T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYABET MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇAN HİPOKAMPUSÜNDE ALZHEİMER İLİŞKİLİ ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN GENLERİNİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

Lütfiye ÖZPAK

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

ADANA-2019

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYABET MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇAN HİPOKAMPUSÜNDE ALZHEİMER İLİŞKİLİ ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN GENLERİNİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

Lütfiye ÖZPAK

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TDK-2016-5883 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:……
ADANA-2019

KABUL ONAY

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

"Diyabet Modeli Oluşturulmuş Sıçan Hipokampusünde Alzheimer İlişkili ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN Genlerinin Ekspresyon Profillerinin İncelenmesi"

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 08 / 02 / 2019

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. H.Ümit LÜLEYAP
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ
Harran Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Ahmet Turan EVLİCE
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK
Mustafa Kemal Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim 06/03/2019

İMZA
Adı Soyadı
Lütfiye ÖZPAK

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tezin Konusu : Diyabet Modeli Oluşturulmuş Sıçan Hipokampusünde Alzheimer İlişkili ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN Genlerinin Ekspresyon Profillerinin İncelenmesi
Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☒

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon : 541 6282293
E-Posta : payfer@cu.edu.tr
Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 506 5537290
E-Posta : lutfiyeozpak@gmail.com
Adresi : Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve çalışmamızın her aşamasında beni destekleyen, yönlendiren ve motive eden, sorunların çözümüne hoşgörülü, sabırlı yaklaşımını ve etik anlayışını örnek aldığım danışmanım sayın Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI' na en derin saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen, doktora eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız değerli Öğretim Üyelerinden Öğr. Gör. Sabriye KOCATÜRK SEL'e, Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ'a, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN'a, Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP' a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Davut ALPTEKİN' e ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Çalışmamızın deneysel aşamasında her türlü destek ve yardımlarından dolayı Biyofizik Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerinden Doç. Dr. Işıl ÖCAL'a, Arş. Gör. Murat TOKUŞ'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. N. Seda ILGAZ ve Doktora Öğrencisi Hale ÖKSÜZ'e başım her sıkıştığında yanımda oldukları ve tez süresi boyunca yardımlarını esirgemedikleri için teşekkürlerimi sunuyorum.

İstatistik uygulamalarında yardımcı olan Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Yaşar SERTDEMİR ve Arş. Gör. Hülya BİNOKAY'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TDK-2016-5883 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Zübeyde ÖZPAK, babam Nuh Naci ÖZPAK ve abim Ahmet ÖZPAK'a sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi iletiyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ONAY ii
ETİK BEYANI iii
TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xi
ÖZET xiv
ABSTRACT xv
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİ 4
2.1. Diabetes Mellitus 4
2.1.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi 4
2.1.2. Tanı Kriterleri 5
2.1.3. Sınıflandırılması 6
2.2. Tip 2 Diyabet 7
2.2.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi 7
2.2.2. Tip 2 Diyabet Patofizyolojisi 8
2.2.2.1. İnsülin Direnci 8
2.2.2.2. Beta (β) Hücre Yoğunluğunda ve Fonksiyonunda Azalma 10
2.2.3. Tip 2 Diyabet Genetiği 11
2.2.4. Risk Faktörleri 12
2.2.4.1. Obezite 13
2.2.5. Deneysel Tip 2 Diyabet Modelleri 14
2.3. Alzheimer Hastalığı (A. H.) 15
2.3.1. Alzheimer Hastalığı Patolojisi (AB ve NFT) 16
2.4. Tip 2 Diyabet ve Alzheimer Hastalığı 18
2.4.1. Tip 2 Diyabet ve Alzheimer Hastalığında Ortak Patofizyolojik Mekanizmalar 19

