Falougy ve ark., 2008). Dentat girus 3 tabaka içerir (Şekil 1.3.). **Stratum molekulare (moleküler hücre tabakası)**; nispeten hücre içermeyen bir tabakadır, sıçanlarda 250 µm kalınlığındadır ve granül hücrelerinin dentritleri ile doludur. Entorhinal korteksten çıkan perforan lifler ve az olsa da ara nöronlar stratum molekulareyi oluşturan bileşenlerdendir. **Stratum granulare (granüler hücre tabakası)**; yoğun paketlenmiş granül hücrelerinden oluşur. Yaklaşık 60 µm kalınlığında olan bu tabaka 4-8 hücre katmanı içerir. Stratum granulare, granüler hücrelerden oluşmasına rağmen, polimorfik tabakayla olan sınır bölgesinde dentat piramidal sepet hücreleri gibi farklı tip nöronlar da yer alır. Granüler hücre tabakasının iç kısmı ile hilus arasındaki sınır bölgesine subgranüler zon (SGZ) adı verilir. Bu bölgede radial gliya benzeri nöral kök hücreler bulunur. **Polimorfik hücre tabakasında**; birçok nöron tipinin yanında yosunsu lifler ağırlıklı olarak gözlemlenir (Amaral ve ark., 2007).



Şekil 1.3. Hipokampusun dentat girus bölgesine ait bölümlerin adlandırılması.

1.4. Hipokampus Embriyolojisi

Merkezi sinir sistemi üçüncü haftanın başlarında primitif düğümün önünde orta dorsal bölgede yerleşmiş terlik biçimli kalınlaşmış nöral plak halinde belirir. Nöral plağın lateral katlantıları, kısa süre sonra nöral katlantıları oluşturmak üzere kıvrılır. Gelişimin daha ileriki safhalarında nöral katlantılar yükselerek nöral tüpü oluşturmak için birbirleriyle kaynaşırlar. Nöral tüp, embriyonun kranial kısmında 25. günde, kaudal kısmında ise üç gün sonra yani 28. günde kapanır. Nöral tüp kapanmadan önce rostral uçta üç dilatasyon bölgesi (prosensefalon, mezensefalon ve rombensefalon) oluşurken bunlara primer beyin vezikülleri denir. Gelişimin dördüncü haftasında prosensefalondan telensefalon ve diensefalon gelişir. Beşinci haftada rombensefalondan myelensefalon ve metensefalon gelişir (Sadler, 2011).



Şekil 1.4. Sol temporal lobda hipokampus bileşenlerinin katlanma safhalarının koronal düzlemdeki diyagramı. A: Erken fetal gelişimi göstermektedir. Dentat girus (D), kornu Ammonis (C), subikulum (S) ve parahipokampal girus (P), temporal boynuzun (T) medial duvarı ve tabanı boyunca dizi şeklinde düzenlenmiştir. B ve C: Neokorteksin belirgin şekilde genişlemesi ve hipokampusun bileşenlerinin farklı düzeyde büyümesinin bir sonucu olarak, bileşenler temporal boynuzda kademeli olarak katlanır. Katlanma ilk olarak dentat girus ile kornu Ammonis arasında yer alan hipokampal sulkus (kalın ok) çevresinde oluşur. Hipokampal sulkus (ince ok) dentat girus ve subikulum arasına doğru yer değiştirir ve sonunda kaybolur (Kier ve ark., 1997).

Hipokampus telensefalondan gelişmeye başlar. Gelişimin 13. ve 14. haftasında hipokampus temporal lobun medial yüzünde açılmış şekilde bulunur. 15. ve 16. haftalarda dentat girus ve kornu Ammonis katlanmaya başlar. Parahipokampal girus daha büyüktür ve daha medial konumlanmıştır. Kornu Ammonis'in CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri doğrusal olarak düzenlenmektedir. Dentat girusun şekli dar U harfine

benzer yapıdadır. 18. ve 20. haftalar arasında hipokampus yetişkin hipokampusuna benzemeye başlar. Dentat girus ve kornu Ammonis temporal lop içine doğru katlanır. Bu katlanmayla hipokampus ve subikulum birbirine yaklaşır. CA1-3 alanları yay oluştururken, CA4'ün toplam alanı artarak, dentat girusun kavisine girmeye başlar (şekil 1.4) (Kier ve ark., 1997).

Sıçanlarda hipokampus gelişimini araştıran Shirley A. Bayer ve Joseph Altman gebeliğin 17. günüyle postnatal beşinci gúnleri arasını kapsayan çalışmalarında 17. günde hipokampusun, korteksin dil benzeri uzantısı şeklinde talamusun üstünü örttüğünü göstermiştir. Gebelięin 19. günü ve onu izleyen 48 saatlik süre içinde kornu Ammonis'in piramidal hücreleri sıralanırken hem fimbriya hem de hipokampal fissür ilk defa görölür. 21. günde piramidal hücre tabakası kademeli olarak gevşek biçimde paketlenerek arka arkaya kıvrılmıştır. Bu hücre grubu, hipokampal fissür ile ayrılır. Doğum ve postnatal birinci günde piramit tabakanın derinliği azalır ve tipik yetişkin morfolojisini oluşturmak üzere dentat hilus posteriyor yönde eğilmiştir. İnce dentat granüler tabakayla yetişkin morfolojisinin başlangıcına da sahiptir. Doęumun üçüncü günde piramidal katman (CA4) hilusa doğru uzanmıştır. Moleküler katman incedir ve beşinci günden sonra kalınlaşmaya başlar (Bayer ve Altman, 1974).

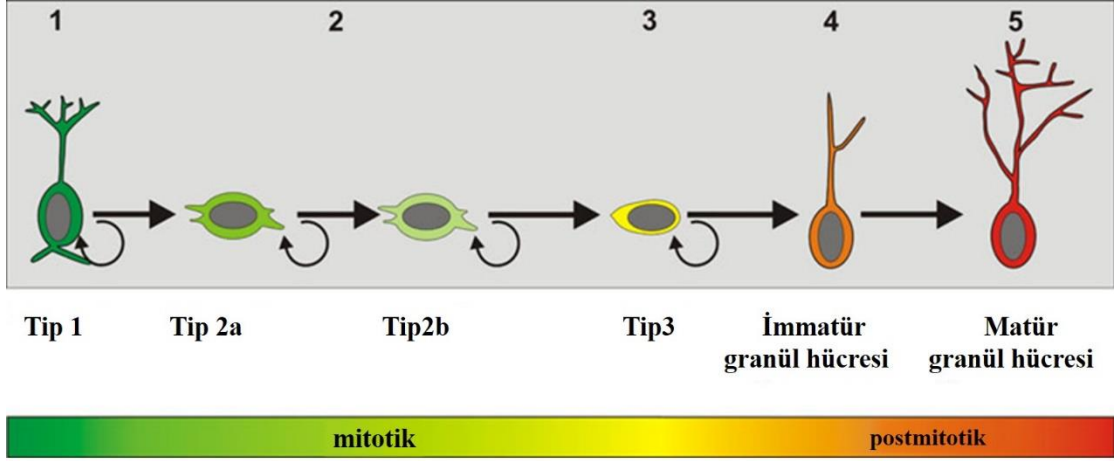
1.5. Hipokampusun Fizyolojisi

1930'lara kadar hipokampal oluşumun olfaktor sistemin bir parçası olduğu düşünölmekteydi. 1937'de James Papez tarafından duygunun anatomik alt yapısını sağlayan devrenin bir parçası olduğu öne süröldü. Anatomik çalışmalardan elde edilen fonksiyona dair en erken bulgulardan hemen sonra insanlarda, hayvanlarda ve ileri davranışsal hayvan modellerinde lezyon çalışmaları yapılarak; öğrenme, hafıza ve uzaysal yön tayininde hipokampusun rolüne dair bugünkü yaygın literatür bilgilerine kavuşulmuştur (Silva, 2014). Epilepsi tedavisi için hipokampusun çift taraflı çıkarıldığı vakalarda önceden öğrenilmiş anıların hatırlanırken sözel simgelere dayalı yeni bilgi edinilemediği saptanmıştır. Ayrıca hipokampusun kısa süreli

belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesine yol açan dürtüyü sağladığı ileri sürülmüştür (Guyton ve ark., 2007).

1.6. Hipokampal Nörogenez ve İlişkili Proteinler

Yetişkin nörogenezini ortaya çıkaran ilk ipucu 1912'de Ezra Allen tarafından geldi. Allen, 120 günlük albino sıçanların lateral ventriküllerinde mitotik figürleri gözlemledi (Ihunwo ve ark., 2016). Daha sonra Altman ve Das yenidoğan ve yetişkin ratlarda thymidine-H uygulaması yaptıkları çalışmalarıyla nörogenezi gösterdi (Altman ve Das, 1966). Yetişkin nörogenezi, nörojenik niş olarak bilinen; hipokampal dentat girusun (DG) alt sınırı olan subgranüler zon (SGZ), lateral ventriküllerin subventriküler zonu (SVZ) ve son zamanlarda tanımlanan üçüncü ventrikülün mediyal ve ventral kısımlarındaki hipotalamik nörojenik nişlerde meydana gelir (Valero ve ark., 2016). Granüler hücre tabakasıyla hilus arasında bulunan SGZ'deki, radyal gliya benzeri nöral progenitör kök hücreler (tip 1) nöroblastlara dönüşmeden önce sınırlı sayıda proliferasyon sergileyen ara (intermedite) progenitör hücreleri (tip 2) meydana getirirler. Nöroblastlar (tip 3) SGZ boyunca tanjantal olarak göç ederler ve immatür nöronlara (tip 4) dönüşürler. İmmatür nöronlar da dentat girus granül nöronlarına (tip 5) farklılaşmak için radyal olarak göç ederler. Tip 5 hücreler matür nöronlar olarak adlandırılır (Bond ve ark., 2015) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Dentat girus nörogenez evreleri. DG'nin granüler tabakasındaki yeni nöronların oluşumu beş aşamaya bölünür. Yetişkin nörogenezi radial gliya ve astrositik özelliklere sahip olan kök hücrelerden (Tip 1 hücreler, 1.evre) köken alır. Çeşitli belirteçlerin ekspresyonlarına dayanarak, birinci evreden sonra üç farklı tip öncü hücre (tip 2a, tip 2b ve tip 3) tanımlanabilir. Bu fazda (2. ve 3. evre) çoğalan hücreler farklıdır, nöronal belirteçleri eksprese etmeye başlar ve DG'nin granüler hücre tabakasına ulaşmak için kısa mesafe göç ederler. Yeni oluşan hücreler postmitotik olur ve geçici olarak kalretinin salgılamaya başlarlar (4. evre). Yeni hücreler aksonlarını CA3 yönüne uzatır, dentritlerini moleküler tabakaya doğru gönderir, hipokampal ağa işlevsel olarak entegre olurlar (5. evre), entorhinal korteksten inputları alır, outputları CA3 ve hilusa gönderirler (von Bohlen ve Halbach, 2011).

1.6.1. Tip 1 Hücreler

Radiyal gliya benzeri hücreler karakteristik morfolojileriyle, yetişkinlerde SGZ'nin kök hücreleri olarak kabul edilir. Bu hücrelerin somaları üçgene benzer, küçük ve güçlü apikal uzantıları granül hücre tabakasına ulaşır, iç moleküler tabakaya ulaşana kadar seyrekçe dallanır. Hipokampusta radiyal gliya benzeri hücreler dentat girusun normal gelişimi için gerekli olan iskeleyi sağlar (Kempermann ve ark., 2004). Tip 1 hücreler gliyal fibriler asidik protein (GFAP), ara filament olan nestin, beyin lipid bağlayıcı protein (BLBP) ve Sox 2 (SRY ilişkili HMG-box gene2)'yi eksprese ederler (von Bohlen ve Halbach, 2011).

1.6.2. Tip 2 Hücreler

Tip 1 hücreler hızlıca çoğalan ara progenitör hücreleri meydana getirir. Yeni oluşan hücre havuzunun genişlemesi çoğunlukla tip 2 evresinde oluşur. Bu hücreler küçük

bir soma, düzensiz şekilli çekirdek, kısa ve horizontal yönlü uzantılarla karakteristiktir (von Bohlen ve Halbach, 2011). Tip 2 hücreler erken nöronal belirteç olan Doublecortin (DCX)'i eksprese edip etmemelerine göre 2 alt gruba ayrılır (Kronenberg ve ark., 2003). Tip 2a ara progenitörler, nestini eksprese eder, DCX eksprese etmez. DCX ekspresyonu genel olarak hücrelerin bir nöronal kökene bağlılığı ile ilişkilidir ve ekspresyonu göç fazında olan hücrelerde en fazladır. Tip 2b hücreler nestin ve DCX ekspresyonuyla karakterizedir. Hem tip 2a hem de tip 2b progenitörler küçük hücrelerdir, çok kısa tanjantal uzantıları bulunur ve SGZ'de kümeler oluşturmaya eğilimlidirler (Hodge ve Hevner, 2011).

1.6.3. Tip 3 Hücreler

Tip 3 hücreler DCX pozitif, nestin negatiftir. Ayrıca proliferatiftirler. Bu aşamada morfolojik değişiklikler görülür. Tip 3 hücrelerin çekirdeği yuvarlaktır. Bazı tip 2 hücrelerinin de eksprese ettiği PSA-NCAM'ı (Polysialylated neural cell adhesion molecule) eksprese ederler. PSA-NCAM'ın yetişkin hipokampal nörogenezinde prekürsör hücre aktivitesi aşamasını gösterdiği belirtilmektedir (Kempermann ve ark., 2004).

1.6.4. Tip 4 Hücreler

DCX ekspresyonu, hücreler postmitotik safhaya geçene kadar devam eder. Yetişkin granül hücresi gelişiminin bu erken postmitotik evresi, geçici kalretinin protein ekspresyonu ile karakterizedir. Yuvarlak ya da hafif üçgen çekirdek ile kolayca görülen apikal dentritleri bulunur. Bu hücreler ayrıca matür nöron göstergesi olarak kullanılan, postmitotik belirteç olan NeuN (Neuronal Nuclei) eksprese ederler (Kempermann ve ark., 2004).

1.6.5. Tip 5 Hücreler

Son aşamada (Tip 5), yeni oluşan granül nöronları, entorhinal korteksten input almak, CA3 ve hilar bölgelerine output göndermek için sinaptik bağlantılar kurarlar. Matür granül hücreleri kalretinin yerine kalbindin eksprese etmeye başlar. Kalbindin, tüm matür granül hücrelerinde bulunur. Kalbindini eksprese eden yeni oluşan hücreler işlevsel olarak hipokampusa entegre olur. Bu hücreler ayrıca NeuN de eksprese ederler (von Bohlen ve Halbach, 2011) (Kempermann ve ark., 2004).

1.7. Metabolik Sendrom (MetS)

İlk tanımlama 1988 yılında Reaven tarafından ‘X Sendromu’ şeklinde yapılmıştır. Sıklıkla glikoz toleransı bulunan kişilerde kardiyovasküler hastalık risk bileşenlerinden en az biri veya daha fazlası bulunmaktadır ve bu gruplaşma ‘X Sendromu’, ‘İnsülin Direnci Sendromu’ ve ‘Metabolik Sendrom’ (MetS) gibi çeşitli şekillerde adlandırılmıştır (Alberti ve Zimmet, 1998). MetS; Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Yetişkin Tedavi Paneli III’ün 2001 yılında yayınlanan tanımına göre; hiperglisemi/insülin direnci, visseral obezite, aterosjenik dislipidemi ve hipertansiyonun temel özelliklerini içerir. Buna göre aşağıdaki beş kriterden en az üç ya da daha fazlasının karşılanması durumunda hastalık ortaya çıkar.

- Bel çevresi kalınlığının kadınlarda 35 inç (88 cm) erkeklerde 40 inç (102 cm)’in üzerinde olması,
- 130/85 mmHg üzerinde kan basıncı,
- Açlık trigliserit düzeyinin 150 mg/dl üzerinde olması,
- Açlık yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterolün erkeklerde 40 mg/dl’den kadınlarda 50 mg/dl’den az olması,
- Açlık kan şekerinin 100 mg/dl’den fazla olması (Huang, 2009).

2009 yılında Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği tarafından yayınlanan Metabolik Sendrom Kılavuzu’nda MetS; ‘insulin direnciyle başlayan abdominal

obezite, glikoz intoleransı veya diabetes mellitus, dislipidemi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği ölümcül bir endokrinopati' şeklinde tanımlanmıştır. Yine aynı kılavuzda MetS görülme sıklığı erişkinlerde ortalama %22 olarak bildirilmektedir. Bu oran yaş ile artış göstererek 20-29 yaş gurubunda %6.7 iken, 60-69 yaş gurubunda ise %43.5 oranına kadar yükselmektedir. Türk Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri çalışmasına göre 2000 yılı itibariyle Türkiye genelinde 30 yaş ve üzerindeki 9.2 milyon kişide metabolik sendromun mevcut olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde metabolik sendrom görülme sıklığı, erkeklerde %28, kadınlarda ise %40'dır (Arslan ve ark., 2009).

MetS; kentleşme, fazla enerji alımı, artan obezite ve yerleşik yaşam alışkanlıklarının yol açtığı dünya çapında önemli ölçüde artan halk sağlığı sorunudur. MetS tip 2 diabetes mellitus (T2DM) riskini beş kat ve kardiyovasküler hastalıkların gelişme riskini iki kat arttırmaktadır (Kaur, 2014).

Metabolik sendromun altında yatan sebep henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. MetS'li çoğu hastada insülinin hücrel etkilerine direnç sergilenmektedir. Hücrel seviyedeki insülin direnci, metabolik risk faktörlerine yatkınlık oluşturan biyokimyasal tepkileri modifiye etmektedir. İnsülin direnci oluşumunun; obezite, fiziksel aktive düzeyleri gibi çevresel faktörler ile genetik faktörlerin kompleks bir şekilde etkileşiminin sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (Roberts ve ark., 2013).

1.8. İnsülin

İnsülin kan glikoz seviyesini düşüren, pankreasın Langerhans adacıklarındaki β hücrelerinden salgılanan hormon olup (Ross ve Pawlina, 2006) keşfi diyabet hastaları için yeni ufuklar açan bir olaydır. İnsülinin arındırılması ve modifikasyonu için prosedürlerin geliştirilmesi 30 yıl sürmüştür. 1922 yılında Banting ve arkadaşları tarafından hazırlanan pankreas ekstraktı 14 yaşında ileri derece diyabetli

bir çocuğa enjekte edilmiştir. Devam edilen enjeksiyonlar sonrasında glikozüri büyük oranda, ketonüri ise tamamen kaybolmuştur ve kan şekeri normale dönmüştür. Tarihte ilk defa, bilim insanları tarafından diyabet hastalığıyla bozulan işleyişin düzeltilebileceğine dair açık ve net kanıtlar gösterilmiştir. Böylece insülinin keşfi, 1923’de Banting ve arkadaşlarına Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülünü kazandırmıştır (Joshi ve ark., 2007) .

İnsülin iki düz polipeptit zincirinin bağlanmasıyla oluşan bir proteindir. A zinciri 21 aminoasit, B zinciri ise 30 aminoasitten oluşur ve birbirlerine disülfid bağları ile bağlanırlar. İnsülin, pankreatik β hücrelerinden preproinsülin olarak salgılanır. Preproinsülin N-ucu sinyal peptidi, A zinciri, B zinciri ve C peptidten oluşur. N-ucu sinyal peptidi proinsülin zinciri oluşurken ayrılır. Golgi kompleksine yönlendirilen proinsüline burada disülfid bağları eklenir ve paketlenmesi sırasında prokonvertaz-1 ve karboksipeptidaz-H enzimleri ile insüline dönüştürülür. İnsülin ve C peptid salgı granüllerinde paketlenir ve salgılanır (Guyton ve ark., 2007).

İnsülin yapımının uyarılması glikoz ya da besin alımıyla artarken, açlıkla azalır. Salgılanan insülinin etkisiyle bazal dolaşımdaki glikoz konsantrasyonu düşürülür ya da diyetle bağlı karbonhidrat yükselmesinden kaynaklanan kan glikoz artışı sınırlandırılır. Karbonhidrat metabolizmasının yanı sıra besin depolanmasına, yağ ve protein metabolizmasına da etkileri vardır (Robert M. Berne, 2008).

1.9. İnsülin Direnci

İnsülin direnci; hedef organ ve dokuların duyarlılığının azalmasından dolayı dolaşımda normal seviyede bulunan insülinin gereken tepkiyi veremediği patolojik bir durumdur. Patolojinin erken safhalarında pankreatik β hücreleri öglisemiyi ve periferik insülin direncini telafi etmek için insülin salgısını arttırmaktadır. Kronik duruma gelindiğinde ise; hiperinsülinemi insülin direncinin artmasına neden olarak glikoz toleransı bozulmasına katkıda bulunmaktadır (Gual ve ark., 2005). İnsülin direncinin tip 2 diyabetin primer defekti olduğu ve obezite, hipertansiyon, polikistik

over sendromu, dislipidemi ve ateroskleroz gelişimine yol açan çeşitli anormalliklere yol açabileceği bildirilmektedir (Pessin ve Saltiel, 2000). İnsülin direncinin nedenleri arasında insülin reseptörü mutasyonları, insülin reseptörüne karşı otoantikolar, genetik şişmanlığa neden olan mutasyonlar, aşırı kiloluluk, glikokortikoid fazlalığı, büyüme hormonu fazlalığı, gebelik, polikistik over sendromu sayılabilmektedir (Guyton ve ark., 2007). İnsülin direncinin hücresel temelini belirlemek için yapılan çalışmalarda, insülin direncinin insülin sinyal iletim yolağındaki aksamalarla ve GLUT 4 vezikülünün plazma membranı ile kenetlenmesi veya kaynaştırılması sırasında oluşan herhangi bir hata nedeniyle ortaya çıkmasının mümkün olduğu bildirilmiştir (Cairns, 2002).

1.10. Beyin ve İnsülin

İnsülinin kan beyin bariyerini (KBB) geçemeyeceği düşünüldüğünden merkezi sinir sistemi (MSS)'nin insülin bağımsız olduğu düşüncesi hakimdi. Bu nedenle beyinde insülinin glikoz metabolizmasına etkileri yeterince araştırılmamıştı. İnsülinin KBB'yi geçebildiği ve MSS'yi etkilediği kanıtlandıktan sonra Havrankova ve ark. tarafından 1977 yılında ratlar üzerinde yapılan bir çalışmayla MSS'de insülin reseptörleri gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarında MSS'deki insülinin nöronların kendi ürettikleri insülin olup olmadığı sorgulanmıştır. Beyindeki insülin konsantrasyonunun kandan 25 kat fazla olduğu bulunduktan sonra MSS'nin farklı bölgeleri analiz edildiğinde, aralarındaki farkın 10 ila 100 kat arasında değiştiği görüldü. Yapılan analizlerle insülinin ya da insüline çok benzeyen bir peptidin MSS'de bulunduğu ortaya konuldu (Havrankova ve ark., 1978).

1991 yılında Plata-Salamán tarafından yayınlanan derlemede; beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunan insülinin MSS'nin lokal sentezi olabileceği düşünülmüştür. Bunun yanında insülinin periferik kandan KBB ve sirkümentriküler organlar aracılığıyla beyine geçebileceği ihtimali üzerinde de durulmuştur. Kan-BOS arayüzünü oluşturan koroid pleksusların BOS'a hızlı insülin taşınması için nonspesifik bir yol olabileceği hipotezi de ileri sürülmüştür. Ayrıca insülinin,

BOS'tan araknoid villus absorpsiyonuyla periferel kana geçebileceği, böylece insülin geçişinin çift yönlü olarak hem kandan beyin-BOS'a hem de beyin-BOS'tan periferel kana doğru gerçekleşiyor olabileceğinden bahsedilmiştir (Plata-Salaman, 1991).

Daha sonraki alışmalar MSS'de bulunan insülinin kaynağını araştırmak üzerine yoğunlaşmıştır. İnsan kadavralarında kandan daha yüksek oranda C peptid ve immnreaktif insülin saptanmıştır. Yaşlı insanların ve Alzheimer hastalarının beyin dokularında C peptid bulunmuştur ve azalan insülin reseptör sayısıyla C peptid arasındaki bağlantı ilk kez gösterilmiştir. RT-PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) alışmalarıyla insülin II mRNA (mesajcı ribonükleik asit, embriyon gelişiminin pre-pankreatik döneminde salgılanır) ftal, neonatal ve yetişkin sıçan beyinlerinde gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal teknikler ve in situ hibridizasyonla ftal nöron kültürlerinde gerçek insülinden farkı olmayan insülin benzeri mRNA ve insülin benzeri maddenin retildeği ve salgılandığı ortaya konulmuştur (Blazquez ve ark., 2014). Tek hücreli kantitatif RT-PCR çalışmalarıyla rat korteksindeki nöroglia hücrelerinde insülin mRNA'sı belirlenmiştir (Gray ve ark., 2014).

Beyinde insülin reseptörlerinin en çok bulunduğu yerler serebral korteks, olfaktör bulbus, hipokampus, beyincik ve hipotalamustur. İnsülin hipokampusta en fazla dentat girusun moleküler hücre tabakasına ve CA1 bölgesinin piramidal hücrelerine bağlanır. Hipokampus insülin etkilerinin hedefi olarak görülmektedir. Ratların nc serebral ventrikülüne insülin verilmesiyle, salin kullanılan kontrol grubuna kıyasla hafızanın daha kuvvetli olduğu gösterilmiştir (Park ve ark., 2000). Vücut kitle indeksi 20-26 kg/m² arasında değişen, aile öyküsünde diyabet olmayan 30 sağlıklı erkeğe uygulanan insülin enjeksiyonuyla, bilişşel işlevlerin geliştirilebileceği gösterilmiştir (Kern ve ark., 2001). Benedict ve ark. 38 sağlıklı insana 8 hafta boyunca intranazal insülin uygulaması yapmıştır. 8 hafta sonra sistemik yan etkileri olmaksızın hafızayı iyileştirdiği ve ruh halini düzelttiği gösterilmiştir (Benedict ve ark., 2004).

İnsülinin; nöronal büyümeyi teşvik ettiği, fokal iskemiye karşı beyini koruduğu ve geçici fokal beyin iskemisi olan sıçanlarda mekânsal öğrenmeyi arttırdığı gösterilmiştir (Kern ve ark., 2001). İnsülin beyinde; besin alımını, vücut ağırlığını, ruh halini, bilişsel fonksiyonu, hafızayı, nöronal sağkalımı ve sinaptik plastisiteyi düzenleyen nöropeptid gibi davranmaktadır. Beyindeki insülin reseptör sinyalinin disregülasyonunun (örn; insülin eksikliği ya da insülin direnci) nörodejeneratif hastalıklar, demans ve duygudurum bozuklukları ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Yanagita ve ark., 2013).

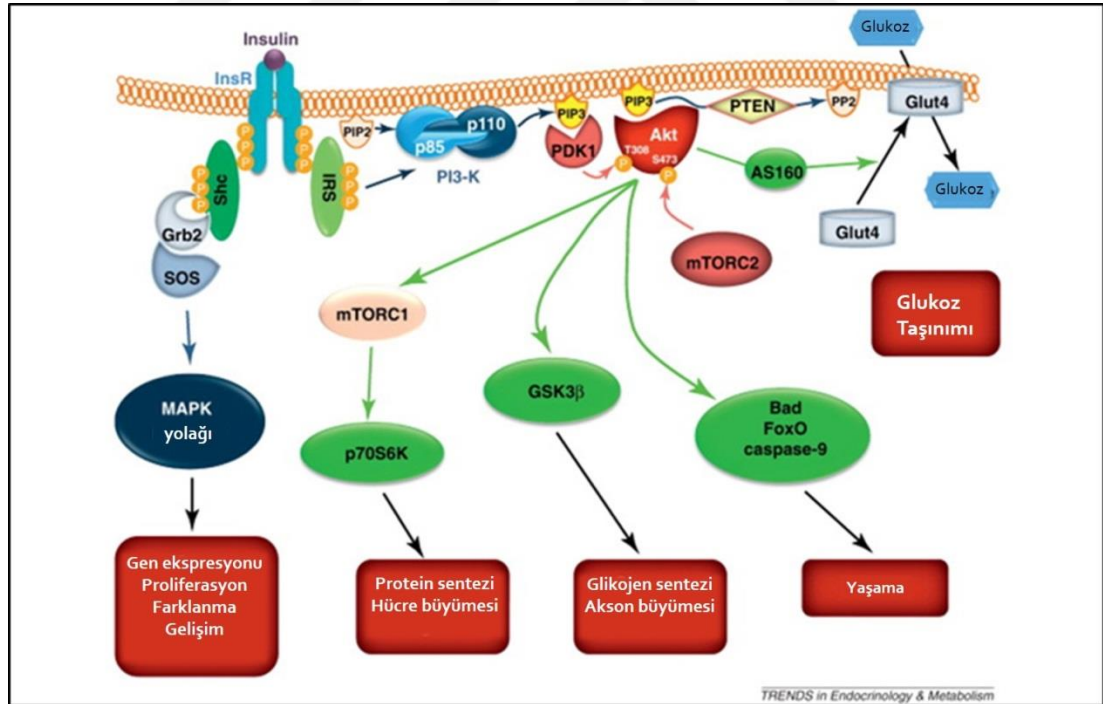
Öğrenme ve hafızayı destekleyen mediyal temporal lobu da içeren birçok beyin bölgesinde, insülinin etkilerini konu alan, bilişsel hafıza ile insülin arasında bağlantı kuran çalışmalarda sayıca artış gözlenmektedir. Ratlarda ve insanlarda yapılan çalışmalarla insülinin öğrenmeyi geliştirdiği, uzaysal hafıza eğitiminde olan ratların dentat girus ve CA1 bölgesindeki insülin reseptör ekspresyonunun artmasıyla normal öğrenme sürecine de hipokampustaki insülin sinyal molekül değişikliklerinin eşlik ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmalarla insülinin bilişsel işlevin düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceği desteklenmiştir (Cholerton ve ark., 2013). Yüksek oranda yağ ve şekerle beslenen kemiricilerde hafıza ve öğrenmedeki yetersizlikler, yapısal ve fizyolojik nöronal değişiklikler [hipokampusun CA1 bölgesindeki dendritik dikenlerin azalması, LTP (Uzun dönem potensiasyon) ve LTD (Uzun Dönem depresyon) kurulumu değişmesi ve DG'de nörogenezin azalması] ile ilişkilendirilmiştir (Zhao ve ark., 2004).

1.11. Beyin İnsülin Sinyal Yolağı

İnsülin hormonu KBB'yi aştıktan ya da burada salgılandıktan sonra beyinde insülin reseptörlerine (IR) bağlanır. IR birbirine disülfid bağıyla bağlanmış α ve β zincirlerinden oluşur. α alt birimi hidrofiliktir ve ekstraselüler yerleşimlidir. β alt biriminin ekstraselüler, transmembran ve intraselüler bölümleri bulunur ve ekstraselüler kısmı α altbirimine disülfid bağıyla bağlanmıştır (Zhao ve ark., 2004). Merkezi sinir sistemindeki IR'lerin birçok özelliği ve moleküler yapısı periferel

IR'lere benzemekle beraber aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. MSS IR'lerinin α ve β altbirimlerinin molekül kütleleri periferel IR'lerinden biraz daha düşüktür (Zhao ve Alkon, 2001).

Nöronların uzun süre hayatta kalmasını, bütünlüğünü korumasını sağlayan, kaybını önleyen nörotrofik faktörler ve hormonlar beyni korurken insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) bu süreçlerde kilit rol oynamaktadır. IGF1 beyinde lokal olarak üretilir ve KBB'yi geçebilir. Nörogenez, sinaptik plastisite ve kompleks bilişsel işlevler de dahil olmak üzere merkezi sinir sistemindeki önemli nörofizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar (De Magalhaes Filho ve ark., 2017). İnsülin ve IGF1 yapısal ve fonksiyonel işlevleri bakımından birbirlerine benzemektedirler, bu yüzden hem IR'yi hem de IGF1R'yi (insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü) aktive edebilirler, ancak kendi reseptörlerine bağlanmak için daha yüksek affinite sergilemektedirler (Bedse ve ark., 2015b).



Şekil 1.6. Merkezi Sinir Sisteminde İnsülin Sinyal Yolağı (Kim ve Feldman, 2012).

İnsülin ya da IGF1'in IR'ye bağlanmasıyla reseptör otofosforile olur, bunu da insülin reseptör substrat (IRS) proteinlerinin fosforile olması takip eder (Plum ve ark., 2005). IRS1 ve IRS2 beyinde yaygın bir biçimde eksprese edilmektedir. IRS proteinlerinin fosforile olmasıyla fosfotidil inositol 3 kinaz (PI3K), mitojen-aktive protein kinaz (MAPK/ERK) yolları aktive olur (bu yollar aynı zamanda hipokampal sinaptik plastisite değişikliklerinin indüksiyon ve ekspresyonuna dahil olmaktadır) (Costello ve ark., 2012). PI3K/Akt yolağının aktivasyonu ile nöronal büyüme ve sağkalım teşvik edilmektedir (Bedse ve ark., 2015a). Grb2-SOS-Ras-MAPK kaskadının aktive olması hücre proliferasyonu, farklılaşması, gen ekspresyonu ve iskelet reorganizasyonunda doğrudan rol oynamaktadır. Ayrıca bu yolak nöronal hücrelerin normal fonksiyonlarına ve yaşamlarına katkı sağlamaktadır (Kleinridders ve ark., 2014) (Şekil 1.6).

PI3K'ya bağlı sinyal yolağının, insülinin metabolik etkileri için çok önemli olduğu ve bu yolağın genellikle MetS ve diyabetli bireylerde etkilendiği gösterilmiştir (Kim ve Feldman, 2012).

1.12. Beyinde Glikoz Taşıyıcı Proteinler (GLUTs)

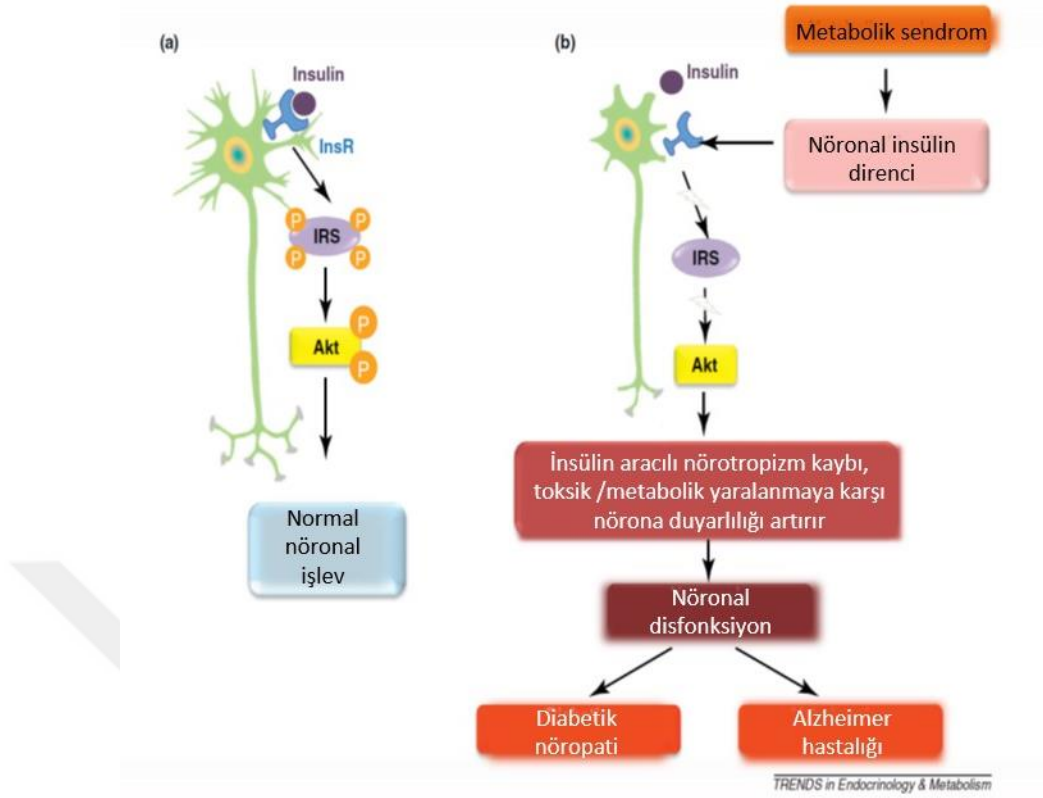
Glikoz beyin için enerji kaynağıdır. Glikozun beyine taşınımı glikoz taşıyıcı proteinler vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir (Maher ve ark., 1994). İnsan beyinde 10 farklı GLUT proteini (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12, GLUT13) eksprese edilmektedir. (Szablewski, 2017). Glikoz GLUT1 aracılığıyla kandan serebral interstisyel sıvıya taşınmakta, nöronlar ve gliya hücrelerinin hücre membranlarında lokalize olan glikoz taşıyıcı proteinler ile hücre içine alınmaktadır (Rooijackers ve ark., 2016). GLUT1 kan beyin bariyerinde, parankimal hücrelerde ve muhtemelen astrositlerde bulunurken, GLUT3 nöronlarda, GLUT5 ise mikrogliya hücrelerinde eksprese edilmektedir (Maher ve ark., 1994). Beyinde GLUT1 ve GLUT3 insülin-bağımsız yerleşim gösterirken, hipokampusta bunlara ilaveten insülin-bağımlı yerleşen GLUT4 glikoz taşıyıcıların etkin olduğu gösterilmiştir (Grillo ve ark., 2009). GLUT4 olfaktor bulbus, hipokampusun dentat

girusu, hipotalamus ve korteksin de içinde bulunduğu beyin bölgelerinde yerleşim göstermektedir. GLUT4 hem plazma membranında hem de sitoplazmada bulunmaktadır. Böylelikle plazma membranına translokasyonu için kolaylıkla mobilize edilebilen bir havuzun oluştuğu düşünülmektedir (Blazquez ve ark., 2014). İnsülin direnci, insülin yokluğu ya da her ikisinin etkisiyle insülin sinyalinin azalmasıyla GLUT4'ün membrana lokalizasyonunda azalma saptanmıştır (Calvo-Ochoa ve Arias, 2015).

İskelet kası, kalp kası ve yağ dokusu gibi perifer dokularında insülinin bağlanması IR'leri aktive eder. IR'nin aktive olmasıyla IRS proteinleri fosforile olarak PI3K ve PIP3'ün [phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate] aktive olmasını dolayısıyla Akt'nin aktive olmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda insülinin etkisiyle, GLUT4'ün translokasyonunun uyarılması ve glikoz alımının artmasının perifer dokularda PI3K bağımlı olduğu gösterilmiştir. Rat hipokampusunda yapılan çalışmalarla GLUT4'ün membrana translokasyonunun perifer dokularla tanımlanan aynı mekanizmayla oluştuğu gösterilmiştir. Bu mekanizmayla insülin aracılı GLUT4 translokasyonunun; hipokampal bağımlı öğrenme ile bağlantılı olan nöronal aktivitenin artması esnasında hipokampal nöronların hızlıca artan glikoz kullanımı için elzem olduğu düşünülmektedir (Grillo ve ark., 2009).

1.13. Beyin İnsülin Direnci

İnsülin direnci; diyabet, obezite, dislipidemi hipertansiyon gibi bir dizi bozukluğun bulunduğu MetS'in temel patolojik özelliğidir. Yakın zamana kadar insülin direnci çalışmaları kas ve yağ dokusu üzerine odaklanmıştır. Yeni veriler insülin direncinin sinir sisteminde de geliştiğini ortaya koymaktadır. Duyusal nöronlardaki insülin direnci, bu nöronların uygun olmayan büyüme faktörü sinyallerine de cevap vererek, nörodejenerasyon ve sonrasında diyabetik nöropati gelişimine katkıda bulunabilir. Diyabette insülin direnci, kortikal ve hipokampal nöronları amiloid beta ve tau toksisitesine karşı savunmasız hale getirerek Alzheimer riskini artırır (Kim ve Feldman, 2012) (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. Nöronal insülin direncinin gelişimi. a) İnsülin sinyal yolağı Akt'yi aktive ederek, normal nöronal fonksiyonu korur. b) MetS varlığında, insülin bağımlı dokularda olduğu gibi nöronlarda insülin direnci oluşur ve insülinin nörotrofik özelliklerine cevap veremez. Nöronlar nörotoksik uyarılara daha yatkın hale gelir (Kim ve Feldman, 2012).

1.14. İnsülin ve Öğrenme

Limbik sistemin hipokampus, piriform korteks ve amigdala alanlarında IR'nin çeşitli sinyal yollarındaki etkileri vasıtasıyla mekansal ve duyuşal bellekte önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Sıçanlarda öğrenmenin değerlendirildiği Morris water maze eğitiminden kısa süre sonra Shc, Grb-2/SOS ve Ras/ MAPK sinyal kaskatı aktive olur ve IR'nin yeni protein sentezine yol açan gen ekspresyonunun aktivasyonunu gerektiren uzun vadeli bellek depolama süreçlerine aracılık ettiği gözlemlenmiştir (Zhao ve Alkon, 2001). Kısa süreli hafıza oluşumu ile ilişkili olan mekansal öğrenme deneylerinden sonra hipokampusta IR mRNA ve IR protein miktarının arttığı gösterilmiştir (Kim ve Feldman, 2012).

İnsülin; hafıza oluşumu için önemli olduğu düşünülen hücre membranındaki NMDA (N-methyl-D-aspartate) reseptörlerinin ekspresyonlarını etkileyerek LTP'nin indüksiyonunu arttırabilmektedir. İnsülin; bilişselliği etkilediği bilinen asetilkolin ve norepinefrin nörotransmitterlerinin ekspresyonunu düzenlenmektedir. Dahası insülin; öğrenme ve hafıza için önemli olan beyin bölgelerinde kortikal glikoz metabolizmasını arttırıcı rol oynayabilmektedir (Cholerton ve ark., 2013).

Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar üzerinde yapılan araştırmalarda sağlıklı insan ve rat hücre kültürlerinde insülin, amiloid prekürsör proteinin fosforilasyonunu azaltıp, β -sekretaz, insülin degrade edici enzim ve glukojen sentaz kinaz-3 β gibi anti-amiloidojenik proteinleri arttırmaktadır. İnsülini katabolize eden bir metalloproteaz olan insülin degrade edici enzim beyinde yüksek miktarda eksprese edilir ve amiloid- β temizlenmesinde önemli rol oynar (Cholerton ve ark., 2013).

1.15. Çalışmanın Amacı

Literatürde diyabetli hayvanlarda ya da Alzheimer araştırmasına yönelik çeşitli hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, insülin reseptörleri yoğunluğu ile nöroenez arasında ilişkiyi daha çok davranış modelleriyle tanımlamaktadır. MetS'de oluşan insülin direnci etkisinde hipokampustaki nöronlarda insülin reseptörlerinin etkileniminde yetişkin nörogenezi ve programlanmış hücre ölümü arasındaki ilişkinin araştırılması diyabetle birlikte nörodejeneratif hastalıklara zemin hazırlayıcı mekanizmalara da ışık tutacaktır. MetS'li hayvanlarda daha önce hipokampal nörogeneze yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Çalışma bu yönüyle özgün bir çalışmadır. Çalışmamızda; MetS deney modeli oluşturulan sıçanlarda, hipokampusta insülin reseptör yoğunluğundaki değişimlerle nöroenez ve nöronal hücre ölümü arasındaki dengenin ne ölçüde etkilendiğinin farklı doku teknikleri kullanılarak gösterilmesi hedeflenmiştir. Literatürde insülin için tanımlanan nöroprotektif etkinin MetS oluşturulmuş sıçanlarda gözlenebilmesi için ekzojen insülin enjeksiyonu yapılmıştır. Deney gruplarına hayvan davranış deneyleri uygulanarak, sonrasında nöroenez, apoptoz ve insülin sinyal yolağına ilişkin proteinlerin seviyeleri

belirlenecektir. Böylelikle insülin direnci gelişmiş metabolik sendromlu hayvanların hipokampusunda insülin/insülin reseptörü yoğunluğu ile hipokampal nöroenez arasındaki ilişkinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma insülin ve nöroenez arasında etkin mekanizmalara ve mekanizma basamaklarına ilişkin planlayacağımız ileri çalışmalara da temel oluşturacaktır düşüncesindeyiz.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Deney Hayvanlarının Eldesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun 02.08.2017 tarih ve 2017-16-133 No'lu onayı ile gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarının temini, bakım ve beslenmeleri Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlanmıştır. Deneyde 30 adet, deney başlangıç ağırlıkları 180-200 g arasında değişen, iki aylık Wistar türü albino erkek sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar %40-60 nem içeren uygun oda sıcaklığında tutulmuştur. Ortam 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde düzenlenmiş olup yem ve su kısıtlaması yapılmadan beslenmişlerdir. Çalışmada hayvanlar eşit sayıda üç gruba ayrılmıştır. Buna göre;

- Kontrol grubu 10 adet,
- Metabolik sendrom deney modeli oluşturulan grup 10 adet (MetS)
- Metabolik sendrom oluşturulan hayvanlara insulin enjeksiyonu uygulanan grup 10 adet (MetS+İns) olmak üzere üç grup belirlenmiştir.

Kontrol grubundaki hayvanlar standart sıçan yemi ve çeşme suyu verilerek beslenirken diğer iki grup metabolik sendrom deney modeli oluşturulması için özel beslenme programına alınmıştır.

2.2. Sıçanlarda Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşturulması

MetS ve MetS+İns gruplarındaki hayvanlara standart sıçan yemine ek olarak yüksek karbonhidrat içerikli diyet oluşturmak amacıyla % 32 oranında (935 mM) süktroz içeren çeşme suyu verilmiştir (Vasanji ve ark. 2006). Okatan ve arkadaşları tarafından Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yapılan çalışmaların verilerine göre bu besleme protokolü ile 12. haftadan sonra açlık kan

şekerinde ve vücut ağırlıklarında değişimlerin oluşması beklenmektedir. MetS deney modeline ilişkin yayınlarda sükroz ile beslenme süresi 16 hafta olarak belirlenmiş (Okatan ve ark., 2015) , (Aguilera ve ark., 2004) ve hastalık modeli doğrulanana kadar devam etmiştir.

Deney grupları doğrulandıktan sonra MetS + İns grubuna iki hafta boyunca derialtı üç ünite insülin (Humalog Mix 25 Kwikpen 100 U/ml, Lilly İlaç Ticaret Ltd. Şti) enjekte edilmiştir.

2.3. Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşumunun Doğrulanması

Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Diyabet Federasyonu tarafından insanlarda metabolik sendrom tanısı koymak için beş kriter belirlenmiştir. Bunlar;

- glikoz toleransının bozulması,
- insülin direncinin oluşması,
- arteriyal kan basıncında artma,
- dislipidemi (serum trigliserit miktarının artması veya serum HDL düzeyinde azalma),
- abdominal obezite olarak belirlenmiştir.

Bu kriterlerden en az üç tanesine sahip olmak metabolik sendrom tanısı koymak için yeterli görülmektedir (Arslan ve ark., 2009). Çalışmamızda %32 sükroz içeren suyla beslenen deney hayvanlarında metabolik sendrom oluşumunu tespit etmek amacıyla beslenmeye başladıktan sonraki 16., 18. ve 20. haftalarda açlık kan şekeri ölçümleri, oral glikoz tolerans testi değerleri ölçülmüştür. 20. haftada değerler anlamlı çıktıktan sonra serum insülin miktarları tayini ve arteriyal kan basıncı ölçümleri yapılmıştır. Sıçanların deney başlangıç ve son ağırlıkları kaydedilmiştir.

2.3.1. Oral Glikoz Tolerans Testinin Ölçülmesi

Açlık kan şekerlerinin belirlenmesi için bir gece öncesinden aç bırakılan hayvanların kuyruk uçları bistüri yardımıyla kesilerek gelen kanın ilk damlası silindi. İkinci damla kan, kan şekeri ölçüm cihazı (Accu-Chek® Active- Roche Diagnostics) yardımıyla değerlendirilerek sonuçlar kaydedildi (0. Dakika). Açlık kan şekeri ölçümlerini takiben hayvanlara gavaj yoluyla 1 g/kg miktarında glikoz verildi. Glikoz yüklemesinden sonraki değerler ilk 15., 30., 60. ve 120. dakikada ölçüldü.

2.3.2. Serum İnsülin Düzeyinin Belirlenmesi

Hayvanlardan alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra santrifüj edildi ve süpernatant toplandı. Toplanan süpernatantta serum insülin düzeylerinin ölçülmesi için Elabscience Rat İnsülin Elisa Kit (E-EL-R2466) kullanıldı. Kitin içinde rat insülin antikoruyla kaplanmış 96'lık plaka, Standard Working Solution, standartların hazırlanması için Reference Standard&Sample Diluent, Biotinylated Detection Ab, HRP Conjugate, Substrate Reagent ve Stop Solution bulunmaktadır. Standart çözeltinin hazırlanması için Standard Working Solution, Reference Standard&Sample Diluent içinde çözöldü ve 6 kez 1:1 oranında dilüe edildi. Elde edilen değerler, serumdaki insülin seviyesinin belirlenmesi için referans değerler olarak kullanıldı. Reference Standard&Sample Diluent ve süpernatanttan 100µl alınarak kuyucuklara eklendi ve 37°C'de 90 dk inkübe edildi. Inkübasyondan sonra sıvı uzaklaştırıldı ve 100 µl Biotinylated Detection Ab ile 37°C'de 60 dk, 100 µl HRP Conjugate ile 37°C'de 30 dk, inkübe edildi ve her işlemten sonra kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandı. 90 µl Substrate Reagent eklenerek 37°C'de, karanlıkta 25 dk. inkübe edildi ve reaksiyon 50 µl Stop Solution eklenerek durduruldu. Kuyucuklardaki renk değişimi spektrofotometre ile ölçölüp, insülin miktarları hesaplandı.

HOMA-IR; açlık kan glikozu ve serum insülin değerleriyle hesaplanan, insülin direnci gelişimini tespiti için kullanılan testtir. Açlık kan glikozu ölçümleri ve serum

insülin değerleri $HOMA-IR = \text{Açlık Glikoz (mmol/L)} \times \text{Açlık İnsulin (mU/L)} / 22,5$ formülüne yerleştirilerek insülin direnci gelişimi hesaplanmıştır. Veriler arasında istatistiksel olarak fark olduğunu gördükten sonra; pankreas beta hücrelerinin insulin salınım oranları arasında fark olup olmadığını görmek için $HOMA-\beta$ ($HOMA-\beta = [20 \times \text{Açlık İnsulin (mU/L)}] / [\text{Açlık Glikoz (mmol/L)} - 3.5]$) formülü kullanılmıştır (Shpilberg ve ark., 2012).

2.3.3. Kan Basıncı Ölçümü

Hayvanların kan basıncı ölçümleri kuyruktan ‘tail cuff’ yöntemi ile (NIBP200-A noninvaziv tansiyon ölçüm aleti, BIOPAC) gerçekleştirildi. Deney için düşük dozda anestezi verilerak sakinleştirilen hayvanların kuyruklarına sensör takılarak kalp atım hızları ve sistolik kan basınçları kaydedildi.

2.3.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi

Hayvanların deney başlangıç ve bitiş ağırlıkları (SOEHNLE marka tartı) ölçülüp kaydedildi.

2.4. Davranış Deneyleri

Deney hayvanlarında öğrenme ve hafıza düzeylerinin belirlenmesi için Yükseltilmiş Artı Labirent Testi, Vanderwolf Yüzme Testi; anksiyete benzeri davranışları değerlendirmek için Yükseltilmiş Artı Labirent, Açık Alan Testi, Aydınlık Karanlık Alan Testi kullanılmıştır. Stres belirteci olarak Harder Bezi Değerlendirmesi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda hazırlanan deney düzeneklerinde gerçekleştirildi.

2.4.1. Açık Alan Testi (Open Field Test)

İlk kez 1934 yılında Hall tarafından oluşturulan (Hall, 1934) açık alan testi hem yeni ortamdan hem de açık alan korkusundan kaynaklanan anksiyeteyi ölçmek için kullanılan bir testtir. Sistem kare veya silindirik şekilde olup içinde 20 adet kare bulunur. Anksiyete arttıkça hayvanların genellikle kenarlarda bulunan karelerde, anksiyete azaldıkça sistemin orta kısımlarında bulunan karelerin içinde geçirdikleri süre artar. Hayvanlarda anksiyetenin azalmasıyla lokomotor aktivite yükselir ve buna bağlı olarak yeni çevreyi araştırma davranışı artar. Açık alan testi beş dakika olacak şekilde uygulanmıştır. Her test sonrası ortam %70 etanol ile temizlenmiş ve kurulanmıştır. Deney süresi içinde hayvanların davranışları (orta kesimde geçen süre, orta kesime girme sayısı, kenar alanda geçen süre, katedilen toplam mesafe, rearing yani ayağa kalkma ve geçiş gecikmesi) deney düzeneğinin üstüne sabitlenmiş bir kamera ile kayıt altına alınıp, analiz işlemlerinde kullanılmıştır.

2.4.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

1985 yılında Pellow ve ark. tarafından revize edilen (Pellow ve ark., 1985) deney düzeneği yerden yüksekliği 50 -70 cm arasında olan artı (+) şeklinde düzenlenmiş iki açık iki kapalı koldan oluşmaktadır. Eğer hayvanlar kapalı kolda daha fazla süre harcamış ise bu artan anksiyetenin, açık kolda daha fazla süre harcamış ise azalan anksiyetenin göstergesidir. Bu sistem sıçanlarda ve farelerde yükseklik korkusundan kaynaklanan anksiyeteyi ölçmek için kullanılır. İşlem süresi beş dakika olarak uygulanmıştır. Birinci gün anksiyete değerlendirilmesi için denekler açık kola bakacak şekilde deney düzeneğine yerleştirilmiştir. Birinci günden elde edilen veriler anksiyete benzeri davranışlar ile ilgilidir. Deney 24 saat sonra uzaysal öğrenmeyi değerlendirmek için tekrarlanmıştır. İkinci gün denekler açık kolun distaline bırakılarak kapalı kola geçinceye kadar harcanan süre kamera ile kayıt altına alınmıştır. 90 saniye içinde kapalı kola geçmeyen denekler için transfer geçiş süresi

90 saniye kabul edilmiştir (Yükseltilmiş artı labirent testi ikinci gün öğrenmeyi değerlendirmek amacıyla kullanıldığından, transfer geçiş süresinin uzaması öğrenmenin bozulduğu anlamına gelmektedir). Her işlem sonrası sistem silinip kurulanmış böylelikle oluşan defakasyon, idrar, ter ve tüy gibi hayvana ait atıklar temizlenmiştir. Deney düzeneğine yerleştirilen hayvanların davranışları (ayağa kalkma, açık kolda geçen süre, kapalı kolda geçen süre, açık kola girme sayısı) gözlemlenmiş ve kamera ile beş dakika süresince kaydedilmiştir. Kaydedilen görüntüler daha sonra analiz edilmiştir.

2.4.3. Vanderwolf Yüzme Testi

1987 yılında Vanderwolf tarafından tanımlanan (Vanderwolf, 1987) yüzme testi uzaysal öğrenmenin değerlendirildiği testtir. Test süresi iki gün olarak belirlenir. Deney düzeneğinde bir su tankı ve su tankı içine yerleştirilmiş bir platform bulunur. Su tankı içindeki platformun hayvan tarafından görülmemesi için su içine gıda boyası, süt veya süt tozu konarak opak duruma getirilir. Deneyimizde bu işlem için süt kullanılmıştır. Hayvanlara yüzme tankında birinci gün 10 kez, ikinci gün 10 kez olmak üzere antrenman yaptırılmıştır. Bu antrenmanlar en fazla bir dakika sürmektedir ve bu süre içinde hayvanın yüzme tankı içindeki platforma çıkması gerekmektedir. Bir dakika içinde platforma çıkamayan denek platforma konulmuştur. İkinci gün öğrenmenin olumlu yönde gelişmesinden dolayı hayvanların platforma çıkma süresinin ilk günden farklı olarak kısalması beklenmektedir. Hayvanların birinci ve ikinci günlerde platforma çıkma süreleri tespit edilmiş ve bu antrenmanlar kamera ile kayıt altına alınmıştır. Kaydedilen görüntüler üzerinden analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

2.4.4. Aydınlik Karanlık Kutusu Testi

1980 yılında tanımlanıp 1987 yılında modifiye edilen (Belzung ve ark., 1987) deney düzeneği 110 x 40 cm ölçülerinde birbiriyle temas halinde olan eşit iki bölmeden

oluşur. Bu bölmelerin biri aydınlık alan diğeri karanlık alandır ve ortada iki alanı birbirine bağlayan bir delik bulunmaktadır. Rodentlerin nokturnal canlı olmaları nedeniyle yüksek ışık anksiyeteye neden olmaktadır. Hayvanlar aydınlık alana konulup beş dakika süre boyunca gözlemlenmiştir. Deney esnasında hayvanların davranışları kamera ile kayıt altına alınmıştır. Hayvan davranışları gözlemlenirken dikkat edilmesi gereken parametreler hayvanın aydınlık alanda bulunduğu süre, karanlık alanda bulunduğu süre, aydınlık karanlık alan arasında geçiş sayısı, iki ayağı üzerine kalkma hareketinin tekrarlanma sayısı olarak belirlenmiştir.

2.4.5. Harder Bezi Değerlendirmesi

Harder bezi üçüncü göz kapağı bulunan memelilerin göz çukurunda bulunan bir bezdir. Anksiyete ile beraber Harder bezi sekresyonunun arttığı daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Harder bezi sekresyonunun artmasıyla kanlı gözyaşı (chromodacryorrhea) adı verilen salgı artar (Burn ve ark., 2006). Bezin fonksiyonu her davranış deneyi sonrası 1, 3, 5, 7 ve 9 saat arayla kanlı gözyaşı skalasına göre (Çizelge 2.1) 0-5 arasında skorlanarak değerlendirilmiştir.

Kanlı Gözyaşı Skalası
Skor 0: Gözde görülebilir kanlı gözyaşı damlası olmadığı durumlar
Skor 1: Gözde 1 mm'den daha küçük kanlı gözyaşı damlası olduğu durumlar
Skor 2: Gözde bir büyük ya da birkaç küçük kanlı gözyaşı damlası olduğu durumlar
Skor 3: Gözde birkaç büyük ya da birçok küçük kanlı gözyaşı damlası olduğu durumlar
Skor 4: Burnun %25-50 oranının ya da göz çevresinin kanlı gözyaşı ile kaplı olduğu durumlar
Skor 5: Burnun %50'sinden fazlasının ya da göz çevresinin kanlı gözyaşı ile kaplı olduğu durumlar

Çizelge 2.1. Sıçanların Harder bezi sekresyonunun değerlendirildiği kanlı gözyaşı skalası (Burn ve ark., 2006).

2.5. Dokuların Elde Edilmesi

Deney gruplarındaki hayvanlar uygulanan testler sonunda ketamin/ksilazin (90 mg/kg-10 mg/kg, kas içi) kullanılarak derin anesteziye alındı. Dekapitasyon sonrası

hayvanların beyinleri çıkarıldı. Beyinler hemisferlerinden iki eşit parçaya ayrıldı. Sol hemisferin hipokampusu western blotlama işlemi için çıkarıldıktan sonra ependorflara konularak -80°C'de muhafaza edildi. Sağ hemisfer rutin histoloji boyamaları ve immünohistokimyasal işaretlemler için % 10 fosfat tamponlu formalin solüsyonuna alındı ve 24-72 saat süreyle fikse edildi. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile dentat girus bölgesindeki nöronların ultrastrüktürel yapılarının incelenebilmesi için sol hipokampustan 1 mm³ lük örnekler % 2,5 gluteraldehit içeren tespit solüsyonu içine alındı ve +4°C derecede muhafaza edildi.

2.6. Işık Mikroskop İncelemeleri İçin Rutin Histolojik Takip Prosedürü

Tespit aşaması tamamlanan dokular dehidratasyon işlemine tabi tutuldu. Bu işlem dahilinde önce dokular akar su altında bekletilerek dokuların içine nüfuz etmiş olan formaldehit uzaklaştırıldı. Tekrarlanan aşamalarda dereceli etanoller tazelenerek; %75'lik etanolde 2 kez 60 dakika, %96'lık etanolde 60 dakika ve 1 gece, %100'lük etanolde ise 2 kez 60 dakika bekletildi. Dehidratasyon işlemi tamamlandıktan sonra dokular ksilene alındı şeffaflanma işlemi gerçekleşene kadar bekletildi. Şeffaflanan beyin dokusu örnekleri 60 °C'lik etüvde 30 dakika ksilen ve sıvı parafin içinde bekletildikten sonra saf parafine alındı ve 4 saat sıcak parafin içinde bekletildi. Parafin infiltrasyonu tamamlandıktan sonra dokular sıcak parafine koronal yönde kesit alınacak şekilde gömülerek bloklandı ve oda sıcaklığında sertleşmesi beklendi. Sertleşen parafin bloklar +4 °C'de kesit alınana kadar muhafaza edildi.

Parafin bloklara gömülü beyin dokuları kesit alınmadan önce -18 °C'de en az 20 dakika bekletildi. Önceden poly-l-lysin kaplanan lamlara tüm hipokampusu kapsayacak şekilde her örnekten 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesit alma işlemi Leica RM 2125RT model sliding mikrotom ile yapıldı. Lam üzerine alınan kesitlerin boyama işlemi yapılmadan önce 60 °C'lik etüvde bir gece bekletilerek deparafinizasyonları sağlandı. Boyamaya hazır hale gelen kesitlere Hematoksilen Eozin, Krezil Viyole ve immünohistokimyasal işaretlemler aşağıdaki prosedürlere uygun olarak gerçekleştirildi.

2.6.1. Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama Prosedürü

Ksilen ile kesitler 20 dakika deparafinize edildi.

%100, %96 ve %75 etanol serisi ile ikişer dakika hidrasyon işlemi yapıldı.

Kesitler suda yıkandı.

Hematoksilen solüsyonunda 1 dakika boyunca boyama yapıldı.

Kesitler tekrar suda yıkandı.

Eozin solüsyonunda 30 saniye boyunca boyama yapıldı.

Kesitler suda yıkandı.

%75, %96 ve %100'lük etanol serisi ile sırasıyla 30 saniye, 1 dakika, 2 dakika süreyle dehidrate edildi.

Ksilen ile en az 20 dakika şeffaflandırma işlemi yapıldı.

Kesitler entellan ile kapatıldı.

2.6.2. Krezil Viyole Boyama Prosedürü

Ksilen ile kesitler 20 dakika deparafinize edildi.

%100, %96 ve %75 etanol serisi ile ikişer dakika hidrasyon işlemi yapıldı.

Kesitler önce suda sonra da dH₂O ile yıkandı.

%0,1 krezil viyole solüsyonunda 60 °C etüvde 30 dakika boyunca boyandı.

Distile su (dH₂O) ile hızlıca yıkandı.

%75, %96 ve %100'lük etanol serisinden hızlıca geçirildi.

Ksilen ile en az 20 dakika şeffaflandırma işlemi yapıldı.

Kesitler entellan ile kapatıldı.

2.6.3. İmmünohistokimyasal İşaretlemelelerde Kullanılan Antikorlar ve İşaretleme Prosedürü

Çalışmamızda hipokampusun dentat girus bölgesinde subgranüler zonda yer alan hücrelerin işaretleme için kullanılan antikorlar ve özellikleri aşağıda sıralanmıştır.

Ki67: Hücre bölünmesi düzenlenmesinde rol oynayan DNA bağlayıcı bir proteindir. Hücre döngüsünde G1 fazının başında birikmeye başlar mitoz sırasında pik yapar. Proliferasyon belirteci olarak kullanılmaktadır (Nagy ve ark., 1997).

DCX: DCX ifadesi proliferasyon evresinden postmitotik evreye kadar devam eder (Kempermann ve ark., 2015).

NeuroD1: Gelişme ve yetişkinlik dönemlerinde yenidoğan nöronların göçü, olgunlaşması ve yaşamasıyla birlikte nörogenez için de önemli olduğu gösterilmiştir (Aprea ve ark., 2014).

NeuN: Nöronal nükleer antijen (NeuN) olup omurgalılarda nöron spesifik nükleer proteindir. İmmatür nöronlarda ifadelenmesi bulunmamaktadır (Gusel'nikova ve Korzhevskiy, 2015).

İnsülin (İns): KBB'yi geçen ya da nöronlarda salgılanan insülin, insülin sinyal yolağını aktive etmektedir (Zhao ve ark., 2004).

İnsülin Reseptör (IR): İnsülinin bağlanmasıyla aktive olur ve insülin sinyal yolağında görev almaktadır (Park ve ark., 2000).

İnsülin Reseptör Substrat 1 ve 2 (IRS1-IRS2): Aktive olan insülin reseptörleri IRS'lerin aktive olmasını sağlar (Plum ve ark., 2005).

Glikoz Taşıyıcıları (GLUT3-GLUT4): Memeli beyni için enerji kaynağı olan glikozun nöronlara alınmasında görev alan proteinlerdir. GLUT3 tüm nöronlarda bulunurken (Vannucci ve ark., 1997), GLUT4 hipokampus dentat girus bölgesinin de içinde bulunduğu spesifik bölgelerde bulunmaktadır (Blazquez ve ark., 2014).

Cleaved caspase 3: Hücrenin canlılığını kaybetmesi esnasında ya da öncesinde görev alan kaspaz proteindir (Porter ve Janicke, 1999).

TUNEL: Kitin çalışma prensibi apoptozun erken evrelerinde oluşan tek ve çift sarmal DNA kopmalarının saptanmasına dayanır.

Kök hücreleri ve yeni oluşan nöronları işaretlemek için Ki67, DCX ve NeuroD1 antikorlarını, olgun nöronları göstermek için NeuN antikorunu kullandık. Hipokampus bölgesinde insülini göstererek, insülin sinyal yolağında rol oynayan insülin reseptörü ve insülin reseptörünün bağlanacağı substratı işaretlemek için IR, IRS1 ve IRS2 antikorları kullandık. Hipokampus glikoz taşıyıcılarını işaretlemek için GLUT3 ve GLUT4 antikorlarını kullandık. Cleaved caspase 3 ve TUNEL boyamalarıyla hücre ölümünü göstermeyi amaçladık. Kullanılan antikorların bilgisi ve dilüsyon oranları Çizelge 2.2’de verilmektedir.