2.4.1.1. İnsülin ve İnsülin Reseptörlerinde Bozukluk 20
2.4.1.2. Amiloid Peptidler 22
2.4.1.3. NFT ve Hiperfosforile Tau Proteini 23
2.4.1.4. Protein Kinaz B (PKB/Akt) ve Glikojen Sentaz Kinaz 3 (GSK3) 24
2.4.1.5. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE) ve O-bağlı N-asetil Glukozamin (O-GlcNAc) 24
2.4.1.6. IDE (İnsulin Degrade Eden Enzim) 26
2.4.1.7. ApoE4 26
2.4.1.8. Oksidatif Stres ve İnflamasyon 26
2.4.1.9. Kan Beyin Bariyeri Hasarı (KBB) 27
2.4.1.10. Obezite ve Serbest Yağ Asitleri 28
2.5. Beyin Ekstraselüler Matriksi ve Alzheimer İlişkisi 29
2.5.1. ADAMTS4 Geni 32
2.5.2. RELN Geni 34
2.5.3. TIMP3 Geni 36
2.5.4. BCAN Geni 37
3. GEREÇ ve YÖNTEM 39
3.1. Gereçler 39
3.1.1. Cihazlar 39
3.1.2. Kimyasal Malzemeler 39
3.1.3. Sıçanların Temin Edilmesi ve Bakımı 40
3.2. Yöntem 40
3.2.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi ve Deney Öncesi Hazırlık 40
3.2.1.1. Çalışmada Kullanılan Yemin Hazırlanması 41
3.2.1.2. Streptozotosin Hazırlanması 42
3.2.1.3. İnsülin Çözeltisinin Hazırlanması 42
3.2.2. Ratlarda İnsülin Direnci Oluşturma 43
3.2.3. Tip 2 Diyabet Modelinin Oluşturulması 43
3.2.4. Ağırlık ve Açlık Kan Glikozu Ölçümü 43
3.2.5. Deneyin Sonlandırılması 44
3.2.6. Biyokimyasal Analizler 44
3.2.6.1. İnsülin Tolerans Testi (ITT) 44

3.2.6.2. İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi 44
3.2.7. Histopatolojik Analizler 44
3.2.8. Moleküler Analizler 45
3.2.8.1. RNA İzolasyonu 45
3.2.8.2. cDNA Sentezi 46
3.2.8.3. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 46
3.2.9. İstatistiksel Analizler 48
4. BULGULAR 49
4.1. Canlı Ağırlık Değişimi Verileri 49
4.2. Kan Glikoz Değişimi Verileri 50
4.3. Serum İnsülin Seviyeleri 52
4.4. İnsülin Tolerans Testi (ITT) 53
4.5. Histopatolojik Analiz Sonuçları 54
4.6. Moleküler Analiz Sonuçları 57
5. TARTIŞMA 60
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 65
KAYNAKLAR 67
ÖZGEÇMİŞ 73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No: **Sayfa No:**

Şekil 1. Tip 2 diyabet patofizyolojisi[27] 11

Şekil 2. Alzheimer Hastalığı Patolojisi[47] 16

Şekil 3. Amiloid prekürsör proteininin proteolizi[52] 18

Şekil 4. Alzheimer hastalığı ve Diyabette ortak mekanizmalar. (İDE: İnsülin degrade eden enzim, Aβ: Amiloid beta, AGE: İleri glikasyon son ürünleri, ROS: Reaktif oksijen türleri) [56] 20

Şekil 5. İnsülin ve insülin reseptörünün eksprese olduğu beyin kısımları. 22

Şekil 6. Periferal ve nöronal insülin direnci komplikasyonları (T2D: Tip 2 diyabet, FFA: serbest yağ asidi, PKB: protein kinaz B, GSK3B: Glikojen sentaz kinaz 3B, IDE: İnsülin degrade eden enzim, KBB: Kan beyin bariyeri, NFT: Nörofibriller tau proteini)[56]. 29

Şekil 7. Presinaptik ECM ve sinaptik plastisite. (tPA: doku plazminojen aktivatörü, ADAMTS: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, MMP: matrix metallo proteinase)[70]. 31

Şekil 8. Reelin geni ve proteolitik işlenmesi[77]. 34

Şekil 9. Tau fosforilasyonunun ADAMTS ve reelin aracılı düzenlenmesi (PKB: protein kinaz B, GSK3β: Glikojen sentaz kinaz 3β, PI3K: Fosfotidilinositol 3 kinaz, ADAMTS: Bir disintegrin ve trombospondin motifi içeren metalloproteinaz, VLDRL: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü, ApoER2: apolipoprotein receptor 2)[74,78]. 36