Adı	Antikor Bilgisi	WB Sulandırma Oranı	IHC Sulandırma Oranı	Lokalizasyonu
Ki 67	PA5-19462	-	1/100	Hücre çekirdeği
DCX	sc-390645	1/300	1/100	Sitoplazma
Neuro D1	ab109224	1/1000	1/100	Sitoplazma ve çekirdek
NeuN	ab177487	1/1000	1/1000	Sitoplazma ve çekirdek
İnsülin (İns)	Thermo #14-9769-82	1/400	1/200	Sitoplazma
IR	ab203746	1/350	1/200	Membran
IRS 1	sc-8038	1/300	-	Sitoplazma
IRS 2	sc-390761 HRP	1/300	1/150	Sitoplazma
GLUT 3	sc-74399 HRP	1/300	1/200	Membran
GLUT 4	sc-53566	1/350	1/200	Membran ve sitoplazma
IGFR1α	sc-7952	1/350	-	Membran
Cleaved Casapse 3	CST #9661	1/500	1/150	Sitoplazma
β Aktin	sc-47778	1/1000	-	Sitoplazma
TUNEL	Sigma 11684817910 ROCHE	-	-	Hücre çekirdeği

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primer antikorların bilgileri, WB ve IHC sulandırma oranları ile proteinlerin lokalizasyonları.

2.6.3.1. İmmünohistokimya İçin İşaretleme Prosedürü

- Kesitler ksilen ile 20 dakika deparafinize edildi.
- %100, %96 ve %75 etanol serisi ile ikişer dakika hidratasyon işlemi yapıldı.
- dH₂O ile yıkandı.
- Formaldehitin kapattığı epitoplari açmak için sitrat solüsyonu (Merck 1.06448.1000, pH:6) ile ısı ve basınç altında antijen açığa çıkarma işlemi yapıldı.
- Dokuların etrafı doku sınırlayıcı kalem ile çizildi.
- PBS (Phosphate buffer saline) ile 3x5 dakika yıkandı.
- Hidrojen peroksidaz ile endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 10 dakika muamele edildi.
- PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
- Bloklama solüsyonu damlatılıp 5 dakika beklendi.
- Primer antikor damlatıldı ve +4°C’de bir gece inkübe edildi.
- PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
- Sekonder antikor damlatıldı 10 dakika oda ısısında tutuldu.
- PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
- Streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 10 dakika muamele edildi.
- PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
- DAB (3,3’-diaminobenzidine) ile 1-3 dakika arasında değişen sürelerde bekletildi.
- dH₂O ile 3x5 dakika yıkandı.
- %75, %96 ve %100 etanol serilerinde ikişer dakika dehidratasyon işlemi yapıldı.
- Ksilende 20 dakika şeffaflandırıldı.
- Entellanla kapatıldı.

2.6.3.2. TUNEL Boyama Prosedürü

- Kesitler ksilen ile 20 dakika deparafinize edildi.
- %100, %96 ve %75 etanol serisi ile ikişer dakika hidrasyon işlemi yapıldı.
- Distile su (dH₂O) ile yıkandı.
- Formaldehitin kapattığı epitoplari açmak için sitrat solüsyonu (pH:6) ile ısı ve basınç altında antijen retrieval işlemi yapıldı.
- Dokuların etrafı pappen ile çizildi.
- PBS (Phosphate buffer saline) ile 3x5 dakika yıkandı.
- TUNEL reaksiyon karışımı ile (işaretleme solüsyonu + terminal deoksinukleotidil transferaz enzim solüsyonu) 37°C’de 60 dakika inkübe edildi.
- PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
- Converter-POD ile 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- DAB (3,3’-diaminobenzidine) ile reaksiyon gerçekleşene kadar muamele edildi.
- %75, %96 ve %100 etanol serilerinde ikişer dakika dehidrasyon işlemi yapıldı.
- Ksilende 20 dakika şeffaflandırıldı.
- Entellanla kapatıldı.

Yapılan tüm ışık mikroskobu incelemeleri Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Germany) mikroskop kullanılarak yapıldı. Dijital görüntüler Axiovision bilgisayar programı kullanılarak analiz edildi.

2.7. Geçirimli (Transmisyon) Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntülemesi İçin Yapılan Çalışmalar

Sağ hipokampustan % 2,5’luk gluteraldehit içerisinde alınan örneklere TEM için tespit ve takip işlemleri uygulandı.

- 0,2 M fosfat tamponu içerisinde % 2,5 gluteraldehit ve % 2 paraformaldehit (pH= 7.2-7.4) solüsyonlarında +4°C’ de 2-4 saat süreyle birinci tespit işlemi yapıldı.
- 0,1 M fosfat tamponunda 2x15 dakika boyunca rotatorda yıkandı.
- Karanlık ortamda 0,1 M fosfat tamponunda %1 OsO₄ solüsyonu ile rotatorda 2 saat boyunca ikinci tespit uygulandı.
- 0,1 M fosfat tamponunda 3 x 20 dakika yıkandı.
- Distile su ile yıkama işlemi uygulandı.
- %70 etanolde %0,05 uranil asetat ve %1 fosfotungustik asit ile blok boyama işlemine karanlık ortamda ve rotatorda 2 saat süresince devam edildi.
- %70, %96, %100 etanol serileri ve propilenoksit dehidratasyon için kullanıldı.
- 1:1 oranında propilen/Araldit karışımı ile rotatorda 1 saat muamele edildi.
- 2 saat boyunca Araldit içinde tutuldu.
- Blok kalıbı içerisine hipokampus dokuları konuldu, üzerine araldite eklendi.
- Hazırlanan bloklar 80°C’de etüvde 1 gece süre ile polimerizasyon işlemine tabi tutuldu.
- İşlem sonunda bloklar etüvden çıkarılıp soğumaya bırakıldı.

Bloklardan kesitler Leica Ultracut R marka ultramikrotom (Leica, Solms, Germany) ile alındı. Yarı ince ışık mikroskopi incelemesi için alınan 1 µm kalınlığında kesitler toluidin mavisi-azur II ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi. Ultrastrüktürel yapının gözlenmesi amacıyla alınan 70 – 90 nm kalınlığında kesitler gride alındı ve aşağıdaki protokole uygun olarak boyandı.

2.7.1 İnce Kesit Boyama Protokolü

- Alınan kesitler boyama setine yerleştirildi.
- dH₂O ile 1-2 dakika yıkandı.
- 45 dakika boyunca %8’ lik uranil asetat ile boyandı.
- dH₂O ile 1-2 dakika yıkandı.

- 0,1 N NaOH içerisinde yıkandı.
- İkinci boyama için %0,7 kurşun sitrat / %0,9 sodyum sitrat solüsyonunda 20 dakika tutuldu.
- 0,1 N NaOH içerisinde yıkandı.
- dH₂O ile 1-2 dakika yıkandı.

Hazırlanan gridlerin incelemeleri LEO 906E TEM (80 kV, Oberkochen, Germany) marka mikroskop ile yapıldı. Görüntülemeler Sharpey CCD ve Image SP (Germany) dijital görüntüleme sistemi programı ile gerçekleştirildi.

2.8. Western Blotlama Uygulaması

Hayvanların sakrifikasyonu sırasında elde edilen ve ependorflar içinde -80°C’de muhafaza edilen doku örnekleri oda ısısına çıkarıldı. Porselen havan içerisinde sıvı azot yardımıyla parçalandı ve ependorflara koyuldu. Eşit miktarda tartılan doku örnekleri homojenizasyon tampon çözeltisi (Tris-HCl (pH 7,4) 20 mM, NaCl 150 mM, KCl 2 mM, EDTA 2 mM, DTT 0,5mM, Proteaz inhibe eden çözelti 100 mM, PMSF 0,4 %2 NP-40 ve %1 sodyum deoksikolat) ile homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi için önce ultratroks kullanılarak mekanik parçalama gerçekleştirildi. Sonrasında ise +4 °C sıcaklıkta 10.000 Rpm’de (round per minute) 10 dakika santrifüj edildi. Ependorfta oluşan pellet atılırken süpernatant temiz bir ependorfa alındı. Bundan sonraki işlemler süpernatant kullanılarak yapıldı. Süpernatant içinde bulunan protein miktarı BCA (Pierce bicinchoninic ACID protein assay kit, 23225 Thermo) kit ile belirlendi ve her kuyucuğa koyulması gereken protein miktarı hesaplandı. Süpernatant 1:1 oranında sample buffer (leamli) ile sulandırılıp, 5 dakika boyunca 90°C’de inkübe edilerek analizler için hazır hale getirildi.

- Jel dökme düzeneği hazırlanarak ince ve kalın camlar arasına %10'luk ayırıştırma jeli döküldü.
- Jel donduktan sonra üstte kalan kısma %5'lik toplama jeli döküldü ve plastik tarak camların arasına yerleştirildi.
- Toplama jeli donduktan sonra tarak çıkarıldı. İlk kuyucuğa leader sonraki kuyucuklara tekrar edecek şekilde numuneler yüklendi.
- Protein yüklü jel düzeneği elektroforez tankına yerleştirildi ve tank Running buffer solüsyonu ile dolduruldu.
- Tank ile güç sağlayıcı arasındaki bağlantı kurulduktan sonra güç sağlayıcı 90-140 V'a ayarlandı, proteinlerin jel üstünde yürümesi sağlandı.
- Blotlama işlemi için membran (#1704273 PVDF membran) aktive edildi. Sandviç sistem hazırlanıp arasına jel yerleştirildi ve transfer kaseti hazırlandı.
- Kaset kilitlenip Trans-Blot turbo transfer sistem içine yerleştirildi; 1,3A (Amper) ve 25 V (Volt)'da 30 dakika boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi.
- Membran çıkarıldı ve bloking işlemi için BSA (3gr bovine serum albumine + 100 ml ddH₂O) içinde 60 dakika bekletildi. Değişen dilüsyonlarda (Çizelge 2.2) antikor içinde +4°C de bir gece bekletildi.
- TBST ile 3x 10 dakika yıkama işlemi yapıldı.
- Sekonder antikor içine konularak 60 dakika muamele edildi.
- TBST ile 3x 10 dakika yıkama işlemi yapıldı.
- Karanlık odaya geçildi.
- Chemiluminescent Substrate Solüsyonu (Advansa K-12042-D20, Western Bright Quantum kit) 1:1 oranında hazırlandı.
- Membranların üzerine hazırlanan solüsyon damlatıldı ve hiperfilm kaset içine yerleştirilerek membran ışımasının filmi etkilemesi sağlandı.
- Hiperfilm açıldı, önce developer solüsyonuna, sonra ise fiksatife alındı.
- Su ile yıkanarak kurutuldu ve analiz işlemi gerçekleştirildi.

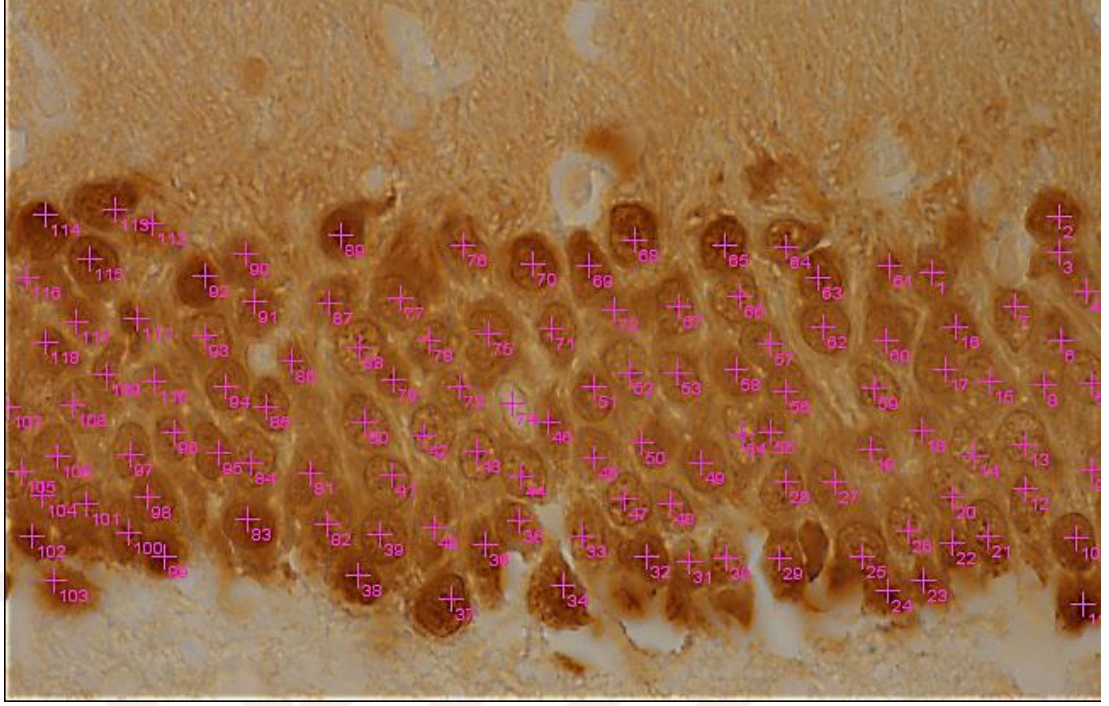
2.9. İmmünohistokimyasal Analizlerin Değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal analizler için her parafin bloktan yaklaşık 120 µm aralıkla, 5 µm kalınlığında 3 farklı seviyeden alınan koronal beyin kesitleri kullanıldı.

Her preperattan 40X büyütmede 6 farklı alanın fotoğrafları çekildi. Boyanma yoğunluğuna göre histolojik skorlama (H-SCORE) yapılacak olan antikorlar için ImageJ software (ImageJ1,51j8, National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak boyanma düzeylerine (i) göre; negatif: 0, düşük pozitif: 1, pozitif: 2, yüksek pozitif: 3 değerleri verildi. Boyanma düzeylerinin % 0-100 arasında değişen piksel oranları (Pi) belirlendi. Elde edilen değerler $H-SCORE = \sum Pi (i + 1)$ (Bacus ve ark., 1988) formülü kullanılarak sayısallaştırıldı. Formüldeki 1; optik yoğunluğun düzeltilmesi için kullanıldı.

Pozitif hücre sayısının hesaplandığı antikor işaretlemelerinde, her preperattan 40X büyütmeyle 6 farklı alandan fotoğraflar çekildi. Gruplardan habersiz iki histolog tarafından sayımlar yapıldı. Sayımın yapıldığı her bir subgranüler zon bölgesi alanı Axio Scope A1 marka mikroskop kullanılarak ölçüldü. 1000 µm² alandaki hücre sayısı hesaplandı.

Dentat girus hücrelerinin tamamını saydığımız NeuN antikoruyla boyalı preperatlardan 100X büyütmede 6 farklı alanın fotoğrafı çekildi ve fotoğrafı çekilen dentat girus bölgesinin alanı hesaplandı. 1000 µm² alandaki hücre sayısı hesaplandı. Çekilen mikrograflardaki hücre sayısı Image J programıyla manuel olarak sayıldı (Resim 2.1).



Şekil 2.1. Hipokampus dentat girus nöronlarının Image j programında sayılması.

2.10. İstatistiksel Analizler

Western blotlama istatistiklerinin değerlendirilmesi için GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanıldı. Gruplar arasındaki fark one-way ANNOVA ile saptandı, ikili karşılaştırmalar student-t testi ile yapıldı. Tüm grafikler Graphpad5 kullanılarak çizildi.

İmmünohistokimyasal analizlerin istatistiksel değerlendirmesi için IBM SPSS 22 programı kullanıldı. IHC incelemeleri ve davranış testleri sonucunda elde edilen verilerden normal dağılım gösterenler için gruplar arasındaki fark one-way ANNOVA ile değerlendirilip, ikili gruplar arasındaki fark için Tukey Post-hoc çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Çalışmamızda normal dağılım göstermeyen verilerin değerlendirilmesi için Kruskal Wallis (KW) testi kullanıldı. Sonuçlar için $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

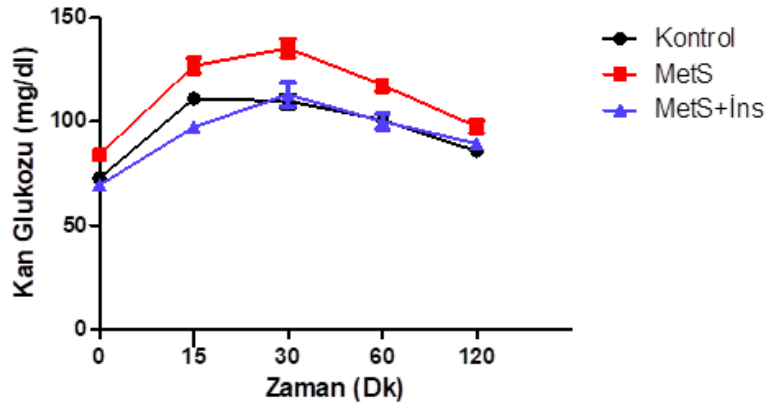
3. BULGULAR

3.1. Deney Hayvanlarında MetS Deney Modelinin Doğrulanması

Çalışmaya ağırlıkları 180-200 g arasında değişen iki aylık Wistar türü erkek sıçanlarla başlandı. MetS deney modeli oluşturmak için ikinci aydan sonra hayvanlar %32 süktroz içeren su ile beslendi. Deney modelinin doğrulanması için kan glikoz seviyeleri, kan insülin düzeyleri değerlendirilip insülin direnç gelişimi ve arteriyal kan basınçları ölçüldü. MetS deney modeli oluşumu doğrulandıktan sonra MetS+İns grubuna 15 gün boyunca insülin enjeksiyonu yapıldı.

3.1.1. Deney Hayvanları OGTT Bulguları

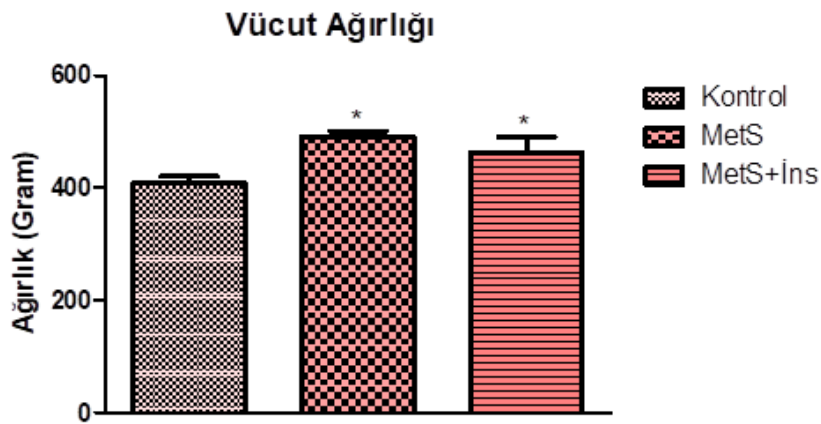
MetS deney modeli oluşturabilmek için beslenen hayvanların açlık kan glikoz düzeyleri, 12.haftadan sonra düzenli olarak ölçüldü. 20.haftada deney grupları kontrol grubuyla kıyaslandığında açlık kan glikozu düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı ($p<0,0001$) gözlemlendi. Ancak insülin uygulaması yapılan MetS+İns grubunda açlık kan glikoz seviyesinin MetS grubuna oranla anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p=0,0004$) (Şekil 3.1, 0.dakika). Açlık kan glikoz seviyesinin artması insülin direnci oluşumu ya da yeterli miktarda insülin miktarının salgılanamaması durumlarını düşündürdü. Oral glikoz tolerans testi uygulaması ile hayvanlarda insülin direnç gelişimi incelendi. MetS gruplarında kontrol gruplarına kıyasla glikoz yüklemesinden sonraki kan glikoz değerlerinde 15.dakikada 0,17 kat ($p=0,0009$), 30. dakikada 0,14 kat ($p<0,0001$), 60. dakikada 0,24 kat ($p<0,0001$) ve 120. dakikalarda 0.18 kat ($p=0,0012$) artış izlendi. 15 günlük insülin uygulamasından sonra hem açlık kan glikoz değerlerinin kontrol seviyelerine indiği hem de 30. dakikadan sonra oral glikoz tolerans testi değerlerinin kontrol grubuyla aynı seviyeye geldiği belirlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. OGTT sonuçları.

3.1.2. Deney Hayvanları Vücut Ağırlığı Değişimi

Hayvanların deney başlangıç ve bitiş ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrol grubunun deney sonu ağırlık artışı iki kat iken, MetS grubunda ağırlık artışı ikibuçuk kat olarak hesaplandı. Yüksek oranda sükröz içeren su ile beslenen hayvanların deney sonu ağırlıkları kontrolle karşılaştırıldığında daha fazla kilo aldıkları gözlemlendi ve aralarında anlamlı fark bulundu ($p<0,0001$). MetS+ İns grubundaki hayvanların deney sonu ağırlıkları kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde yükselirken ($p<0,0317$), MetS grubuna göre ağırlık bakımından fark ($p<0,1423$) bulunamadı (Şekil 3.2).



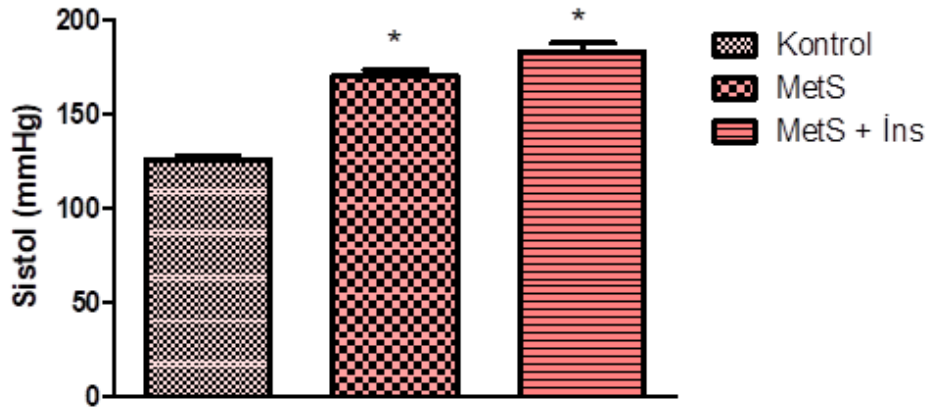
Şekil 3.2. Gruplar arasında vücut ağırlığı değişimine ait çubuk grafik, ortalama±SEM (standart error of mean) * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arasındaki karşılaştırma).

3.1.3. Serum İnsülin Düzeyi Değişimi ve İnsülin Direnci Oluşumu

Deney gruplarından alınan serum örneklerinde kan insülin seviyesine Elisa yöntemiyle bakıldığında; kontrol grubuna oranla MetS grubunun kan insülin seviyesi 10 kat, MetS+İns grubunun insülin seviyesi ise beş kat yüksek olarak bulundu. İnsülin direnç oluşumunu gösteren HOMA-IR testi sonuçlarına göre MetS deney grubunda direnç gelişimi gerçekleşmiştir. Pankreas β hücrelerinden salgılanan insülin miktarları arasındaki farkı görmek için HOMA- β verileri hesaplandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,0001$). Kontrol grubuna oranla MetS ve MetS+İns gruplarında insülin salınımı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0,0001$ $p<0,0001$). MetS ve MetS+İns grupları insülin salınımı açısından karşılaştırıldığında MetS+İns grubunda salınan insülin miktarı anlamlı derecede azalmış olarak bulundu ($p<0,0001$).

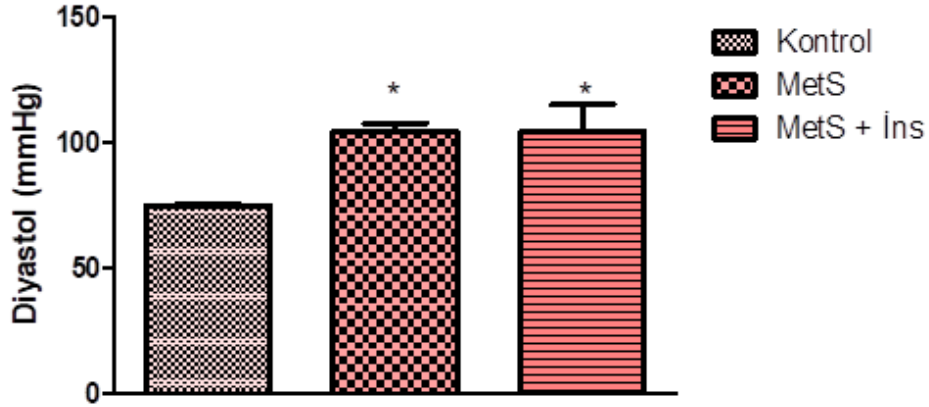
3.1.4. Deney Hayvanları Arteriyel Kan Basıncı Değişimi

MetS deney modelinin doğrulanması için gerekli kriterler arasında yer alan arteriyel kan basıncı değişimi oranlarının değerlendirilmesi için kuyruktan kan basıncı ölçümü yapıldı. Sistolik kan basınçlarına bakıldığında; kontrol grubuna oranla MetS grubunda %36 oranında ($p<0,0001$), MetS+İns grubunda ise %46 oranında ($p<0,0001$) artış gözlemlendi ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. MetS ve MetS+İns grubu sistolik kan basıncı değişimleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p<0,0642$) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sistolik kan basıncı değişimini gösteren çubuk grafik, ortalama±SEM * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arasındaki karşılaştırma).

Gruplar arası diyastolik kan basıncı değişim oranları incelendiğinde ise; kontrol grubuna göre MetS ve MetS+İns gruplarında %40 oranında artış izlendi. Aralarındaki fark ($p<0,0001$, $p<0,0041$) anlamlı olarak bulundu. MetS ve MetS+İns grupları arasında diyastolik kan basıncı değerleri açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,9902$) (Şekil 3.4).

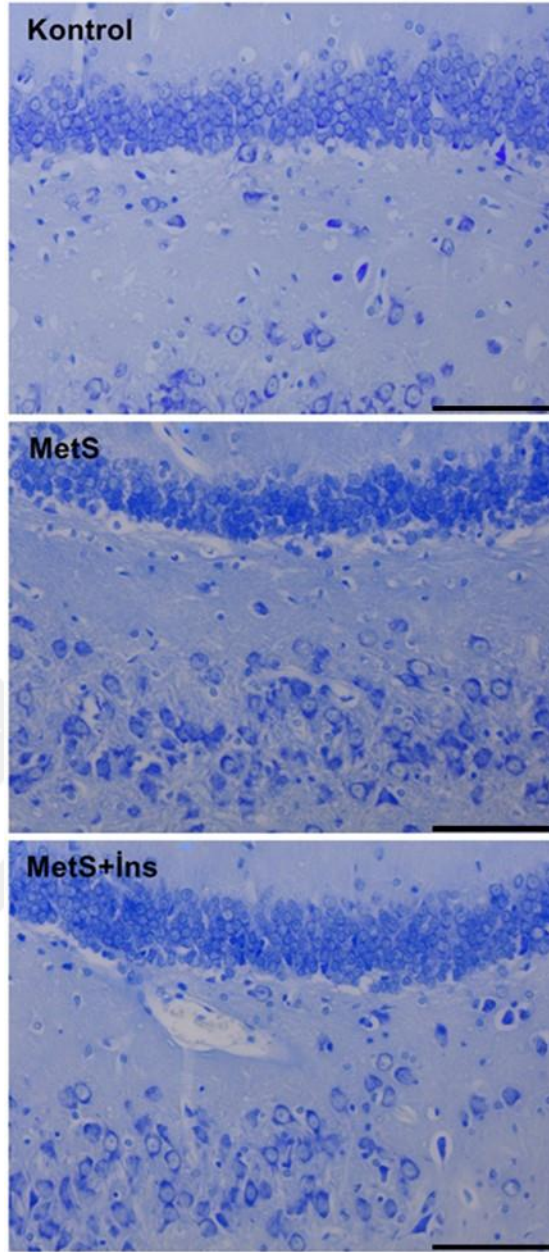


Şekil 3.4. Diyastolik kan basıncı değişimini gösteren çubuk grafik, ortalama±SEM * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arasındaki karşılaştırma).

3.2. Histomorfoloji Bulguları

3.2.1. Krezil Viyole Boyamasına Ait Bulgular

Krezil viyole ile boyalı preperatlarda, kontrol grubuna ait kesitlerde hipokampusun dentat girus bölgesinde nöronların belirgin iri ökromatin nükleus içerdikleri ve sitoplazma oranlarının az olduğu görüldü. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MetS grubuna ait kesitlerde bazı nöronlarda çekirdeklerin koyu bazofilik boyandığı görüldü. MetS+İns grubu kesitlerinde MetS grubundan farklı olarak koyu bazofilik boyanan çekirdeklerin yerini ökromatin çekirdekli nöronların aldığı ve aralarında yer yer piknotik çekirdekli nöronların varlığı dikkat çekti (Şekil 3.5.).



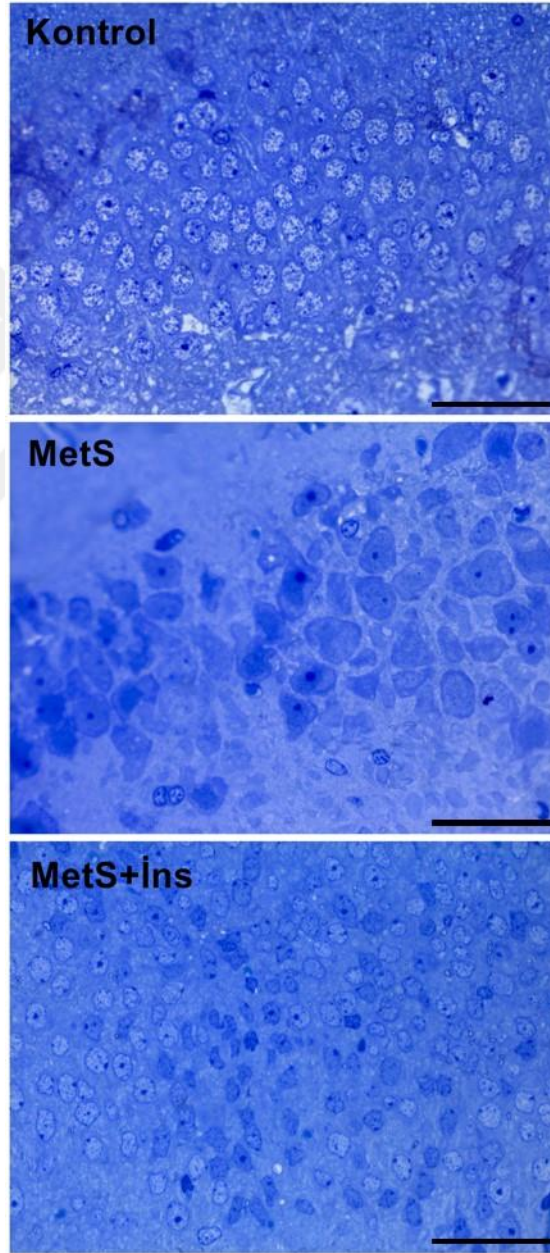
Şekil 3.5. Hipokampus dentat girus bölgesine ait mikrograflar. Boya: Krezil Viyole Bar: 100 µm

3.2.2. Yarı İnce Kesitlere Ait Bulgular

Hipokampus dentat girusun toluidin mavisi-azur II ile boyalı yarı ince kesitlerinde görülen açık bazofilik boyanan granül hücreleri iri, yuvarlak ve ökromatin çekirdekleri ile olağan görünümde izlendi.

MetS grubunda; dentat girus nöronlarının hipertrofik olduğu görüldü ve bazofilik koyu boyanan çekirdekleri dikkat çekti.

MetS+İns grubunda ise dentat girusta olağan görünümlü nöronların arasında yer yer çekirdeği koyu, bazofilik boyanan nöronların bulunduğu, bu nöronların çekirdek yapısının düzensiz olduğu gözlemlendi (Şekil 3.6).



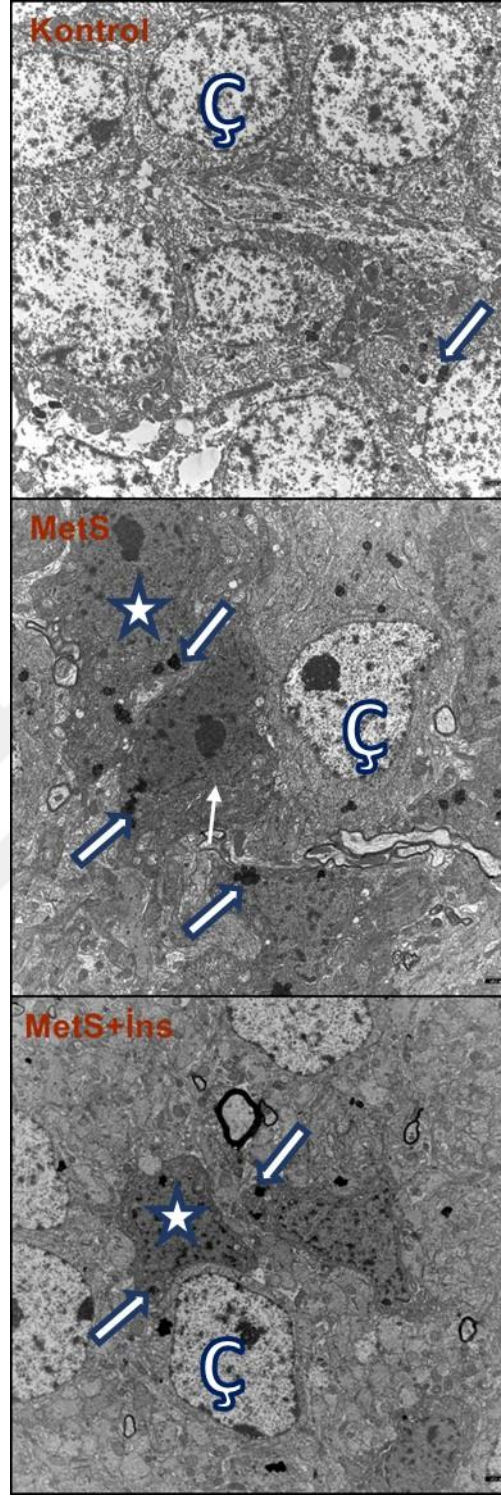
Şekil 3.6. Toluidin mavisi-azur II ile boyalı hipokampus dentat girus bölgesi nöronları. Bar: 100 µm

3.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları

Kontrol grubuna ait ince kesitlerde nöronlar iri, elektron geçirgen çekirdekleriyle gözlendi. Kromatin gevşek ve dağınık olarak gözlendi. Dar bir sitoplazmanın çekirdeği çevrelediği, sitoplazmada organellerin olağan görünümde oldukları izlendi.