Şekil 10. Yüksek yağlı yem hazırlanması 42

Şekil 11. Ratların ortalama canlı ağırlık değişimleri 50

Şekil 12. Ratların Ortalama Kan Glikoz Değişimleri 52

Şekil 13. Ratların Serum İnsülin Seviyeleri Değişimleri 53

Şekil 14. **A.** HFD grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücreler normal görünümde (ok). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **B.** HFD grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücreler normal görünümde (ok). Cresyl violet boyama. Büyütme 200X. **C.** Kontrol grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücreler normal görünümde (ok). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **D.** Kontrol grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücreler normal görünümde (ok). Cresyl violet boyama. Büyütme 200X. 55

Şekil 15. **A.** HFD+STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücrelerden bazılarının büzüşmüş olduğu ve koyu boyandığı görünmekte (oklar). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **B.** HFD+STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki büzüşmüş (oklar) hücreler ve normal

nöronlar (okbaşı). Cresyl violet boyama. Büyütme 200X. **C.** STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücrelerden bazılarınn büzüşmüş olduğu ve koyu boyandığı görünmekte (oklar). Normal nöronlar katmanda görünmekte (okbaşı). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **D.** STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki büzüşmüş (oklar) hücreler. Cresyl violet boyama. Büyütme 200X. **E.** HFD+STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Molekuler tabakada yer alan plak benzeri boyanmış alan (ok). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **F.** STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Moleküler tabakada yer alan Cresyl violet pozitif plak benzeri alanlar (oklar). Cresyl violet boyama. Büyütme 200X.....56

Şekil 16. ADAMTS4 geni ekspresyon analizi verileri (HFD+STZ: yüksek yağlı diyet+streptozotosin, HFD: yüksek yağlı diyet, STZ: streptozotosin) 57

Şekil 17. TIMP3 geni ekspresyon analizi verileri (HFD+STZ: yüksek yağlı diyet+streptozotosin, HFD: yüksek yağlı diyet, STZ: streptozotosin) 58

Şekil 18. RELN geni ekspresyon analizi verileri (HFD+STZ: yüksek yağlı diyet+streptozotosin, HFD: yüksek yağlı diyet, STZ: streptozotosin).....58

Şekil 19. BCAN geni ekspresyon analizi verileri (HFD+STZ: yüksek yağlı diyet+streptozotosin, HFD: yüksek yağlı diyet, STZ: streptozotosin) 59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No: **Sayfa No:**

Çizelge 1. Diyabet için tanı kriterleri[7] 5

Çizelge 2. Diyabet ve bozulmuş glikoz regülasyonu için yeni tanı kriterleri[11] 6

Çizelge 3. Deney grupları ve yapılan uygulamalar 41

Çizelge 4. Standart yem ve yüksek yağlı yem içerikleri[14] 42

Çizelge 5. Ratların ortalama ağırlık değişimleri (X : ortalama, SS : standart sapma) 49

Çizelge 6. Ratların ortalama kan glikoz değişimleri (X : ortalama, SS : standart sapma) 51

Çizelge 7. Ratların Serum insülin seviyeleri 52

Çizelge 8. İnsülin tolerans testi sonucu kan glikoz değerleri (X : ortalama, SS : standart sapma) 54

Çizelge 9. Gen Ekspresyonu Verileri 59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