MetS grubunda olağan görünümlü nöronların yanı sıra sitoplazma ve çekirdeği elektron yoğun görünümde koyu gözlenen hücrelerin sayısında artış dikkat çekti. Bu hücrelerin çekirdeklerinde kromatin kondansasyonu ve kümelenmesi görülürken hücre çekirdeklerinde çekirdekçik belirgin olarak görüldü. Sitoplazmada granüler endoplazma retikulumu genişlemeleri belirgin olarak görüldü ve bol miktarda lizozom izlendi.

MetS+İns grubunda ise normal görünümlü nöronların arasında çekirdek ve sitoplazması elektron yoğun olarak gözlenen hücreler izlendi. Çekirdekte kromatin kümeleşmeleri ve yer yer sitoplazmada lizozomlar, granüler endoplazma retikulumunda genişlemeler görüldü (Şekil 3.7).



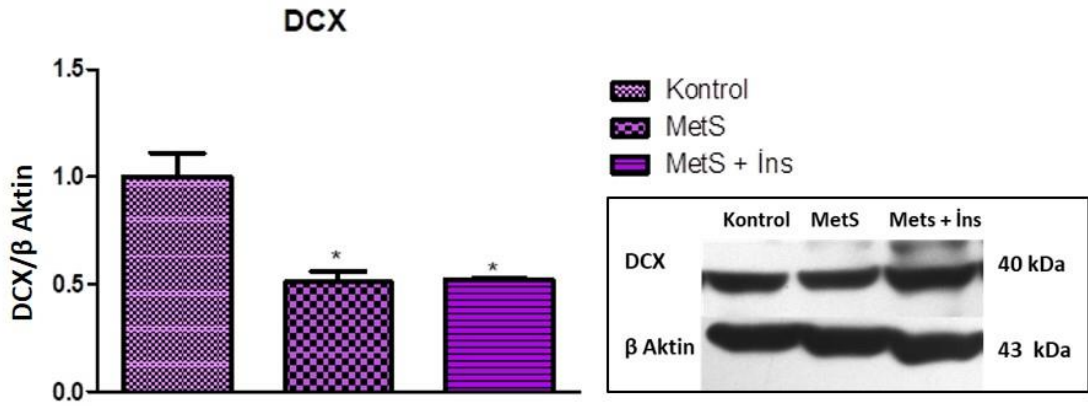
Şekil 3.7. Kontrol, Mets ve MetS+İns gruplarına ait elektron mikrograflar. Ç: çekirdek, Yıldız: Elektron yoğun çekirdek ve sitoplazmaya sahip nöronlar, Ok: Lizozom, İnce ok: Genişlemiş granüllü endoplazma retikulumu. Bar: 1000 nm

3.3. İmmünohistokimya İncelemeleri ve Western Blotlama Analizleri

3.3.1. Nörogenez İle İlişkili Moleküllere Ait Bulgular

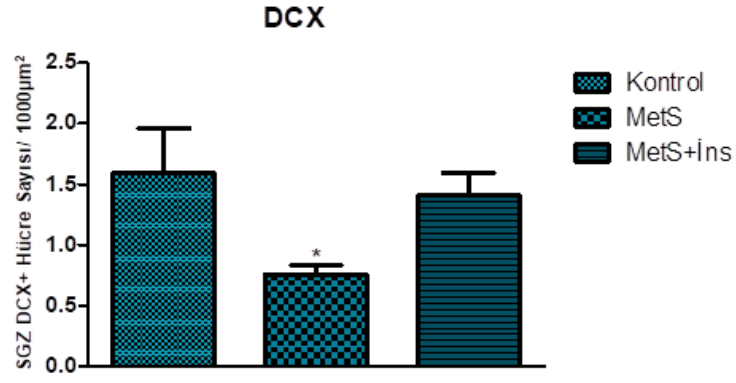
3.3.1.1 DCX Bulguları

Nörogenez belirteci olarak kullanılan DCX antikoruna ile yapılan western blotlama analizleri sonuçlarına göre gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,0112$). DCX protein miktarı MetS ve MetS+İns gruplarında kontrol grubuna oranla anlamlı derecede azalmıştır (sırasıyla; $p=0,0077$, $p=0,0216$). MetS+İns grubunda protein miktarı MetS grubuna oranla artış göstermesine rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,4348$) (Şekil 3.8).

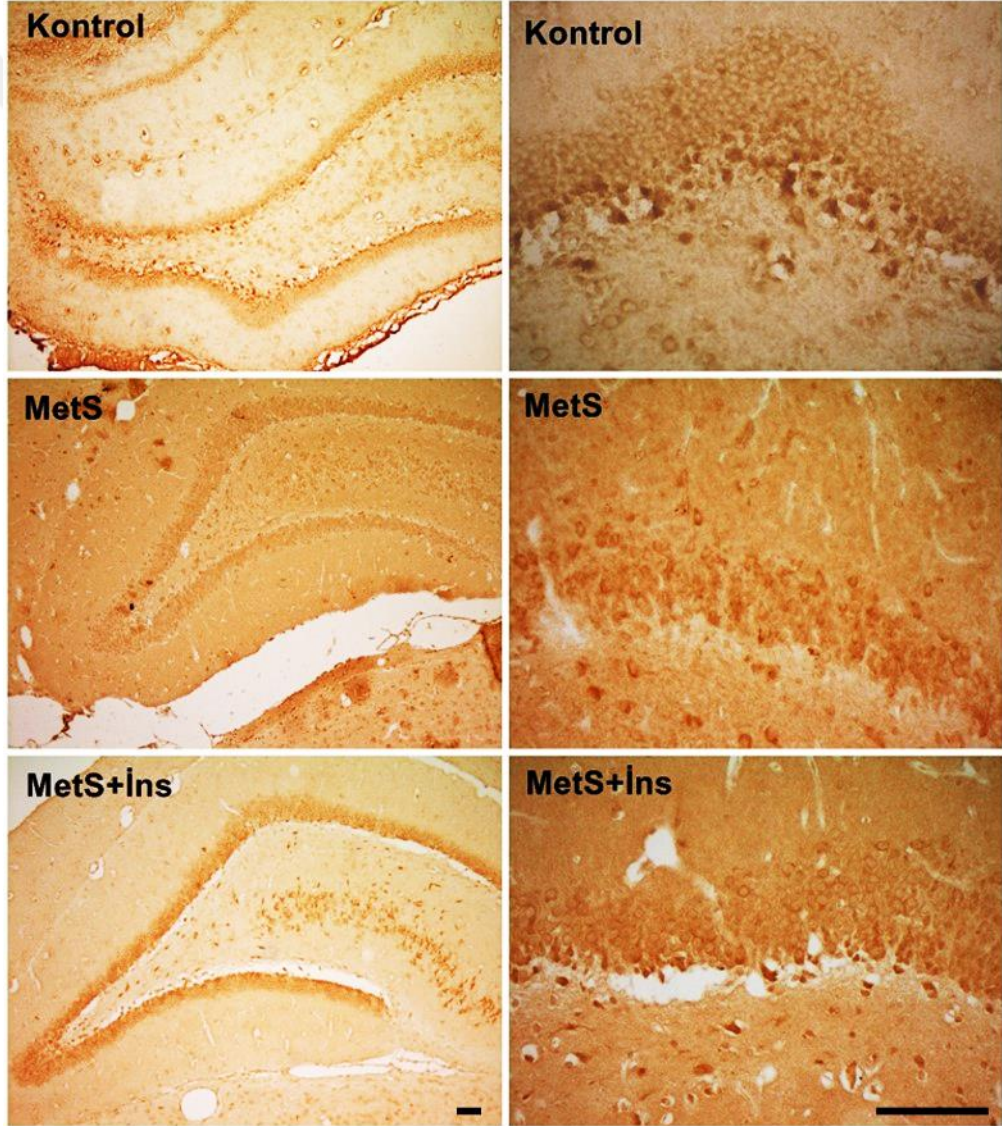


Şekil 3.8. Hipokampus dokusunda DCX antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort $\pm$ SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

DCX antikoruyla yapılan immünohistokimyasal boyamalarda $1000 \mu m^2$ alanda bulunan pozitif hücre sayısı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır [$F(2,19)=5,799$ $p=0,011$]. Kontrol grubuyla MetS grubu karşılaştırıldığında MetS grubu H-skor oranı anlamlı derecede azalmıştır ($p=0,010$). Kontrol grubuyla MetS+İns grubu arasında ($p=0,598$) ve MetS ve MetS+İns grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,130$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.9, Şekil 3.10).



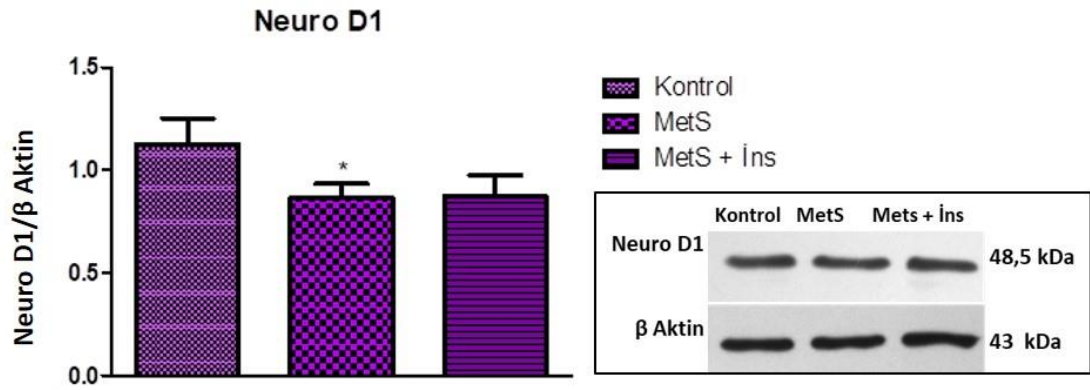
Şekil 3.9. Hipokampus SGZ’de 1000 µm² alanda DCX pozitif hücreler çubuk grafikte (Ort ±Std) gösterilmektedir. *p<0,05 (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma).



Şekil 3.10. Dentat girus DCX primer antikor işaretlemeleri. DCX pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ’de izlenmektedir. Bar: 100 µm

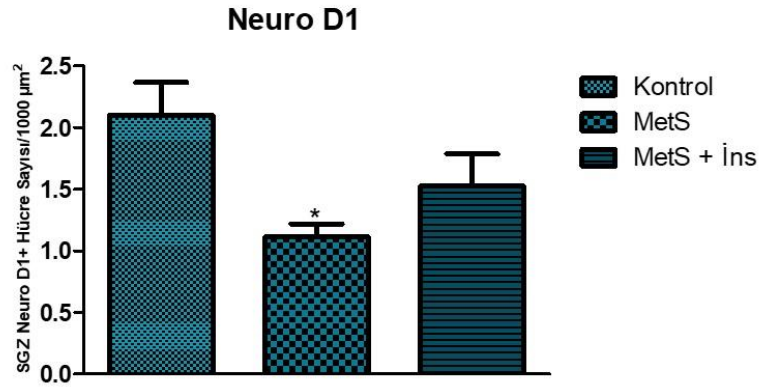
3.3.1.2. Neuro D1 Bulguları

Yeni oluşan nöronların yaşaması ve olgunlaşması için gerekli olan NeuroD1 proteininin (Gao ve ark., 2009) western blotlamaya ait bantları analiz edildi. Gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı ($p>0,05$). Kontrol grubu MetS grubuyla karşılaştırıldığında MetS grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma görüldü ($p=0,0413$). Kontrol ve MetS+İns grupları ($p=0,0799$) ile MetS ve MetS+İns grupları arasında fark bulunmadı ($p=0,4886$) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Hipokampus dokusunda NeuroD1 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort $\pm$ SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma).

Neuro D1 primer antikoruna ile immünohistokimyasal boyama yapılan kesitlerde immünopozitif hücreler sayıldı ve $1000 \mu m^2$ alanda bulunan pozitif hücre sayıları açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(2,32)=4,956$ $p=0,013$]. Kontrol grubu ile MetS grubu karşılaştırıldığında, MetS gruplarında pozitif hücre sayısının azaldığı görüldü ve aradaki fark anlamlı bulundu ($p=0,011$), MetS+İns grubunda kontrol grubuna oranla pozitif hücre sayısında azalma gözlemlendi ancak aralarındaki fark anlamlı değildi ($p=0,233$). MetS ve MetS+İns grupları karşılaştırıldığında; MetS+İns grubunda pozitif hücre sayısında artış gözlemlendi ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,562$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.12, Şekil 3.13).



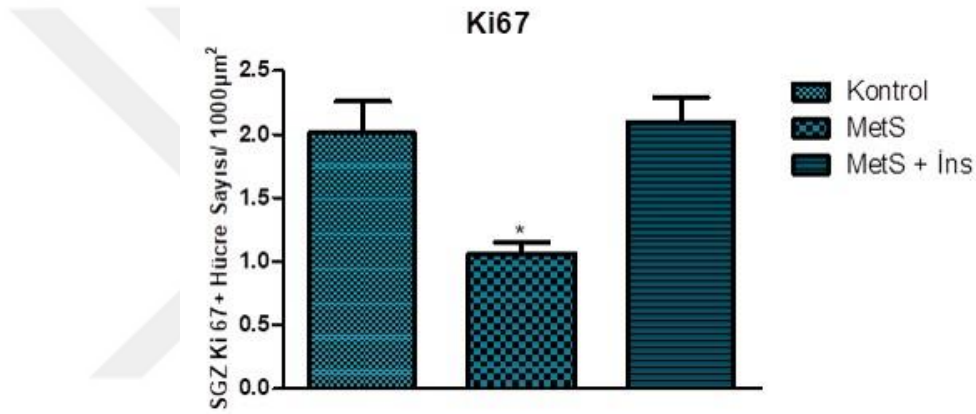
Şekil 3.12. Çubuk grafikte hipokampus SGZ’de 1000 μm^2 alanda NeuroD1 pozitif hücreler (Ort $\pm$ Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma).



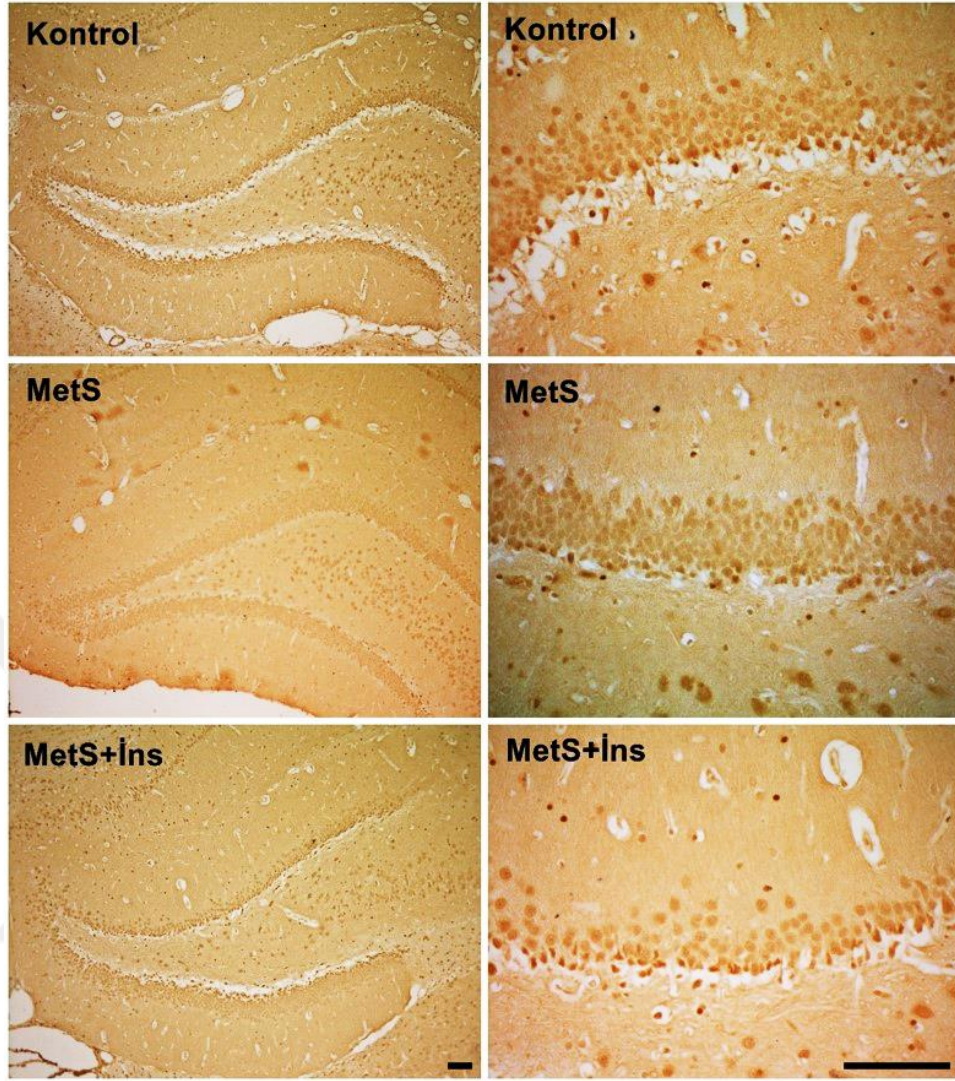
Şekil 3.13. Dentat girus NeuroD1 primer antikor işaretlemeleri. NeuroD1 pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ’de izlenmektedir. Bar: 100 μm

3.3.1.3. Ki67 Bulguları

Proliferasyon göstergesi olan Ki67 işaretli kesitler incelendiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(2,30)=4,945$ $p=0,014$]. MetS grubunda kontrol grubuna oranla $1000 \mu\text{m}^2$ alanda bulunan immünpozitif hücre sayıları açısından anlamlı azalma görülürken ($p=0,017$) kontrol ve MetS+İns grubu arasında fark bulunmadı ($p=1,00$). MetS+İns grupları MetS ile karşılaştırıldığında pozitif hücre sayısı ortalamasının artmasına rağmen istatistiksel olarak aralarında değişim bulunmadığı görüldü ($p=0,084$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.14, Şekil 3.15).



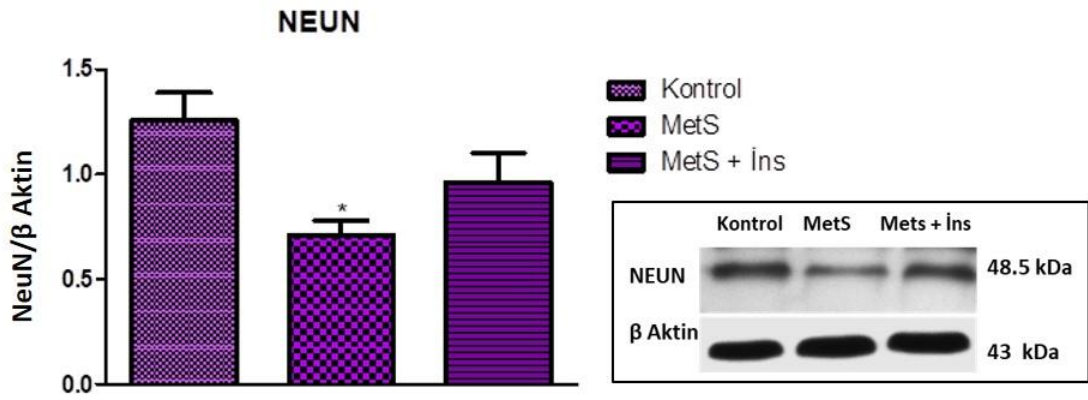
Şekil 3.14. Çubuk grafikte hipokampus SGZ’de $1000 \mu\text{m}^2$ alandaki Ki67 pozitif hücreler (Ort±Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma).



Şekil 3.15. Dentat girus Ki67 primer antikor işaretlemelemleri. Ki67 pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ’de izlenmektedir. Bar: 100 µm

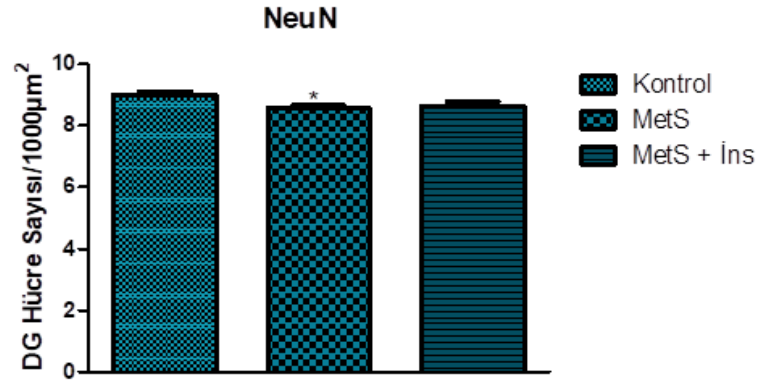
3.3.1.4. NeuN Bulguları

Olgun nöronların çekirdeklerini işaretleyen NeuN primer antikoru ile yapılan western blotlama analiz sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,0267$). Kontrol grubuna oranla MetS grubunda protein miktarı anlamlı derecede azalırken ($p=0,0047$) MetS+İns grubunda değişim gözlenmemiştir ($p=0,0838$). MetS+İns grubunda protein miktarında artış gözlemlenmekle birlikte MetS ve MetS+İns grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,0783$) (Şekil 3.16).

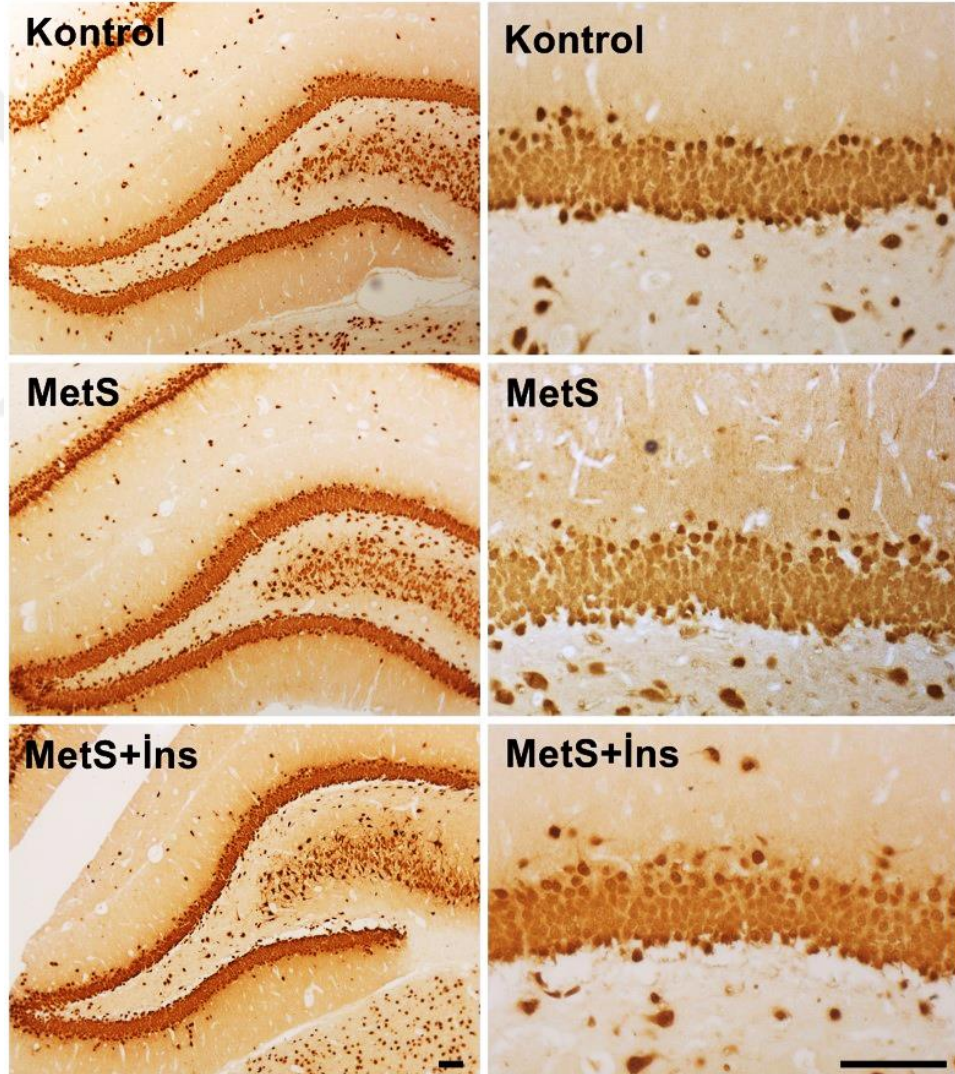


Şekil 3.16. Hipokampus dokusunda NeuN antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik Ort $\pm$ SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma).

NeuN primer antikoru ile yapılan immünişaretleme sonucunda dentat girusun 1000 μm^2 'lik alanında bulunan hücre sayısı bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(2,27)=4,075$ $p=0,028$]. Kontrol grubuna oranla MetS grubunda hücre sayısı istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0,05$). Kontrol grubu ile MetS+İns grubu ve MetS grubuyla MetS+İns grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmamıştır (sırasıyla; $p=0,095$ $p=1,0$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.17, Şekil 3.18).



Şekil 3.17. Çubuk grafikte hipokampus dentat girusta 1000 μm^2 alandaki NeuN pozitif hücreler (Ort $\pm$ Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma).



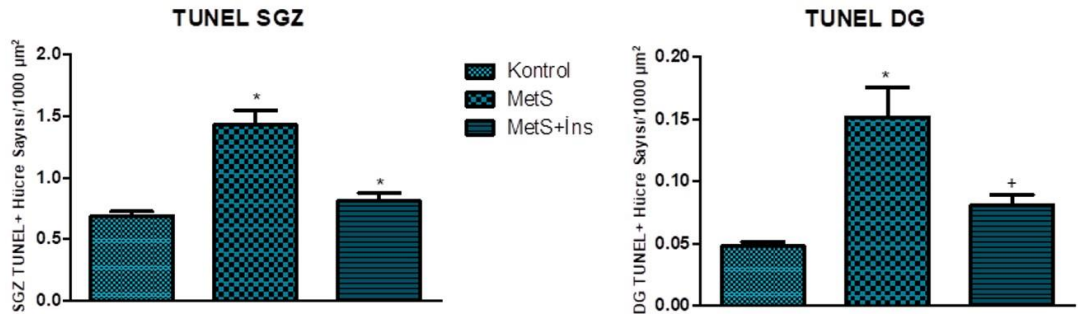
Şekil 3.18. Dentat girus NeuN primer antikor işaretlemeleri. NeuroD1 pozitif hücreler koyu boyalı olarak izlenmektedir. Bar: 100 μm

3.3.2. Apoptoz Bulguları

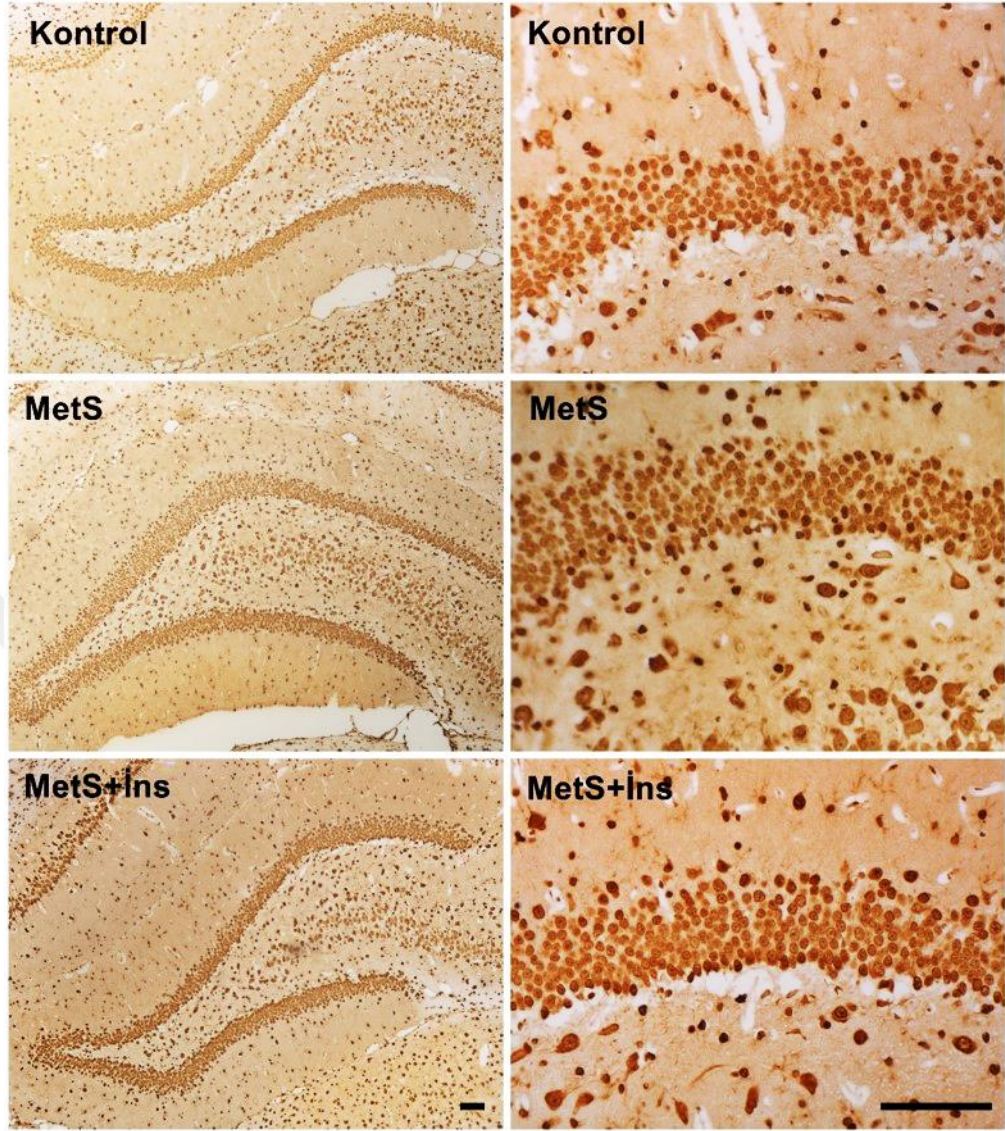
Hipokampus bölgesindeki hücrelerde hücre ölümünü incelemek için western blotlama analizlerinde cleaved caspase 3 ve immünohistokimyasal boyamalarla cleaved caspase 3 ve TUNEL oranları değerlendirildi.

TUNEL boyamaları analizleri sonucunda SGZ’de 1000 μm^2 alanda bulunan pozitif hücre sayıları bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(2,25)=26,784$ $p<0,0001$]. MetS grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pozitif hücre sayısının anlamlı şekilde arttığı görülürken ($p<0,0001$), MetS+İns grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,675$). MetS ve MetS+İns grupları karşılaştırıldığında MetS+İns grubunda pozitif hücre sayısının azaldığı görüldü ($p<0,0001$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.19, Şekil 3.20).

DG’de 1000 μm^2 alandaki TUNEL pozitif hücre sayısı bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(2,28)=17,424$ $p<0,0001$]. Kontrol grubuna oranla MetS grubunda pozitif hücre sayısı anlamlı derecede artarken ($p<0,0001$), MetS+İns grubunda fark bulunmamıştır ($p<0,156$). MetS grubuyla MetS+İns grupları karşılaştırıldığında, MetS+İns grubunda pozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p<0,001$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.19, Şekil 3.20).

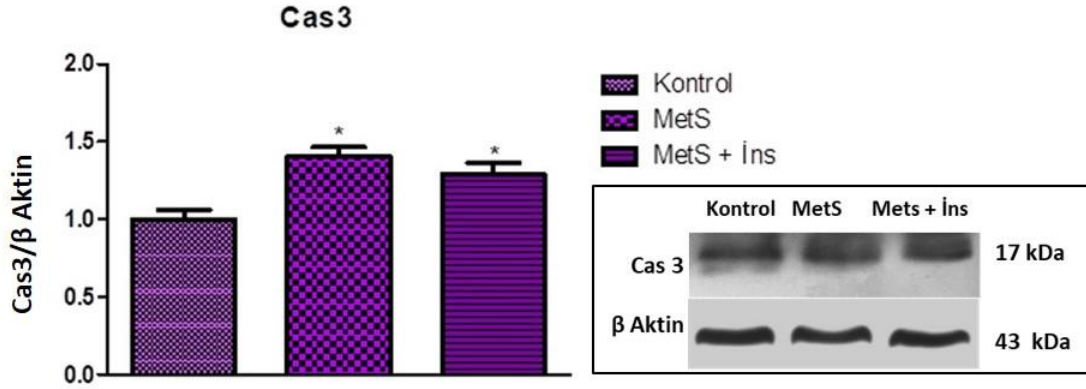


Şekil 3.19. Çubuk grafikte hipokampus SGZ ve DG’de 1000 μm^2 alanda TUNEL pozitif hücreler (Ort $\pm$ Std) gösterilmektedir, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).



Şekil 3.20. Dentat girus TUNEL antikor işaretlemleri. TUNEL pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ’de izlenmektedir. Bar: 100 µm

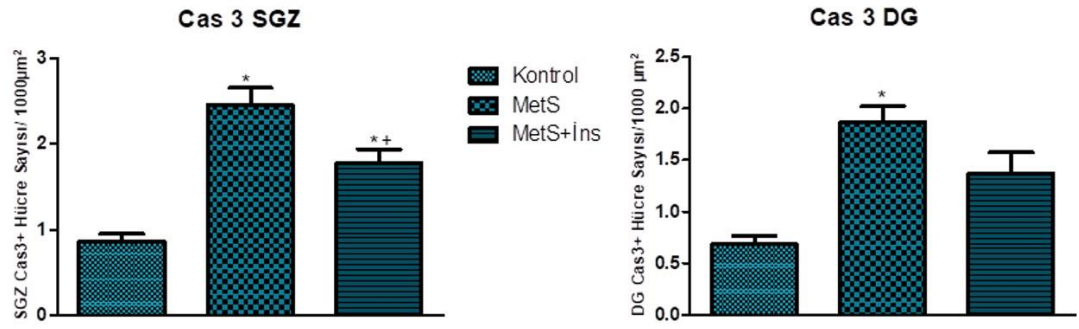
Cleaved caspase 3 antikoruyla yapılan western blotlama analiz sonuçlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,021$). Kontrol grubuyla MetS grubu protein miktarları karşılaştırıldığında, MetS grubunda anlamlı derecede artış görülürken ($p=0,0092$) kontrol grubuna kıyasla MetS+İns grubunda anlamlı artış görüldü ($p=0,0267$). MetS ve MetS+İns grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p=0,1614$) (Şekil 3.21).



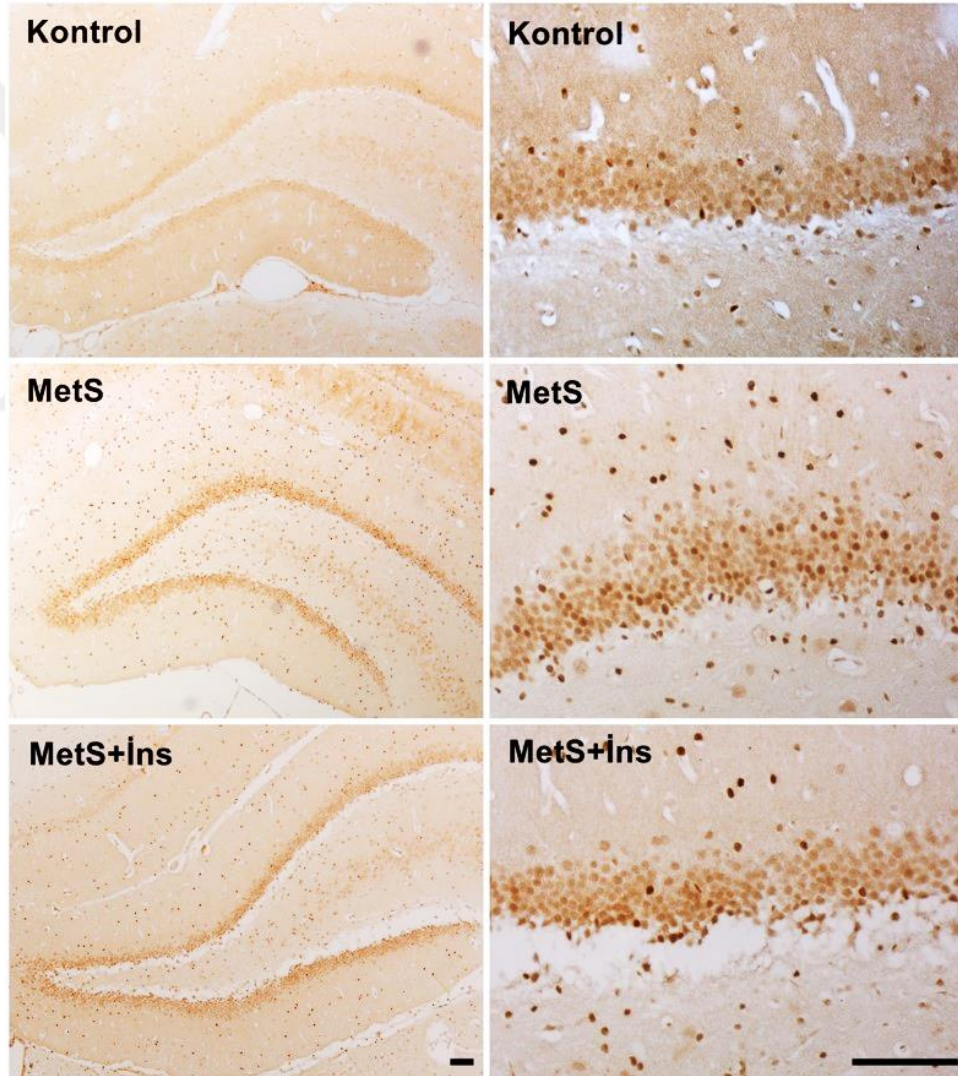
Şekil 3.21. Hipokampus dokusunda Cleaved Caspase 3 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort $\pm$ SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

Cleaved caspase 3 antikoru ile yapılan işaretlemelerin SGZ alanındaki sonuçları bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(2,26)=33,991$ $p<0,0001$]. MetS grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında MetS grubunda $1000 \mu m^2$ alandaki pozitif hücre sayısının arttığı ($p<0,0001$), MetS+İns grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise pozitif hücre sayısının anlamlı derecede arttığı görüldü ($p<0,001$). MetS ve MetS+İns grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamasına rağmen ($p=0,090$), MetS+İns grubunda pozitif hücre sayılarının ortalaması MetS grubuna göre azalmıştır (Çizelge 3.1, Şekil 3.22, Şekil 3.23).

Cleaved caspase 3 antikoru ile yapılan işaretlemelerde DG'nin $1000 \mu m^2$ alanında bulunan pozitif hücre sayısı bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur [$F(2,28)=11,127$ $p<0,0001$]. Kontrol grubuna oranla, MetS grubunun pozitif hücre sayısında anlamlı artış görülürken ($p<0,0001$), MetS+İns grubunda fark bulunmadı ($p<0,024$). MetS ve MetS+İns grupları arasında da istatistiksel olarak fark yoktu ($p=0,131$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.22, Şekil 3.23).



Şekil 3.22. Çubuk grafikte hipokampus SGZ'deki Cleaved caspase 3 pozitif hücreler (Ort±Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

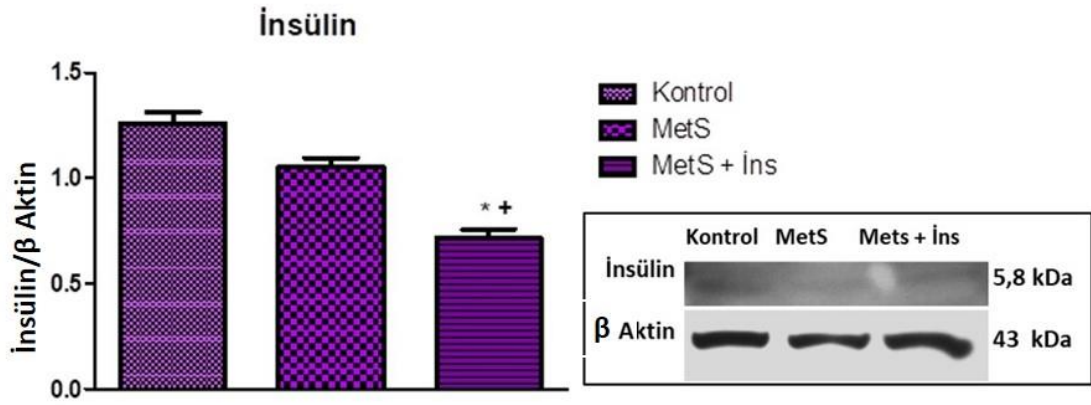


Şekil 3.23. Dentat girus Cleaved Caspase 3 primer antikor işaretlemeleri. Cleaved Caspase 3 pozitif hücreler koyu boyalı olarak SGZ'de izlenmektedir. Bar: 100 µm

3.3.3 İnsülin Sinyal Yolağı İle İlgili Bulgular

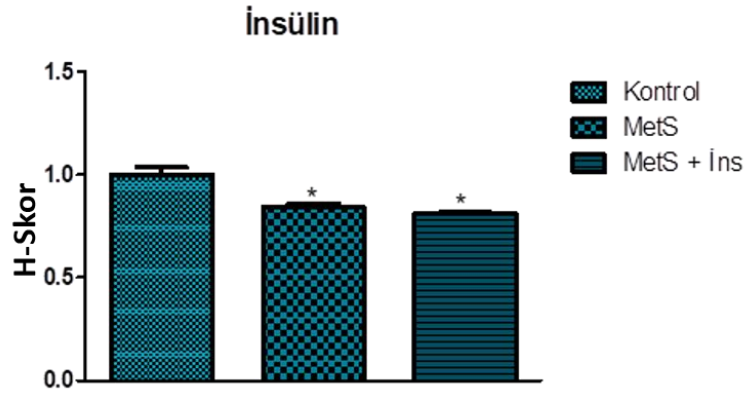
3.3.3.1. İnsülin Bulguları

İnsülin antikoru ile yapılan western blotlama analiz sonuçları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,0039$). Kontrol grubu MetS grubu ($p=0,0340$) ve MetS+İns grupları ($p=0,0027$) karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülmüştür. MetS ve MetS+İns grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı azalma vardır ($p=0,0158$) (Şekil 3.24).

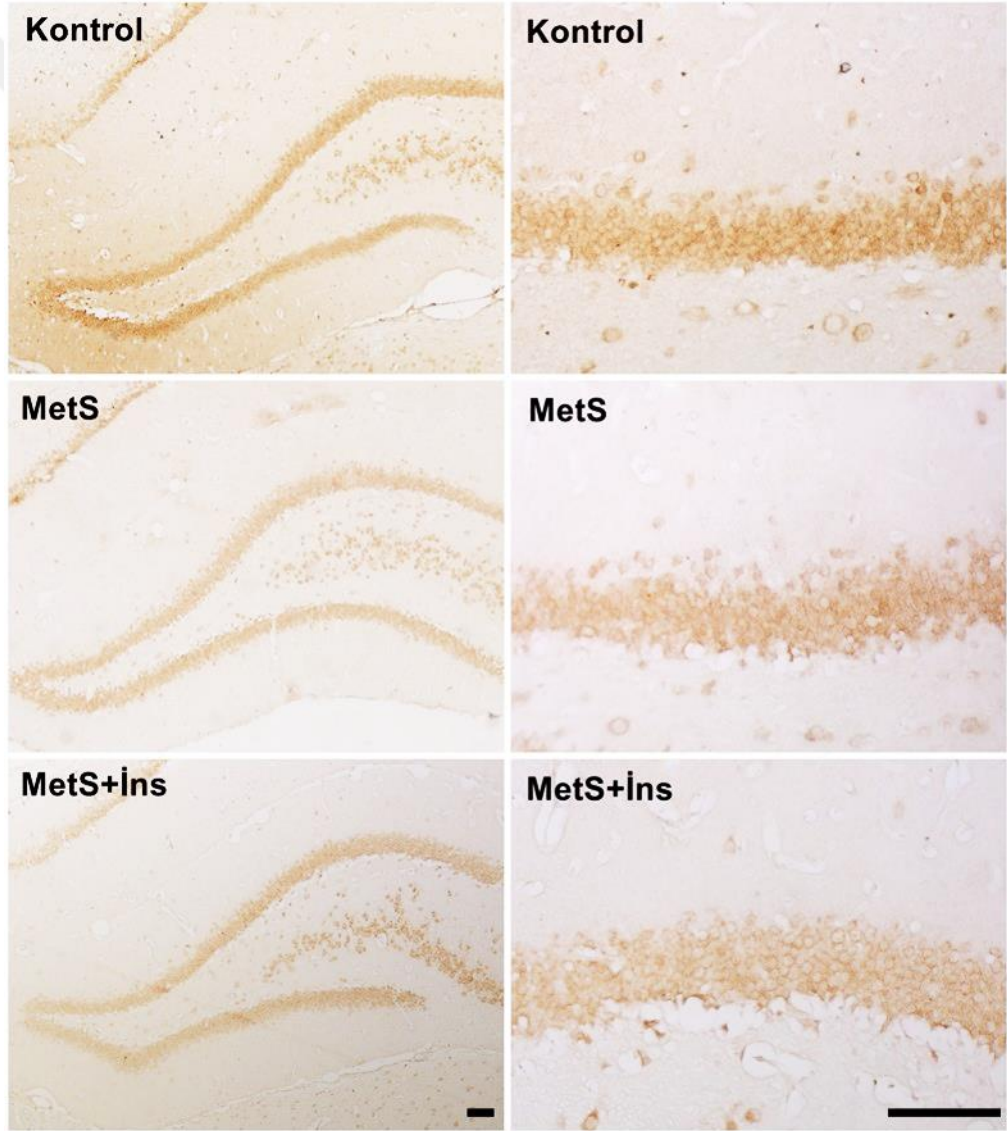


Şekil 3.24. Hipokampus dokusunda insülin antikoru ile yapılan western blot analizi ve analiz için çubuk grafik, Ort±SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

İnsülin antikoru ile yapılan immün işaretleme analizleri sonuçlarına bakıldığında H-skor değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur [$F(2,30)=19,353$ $p<0,0001$]. Kontrol grubunda H-skor ortalaması diğer iki grubun ortalamalarından yüksektir ($p<0,0001$). MetS ve MetS+İns grupları karşılaştırıldığında MetS+İns grubunda H-skor ortalamasının azaldığı görülmüş ancak aralarında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.25, Şekil 3.26).



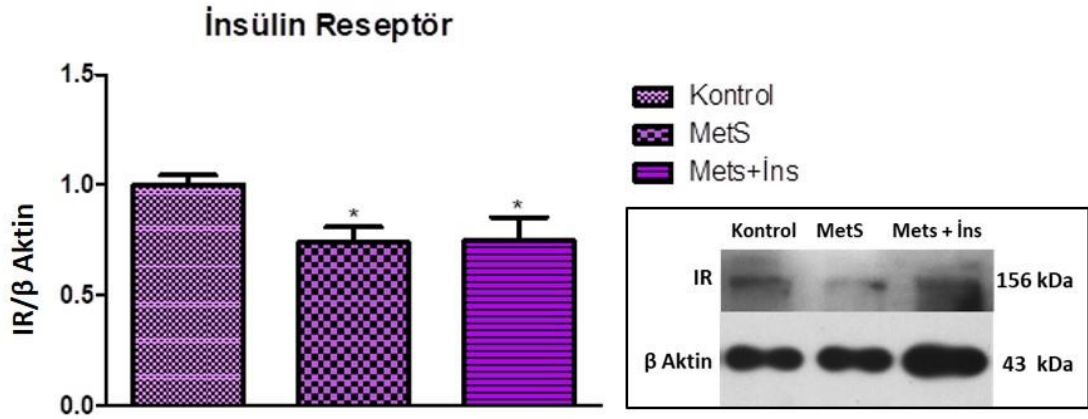
Şekil 3.25. Hipokampusun dentat girus bölgesinde insülin primer antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelerin H-skor ortalamaları çubuk grafikte (Ort±Std) gösterilmektedir. * $p < 0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma).



Şekil 3.26. Dentat girus insülin primer antikor işaretlemeleri. Bar: 100 μm .

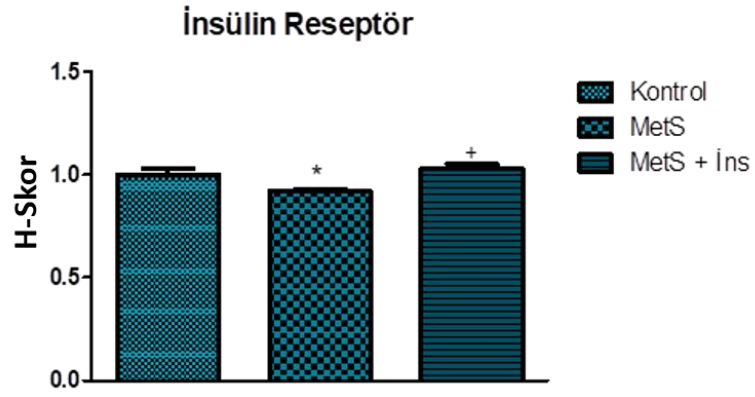
3.3.3.2 İnsülin Reseptör (IR) Bulguları

İnsülin hormonunun bağlanacağı insülin reseptör oranında değişim olup olmadığını görmek için immünohistokimyasal analizler ve western blotlama analizleri yapıldı. Western blotlama analizleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,0359$). Kontrol grubuna oranla MetS ($p=0,005$) ve MetS+İns ($p=0,036$) gruplarında insülin reseptör oranı anlamlı derecede azaldı. MetS ve MetS+İns grupları arasında fark bulunmadı ($p=0,4758$) (Şekil 3.27).

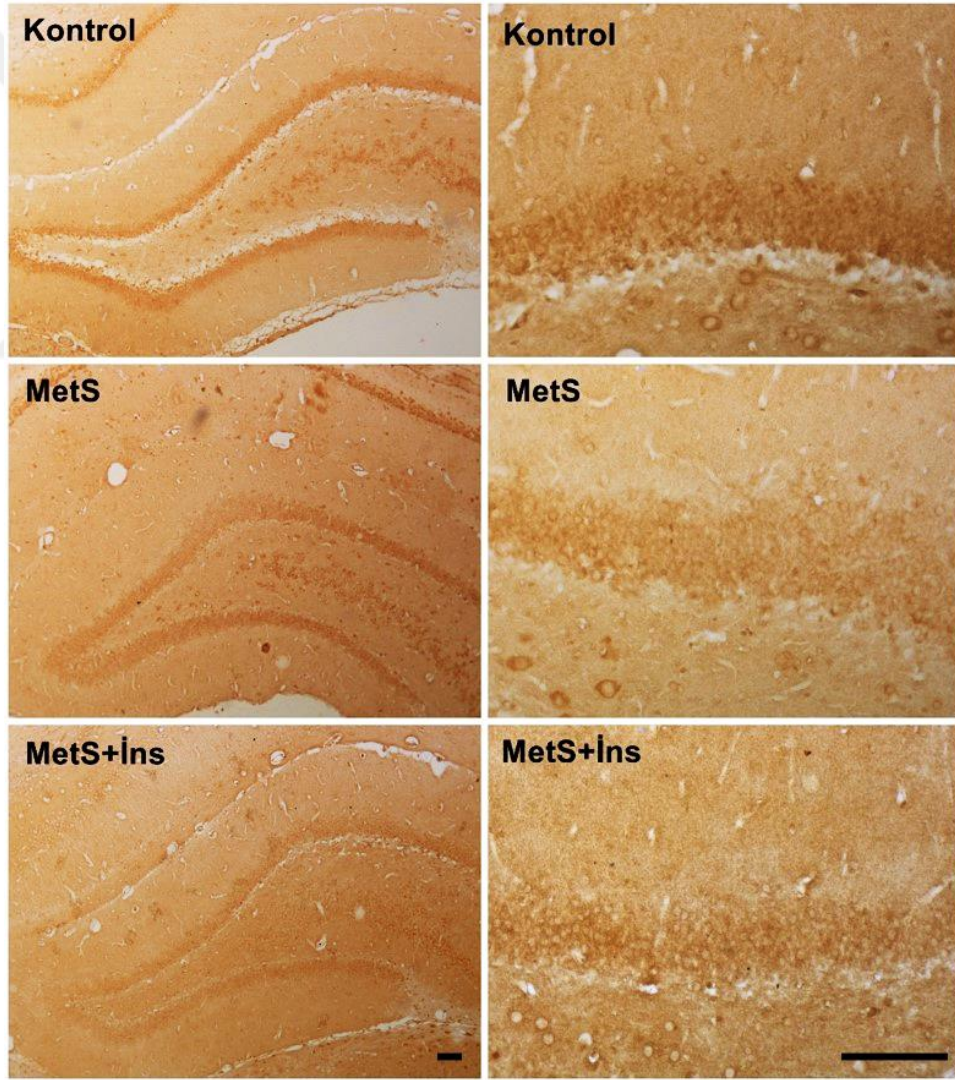


Şekil 3.27. Hipokampus dokusunda IR antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort $\pm$ SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

İnsülin reseptör antikoruyla kesitlerde yapılan işaretlemelerin analizlerine bakıldığında; gruplar arasında H-skor ortalamaları üç grupta farklıdır [$F(2,33)=6,100$ $p=0,006$]. Kontrol grubu ile MetS grubu arasında anlamlı derecede azalma ($p=0,05$) görülürken MetS+İns grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=1,00$). MetS ve Mets+İns grupları arasında immünaktif alanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0,006$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.28, Şekil 3.29).



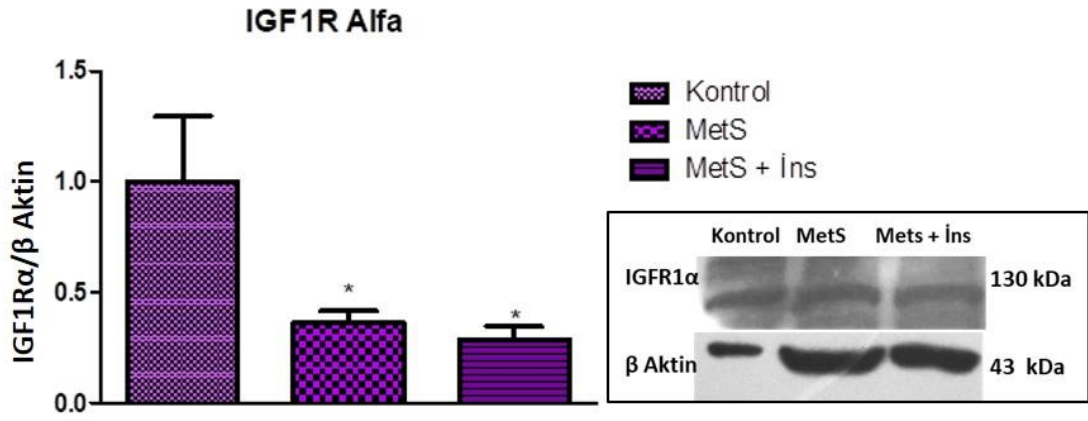
Şekil 3.28. Hipokampusun dentat girus bölgesinde insülin reseptör primer antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelerin H-skor ortalamaları çubuk grafikte (Ort±Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).



Şekil 3.29. Dentat girus IR primer antikor işaretlemeleri. Bar: 100 μ m

3.3.3.3 IGF1R α Bulguları

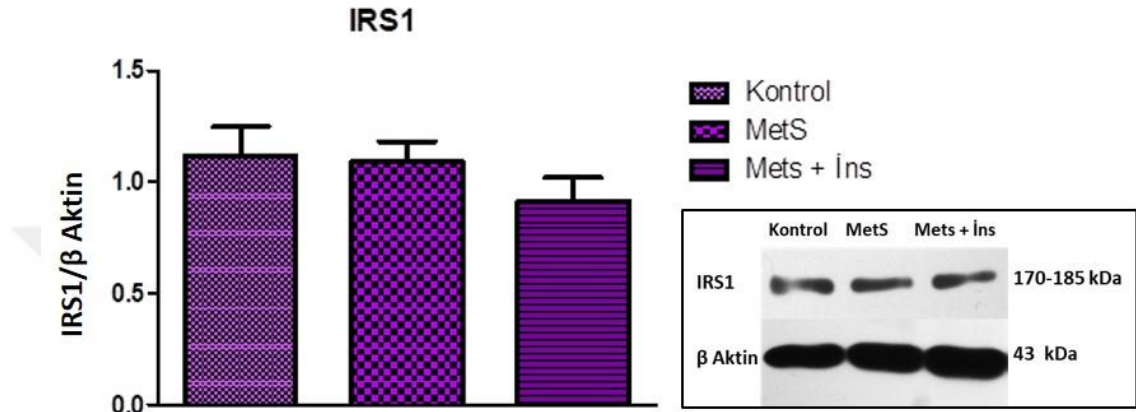
İnsülinin bağlanarak insülin sinyal yolağını aktive edebildiği diğer reseptör olan insülin benzeri büyüme faktörü reseptör protein miktarı IGF1R α analizleriyle hesaplandı. Western blotlama analiz sonuçları incelendiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0,0329$). Kontrol grubu protein miktarları MetS grubuyla ($p=0,0273$) ve MetS+İns gruplarıyla ($p=0,0383$) karşılaştırıldığında anlamlı derecede azaldığı görüldü. MetS ve MetS+İns grupları karşılaştırıldığında ise anlamlı fark bulunmadı ($p=0,1794$) (Şekil 3.30).



Şekil 3.30. Hipokampus dokusunda IGF1R α antikorunun western blot analizi ve çubuk grafik, Ort $\pm$ SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

3.3.3.4. IRS1 Bulguları

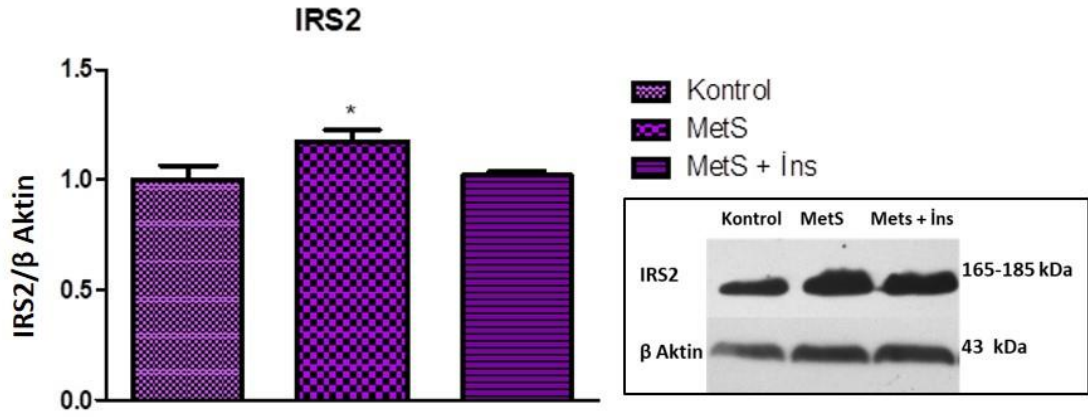
İnsülin reseptörü tarafından aktive edilerek insülin sinyal yolağı aktivasyonunda rol oynayan IRS1 proteinin western blotlama analizleri yapıldığında istatistik olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,4539$) (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. Hipokampus dokusunda IRS1 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort $\pm$ SEM. $p>0,05$.

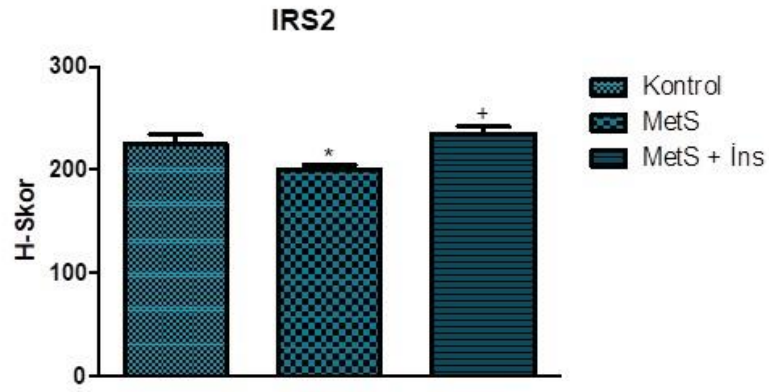
3.3.3.5 IRS2 Bulguları

İnsülin reseptörü tarafından aktive edilerek insülin sinyal yolağı aktivasyonunda rol oynayan diğer substrat olan IRS2 proteininin western blotlama protein analiz sonuçlarında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,1270$). Kontrol ve MetS grupları karşılaştırıldığında MetS grubunda protein miktarının anlamlı olarak arttığı ($p=0,0499$) görülürken, kontrol ile MetS+İns grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı ($p=0,4241$). MetS grubuyla MetS+İns grubu karşılaştırıldığında MetS+İns grubunda protein miktarının azalmasına rağmen istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p=0,0505$) (Şekil 3.32).

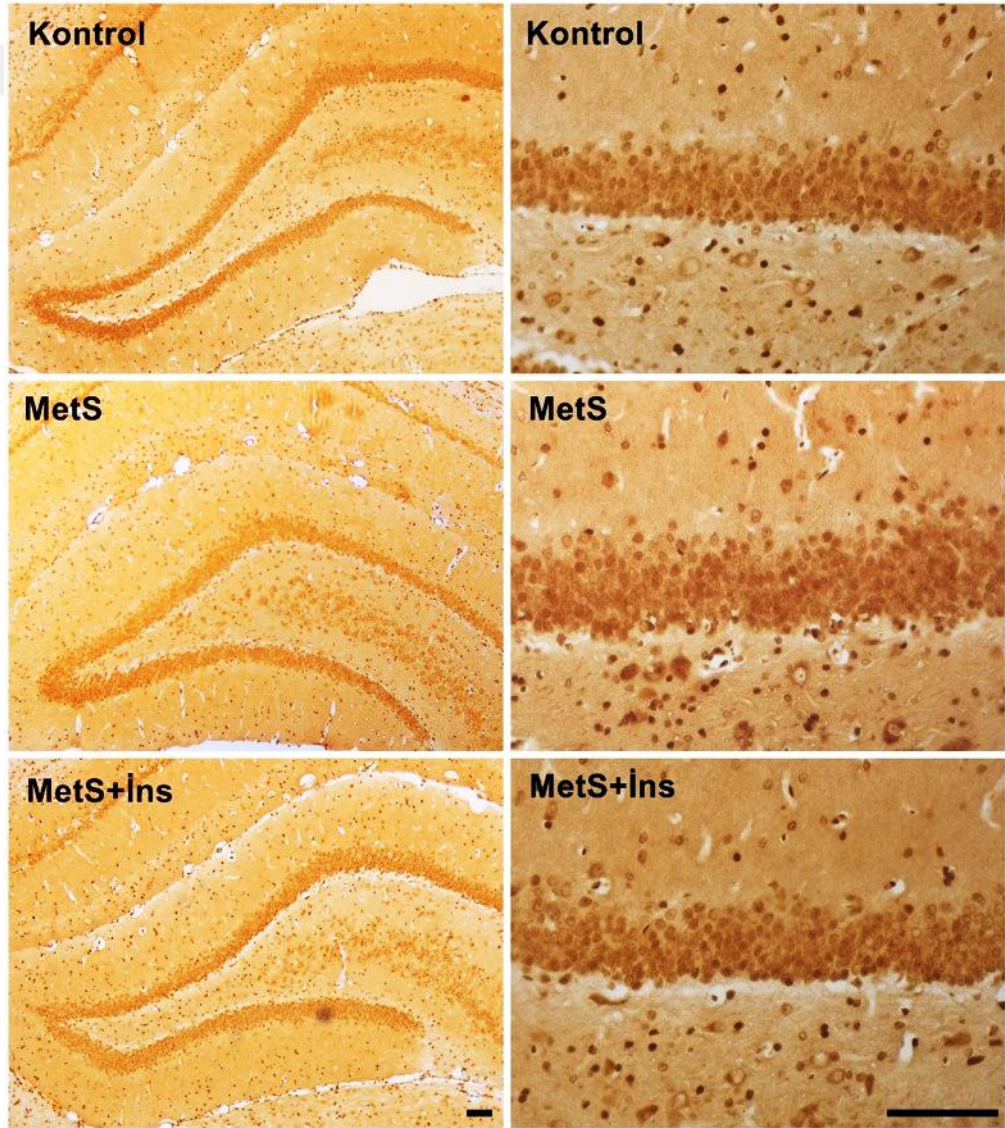


Şekil 3.32. Hipokampus dokusunda IRS2 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort±SEM, $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma).

IRS2 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal analiz sonuçları H-skor ortalamaları açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında fark anlamlı bulundu [$F(2,32)=6,131$ $p=0,006$]. Kontrol grubuyla MetS ve MetS+İns grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla; $p=0,065$, $p=0,935$). MetS ve MetS+İns grupları karşılaştırıldığında MetS+İns grubunda H-skor ortalamasının anlamlı olarak yükseldiği görüldü ($p=0,006$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.33, Şekil 3.34).



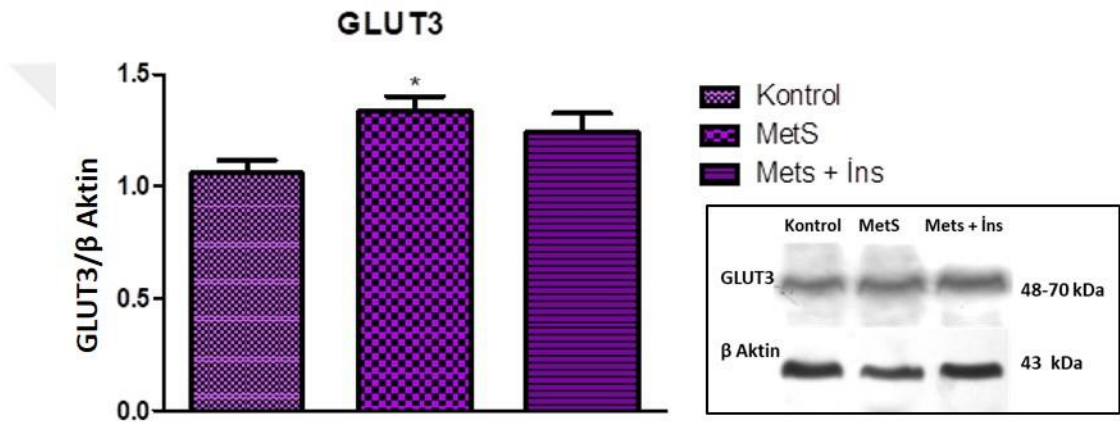
Şekil 3.33. Hipokampusun dentat girus bölgesinde IRS2 antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelemlerin H-skor ortalamaları çubuk grafikte (Ort±Std) gösterilmektedir. +p<0,05 (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).