11β-HSD-1	11 beta hidroksi steroid dehidrojenaz
ADA	Amerika Diyabet Birliği
ADAMTS 4	Trombospondin motifi içeren bir disintegrin ve metalloproteinaz
ADDL	Amiloid beta Kökenli difüze olabilen ligand
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri
AH	Alzheimer Hastalığı
AICD	APP Hücre İçi Alan
APG	Açlık Plazma Glikoz Düzeyi
ApoE	Apolipoprotein E
ApoEr2	Apolipoprotein reseptör 2
APP	Amiloid Prekürsör Protein
Aβ42	Amiloid beta 42
BAG	Bozulmuş Açlık Glikozu
BCAN	Brevikan
BGT	Bozulmuş Glikoz Toleransı
CB-1	Kannabinoid 1
CS	Kondroitin Sülfat
DM	Diabetes Mellitus
ECM	Ekstraselüler Matriks
FFA	Serbest Yağ Asitleri
GCK	Glikokinaz
GLUT 4	Glikoz Taşıyıcı tip 4
GSK3	Glikojen Sentaz 3
HbA1c	Hemoglobin A1c
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HFD	Yüksek Yağlı Diyet
HNF1A	Hepatosit Nükleer Faktör 1A
HS	Heparan Sülfat
IAPP	Adacık Amiloid Polipeptidi
IDDM	İnsüline Bağımlı Diyabet

IDE	İnsülin Degrade Eden Enzim
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP	IGF-1'e Bağlanan Protein
IL-6	İnterlökin 6
IRS-1	İnsülin Reseptör Substrat 1
ITT	İnsülin Tolerans Testi
İR	İnsülin Reseptörü
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KS	Keratan Sülfat
MAP	Mikrotübül Asosiyasyon Protein
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MODY	Gençlerde görülen tek gene bağlı diyabet
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NDDG	Ulusal Diyabet Data Grup
NFY	Nörofibriller Yumak
NHANES	Ulusal Beslenme ve Besin İnceleme Araştırmaları
NIDDM	İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet
O-GlcNAc	O bağlı N asetil glikozamin
OGTT	Oral Glikoz Tolerans Testi
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PI3K	Fosfotidil İnositol 3 Kinaz
PKB	Protein Kinaz B
PNN	Perinöronal Ağlar
PPAR-γ	Peroksizom Proliferatör Aktif Reseptör Gama
PSEN 1	Presenilin 1
PSEN 2	Presenilin 2
RAGE	AGE Reseptörü
RELN	Reelin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCAT	Subkutan Adipoz Doku
STZ	Streptozotosin

T2D	Tip 2 Diyabet
TIMP3	Doku İnhibitör Metalloproteinaz 3
TLR4	Toll like reseptör kinaz 4
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör-alfa
tPA	Doku Plazminojen Aktivatörü
TURDEP	Türkiye Diyabet, Obezite, Hipertansiyon Epidemiyolojisi
VAT	Viseral Adipoz Doku
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein Receptor
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Diyabet Modeli Oluşturulmuş Sıçan Hipokampusünde Alzheimer İlişkili ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN Genlerinin Ekspresyon Profillerinin İncelenmesi

Tip 2 Diyabet (T2D), insülin sekresyonunda bozukluk ya da insülin etkisine karşı direnç veya her iki durumun bir arada bulunması ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Alzheimer hastalığı, nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik bozukluklara sebep olan ilerleyici ve geri dönüşümsüz bir beyin hastalığıdır. Alzheimer hastalığı ve Tip 2 Diyabet endüstrileşmekte olan ülkelerde çok fazla sayıda insanı etkileyen ve dejeneratif süreçlerinde ortak moleküler mekanizmalar yer alan hastalıklardır. Bu bağlamda çalışmamızın amacı, yüksek yağlı diyet (HFD) ve streptozotosin (STZ) enjeksiyonu ile tip 2 diyabet modeli geliştirdiğimiz ratlarda, beyin ekstraselüler matriks moleküllerini kodlayan Alzheimer hastalığı patofizyolojisi ile de ilişkili olduğu düşünülen ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmesidir.

Toplamda 40 rat, HFD+STZ (10), HFD (10), STZ (10), Kontrol (10) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. 20 haftalık deney süresi boyunca tüm ratların ağırlık ve kan glikoz seviyeleri kaydedildi, insülin tolerans testi yapıldı. Deney süresi sonunda ratların hipokampusleri izole edildikten sonra bir kısmından Real time PCR yöntemi ile gen ekspresyonu seviyeleri belirlenirken, diğer kısmı ile histopatolojik incelemeler yapıldı.