Şekil 3.34. Dentat girus insülin primer antikor işaretlemelemleri. Bar: 100 µm

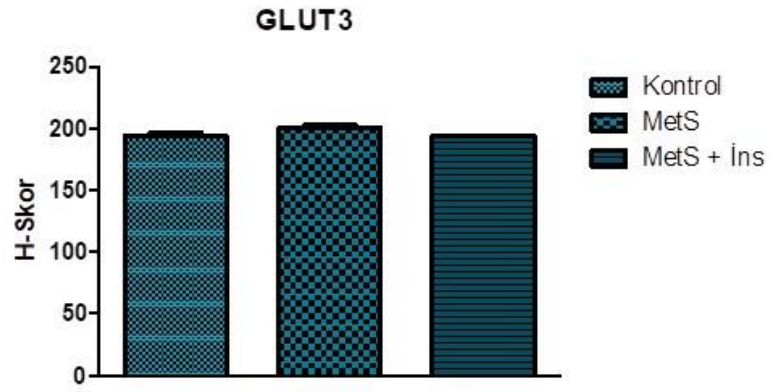
3.3.3.6. GLUT3 Bulguları

İnsülin bağımsız glikoz taşıyıcısı olan GLUT3'ün western blotlama analizlerine bakıldığında istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı fark bulundu ($p=0,0486$). Kontrol grubuna oranla MetS grubunda protein miktarı artmış ($p=0,0082$), MetS+İns grubunda da protein miktarında artış gösterdi ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. MetS grubu ile MetS+İns gruplarındaki protein miktarı artışı istatistiksel olarak anlamsızdı ($p=0,2105$) (Şekil 3.35).

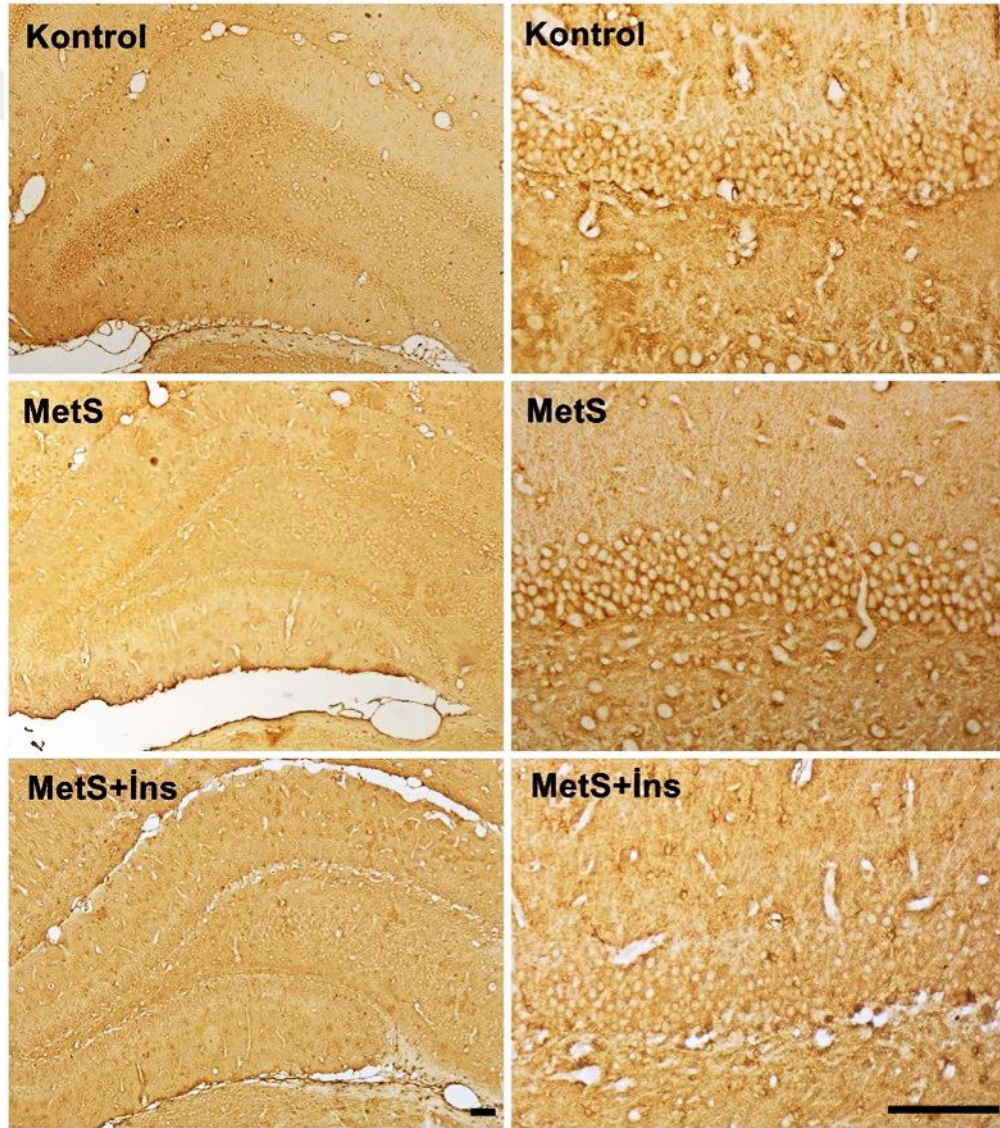


Şekil 3.35. Hipokampus dokusunda GLUT3 antikorunun western blot analizi ve çubuk grafik, Ort±SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma).

GLUT3 antikoruyla yapılan boyamaların immünpozitiflik açısından H-skor ortalama değerlerine göre analiz edildiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı [$F(2,21)=2,374$ $p=0,118$] (Çizelge 3.1, Şekil 3.36, 3.37).



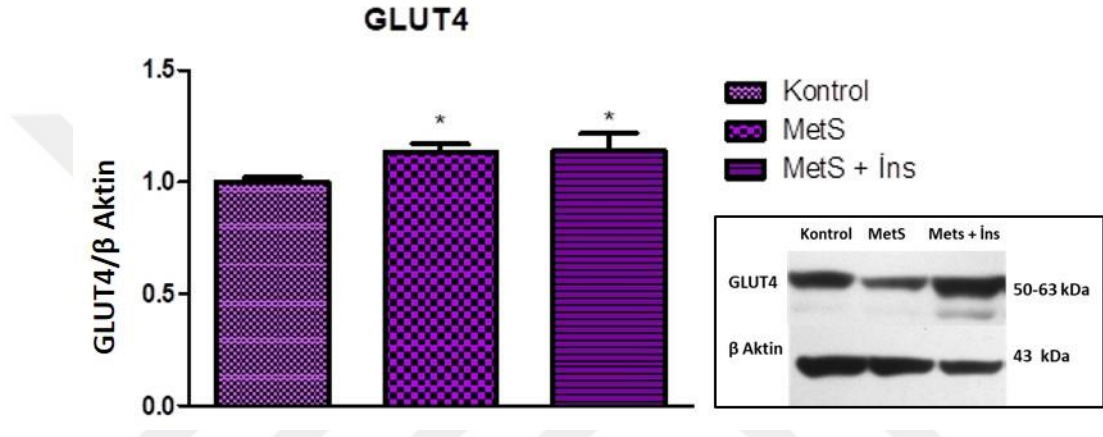
Şekil 3.36. Hipokampusun dentat girus bölgesinde GLUT3 antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelemlerin H-skor ortalamaları çubuk grafikte (Ort±Std) gösterilmektedir. $p>0,05$.



Şekil 3.37. Dentat girus GLUT3 primer antikor işaretlemelemleri. Bar: 100 μ m

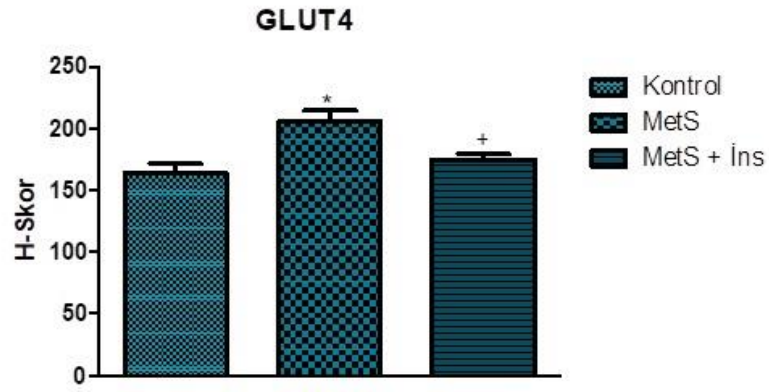
3.3.3.7. GLUT4 Bulguları

İnsülin bağımlı glikoz taşıyıcısı olan GLUT4 antikoruyla yapılan western blotlama analiz sonuçları incelendiğinde kontrol grubuna oranla MetS ve Mets+İns gruplarında protein miktarı anlamlı derecede artmış olarak görüldü (sırasıyla; $p=0,006$ $p=0,036$). Mets+İns grubunda Mets grubuna oranla protein miktarının artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,4747$).

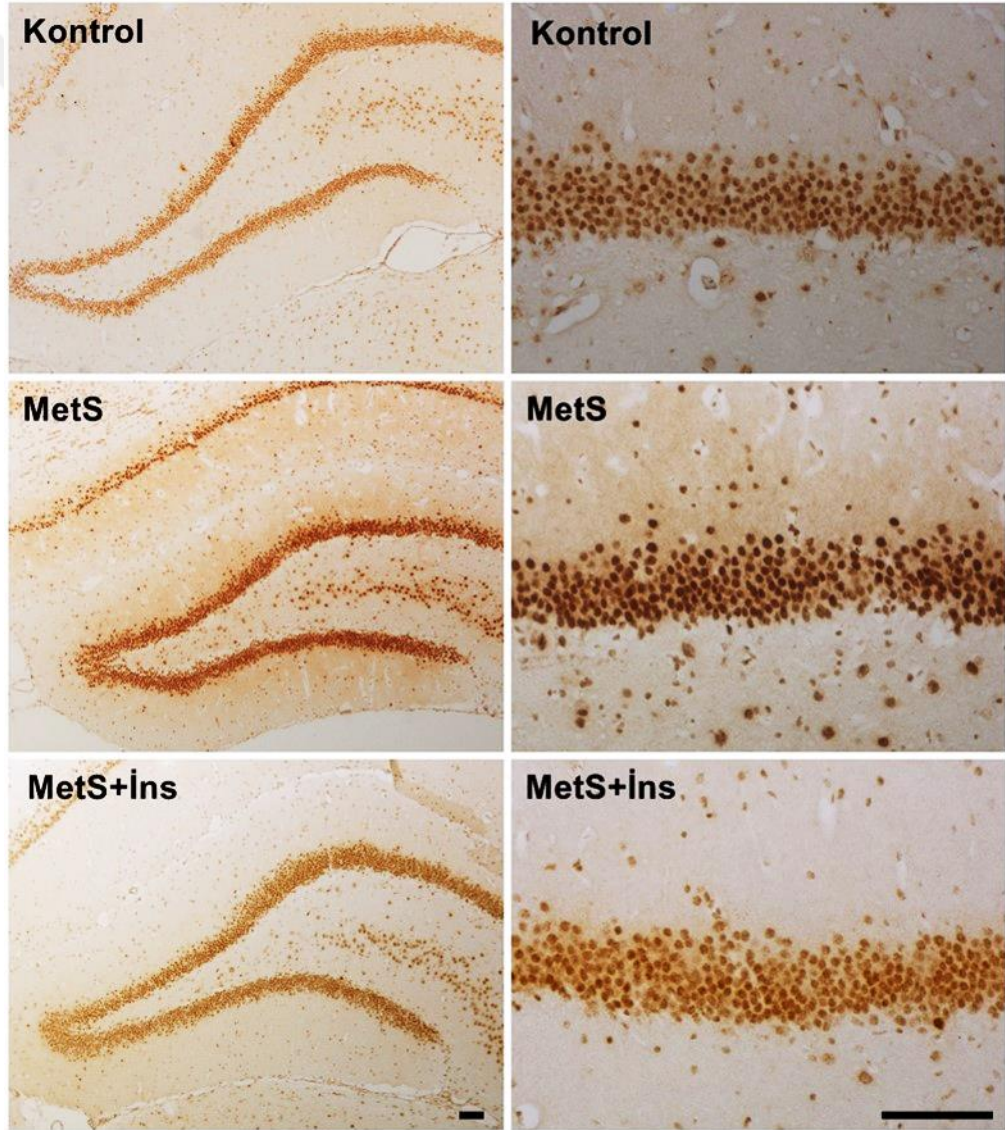


Şekil 3.38. Hipokampus dokusunda GLUT4 antikorunun western blot analizi ve analize ait çubuk grafik, Ort±SEM, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

GLUT4 primer antikoruyla yapılan işaretlemelerin H-skor ortalamaları açısından gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu [$F(2,29)=9,077$ $p=0,001$]. MetS grubunun H-skor ortalaması kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p=0,001$). Kontrol ile MetS+İns grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,005$). MetS+İns grubunda MetS grubuna oranla H-skor ortalamasının anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p=0,011$) (Çizelge 3.1, Şekil 3.39, Şekil 3.40).



Şekil 3.39. Hipokampusun dentat girus bölgesinde GLUT4 antikoruna karşı yapılan immün işaretlemelemlerin H-skor ortalamalarına ait çubuk grafik (Ort±Std) gösterilmektedir. * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).



Şekil 3.40. Dentat girus GLUT4 antikor işaretlemelemleri. Bar: 100 μm

IHC Boyamalarına Ait Değişkenler	Kontrol Ort±Std	MetS Ort±Std	MetS+İns Ort±Std	p değeri
1000 µm² alanda bulunan pozitif hücre sayısı				
DCX	1,83±0,9	0,75±0,21	1,40±0,52	p=0,011
Neuro D1	2,10±0,88	1,11±0,36	1,52±0,90	p=0,013
Ki67	1,89±0,96	1,06±0,29	1,80±0,047	p=0,014
NeuN	9,0±0,41	8,41±0,52	8,56±0,26	p=0,028
Cleaved Caspase 3 SGZ	0,87±0,35	2,44±0,64	1,88±0,35	p=0,0001
Cleaved Caspase 3 DG	0,68±0,25	1,86±0,49	1,37±0,71	p=0,0001
TUNEL SGZ	0,69±0,41	1,42±0,33	0,81±0,21	p=0,0001
TUNEL DG	0,04±0,01	0,15±0,06	0,08±0,02	p=0,0001
H-skor sonuçları, Ort±Std				
İnsülin	136,6±15,5	114,9±8,81	110,9±4,00	p=0,0001
IR	221,3±21,3	203,8±6,01	227,0±19,22	p =0,006
IRS2	224,4±32,2	200,1±15,2	234,9±23,1	p=0,006
GLUT3	193,4±9,31	200,1±6,34	193,1±2,33	p=0,118
GLUT4	163,6±22,8	205,4±29,0	174,7±16,2	p=0,001

Çizelge 3.1. Tüm gruplara ait IHC analizlerine ait verilerin ortalama ve standart sapmaları.

3.4. Davranış Testi Analizleri

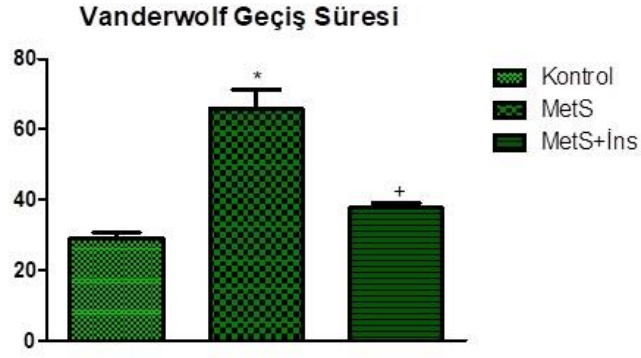
3.4.1 Vanderwolf Yüzme Testi

Uzaysal öğrenmenin değerlendirilmesi için kullanılan Vanderwolf yüzme testinde antrenman yüzmesi geçiş süreleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu [$F(2,27)=31,196$ $p=0,0001$]. Kontrol grubuna oranla MetS grubunun geçiş süresi anlamlı derecede arttı ($p=0,0001$). Kontrol grubuyla MetS+İns grupları geçiş süreleri farkı istatistiksel olarak anlamsızdı ($p=0,079$). MetS ve MetS+İns grupları karşılaştırıldığında geçiş süresinin MetS+İns grubunda anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p=0,0001$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.41).



Şekil 3.41. Vanderwolf testi antrenman yüzmesi geçiş sürelerini gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

Vanderwolf testi geçiş süreleri, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede değişti [$F(2,27)=31,196$ $p<0,0001$]. Kontrol grubuna oranla MetS grubunda süre anlamlı derecede artarken ($p<0,0001$), MetS+İns grubunda artış olmasına rağmen istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p<0,267$). MetS ile MetS+İns grupları karşılaştırıldığında MetS+İns grubunda süre anlamlı derecede azaldığı bulundu ($p<0,0001$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.42).

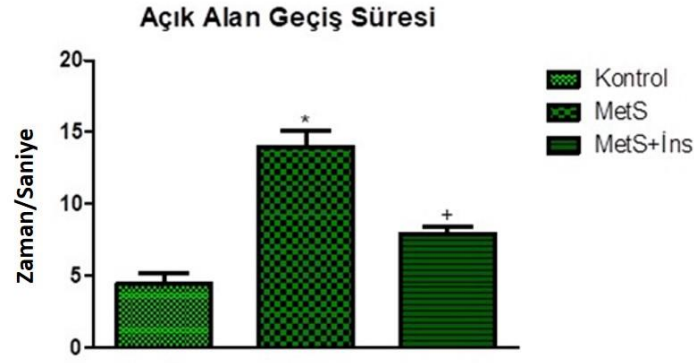


Şekil 3.42. Vanderwolf testi geçiş gecikmesini gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

3.4.2 Açık Alan Testi

Anksiyete ve lokomotor aktivite ölçümü için yapılan açık alan testinde video kamera görüntülerinden geçiş gecikme süreleri, merkez bölgede geçen süre, periferde geçen süre, toplam katedilen mesafe (cm), iki ayak üzerine kalkma sayısı ve merkez bölgeye girme sayıları hesaplanmıştır.

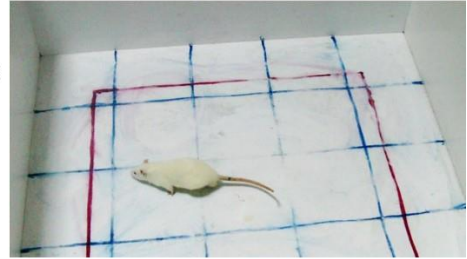
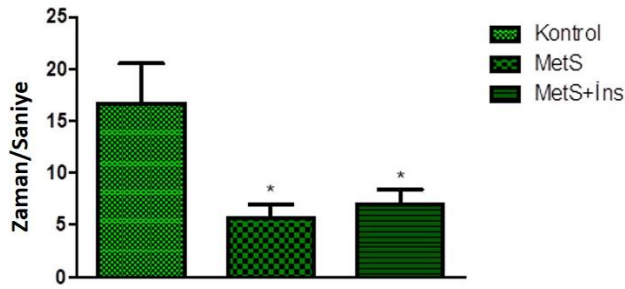
Gruplar, açık alan geçiş süresi bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu [$F(2,27)=34,975$ $p=0,0001$]. Kontrol ile MetS grubu karşılaştırıldığında, MetS grubunda süre anlamlı derecede yükseldi ($p<0,0001$). Kontrol grubuyla MetS+İns grubu karşılaştırıldığında sürenin artmasına rağmen istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p<0,017$). MetS grubuna oranla MetS+İns grubunda süre anlamlı düzeyde yükseldi ($p<0,0001$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.43).



Şekil 3.43. Açık alan testi geçiş süresini gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

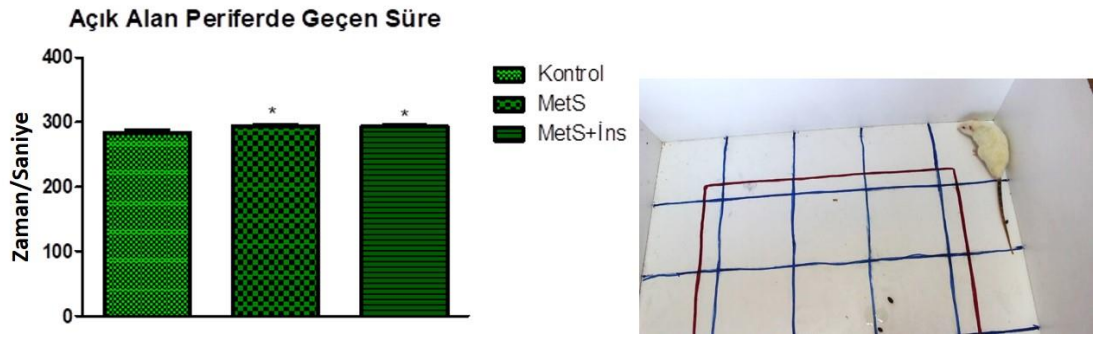
Merkez bölgede geçen süre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklıdır [$F(2,27)=5,948$ $p=0,007$]. Kontrol grubuyla MetS grubu karşılaştırıldığında MetS ($p=0,012$) ve MetS+İns ($p=0,029$) gruplarında süre önemli ölçüde azalmıştır. MetS ve MetS+İns grupları arasındaki süre farkı istatistiksel olarak anlamsızdır ($p=1,00$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.44).

Açık Alan Merkez Bölgede Geçen Süre



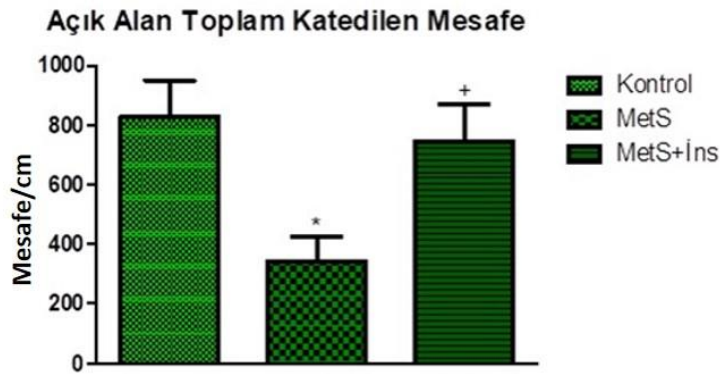
Şekil 3.44. Açık alan testi merkez bölgede geçen süreyi gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma) ve açık alan testi deney düzeneği.

Perifer bölgede geçen süre gruplar arasında anlamlı derecede farklıdır [$F(2,27)=5,948$ $p=0,018$]. Kontrol grubuyla MetS grubu karşılaştırıldığında MetS grubunun periferde geçirdiği süre anlamlı derecede artmıştır ($p=0,012$). Kontrol grubuna oranla MetS+İns grubunda süre azalmıştır ($p=0,029$). MetS ve MetS+İns grupları arasında süre bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=1,00$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.45).



Şekil 3.45. Açık alan testi periferde geçen süreyi gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma) ve açık alan testi deney düzeneği.

Grupların beş dakikada katettikleri toplam mesafe istatistiksel olarak anlamlıdır [$F(2,27)=5,482$ $p=0,018$]. Kontrol grubuna oranla MetS grubunda katedilen mesafe anlamlı derecede azalmıştır ($p=0,014$). Kontrol grubuyla MetS+İns grubu karşılaştırıldığında mesafeler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır ($p=1,00$) MetS grubuna oranla MetS+İns grubunda mesafenin anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p=0,048$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.46).

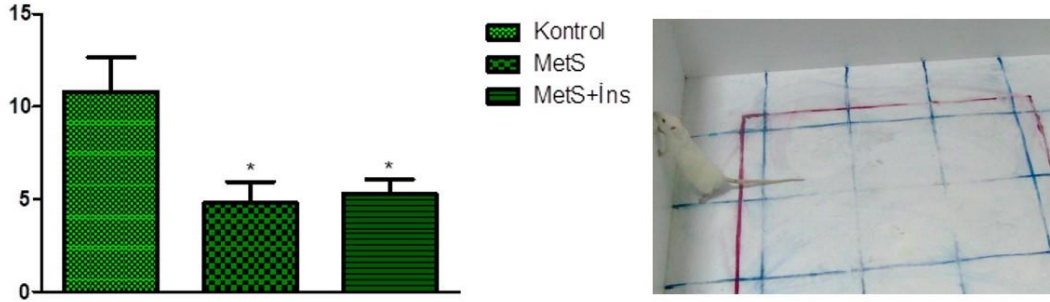


Şekil 3.46. Açık alan testi toplam katedilen mesafeyi gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

Açık alan testindeki deneklerin iki ayak üzerine kalkma sayıları bakımından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır [$KW(2)=9,358$ $p=0,009$]. Kontrol grubuyla MetS grubu karşılaştırıldığında MetS grubunda iki ayak üzerine kalkma sayısı anlamlı ölçüde azalmıştır ($p=0,009$). Kontrol grubuyla MetS+İns grubu karşılaştırıldığında MetS+İns grubunda sayının anlamlı derecede azaldığı

görülmüştür ($p=0,009$). MetS ve MetS+İns grupları arasında anlamlı fark yoktur ($p=0,703$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.47).

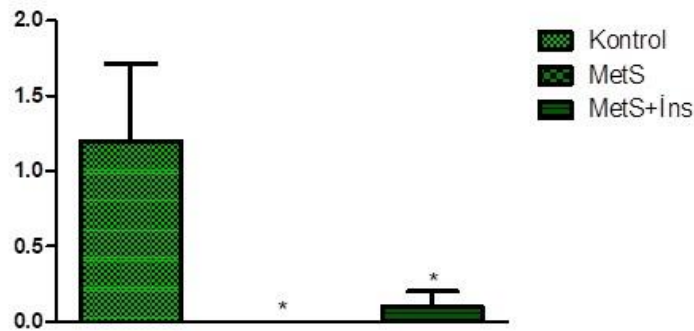
Açık Alan İki Ayak Üzerine Kalkma Sayısı



Şekil 3.47. Açık alan testi iki ayak üzerine kalkma sayısını gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma) ve açık alan testi deney düzeneği.

Gruplar arasında merkeze girme sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur [$KW(2)=11,363$ $p=0,003$]. Kontrol ve MetS grupları karşılaştırıldığında MetS grubunun merkez bölgeye hiç girmediği görülmüş istatistiksel olarak fark anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p=0,005$). Kontrol grubuna oranla MetS+İns grubunda sayı anlamlı derecede azaldı ($p=0,020$). MetS ve MetS+İns grupları arasında anlamlı fark yoktur ($p=0,317$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.48).

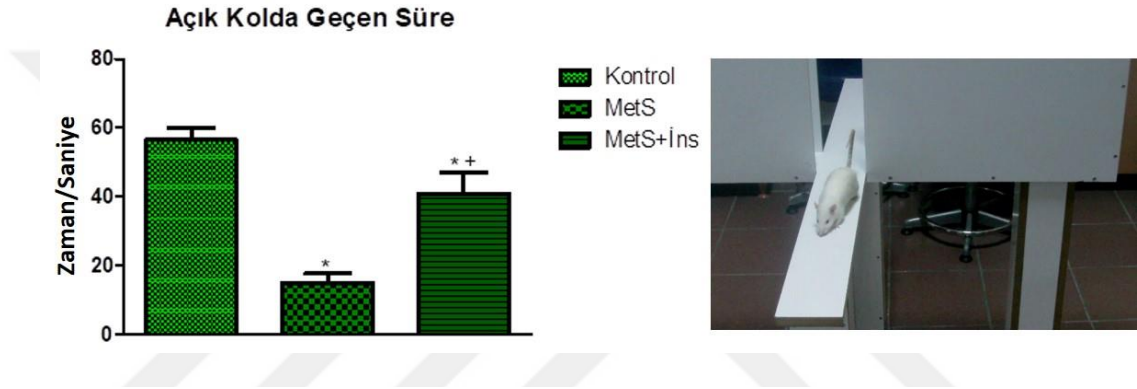
Merkez Bölgeye Girme Sayısı



Şekil 3.48. Açık alan testi merkez bölgeye girme sayısını gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS grupları arası karşılaştırma).

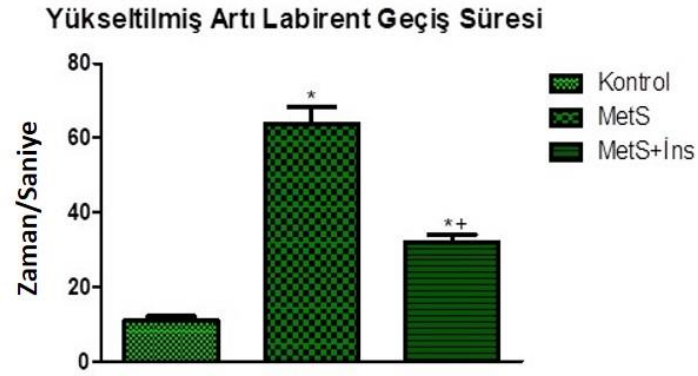
3.4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Anksiyete ve öğrenmenin değerlendirilmesi için yapılan yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçen süre bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur [$F(2,27)=24,022$ $p=0,0001$]. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MetS ($p=0,0001$) ve MetS+İns ($p=0,047$) gruplarında açık kolda geçen sürenin anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür. MetS grubuna oranla MetS+İns grubunda açık kolda geçen sürenin MetS+İns grubunda anlamlı derece arttığı görüldü ($p=0,001$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.49).



Şekil 3.49. Yükseltilmiş artı labirent testi açık kolda geçen süreyi gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma) ve yükseltilmiş artı labirent testi deney düzeneği.

Yükseltilmiş artı labirentin ikinci gün testi olan uzaysal öğrenmenin değerlendirildiği transfer geçiş süreleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(2,27)=76,747$ $p<0,0001$]. Kontrol grubu MetS ve MetS+İns gruplarıyla karşılaştırıldığında süre anlamlı derecede uzadı (sırasıyla; $p<0,0001$, $p<0,0001$). MetS ve MetS+İns grupları karşılaştırıldığında MetS grubuna göre MetS+İns grubunda geçiş süreleri anlamlı istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p<0,0001$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.50).

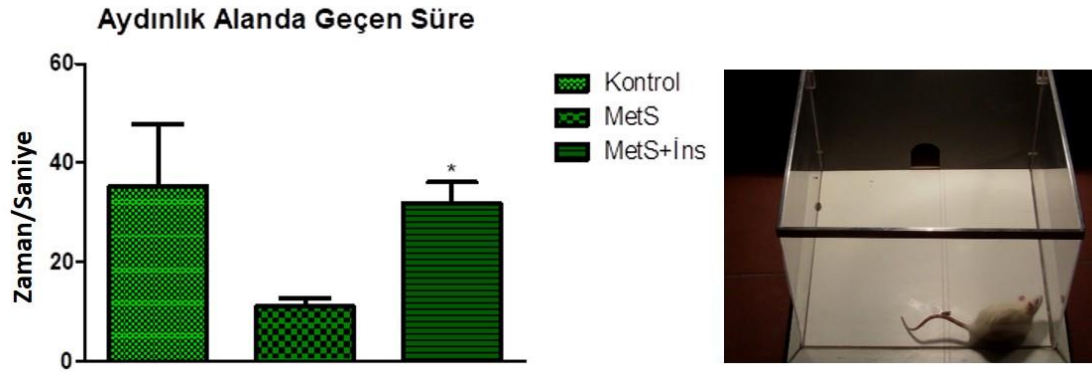


Şekil 3.50. Yükseltilmiş artı labirent testi geçiş sürelerini gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS-MetS+İns grupları arası karşılaştırma), + $p<0,05$ (MetS ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

3.4.4. Aydınlik Karanlık Kutusu

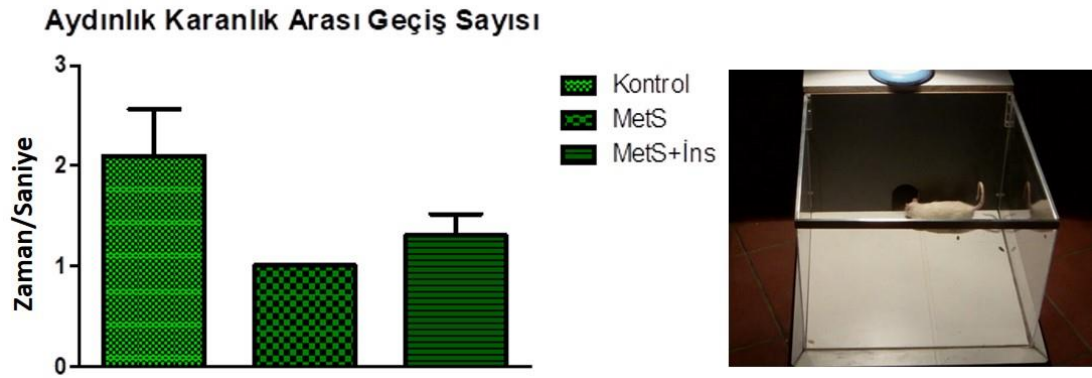
Anksiyetenin değerlendirilmesi için yapılan aydınlık karanlık kutusu testinde; aydınlık alanda geçen süre, aydınlık karanlık arası geçiş sayısı ve aydınlık alanda iki ayağı üzerine kalkma sayısı kaydedilmiştir.