Çalışma sonuçlarımıza göre, deneysel tip 2 diyabet modeli ratlarda histolojik incelemede plak benzeri yapılara rastlanırken, moleküler incelemelerde ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genlerinin ekspresyon seviyeleri HFD+STZ ve STZ gruplarında kontrole kıyasla azalmışken, HFD grubunda inhibitör TIMP3 hariç ekspresyon seviyeleri artmıştır.

Sonuç olarak, bu genlerin, T2D ve Alzheimer hastalık örgüsünde hangi aşamada nasıl bir rol oynadıklarına dair yorum yapılabilmesi ve bu hastalıkların önlenmesi, tedaviye yönelik yeni yaklaşımlar benimsenebilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

<u>Anahtar Sözcükler:</u> Tip 2 diyabet, Alzheimer Hastalığı, ADAMTS4 geni, TIMP3 geni, RELN geni, BCAN geni.

ABSTRACT

İnvestigation the Expression Profiles of Alzheimer Associated Genes, ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN in the Hippocampus of Experimantal Diabetic Model Rats

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disorder characterized by a disorder in insulin secretion or resistance to insulin action or a combination of both conditions. Alzheimer's disease is a progressive and irreversible brain disease that causes neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. Alzheimer's disease and type 2 diabetes are diseases that affect a large number of people in industrialized countries and involve common molecular mechanisms in degenerative processes. The aim of our study is to investigate the expression levels of ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genes, which encode the extracellular matrix molecules and are thought to be related to the pathophysiology of Alzheimer's disease, in rats that we developed type 2 diabetes model by injection of high fat diet (HFD) and streptozotocin (STZ).

In total, 40 rats were divided into 4 groups as HFD + STZ (10), HFD (10), STZ (10), and Control (10). Weight and blood glucose levels of all rats were recorded and insulin tolerance test was performed. At the end of the experimental period, hippocampus was isolated from the rats and a part of them were used for gene expression analysis by Real time PCR, and other parts were used for hystological analyses.

According to our results, plaque-like structures were found in histological examination of experimental type 2 diabetes model, in molecular studies, expression levels of ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genes were decreased in HFD + STZ and STZ groups compared to control, whereas expression levels except inhibitor TIMP3 were increased in HFD group.

As a result, for understanding the role of these genes in the T2D and Alzheimer's disease and for preventing the diseases and for adopting new approaches to treatment, further studies are to be done.

Keywords: **Type 2 diabetes, Alzheimer Disease, ADAMTS4 gene, TIMP3 gene, RELN gene, BCAN gene.**

1. GİRİŞ

Yeterli insülin üretilemediğinde ve/veya insülinin biyolojik etkinliğinde meydana gelen azalma sonucu gelişen insülin direnci nedeniyle organizmanın temel biyomoleküllerden yeterince yararlanamadığı Diabetes Mellitus (DM), kronik bir metabolizma hastalığıdır[1].

Diyabet gelişmişlik düzeyi ile ilişkili olmayıp sağlıksız beslenme ve sedanter yaşam sonucu küresel ve toplumsal felakete dönüşmektedir. Uluslar arası Diyabet Federasyonu'nun 2017 yılında yayınladığı diyabet atlasına göre, dünyada 425 milyondan fazla insan diyabetli ve bu insanların üçte biri 65 yaş üstü bireylerden oluşuyor ve dünyadaki diyabetli birey sayısının 2045 yılında %48 oranında artarak 629 milyona ulaşacağı düşünülüyor[2].

Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association [ADA]) 1998 yılında diyabeti, 4 genel kategoride toplamıştır[8]. Bunlardan Tip 2 diyabet, patolojisinde hala karanlık noktalar olan, tüm diyabet olgularının %90-95'ni oluşturan, nisbi insülin eksikliği ve insülin direnci görülen, genellikle orta yaş ve sonrasında ortaya çıkan ve yaşlanma ile görülme olasılığı artan bir diyabet tipidir. Günümüzde beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzının değişmesi ve artan obezite oranları nedeniyle çocukluk ve ergenlik dönemlerinde de tip 2 diyabet sıklığı artmaktadır[12,13]. Tip 2 diyabet, insülin sekresyonunda bozukluk ya da insülin etkisine karşı direnç veya her iki durumun bir arada bulunması ile, hiperglisemiyle karakterize metabolik bir hastalıktır[14].