Aydınlık alanda geçen süre bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur [KW(2)=8,724 $p=0,013$]. Kontrol grubuna oranla MetS ($p=0,226$) ve MetS+İns ($p=0,364$) grubunda süre kısalmasına rağmen fark bulunmadı. MetS+İns grubunda MetS grubuna oranla süre uzamıştır ve fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.51).



Şekil 3.51. Aydınlik karanlik kutusu testi aydınlık alanda geçen süreleri gösteren çubuk grafik, Ort±Std, * $p<0,05$ (Kontrol ile MetS+İns grupları arası karşılaştırma).

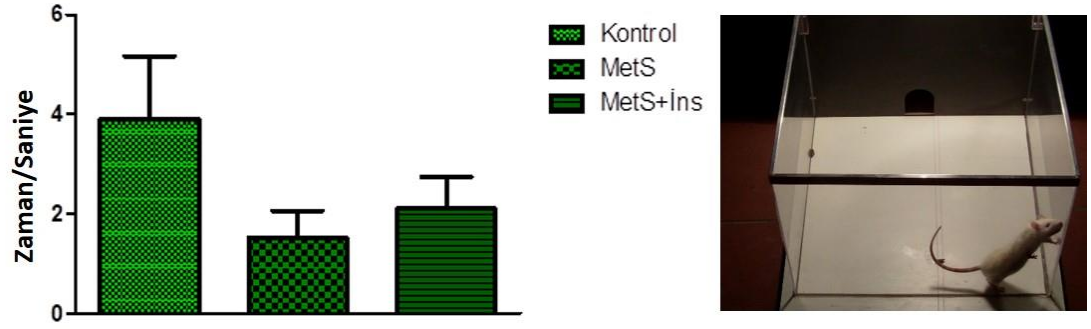
Aydınlik karanlik arası geçiş sayısı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildir [KW(2)=4,512 $p=0,105$] (Çizelge 3.2, Şekil 3.52).



Şekil 3.52. Aydınlik karanlik kutusu testi aydınlık karanlık bölgeler arası geçiş sürelerini gösteren çubuk grafik, Ort±Std, $p>0,05$ ve aydınlık karanlik kutusu deney düzenegi.

Aydınlik alanda iki ayak üzerine kalkma sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır [KW(2)=2,058 $p=0,357$] (Çizelge 3.2, Şekil 3.53).

Aydınlık Alanda İki Ayak Üzerine Kalkma



Şekil 3.53. Aydınlik karanlık kutusu testi aydınlık alanda iki ayak üzerine kalkma sayılarını gösteren çubuk grafik, Ort±Std, $p>0,05$ ve aydınlık karanlık kutusu deney düzenegi.

3.4.5. Harder Bezi Değerlendirmesi

Hayvan refahı ve stresin değerlendirilmesinde artmış Harder bezi sekresyonu skorlanmaktadır. Kontrol grubunda skor 0 iken, MetS grubunda skor 2 ve MetS+İns grubunda ise skor 1 olarak değerlendirilmiştir.

Davranış Deneylerine Ait Değişkenler	Kontrol Ort±Std	MetS Ort±Std	MetS+İns Ort±Std	p değeri
Antrenman yüzmesi geçiş süreleri	1,5±2,91	23,1±4,93	14,2±2,09	p=0,0001
Vanderwolf geçiş süresi	29,02±5,28	65,72±17,5	37,6±4,5	p=0,0001
Açık alan geçiş süresi	4,43±2,33	13,98±3,5	7,90±1,52	p=0,0001
Açık alan merkez bölgede geçen süre	16,7±12,05	5,70±4,16	7,00±4,2	p=0,007
Açık alan periferde geçen süre	283,3±12,05	294,3±4,16	293±4,42	p=0,007
Açık alan toplam katedilen mesafe	828±382,76	344±256,26	746,0±393,7	p=0,010
Açık alan iki ayak üzerine kalkma sayısı	10,8±5,84	4,8±3,52	5,3±2,4	p=0,009
Merkez bölgeye girme sayısı	1,2±1,61	-	0,1±0,31	p=0,003
Açık kolda geçen süre	56,6±1,81	14,8±8,67	40,9±19,09	p=0,0001
Yükseltilmiş artı labirent geçiş süresi	11,0±3,33	63,7±15,03	32,1±6,15	p=0,0001
Aydınlık alanda geçen süre	35,2±39,91	31,7±13,74	11,0±5,16	p=0,013
Aydınlık karanlık arası geçiş sayısı	2,1±1,44	1,3±0,67	-	p=0,105
Aydınlık alanda iki ayak üzerine kalkma	3,9±3,98	2,1±2,02	1,5±1,77	p=0,357

Çizelge 3.2. Tüm gruplara ait davranış deneyi analizlerine ait verilerin ortalama ve standart sapmaları.

4. TARTIŞMA

Metabolik sendrom etiyolojisinde; değişen beslenme alışkanlıkları, alınan enerjinin harcanandan fazla olması, sedatif yaşam tarzı ve modernite olan en önemli sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir (Motamedi ve ark., 2017). Metabolik sendrom T2DM oluşturma riskini arttırmaktadır (Alberti ve ark., 2009) (Kaur, 2014). Yetişkin nörogenezinin devam ettiği yerlerden biri olan hipokampusun, öğrenme, hafıza ve uzaysal yön tayininde rolü olduğu bilinmekle birlikte (Silva, 2014), yapılan çalışmalarla T2DM'li ratlarda nörogenezin azaldığı gösterilmiştir (Lang ve ark., 2009).

İnsülin beyinde; bilişsel fonksiyonu, hafızayı, nöronal sağkalımı ve sinaptik plastisiteyi düzenleyen nöropeptid gibi davranmaktadır (Yanagita ve ark., 2013). MetS'in temel patolojik özelliklerinden olan insülin direnci yakın zamana kadar sadece yağ ve kas dokusu üzerinde gösterilirken, son çalışmalar insülin direncinin sinir sisteminde de geliştiğini ortaya koymuştur. Nöronlardaki insülin direnci, nörodejeneratif hastalıklara zemin hazırlamaktadır (Kim ve Feldman, 2012). Çalışmamızda MetS oluşturulan hayvanlara insülin enjeksiyonunun, nöronal sağkalıma etkisini, insülin sinyal yolağı ile nörogenez arasındaki ilişkiyi ve bilişsel fonksiyon üzerindeki etkilerini araştırmayı hedefledik.

Işık mikroskop incelemelerinde, krezil viyole ve toluidin mavisi-azur II ile boyalı kontrol grubuna ait hem parafin hem de yarı ince kesitlerde hipokampal granüler nöronlar olağan görünümde, sitoplazma çekirdek oranlarının çekirdek lehinde bulunduğu, çekirdeğin ökromatin olduğu görüldü. MetS grubuna ait kesitlerde granüler nöronların çoğunun koyu bazofilik sitoplazma ve çekirdek içerdikleri görüldü. MetS grubundaki nöronların bu özellikleri diyabet üzerine yapılan çalışmalarla uyumlu bulundu (Ahmadpour, 2012). MetS+İns grubunda normal görünümlü nöronların yanısıra koyu bazofilik nöronların varlığı dikkat çekti.

Geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde kontrol grubu nöronlarda çekirdeğin gevşek ve dağınık kromatin içerdiği, sitoplazmadaki organellerin olağan görünümde oldukları, sitoplazma ve çekirdeğin elektron geçirgen olduğu görüldü. MetS grubunda nöronların çoğunun sitoplazma ve çekirdeğinde elektron yoğun görünüm izlendi. Çekirdekte heterokromatin kümeleşmeler görülürken, sitoplazmada lizozomlarda artış, granüllü endoplazma retikulumu sarnıçlarında genişlemeler belirlendi. MetS grubu bulguları literatürde diyabetli hayvanlarla yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulundu (Ahmadpour, 2012). MetS+İns gruplarında ise elektron yoğun görünümlü çekirdek ve sitoplazma içeren hücrelerin arasında normal görünümlü nöronların varlığı dikkat çekiciydi. Bu görünüm insülinin nöroprotektif etkisine bağlandı.

T2DM’li ratlarda nörogenezin azaldığını göstermek için DCX seviyesine bakıldığını (Hwang ve ark., 2008), yetişkin nörogenezinde proliferasyonu kanıtlamak için Ki67 antikorunun kullanıldığını (Kee ve ark., 2002) ve NeuroD1’in yetişkin nörogenezinde yeni oluşan nöronların olgunlaşması ve yaşaması için gerekli olduğunu (Gao ve ark., 2009) bildiren çalışmalar yayınlanmıştır. Metabolik sendromun T2DM oluşumuna zemin hazırlayıcı etkilerinden dolayı çalışmamızda; nörogenezde oluşan değişiklikleri araştırmak için yüksek oranda şekerle beslenen ve metabolik sendrom oluşturulan sıçanlar kullanıldı. DCX, Neuro D1 antikorları ile hem WB hem de IHC analizleri ve Ki67 antikorlu ile sadece IHC analizleri yapıldı. Yapılan analizlerde kontrol grubuna oranla MetS gruplarında bu proteinlerin ekspresyonlarının anlamlı derecede azaldığı görüldü. MetS gruplarına oranla MetS+İns gruplarında protein ekspresyonlarının arttığı görüldü ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu durum MetS’de SGZ bölgesinde nörogenezin azaldığını gösterirken, insülin enjeksiyonu ile bu bölgede proliferasyonun istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttığının göstergesidir.

NeuN sadece matür nöronlarda eksprese edilmektedir. Bu proteini kodlayan genlerin silinmesiyle nörogenezin azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda NeuN’in eksitatör ve inhibitör sinaptik iletimi, kısa dönem ve uzun dönem sinaptik plastisiteyi, dentritik diken yoğunluğunu ve sinaps ilişkili

davranışları düzenlediği bildirilmiştir. NeuN disfonksiyonunun; epilepsi, otizm spektrum bozukluğu, nörogelişimsel gecikme ve bilişsel bozukluklarda görüldüğü bilinmektedir. (Lin ve ark., 2016). Çalışmamızda NeuN protein yoğunluğunu incelemek için yapılan WB ve IHC analizleri sonuçlarında; kontrol grubuna oranla MetS grubunda anlamlı derecede azalma görüldü. MetS+İns grubunda MetS grubuna oranla artış görüldü ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Literatürde tutarlı bir biçimde diyabetik hayvanların hipokampus ortamının apoptoza zemin hazırladığı ve hipokampusta apoptotik belirteç oranlarının yükseldiğinden bahsedilmektedir (Ho ve ark., 2013). Çalışmamızda MetS gruplarında gözlediğimiz NeuN işaretli nöron sayılarındaki azalmanın, proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge değişimden kaynaklanıp kaynaklanmadığını incelemek için apoptoz belirteçleri olan cleaved caspase 3 ve TUNEL ile işaretlemeler yapıldı. Cleaved caspase 3 bulgularıyla, nörogenezin gerçekleştiği SGZ alanında kontrol grubuna oranla MetS ve MetS+İns gruplarında apoptozun anlamlı derecede arttığı görüldü. MetS grubuna göre MetS+İns grubunda insülinin iyileştirici etkisiyle apoptoz oranları azaldı fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. SGZ TUNEL işaretlemeleri sonuçlarına göre, kontrol grubuna oranla MetS grubunda apoptozda anlamlı artış görülürken, MetS grubuna oranla MetS+İns grubunda anlamlı azalma görüldü. Apoptozun hipokampusun dentat girusunda bulunan tüm nöronlar üzerine etkisine bakıldığında ise hem cleaved caspase 3 hem de TUNEL işaretlemeleri sonuçlarında kontrol grubuna oranla MetS gruplarında apoptoz artışı dikkat çekti. TUNEL işaretlemeleri sonuçlarına göre MetS grubuna oranla MetS+İns grubunda anlamlı azalma görülürken, cleaved caspase 3 verilerine göre aradaki fark anlamlı bulunmadı. Özellikle TUNEL bulgularına dayanarak insülinin, hipokampusun SGZ ve DG alanlarında bulunan nöronlar üzerinde apoptozdan koruyucu etki gösterdiği söylenebilir. Bu bulgu cleaved caspase 3 bulgularıyla kısmen de olsa desteklenmektedir.

T2DM hastalığında, beyinde ve hipokampal bölgede insülin direnci oluşmasıyla, insülin reseptör ve insülin reseptör substratları azalır. Hayvan çalışmaları sonuçlarına göre T2DM ve Alzheimer hastalığında insülin reseptör ifadesi ve aktivasyonunun

azaldığı gösterilmiştir (Biessels ve Reagan, 2015). Shpakov ve arkadaşlarının yayınladığı derlemede; T2DM ve MetS'de kandaki normal veya yükselmiş insülin konsantrasyonu yüzünden, insülinin KBB aracılığıyla taşınarak beyin insülin seviyesinin azalmasına neden olduğu belirtilmektedir. Böylece, beyin insülin sinyalizasyon sisteminin fonksiyonel aktivitesi zayıflar, periferik metabolizmanın merkezi kontrolü olumsuz olarak etkilenir ve metabolik bozuklukların ve insülin direncinin şiddeti artar (Shpakov ve ark., 2015). Çalışmamızda MetS oluşturulmuş hayvanların hipokampusunda insülin sinyal yolağında görevli olan insülin, IR, IGF1R α , IRS1 ve IRS2 düzeyleri incelendi.

Çalışmamızda MetS grubu hayvanlarda kan insülin seviyelerinde artış olurken, hipokampusun WB ve IHC analizlerinde insülin düzeylerinin azaldığını gördük. Bu durumu; MetS'de kan insülin düzeyinin yükselmesiyle, periferik insülinin KBB'yi kolaylıkla geçmesine ve nöronların ihtiyacını karşılamasından dolayı nöron içinde insülin üretiminin azalmış olabileceğine bağladık. MetS+İns gruplarında, insülin enjeksiyonuyla kan insülin seviyesi azalırken, WB ve IHC analizlerinde hipokampus insülin seviyeleri MetS grubuna oranla daha da azaldı. HOMA- β bulgularımızla uyumlu olarak MetS grubuna oranla MetS+İns grubunda pankreas β hücrelerinden salgılanan insülin miktarının azalması, ekzojen insülinin β hücrelerinin salgısını baskıladığını gösterir. Bu bulgu sonucunda ekzojen insülinin nöronların da ihtiyacını karşılayarak, nöronların insülin üretimini de azaltmış olabileceği kanaatindeyiz.

Bazı patolojik durumlarda beyin dışındaki perifer hücrelerin insülin hassasiyetinin azalması, yüzey IR sayılarının azalmasına dayandırılmaktadır. Dahası; insülin direnci durumlarına eşlik eden hiperinsülinemi, IR sayısının azalması için işbirliğinde bulunan faktör olarak tanımlanmaktadır (Reed ve ark., 1981). Alzheimer, Parkinson ve diğer nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesinde diyabet, obezite ve MetS arasında bağlantı olduğu düşünülmektedir (Jha ve ark., 2017). Dahası diyabet ve nörodejenetarif hastalıklar arasındaki ilişki açıklanarak, Alzheimer ve Parkinson hastası olan bireylerde beyinde IR ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. Bu durum nörodejenerasyonun nedeni mi yoksa sebebi mi, ya da nöronal insülin direncinin bu bozukluklar için risk faktörü olup olmadığı konularını gündeme getirmektedir (Plum

ve ark., 2005). Çalışmamızda kontrol grubuna oranla MetS grubunda hem WB analizlerinde hem de IHC bulgularında IR oranının anlamlı derecede azaldığını ve WB analiziyle IGF1R α oranının da IR oranını destekleyici düzeyde azaldığını gördük. Bu bulgu MetS'in nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna katkıda bulunduğunun göstergesidir. MetS+İns gruplarında ise WB analizlerinde MetS grubuna oranla anlamlı değişim gözlenmezken, IHC analiz sonuçlarında MetS+İns gruplarında anlamlı artış görüldü.

Alzheimer hastalarının beyinlerinde özellikle hipotalamus ve hipokampusta IR, IGF1R ve IRS1 proteinlerinin ekspresyonu ve aktivasyonunda azalma görülürken, genellikle inhibitör olarak kabul edilen IRS1'in serin fosforilasyonunda artış gözlenmiştir (Kleinridders ve ark., 2014). Çalışmamızda MetS gruplarında WB analizlerinde IRS1 seviyenin azaldığını gözlemlese de gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Farelerde IRS2 geninin silinmesiyle, hipokampusun sinaptik geçirgenliğinde uzun süreli potansiyasyonun (LTP, sinapsın yapısındaki öğrenme temelli değişikliğin göstergesi) bozulduğundan söz edilmektedir (Martin ve ark., 2012). 2013 yılında yayınlanan makalede yaşlı sıçanlarda nöronal IRS2'nin aşırı ekspresyonunun; yağ kitlesinin, insülin direncinin ve glikoz intoleransının artmasına neden olduğu bildirilmektedir (Zemva ve ark., 2013). Yaptığımız WB analizleri sonucunda; IRS2'nin MetS gruplarında anlamlı derecede arttığını, MetS+İns gruplarında kontrol seviyesine gerilediğini gördük. Fakat IHC analizlerinde bunun tam tersi olacak şekilde MetS gruplarında azaldığını, MetS+İns gruplarında MetS grubuna göre anlamlı oranda arttığını gördük. Bu değişik sonuçlar; WB ile hipokampal oluşumun tüm nöronlarındaki protein oranını veriyor olmamız, IHC analizleri ile ise sadece dentat gyrusun granüler nöronlarındaki oranları ele almamızdan kaynaklanıyor olabilir.

GLUT3 insülin bağımsız glikoz taşıyıcısıdır. Nöronal aktivasyon ve yüksek nöronal enerji talebi sırasında, nöron kullanılabilir yakıtlardan yararlanır; böylece, serebral

glikoz kullanımının artması ile ilişkili tüm in vivo koşullar boyunca GLUT3 ekspresyonunda bir artış gözlenir. Hem normal koşullarda hem de deneysel olarak serebral glikoz kullanımının artması için GLUT3 ekspresyonunun artması gerekmektedir (Simpson ve ark., 2008). Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda MetS gruplarında WB ve IHC analizlerinde GLUT3 seviyesinin literatürle uygun biçimde arttığını gözlemledik. MetS+İns gruplarında artan ekspresyonun anlamlı olmasa da azaldığını gördük.

GLUT4 insülin bağımlı glikoz taşıyıcısıdır. GLUT4'ün plazma membranına taşınması; beyincik, korteks ve hipokampusta plazma insülin seviyesinin arttığı durumlarda gerçekleşmektedir (Blazquez ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarla, plazma insülin düzeylerinde glikoz aracılı artışların sıçan hipokampusunda sitozolden plazma membranına GLUT4 translokasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Grillo ve ark., 2009). Çalışmamızda kontrol grubuna oranla MetS ve MetS+İns gruplarında kan insülin seviyesinin arttığı görüldü. Literatürle uyumlu olarak artan insülin seviyesine uygun olarak WB analiz sonuçlarına göre GLUT4 ekspresyonunun kontrol grubuna göre hem MetS hem de MetS+İns gruplarında anlamlı ölçüde arttığı bulundu. IHC analiz sonuçlarına göre ise kontrol grubuna oranla MetS grubunda anlamlı derecede artış görülürken, MetS+İns gruplarında MetS grubuna göre azalmıştı.

Yaptığımız çalışmada MetS grubu hayvanlarda serum insülin seviyesindeki artışın GLUT4'ün ekspresyonunun arttırdığını gözlemledik. Ancak MetS'li hayvanlarda insülin sinyal yolağı elemanlarından olan IR'ın hipokampusta ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak insülin sinyal yolağı yeterince aktive olamadı. Bu nedenle GLUT4'ün ekspresyonunun artmasına rağmen aktive olamaması nöronlara yeterince glikoz alımının gerçekleşememesine neden oldu. Bu yüzden nöronların ihtiyacı olan glikozu karşılamak için GLUT3 ekspresyonunun arttığı düşüncesindeyiz.

Nörogenez çoğu memelide hipokampusun dentat girus (DG) bölgesinde erişkin dönemde de devam eder (Altman ve ark., 1965). Yetişkin kök hücreleri DG'nin

subgranüler zon bölgesinde bulunur ve nöronlara farklanarak hipokampusun granüler hücre tabakasına göç eder (Kronenberg ve ark., 2003), plastisiteyi artırarak öğrenme ve hafızanın artmasını sağlar (Kheirbek ve ark., 2012). Çalışmamızda MetS ile beraber nöroenezin azaldığını ve hücre ölümünün arttığını gösterdik. Bu veriler doğrultusunda sinaptik plastisitenin azalmasına bağlı olarak hafıza ve öğrenmede ortaya çıkarabilecek bozulmayı araştırmak için Vanderwolf yüzme testi ve yükseltilmiş artı labirentin ikinci gün sonuçları kullanıldı. Çalışmamızda Vanderwolf yüzme testi sonuçları incelendiğinde, kontrol grubuna oranla MetS grubunda hem ilk gün yapılan antrenman denemelerinde hem de 24 saat sonra yapılan denemelerde sıçanların platformu bulma süresi uzamıştır. Bu durum MetS'in öğrenmeyi bozduğunun bir göstergesidir. MetS+İns grubunda hem kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın olmaması hem de MetS grubuna göre anlamlı bir azalma olması, MetS'de insülinin koruyucu etkisini göstermektedir. Yükseltilmiş artı labirentin ikinci gün sonuçlarına göre, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İns gruplarında geçiş sürelerinin anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. Bu durum öğrenmenin bozulduğu anlamına gelmektedir. MetS+İns grubunda ise MetS grubuna oranla geçiş sürelerinin anlamlı derecede azalması, insülinin öğrenme üzerine pozitif etkisinin göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Diyabet hem fiziksel (Mundet ve ark., 2008) hem de psikolojik (Anderson ve ark., 2001) komplikasyonlara yol açmaktadır. Diyabet popülasyonunun incelendiği çalışmalarda; genel anksiyete bozukluğunun %14 ve artmış anksiyete septomlarının %40 düzeyinde olduğu bildirilmiştir (Grigsby ve ark. 2002). MetS'li bireylerde depresyon riski, sağlıklı bireylere göre iki kat daha fazladır (Rosolová H ve Podlipný J., 2009). Çalışmamızda sıçanların anksiyete ve depresyon durumuna ilişkin davranışlarını incelemek için; açık alan testi, yükseltilmiş artı labirentin birinci gün testi, aydınlık karanlık kutusu testleri yapılmış ve Harder bezi değerlendirilmiştir.

Açık alan testi sonuçlarına göre,

- Merkez bölgede geçen süre ve merkez bölgeye girme sayısı MetS ve MetS+İns grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak azalmıştır. Bu durum anksiyete davranışının arttığının göstergesidir.

- Periferik bölgede geçen sürenin kontrol grubuna oranla MetS ve MetS+İns gruplarında artması da bir anksiyete göstergesidir.
- Anksiyetenin azalmasına bağlı olarak sıçan iki ayağı üzerine kalkarak etrafı araştırmaktadır. Açık alan testinde iki ayak üzerine kalkma davranışının azalması anksiyetenin artması anlamına gelmektedir (Lau ve ark., 2008). Çalışmamızda iki ayak üzerine kalkma davranışı incelendiğinde kontrol grubuna oranla MetS ve MetS+İns gruplarında sayının anlamlı derecede azaldığı görülmüştür.
- Açık alan testinde toplam katedilen mesafe horizontal düzlemde yapılan lokomotor aktivitedir. Locomotor aktivitenin artışı, anksiyetenin azaldığı anlamına gelir (Lau ve ark., 2008). Çalışmamızda kontrol grubuna oranla MetS oluşturulan grupta katedilen mesafenin azaldığı ve lokomotor aktivitenin bozulduğu görülmüştür. MetS grubuna oranla MetS+İns grubunda ise toplam katedilen mesafe anlamlı olarak düzelmiştir.

Yükseltilmiş artı labirent en sık kullanılan hayvan anksiyete testidir. Yeni çevre ve yükseklik korkusu deneklerde anksiyete benzeri davranışlara yol açmaktadır. Anksiyete artışına bağlı olarak kapalı kolda geçen süre azalırken, azalmasına bağlı olarak açık kolda geçen süre artmaktadır (Walf ve Frye, 2007). Çalışmamızda kontrol grubuna oranla MetS ve MetS+İns grubunun açık kolda harcadığı süre anlamlı derecede azalmıştır. Bu durum her iki grupta anksiyete benzeri davranışların arttığının göstergesidir. MetS grubuna oranla MetS+İns grubunda açık kolda geçen süre anlamlı olarak artmıştır. İnsülin enjeksiyonu bu yönüyle yükseltilmiş artı labirentte anksiyeteyi azaltıcı rol oynamıştır.

Aydınlık Karanlık Kutusu testi yeni çevre adaptasyonu ve yüksek ışık ile oluşturulan doğal bir anksiyete testidir. Anksiyetenin azalması ile aydınlık bölgede geçen süre, bölmeler arası geçiş sayısı ve aydınlık alanda iki ayağı üzerine kalkma sayısı artmaktadır (Çalışkan ve ark., 2017).

Çalışmamızda kontrol grubuna oranla MetS ve MetS+İns gruplarında aydınlık bölmede geçen süre azalmıştır. Yüksek ışık, kontrol grubuna göre diğer iki grupta anksiyete benzeri davranışların artışına yol açmıştır. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Harder bezi üçüncü göz kapağı bulunan memelilerin göz çukurunda bulunan bir bezdir. Anksiyete ile beraber Harder bezi sekresyonunun arttığı daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Bezin fonksiyonu her davranış deneyi sonrası kanlı gözyaşı (Chromodacryorrhoe) skalasına göre değerlendirilmiştir. Bu skalaya göre MetS grubunda skor 2, MetS+İns gruplarında ise skor 1 düzeyinde sekresyon bozukluğu tespit edilmiştir. Bu durum insülinin, anksiyete üzerinde olumlu etkisi olduğu yönünde yorumlanabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda yüksek sükroz içerikli içme suyuyla beslenerek MetS oluşturulan sıçanların hipokampusunda nöroenez belirteç oranlarının anlamlı derecede azaldığı, apoptoz oranının ise yükseldiği bulundu.

MetS oluşturulmuş hayvanlara 15 gün derialtı insülin enjeksiyonundan sonra nöroenez belirteç oranlarının arttığı, hücre ölümünün azaldığı görüldü. Bu veriler ışığında insülinin nöroenezi artırıcı ve apoptozu azaltıcı etkisinden söz edilebilir.

Nöroeneze ilişkin elde edilen sonuçların, insülin sinyal yolağı ile ilişkisini araştırmak için insülin sinyal yolağında bulunan; insülin, IR, IGF1R α , IRS1, IRS2, GLUT3 ve GLUT4 proteinlerin oranlarına bakıldı. Buna göre;

- MetS ve MetS+İns gruplarında hipokampusun insülin sekresyonu azaldı. Daha sonra planlanacak çalışmalarda nöronlardaki insülin sekresyon oranlarının C-peptit seviyeleri tayin edilerek araştırılmasının daha doğru sonuçlara ulaşılmasını sağlayacağı kanaatindeyiz. Böylelikle C-peptidin nöroprotektif ve anti-inflamatuvar etkilerinden yararlanıp yararlanılmadığı da belirlenebilir.
- İnsülinin bağlanarak insülin yolağının aktive olmasını sağlayan IR ve IGF1R α oranlarının MetS grubunda azaldığı, insülin enjeksiyonundan sonra da azalan seviyenin arttığı bulundu. Sonraki çalışmalarda IR'nin fosfo-IR oranına bakılarak, aktivasyon oranında değişiklik olup olmadığı belirlenebilir.
- Sinyal yolağının hücre içi elemanlarından olan IRS1 düzeyinin değişmediği görüldü. IRS2 ekspresyonu, insülin enjeksiyonuyla MetS grubuna göre anlamlı düzeyde arttı. Sinyal yolağının aktivasyon oranı, fosforile IRS1 ve IRS2 düzeylerine bakılarak daha ayrıntılı incelenebilir.
- Hücrenin enerjisini karşılayan glikozu hücre içine alan insülin bağımsız glikoz taşıyıcısı olan GLUT3 seviyesinin MetS grubunda WB'de anlamlı

derecede arttığı IHC’de ise fark bulunmadığı görüldü. Yine MetS gruplarında insülin bağımlı glikoz taşıyıcısı olan GLUT4’ün oranının arttığını ise hem WB hem de IHC analiz yöntemleriyle gösterdik. İnsülin enjeksiyonundan sonra GLUT3 düzeyinde değişiklik olmazken, GLUT4 düzeyi IHC analizlerinde anlamlı oranda azaldı. Sonraki çalışmalarda GLUT3 ve GLUT4 artışının, sitoplazma ve membran seviyeleri arasındaki ilişkiye bakılabilir.

MetS grubunda azalan nörogenez üzerinde insülin sinyal yolağının etkisi olabileceğini düşünüyoruz. Bu nedenle mapk yolağının değerlendirilmesi ve ER stresinin bu yolak üzerindeki etkisinin araştırılması bundan sonraki çalışmalarımızın hedefleri arasında yer alacaktır.

MetS deney modeli oluşturulan gruba insülin uygulama süresinin arttırılması durumunda daha etkili sonuçların gözlenebileceği düşüncesindeyiz.

Ayrıca davranış deneyleri sonucunda MetS grubunda kontrol grubuna göre anksiyetenin arttığı ve öğrenmenin azaldığı; insülin enjeksiyonundan sonra ise MetS grubuna göre MetS+İns grubunda öğrenme ve hafızanın arttığı, anksiyetenin azaldığı sonuçlarına varıldı.

ÖZET

Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Hipokampusun Nörogenezine Etkili Faktörlerin İncelenmesi

Metabolik sendrom (MetS); değişen beslenme alışkanlıkları, sedatif yaşam tarzı gibi nedenlerle gittikçe artan sıklıkta görülen, insulin direnci, karın bölgesinde yağlanma, glikoz intoleransı veya Tip2 Diabetes Mellitus (T2DM), dislipidemi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği bir hastalık tablosudur. Metabolik sendromun ilerleyen aşamalarında T2DM gelişimi ile Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişim sıklığı arasında ilişki gösterilmiştir. Yetişkin nörogenezinin devam ettiği yerlerden biri olan hipokampus, hafıza ve bellek olayları ile ilgilidir. T2DM hipokampal bölgede insülin direnci nedeniyle insülin reseptör ve insülin reseptör substratlarının azalmasına yol açar. Bu durum hipokampal bağımlı hafızayı ve yetişkin hipokampal nörogenezini azaltır. Bu bilgiler ışığında T2DM oluşum riskini arttıran MetS deney modeli oluşturduğumuz sıçanlar üzerinde yaptığımız çalışmada, nörogenez oranı, öğrenme ve anksiyete değerlendirmesi ve insülin sinyal yolağında yer alan bazı proteinlerin düzeylerini inceleyerek, aralarındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçladık.

Çalışmamızda üç grup için toplam 30 adet, başlangıç ağırlıkları 185-200 g olan iki aylık Wistar Albino türü erkek sıçanlar kullanıldı. MetS deney modeli oluşturulan MetS (n=10) ve MetS+İns (n=10) grupları, % 32 sükröz içeren içme suyuyla beslenirken, kontrol grubu (n=10) normal içme suyuyla beslendi. MetS deney modeli oluşumunun doğrulandığı 16. haftadan sonra MetS+İns grubuna 15 gün süreyle, deri altı, üç ünite insülin enjeksiyonu uygulandı. Bütün gruplarda açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent testi, Vanderwolf yüzme testi, aydınlık karanlık kutusu testi ve Harder bezi değerlendirmeleri yapıldıktan sonra sakrifiye edilerek beyin dokuları çıkarıldı. Sol hemisfere ait hipokampusun bir kısmı western blotlama (WB) için donduruldu. Bir kısmı ise glüteraldehit fiksasyonu sonrası araldite gömüldü, toluidin mavisi-azur II ile boyanan yarı ince kesitler ışık mikroskobu ile, uranil asetat/kurşun sitrat ile boyanan ince kesitler ise geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelendi. Sağ hemisfer tamponlu formaline alınarak rutin histolojik takip işlemlerine tabi tutuldu. Genel değerlendirme krezil viyole boyalı parafin kesitlerde ışık mikroskobu ile gerçekleştirildi. WB ve immünohistokimya (IHC) analizleri için; DCX, Neuro D1, NeuN, insülin, insülin reseptör, insülin reseptör substratı (IRS)2, GLUT3, GLUT4, Cleaved caspase 3, protein oranları değerlendirildi. Ayrıca IHC analizlerinde Ki67, TUNEL boyanma düzeyleri, WB analizlerinde ise IRS1 ve IGF1Rα protein düzeyleri incelendi. Analiz sonuçları GraphPad Prism 5.0 ve IBM SPSS 22 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmamızda MetS oluşturulmuş sıçanlara yapılan davranış testleri sonucunda hafıza ve bellekte bozulmalarla anksiyetede artış görüldü. Nörogenez belirteç ekspresyonları azalırken, bu azalmayla uygun biçimde apoptozun arttığı belirlendi. Azalan nörogenez oranıyla beraber nöronlarda insülin sekresyonu ve insülin reseptör düzeyi azaldı. İnsülin sinyal yolağının yeterince aktifleşmemesinden dolayı, nöronların enerji ihtiyacını karşılamak için GLUT 3 ve GLUT 4 oranları arttı. İnsulinin nöronlar üzerinde nörotrofik, nöromodülatör, nöroprotektif etkilerinden yararlanabilmek için MetS oluşturulmuş sıçanlara insülin enjekte edildi. İnsülin enjeksiyonundan sonra hafıza ve belleğin geliştiği, anksiyetenin azaldığı, nörogenez belirteci olan protein oranlarının arttığı ve insülin sinyal yolağı protein düzeylerinin kontrol seviyelerine yakın duruma geldiği görüldü.

Çalışmamızda MetS’de azalan nöroenez ve artan anksiyetenin, insülin reseptör ekspresyonunda azalmayla bağlantılı olabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca literatürde ilk defa MetS’de nöroenezin azaldığı WB ve IHC ile gösterildi. MetS oluşturulan hayvanlara insülin enjeksiyonundan sonra davranış testlerinde pozitif yönde değişim görülürken, WB ve IHC analizleriyle de nöroenezin arttığı belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Hipokampus, İnsülin, İnsülin Sinyal Yolağı, Metabolik Sendrom, Nöroenez.



SUMMARY

Investigation of Effective Factors on Hippocampal Neurogenesis in Rats With Metabolic Syndrome.

Metabolic Syndrome (MetS) is a frequent disease which is caused with reasons such as changing nutrition habits, sedative lifestyle and prognosed with insulin resistance, increased abdominal adiposity, glucose intolerance or Type 2 Diabetes Mellitus, dislipidemia, hypertension and coroner artery disease. In MetS progression, it was shown that there is a relationship between frequency of TDM2 progression with frequency of progression of some neurodegenerative diseases such as Alzheimer. Hippocampus where adult neurogenesis continues, is related to memory. TDM2 causes reduction in insulin receptors and their substrates in hippocampal area because of insulin resistance. This situation decreases hippocampal dependent memory and hippocampal neurogenesis of adults. In the light of these knowledge in the study which we created experimental model of MetS so that it increase TD2M progression risk and we aimed to evaluate neurogenesis rate, learning and anxiety degrees, analysis of some proteins levels from insulin signal pathway, then we aim to introduce the relationship between them.

In our study, totally 30 two months old Wistar Albino male rats were used for three different groups starting weights were varying between 185-200 g. MetS (n=10) and MetS+Ins (n=10) groups which experimental MetS model was set, were fed with tap water containing %32 sucrose while control group (n=10) was fed with normal tap water. After 16th week when experimental model of MetS formation was confirmed, to MetS+Ins group, three units insulin subcutaneous injection were administired during 15 days. In all groups, open area test, elevated plus maze test, Vanderwolf swim test, light-dark box test, Harderian gland evaluation were performed, then animals were sacrificed and brains were dissected. A part of hippocampus from left hemisphere was frozen for Western Blot (WB) Analysis. The other part was embedded into araldit after glutaraldehyde fixation, semi-thin sections stained with Toluidin Blue-Azur II were evaluated with light microscope, while thin sections stained with uranyl acetate/Lead citrate were analyzed with Transmission Electron Microscope (TEM). Right hemispheres were fixed in buffered formaline solution and processed with histological routine. Overall assessment was performed with light microscope on Cresyl Violet stained paraffin sections. For WB and immunohistochemistry (IHC) analysis; DCX, Neuro D1, NeuN, insulin, insulin receptors, insulin receptor substrate (IRS) 2, GLUT 3, GLUT 4, Cleaved caspase 3, protein levels were evaluated. In addition, Ki67, TUNNEL positivity degrees in IHC analysis; IRS1 and IGF1R α protein levels in WB analysis were assessed. Analysis results were evaluated statistically with GraphPad Prism 5.0 and IBM SPSS 22 statistical software and the p values less than 0,05 were considered stastically significant.

As a result of behaviour tests of rats with experimental MetS, an increase in anxiety with memory deficiency was observed. While neurogenesis marker expressions were decreasing, in correlation with this decrease, an increase in level of apoptosis was observed. Insulin secretion and insulin receptor levels decreased in neurons in proportion to decrease in neurogenesis. Since insulin signal pathway was not activated properly, GLUT 3 and GLUT 4 ratios increased to accomplish enegry requirement of neurons. In order to get benefit from neurotrophic, neuromodulator, neuroprotective effects of insulin on neurons, insulin was injected into rats with MetS. After insulin injection, improvement of memory, decrease in

anxiety, increase in levels of neurogenesis marker proteins and insulin signal pathway protein levels were observed as approaching to control levels.

In our study, it was concluded that in MetS; there is a relationship between decreased neurogenesis, increase anxiety and decreased insulin receptor expression. Besides, it was shown first time with WB and IHC that there is a decrease in neurogenesis in MetS. Increase in neurogenesis was determined with WB and IHC analysis while there was a change in positive way in behaviour tests after insulin injection into rats with MetS.

Key Words: Hippocampus, Insulin, Insulin Signal Pathway, Metabolic Syndrome, Neurogenesis.



KAYNAKLAR

- AHMADPOUR, S. 2012. CNS complications of diabetes mellitus type 1 (type 1 diabetic encephalopathy). Pathophysiology and Complications of Diabetes Mellitus. InTech.
- ALBERTI, K. G., ECKEL, R. H., GRUNDY, S. M., ZIMMET, P. Z., CLEEMAN, J. I., DONATO, K. A., FRUCHART, J. C., JAMES, W. P., LORIA, C. M., SMITH, S. C., JR., INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION TASK FORCE ON, E., PREVENTION, HATIONAL HEART, L., BLOOD, I., AMERICAN HEART, A., WORLD HEART, F., INTERNATIONAL ATHEROSCLEROSIS, S. & INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF, O. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120, 1640-5.
- ALBERTI, K. G. & ZIMMET, P. Z. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 15, 539-53.
- ALTMAN, J. & DAS, G. D. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol*, 126, 337-89.
- AMARAL, D. G., SCHARFMAN, H. E. & LAVENEX, P. 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*, 163, 3-22.
- ANDERSON, R. J., FREEDLAND, K. E., CLOUSE, R. E. & LUSTMAN, P. J. 2001. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 24, 1069-78.
- APREA, J., NONAKA-KINOSHITA, M. & CALEGARI, F. 2014. Generation and characterization of Neurod1-CreER(T2) mouse lines for the study of embryonic and adult neurogenesis. *Genesis*, 52, 870-8.
- ARSLAN, M., ATMACA, A., AYVAZ, G., BAŞKAL, N., BEYHAN, Z., BOLU, E., CAN, S., ÇORAKÇI, A., DAĞDELEN, S. & DEMIRAĞ, N. G. 2009. METABOLİK SENDROM KILAVUZU.
- BACUS, S., FLOWERS, J. L., PRESS, M. F., BACUS, J. W. & MCCARTY, K. S., JR. 1988. The evaluation of estrogen receptor in primary breast carcinoma by computer-assisted image analysis. *Am J Clin Pathol*, 90, 233-9.
- BAYER, S. A. & ALTMAN, J. 1974. Hippocampal development in the rat: Cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *Journal of Comparative Neurology*, 158, 55-79.

- BEDSE, G., DI DOMENICO, F., SERVIDDIO, G. & CASSANO, T. 2015a. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. *Frontiers in neuroscience*, 9.
- BEDSE, G., DI DOMENICO, F., SERVIDDIO, G. & CASSANO, T. 2015b. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. *Front Neurosci*, 9, 204.
- BELZUNG, C., MISSLIN, R., VOGEL, E., DODD, R. H. & CHAPOUTHIER, G. 1987. Anxiogenic effects of methyl-beta-carboline-3-carboxylate in a light/dark choice situation. *Pharmacol Biochem Behav*, 28, 29-33.
- BENEDICT, C., HALLSCHMID, M., HATKE, A., SCHULTES, B., FEHM, H. L., BORN, J. & KERN, W. 2004. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 1326-34.
- BEST, P. J. & WHITE, A. M. 1999. Placing hippocampal single-unit studies in a historical context. *Hippocampus*, 9, 346-351.
- BIESSELS, G. J. & REAGAN, L. P. 2015. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nat Rev Neurosci*, 16, 660-71.
- BLAZQUEZ, E., VELAZQUEZ, E., HURTADO-CARNEIRO, V. & RUIZ-ALBUSAC, J. M. 2014. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 161.
- BOND, A. M., MING, G. L. & SONG, H. 2015. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*, 17, 385-95.
- BURN, C. C., PETERS, A., DAY, M. J. & MASON, G. J. 2006. Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. *Lab Anim*, 40, 353-70.
- CAIRNS, F. 2002. Studies of the mechanism of insulin resistance in hypertensive rats. University of Glasgow.
- CALVO-OCHOA, E. & ARIAS, C. 2015. Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models. *Diabetes Metab Res Rev*, 31, 1-13.
- CHOLERTON, B., BAKER, L. D. & CRAFT, S. 2013. Insulin, cognition, and dementia. *Eur J Pharmacol*, 719, 170-9.
- COSTELLO, D. A., CLARET, M., AL-QASSAB, H., PLATTNER, F., IRVINE, E. E., CHOUDHURY, A. I., GIESE, K. P., WITHERS, D. J. & PEDARZANI, P. 2012. Brain deletion of insulin receptor substrate 2 disrupts hippocampal synaptic plasticity and metaplasticity. *PLoS One*, 7, e31124.
- ÇALIŞKAN H, AKAT F., ZALOĞLU N. 2017. Şartsız Hayvan Anksiyete Testleri. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 16(1), 35-40.

- DE MAGALHAES FILHO, C. D., KAPPELER, L., DUPONT, J., SOLINC, J., VILLAPOL, S., DENIS, C., NOSTEN-BERTRAND, M., BILLARD, J. M., BLAISE, A., TRONCHE, F., GIROS, B., CHARRIAUT-MARLANGUE, C., AID, S., LE BOUC, Y. & HOLZENBERGER, M. 2017. Deleting IGF-1 receptor from forebrain neurons confers neuroprotection during stroke and upregulates endocrine somatotropin. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37, 396-412.
- EL FALOUGY, H., KUBIKOVA, E. & BENUSKA, J. 2008. The microscopical structure of the hippocampus in the rat. *Bratisl Lek Listy*, 109, 106-10.
- GAO, Z., URE, K., ABLES, J. L., LAGACE, D. C., NAVE, K. A., GOEBBELS, S., EISCH, A. J. & HSIEH, J. 2009. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci*, 12, 1090-2.
- GRAY, S. M., MEIJER, R. I. & BARRETT, E. J. 2014. Insulin regulates brain function, but how does it get there? *Diabetes*, 63, 3992-7.
- GRILLO, C. A., PIROLI, G. G., HENDRY, R. M. & REAGAN, L. P. 2009. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res*, 1296, 35-45.
- GRIGSBY, A. B., ANDERSON, R. J., FREEDLAND, K. E., CLOUSE, R. E. & LUSTMAN, P. J. 2002. Prevalence of anxiety in adults with diabetes: a systematic review. *J Psychosom Res*, 53, 1053-60.
- GUAL, P., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. & TANTI, J. F. 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 87, 99-109.
- GUSEL'NIKOVA, V. V. & KORZHEVSKIY, D. E. 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7, 42-7.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E., ÇAVUŞOĞLU, H., YEĞEN, B. Ç., AYDIN, Z. & ALICAN, İ. 2007. *Tıbbi fizyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri*.
- HALL, C. S. 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative psychology*, 18, 385.
- HAVRANKOVA, J., SCHMECHEL, D., ROTH, J. & BROWNSTEIN, M. 1978. Identification of insulin in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 5737-41.
- HO, N., SOMMERS, M. S. & LUCKI, I. 2013. Effects of diabetes on hippocampal neurogenesis: links to cognition and depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 37, 1346-62.
- HODGE, R. D. & HEVNER, R. F. 2011. Expression and actions of transcription factors in adult hippocampal neurogenesis. *Dev Neurobiol*, 71, 680-9.
- HUANG, P. L. 2009. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*, 2, 231-7.

- HWANG, I. K., YI, S. S., KIM, Y. N., KIM, I. Y., LEE, I. S., YOON, Y. S. & SEONG, J. K. 2008. Reduced hippocampal cell differentiation in the subgranular zone of the dentate gyrus in a rat model of type II diabetes. *Neurochem Res*, 33, 394-400.
- IHUNWO, A. O., TEMBO, L. H. & DZAMALALA, C. 2016. The dynamics of adult neurogenesis in human hippocampus. *Neural Regen Res*, 11, 1869-1883.
- İZCİ, Y. & ERBAŞ, Y. C. 2015. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları.
- JHA, S. K., JHA, N. K., KUMAR, D., AMBASTA, R. K. & KUMAR, P. 2017. Linking mitochondrial dysfunction, metabolic syndrome and stress signaling in Neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 1132-1146.
- JOSHI, S. R., PARIKH, R. M. & DAS, A. K. 2007. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. *J Assoc Physicians India*, 55 Suppl, 19-25.
- KAUR, J. 2014. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*, 2014, 943162.
- KEE, N., SIVALINGAM, S., BOONSTRA, R. & WOJTOWICZ, J. M. 2002. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods*, 115, 97-105.
- KEMPERMANN, G., JESSBERGER, S., STEINER, B. & KRONENBERG, G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27, 447-52.
- KEMPERMANN, G., SONG, H. & GAGE, F. H. 2015. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, a018812.
- KERN, W., PETERS, A., FRUEHWALD-SCHULTES, B., DEININGER, E., BORN, J. & FEHM, H. L. 2001. Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology*, 74, 270-80.
- KIM, B. & FELDMAN, E. L. 2012. Insulin resistance in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab*, 23, 133-41.
- KIER, E. L., KIM, J. H., FULBRIGHT, R. K. & BRONEN, R. A. 1997. Embryology of the human fetal hippocampus: MR imaging, anatomy, and histology. *AJNR Am J Neuroradiol*, 18, 525-32.
- KLEINRIDDER, A., FERRIS, H. A., CAI, W. & KAHN, C. R. 2014. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes*, 63, 2232-43.
- KNOWLES, W. D. 1992. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol*, 9, 252-63.
- KRONENBERG, G., REUTER, K., STEINER, B., BRANDT, M. D., JESSBERGER, S., YAMAGUCHI, M. & KEMPERMANN, G. 2003. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*, 467, 455-63.

- LANG, B. T., YAN, Y., DEMPSEY, R. J. & VEMUGANTI, R. 2009. Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats. *Brain Res*, 1258, 25-33.
- LAU, A. A., CRAWLEY, A. C., HOPWOOD, J. J. & HEMSLEY, K. M. 2008. Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Behav Brain Res*, 191, 130-6.
- LIN, Y. S., WANG, H. Y., HUANG, D. F., HSIEH, P. F., LIN, M. Y., CHOU, C. H., WU, I. J., HUANG, G. J., GAU, S. S. & HUANG, H. S. 2016. Neuronal Splicing Regulator RBFOX3 (NeuN) Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis and Synaptogenesis. *PLoS One*, 11, e0164164.
- MAHER, F., VANNUCCI, S. J. & SIMPSON, I. A. 1994. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J*, 8, 1003-11.
- MARTIN, E. D., SANCHEZ-PEREZ, A., TREJO, J. L., MARTIN-ALDANA, J. A., CANO JAIMEZ, M., PONS, S., ACOSTA UMANZOR, C., MENES, L., WHITE, M. F. & BURKS, D. J. 2012. IRS-2 Deficiency impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Cereb Cortex*, 22, 1717-27.
- MOTAMEDI, S., KARIMI, I. & JAFARI, F. 2017. The interrelationship of metabolic syndrome and neurodegenerative diseases with focus on brain-derived neurotrophic factor (BDNF): Kill two birds with one stone. *Metab Brain Dis*, 32, 651-665.
- MUNDET, X., POU, A., PIQUER, N., SANMARTIN, M. I., TARRUELLA, M., GIMBERT, R. & FARRUS, M. 2008. Prevalence and incidence of chronic complications and mortality in a cohort of type 2 diabetic patients in Spain. *Prim Care Diabetes*, 2, 135-40.
- NAGY, Z., ESIRI, M. M. & SMITH, A. D. 1997. Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *Acta Neuropathol*, 93, 294-300.
- OKATAN, E. N., KIZIL, S., GOKTURK, H., CAN, B. & TURAN, B. 2015. High-carbohydrate diet-induced myocardial remodelling in rats. *Current Research: Cardiology*, 2.
- PARK, C. R., SEELEY, R. J., CRAFT, S. & WOODS, S. C. 2000. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav*, 68, 509-14.
- PAULSEN, F., WASCHKE, J. & BÖCKERS, T. M. 2016. *Sobotta Anatomi Konu Kitabı*.
- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E. & BRILEY, M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14, 149-67.
- PESSIN, J. E. & SALTIEL, A. R. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, 106, 165-9.
- PLATA-SALAMAN, C. R. 1991. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Neurosci Biobehav Rev*, 15, 243-58.

- PLUM, L., SCHUBERT, M. & BRUNING, J. C. 2005. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 59-65.
- PORTER, A. G. & JANICKE, R. U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 99-104.
- REED, B. C., RONNETT, G., CLEMENTS, P. & LANE, M. 1981. Regulation of insulin receptor metabolism. Differentiation-induced alteration of receptor synthesis and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 3917-3925.
- ROBERT M. BERNE, M. N. L., BRUCE M. KOEPPEN, BRUCE A. STANTON 2008. *Fizyoloji*.
- ROBERTS, C. K., HEVENER, A. L. & BARNARD, R. J. 2013. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol*, 3, 1-58.
- ROOIJACKERS, H. M., WIEGERS, E. C., TACK, C. J., VAN DER GRAAF, M. & DE GALAN, B. E. 2016. Brain glucose metabolism during hypoglycemia in type 1 diabetes: insights from functional and metabolic neuroimaging studies. *Cell Mol Life Sci*, 73, 705-22.
- ROSOLOVA, H. & PODLIPNY, J. 2009. [Anxious-depressive disorders and metabolic syndrome]. *Vnitr Lek*, 55, 650-2.
- ROSS, M. H. & PAWLINA, W. 2006. *Histology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- SADLER, T. W. 2011. *Langman's medical embryology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- SCHARFMAN, H. E., SOLLAS, A. L., SMITH, K. L., JACKSON, M. B. & GOODMAN, J. H. 2002. Structural and functional asymmetry in the normal and epileptic rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 454, 424-39.
- SCHULTZ, C. & ENGELHARDT, M. 2014. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci*, 34, 6-17.
- SHPAKOV, A. O., DERKACH, K. V. & BERSTEIN, L. M. 2015. Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA*, 1, FSO25.
- SHPILBERG, Y., BEAUDRY, J. L., D'SOUZA, A., CAMPBELL, J. E., PECKETT, A. & RIDDELL, M. C. 2012. A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding. *Dis Model Mech*, 5, 671-80.
- SILVA, D. 2014. Neural Mechanisms of Spatial Memory: Dissociating the Encoding and Retrieval of Hippocampal Replay.
- SIMPSON, I. A., DWYER, D., MALIDE, D., MOLEY, K. H., TRAVIS, A. & VANNUCCI, S. J. 2008. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E242-53.
- SONGUR, A., ÖZEN, O. A. & SARSILMAZ, M. 2001. Hipokampus. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 21, 427-431.

- STRANGE, B. A., WITTER, M. P., LEIN, E. S. & MOSER, E. I. 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci*, 15, 655-69.
- SZABLEWSKI, L. 2017. Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 55, 1307-1320.
- TEYLER, T. J. & DISCENNA, P. 1984. The topological anatomy of the hippocampus: a clue to its function. *Brain Res Bull*, 12, 711-9.
- TIEN, R. D., FELSBURG, G. J. & CRAIN, B. 1992. Normal anatomy of the hippocampus and adjacent temporal lobe: high-resolution fast spin-echo MR images in volunteers correlated with cadaveric histologic sections. *AJR Am J Roentgenol*, 159, 1309-13.
- VALERO, J., PARIS, I. & SIERRA, A. 2016. Lifestyle Shapes the Dialogue between Environment, Microglia, and Adult Neurogenesis. *ACS Chem Neurosci*, 7, 442-53.
- VANDERWOLF, C. H. 1987. Near-total loss of 'learning' and 'memory' as a result of combined cholinergic and serotonergic blockade in the rat. *Behav Brain Res*, 23, 43-57.
- VANNUCCI, S. J., MAHER, F. & SIMPSON, I. A. 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*, 21, 2-21.
- VON BOHLEN UND HALBACH, O. 2011. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 345, 1-19.
- WALF, A. A. & FRYE, C. A. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*, 2, 322-8.
- YANAGITA, T., NEMOTO, T., SATOH, S., YOSHIKAWA, N., MARUTA, T., SHIRAISHI, S., SUGITA, C. & MURAKAMI, M. 2013. Neuronal insulin receptor signaling: a potential target for the treatment of cognitive and mood disorders. *Mood Disorders*. InTech.
- ZEMVA, J., UDELHOVEN, M., MOLL, L., FREUDE, S., STOHR, O., BRONNEKE, H. S., DRAKE, R. B., KRONE, W. & SCHUBERT, M. 2013. Neuronal overexpression of insulin receptor substrate 2 leads to increased fat mass, insulin resistance, and glucose intolerance during aging. *Age (Dordr)*, 35, 1881-97.
- ZHANG, J. & JIAO, J. 2015. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int*, 2015, 727542.
- ZHAO, W. Q. & ALKON, D. L. 2001. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol*, 177, 125-34.
- ZHAO, W. Q., CHEN, H., QUON, M. J. & ALKON, D. L. 2004. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol*, 490, 71-81.

Ek 1. Etik Kurul Kararı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ :02/08/2017
TOPLANTI NO : 2017-16
DOSYA NO : 2016-44
KARAR NO : 2017-16-133

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Deniz Billur'un yaptığı, araştırmacı olarak Prof.Dr.Belma Turan, Prof.Dr.Belgin Can, Arş.Gör.Pınar Bayram, Arş.Gör.Ayşegül Toy Durak, Uzm.Bio.Şule Kızıl ve Arş.Gör.Yusuf Olgar'ın katıldığı "Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Hipokampusun Nörogenezine Etkili Faktörlerin İncelenmesi" başlıklı araştırma projesi Kurulumuzun 24/02/2016 tarih ve 2016-5-51sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Proje Yürütücüsü Yrd.Doç.Dr.Deniz Billur 14.07.2017 tarih ve 21634 sayılı dilekçe ile Kurulumuza yaptığı başvuruda, Kurulumuzun 2016-5-51 sayılı kararı dahilinde kullanılan hayvanlara sakrifikasyon işleminden önce davranış testlerinin uygulanmasının proje içeriğine ilave edilmesini ve davranış testlerini uygulamak üzere Arş.Gör.Hasan Çalışkan'ın araştırma ekibine katılmasını talep etmiştir.

Yrd.Doç.Dr.Deniz Billur'un dilekçesi ve ekleri Kurulumuzca incelenmiş ve Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11. maddesinin 5. fıkrası kapsamında değerlendirilmiştir. Kurulumuzun 24/02/2016 tarih ve 2016-5-51sayılı kararıyla onaylanan ve Yürütücülüğünü Yrd.Doç.Dr.Deniz Billur'un yaptığı "Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Hipokampusun Nörogenezine Etkili Faktörlerin İncelenmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriğine davranış testlerinin ilave edilmesinin ve Arş.Gör.Hasan Çalışkan'ın araştırma ekibine katılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

ASLININ AYNIDIR
02/08/2017


Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Pınar

Soyadı: Bayram

Doğum yeri ve tarihi: Aslanapa, 07.07.1987

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Balkiraz Mah. Mamak Cad. 44/13 Mamak Ankara, 0543 918 98 49

II- Eğitimi

2006-2011 Selçuk Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru)

Veteriner Hekim, 2011

Araştırma Görevlisi, 2012

IV- Mesleki Deneyimi

Veteriner Hekim

2011-2012

Kütahya İli Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği

Araştırma Görevlisi	Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri
2012-2013	Bölümü Histoloji ve Embriyoloji ABD (35. Madde ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesine görevlendirme)
Araştırma Görevlisi	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri
2013-Halen	Bölümü Histoloji ve Embriyoloji ABD (Kafkas Üniversitesi adına 35. Madde ile görevlendirme)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Sex determination from the radiographic measurements of calcaneus. Uzuner Muhammet Bora, Geneci Ferhat, Ocak Mert, **Bayram Pınar**, Sancak İbrahim Tanzer, Dolgun Nimet Anil, Sargon Mustafa Fevzi (2017). Anatomy, 10(3), 200-204., Doi: 10.2399/ana.16.039
2. Punica granatum L. Juice Attenuates Experimental Cerebral Vasospasm in the Rabbit Subarachnoid Hemorrhage Model: A Basilar Artery Morphometric Study and Apoptosis. Güvenç Yahya, Demirci Adnan, Billur Deniz, Aydın Sevim, Özeren Ersin, **Bayram Pınar**, Dilli Alper, Gökçe Emre Cemal, Yaman Onur, Çelik Haydar, Karatay Mete, Alagöz Fatih, Kaptanoğlu Erkan (2017). Journal of Neurological Surgery Part A: Central European Neurosurgery, 78(02), 124-131., Doi: 10.1055/s-0036-1584906 PMID: 27509316
3. Incremento de la expresión de Bax proapoptótico y disminución de la expresión de Bcl 2 antiapoptótico en recién nacidos con enterocolitis necrosante. Ateş Ufuk, Göllü Bahadır Gülnur, Küçük Gönül, Billur Deniz, Koloğlu Meltem, Yılmaz Yavuz, Özkan Ulu Hülya, **Bayram Pınar**, Bağrıaçık Emin Ümit, Dindar Hüseyin (2016). Archivos Argentinos de Pediatría, 114(3), 243-247., Doi: 10.5546/aap.2016.243 PMID: 27164337

Vaka Takdimi

1. Nüks Maküler Kornea Distrofisi Nedeniyle Rekeratoplasti Uygulanan Bir Olguda Elektron Mikroskopi BulgularıElectron Microscopy Findings in a Re-Keratoplasty Patient with Recurrent Macular Corneal Dystrophy. Göktürk Hilal, Bilici Serdar, **Bayram Pınar**, Billur Deniz, Yalçındağ Fatime Nilüfer, Can Belgin, Türkiye Klinikleri J Ophthalmol, Doi: 10.5336/ophthal.2016-53252

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. Histopathological evaluation of desferrioxamine effect on fat graft viability. Çelik Bahadır, Billur Deniz, **Bayram Pınar**, Göktürk Hilal, Kızıl Şule, Can Belgin, Sevin Kutlu (2017). 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2017) (**Özet Bildiri/Poster**)
2. Structural effects of microneedling and topical retinol palmitate on burn wounds. Alpat Servet Elçin, Kaya Burak, Göktürk Hilal, **Bayram Pınar**, Kızıl Şule, Can Belgin, Gültan Serdar Mehmet (2017). 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (**Özet Bildiri/Sözlü Sunum**)
3. Immunohistochemical Analysis Of The Antifibrotic Effect Of Pirfenidone On Epidural Fibrosis In The Postlaminectomy Rat Model. Billur Deniz, Güvenç Yahya, Yaman Mesut Emre, Öztürk Yaşar, **Bayram Pınar**, Kızıl Şule, Aydın Sevim, Kaptanoğlu Erkan (2017). 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (**Özet Bildiri/Poster**)
4. Sex determination from the radiographic measurementsof calcaneus. Uzuner Muhammet Bora, Geneci Ferhat, Ocak Mert, **Bayram Pınar**, Sancak İbrahim Tanzer, Sargon Mustafa Fevzi (2016). 17th Turkish National Anatomy Congress with International Participation, 10(Suppl 2), 91-205., Doi: 10.2399/ana.16.091s (**Özet Bildiri/Sözlü Sunum**)
5. Microanatomic examination of histological sections taken from silicone plastinates GENECİ Ferhat, Ocak Mert, Uzuner Muhammet Bora, **Bayram Pınar**, Kızıl Şule, Billur Deniz, Sargon Mustafa Fevzi (2016). 17th Turkish National Anatomy Congress with International Participation, 10(Suppl 2), 91-205., Doi: 10.2399/ana.16.091s (**Özet Bildiri/Sözlü Sunum**)

6. Does Low Frequency Electrical Stimulation Enhance Peripheral Nerve Regeneration Following Crush Injury to Rats An Electrophysiological Histopathological and Histomorphometrical Evaluation. Aydın Gülümser, Katmerlikaya Kıvanç, Billur Deniz, Bakar Bülent, Aydın Sevim, Tosun Aliye, **Bayram Pınar**, Yorulmaz Elem, Özdemir I (2016). 10th International Society Of Physical And Rehabilitation Medicine (Isprm) Congress (**Poster Bildiri**)
7. An overview to trauma from subfornical organ window Billur Deniz, Edebali Nurullah, **Bayram Pınar**, Kızıl Şule, Göktürk Hilal, Can Belgin, Açıkgöz Bektaş (2016). 14th National Congress of Neuroscience, 10(Suppl 1), 1-85., Doi: 10.2399/ana.16.001s (**Özet Bildiri/Poster**)
8. The Effects of Heparin and Metamizole Sodium on the Fat Graft Viability. Hameed Murad, Billur Deniz, **Bayram Pınar**, Kaya Burak, Serel Savaş (2016). European Association of Plastic Surgeons. Twenty-Seventh Annual Meeting. (**Özet Bildiri/Sözlü Sunum**)
9. Hiperkolesterolemik diyet etkisinde tavşan aort duvarında histopatolojik ve ultrastrüktürel değişikliklerin gösterilmesi. Özkan Özer, Billur Deniz, Kızıl Şule, **Bayram Pınar**, Afshani Masoud, Türközkan Nurten, Öztürk Hasan Serdar (2014). 6th International Scientific Conference of Iranian Academicians in Turkey (**Poster Bildiri**)
10. Plantago majorun hiperkolesterolemik diyetle ateroskleroz oluşturulan tavşanlarda ateroskleroz ve aterosklerotik risk faktörleri üzerine etkileri. Özkan Özer, Billur Deniz, Kızıl Şule, **Bayram Pınar**, Afshani Masoud, Türközkan Nurten, Öztürk Hasan Serdar (2016). Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Doi: 10.2399/ana.16.001s (**Özet Bildiri/Poster**)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. Deneysel tip 1 Diabetes Mellitus ta antrenmanın akciğerler üzerindeki etkisi. Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği (TÜSAD) 38. Ulusal Kongresi, 15-19 Ekim 2016, İzmir (**Poster Sunumu**)
2. Deneysel Kafa Travması Sonrası Sirkümventriküler Organ Kapiller Yapılarının İnce Yapı Düzeyinde İncelenmesi. 22. Elektron Mikroskopi Kongresi, 2-4 Eylül 2015, İstanbul, (**Poster Sunumu**)
3. Maküler Kornea Distrofisi Tanısında Elektron Mikroskopinin Yeri Olgu Sunumu. 22. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2-4 Eylül 2015, İstanbul, (**Poster Sunumu**)

4. Kan Sinir Bariyeri Sıçan Siyatik Sinirinde Histolojik Yöntemlerle Gösterilmesi. 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi 13.Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015, Konya **(Poster Sunumu)**
5. Sıçanlarda Periferik sinir Travması Sonrası Perinöral Hücrelerin İmmünohistokimyasal ve Ultrastrüktürel Olarak İncelenmesi. XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Mayıs 2014, Ankara **(Poster Sunumu)**

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri:

1. Metabolik Sendromlu Sıçan Kortikal Nöronlarında Endoplazmik Retikulum Stresiyle İlgili Faktörlerin Araştırılması, Ankara Üniversitesi BAP, Araştırmacı, , 07/11/2016 (Devam Ediyor)
2. Mikroporasyon ve Topikal Retinol Palmitat Uygulamasının Yanık Hasarı Üzerine Olan Etkilerinin Sıçan Modelinde Araştırılması, Ankara Üniversitesi BAP, Araştırmacı, 13/02/2015 - 13/08/2015
3. Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Hipokampusun Nörogenezine Etkili Faktörlerin İncelenmesi, Ankara Üniversitesi BAP, Araştırmacı, 07/11/2016 (Devam Ediyor)

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri:

- Eğiticilerin Eğitimi Sertifika Programı, 2015, Ankara Üniversitesi, Ankara
- Öğretmenlik Sertifikası Programı (Pedagojik Formasyon), 2013, Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesi, Ankara
- Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası 12-23 Ekim 2009, GATA, Ankar
- Laboistatistik: Temel Laboratuvar Bilimleri İçin Biyoistatistik Kursu, 23-24 Mayıs 2015, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Ankara
- Güncel İyi Üretim Uygulamalarında (cGMP) Hücresel Tedavi Ürünleri Kalite standartları Kursu-TÜBA, 10 Nisan 2015, Antalya
- Biyoistatistik Çözümleme Kursu, 26 Mayıs 2014, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

- Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi Kursu 30 Mayıs-01 Haziran 2014, THED, Ankara Üniversitesi-TÜBİTAK Kursu)

Bilimsel Toplantılarda Alınan Ödüller

1. Best poster award in first prize, 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemisry, FRANSA, 2017
2. Poster Birincilik Ödülü, Türk Elektron Mikroskopi Derneği, 2015