Tip 2 diyabet patofizyolojisinde, insülin duyarlılığında azalma, pankreas beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğu sonucu insülinin yetersiz salgılanması, karaciğerde glikoz üretiminde artış meydana gelir[16]. İnsülinin biyolojik etkinliği için, pankreas beta hücrelerinden salınıp, portal ven aracılığı ile sistemik dolaşıma katılması, dolaşımdan dokular arası boşluğa geçmesi ve hedef dokuların hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ve hormonal etkinlik için bir seri post reseptör olayı başlatması gerekmektedir[18]. İnsülin direnci durumunda, daha fazla insülin gerekir ve glikozun hücre içine alınmasının azalması veya kaybolması durumunda kan glikoz seviyesinin artması sonucu insülin sekresyonu uyarılır, hiperglisemi ve hiperinsülinemi meydana gelir. İnsülinin karaciğer, kas ve yağ doku gibi hedef dokulardaki etkilerine karşı direnç meydana gelir, hepatik glikoz sentezi artar. Kas ve yağ dokusuna insülin aracılı glikoz

girişi azalır[19,20]. Tip 2 diyabetli obez bireylerin yaklaşık %90'nında insülin direnci olduğu belirlenmiştir. Obez bireylerde insülin direnci gelişiminin, diyabet ortaya çıkmadan çok daha önce meydana geldiği gözlenmiştir[21].

Büyük ölçekli epidemiyolojik çalışmalar tip 2 diyabet için en önemli risk faktörünün obezite olduğunu göstermiştir[31]. Batı toplumlarında obezite oranının dramatik bir artış sergilediği, bununla birlikte obezite ile ilişkili hastalıkların oranında artış olduğu ve hatta bazı bilim adamları tarafından obezitenin insan ırkı fenotipini yavaş yavaş değiştirdiği öne sürülmektedir. Obezite, her geçen gün daha fazla kalori alımı sonucu, kronik kalori alımı dengesizliğinin sebep olduğu aşırı vücut ağırlığı ile karakterize bir durum olarak tanımlanır[33,34].

Tip 2 diyabet gelişiminin anlaşılması, önlenebilmesi ve antidiyabetik ajanların geliştirilebilmesi konusunda bilim dünyasında bu amaç doğrultusunda rodent modelleri sıkça kullanılır. Bu modeller, genetik olarak uyarılan spontan diyabet modelleri ve deneysel olarak uyarılan spontan olmayan diyabet modelleri şeklindedir. Deneysel olarak uyarılan tip 2 diyabet rodent modellerinden bir tanesi de HFD-STZ modelde, ilk sahneyi yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ise daha kısa sürede diyabet patolojisi geliştirmek için kullanılır. HFD ile insülin direnci gelişimi, STZ ile de kısmi pankreatik yıkım sağlayarak hızlı şekilde T2D modeli geliştirmek amaçlanıyor[37].

Alzheimer hastalığı nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik bozukluklara sebep olan ilerleyici ve sinir sistemini yozlaştırıcı, geri dönüşümsüz bir beyin hastalığı olup, hastalığın patolojisinde amiloid plaklar ve nörofibriller yumakların varlığı ile karakterizedir. Demansın en yaygın sebebi olup, tüm demans vakalarının yaklaşık %60-80'ni oluşturur ve insan ömür uzunluğunun artması ile birlikte yaşlı populasyondaki artış sonucu 2050 yılına kadar her 85 kişiden birinde Alzheimer hastalığı meydana gelmesi beklenmektedir[43].

Alzheimer hastalığı ve tip 2 diyabet endüstrileşmekte olan ülkelerde çok fazla sayıda insanı etkileyen ve dejeneratif süreçlerinde ortak moleküler mekanizmalar yer alan hastalıklardır. Diyabetin gelişimi ile ilgili moleküler defektler, Alzheimer hastalığını da içeren tüm demans tiplerinde demans gelişim riskini 2-3 kat arttırmaktadır[51]. Bu ortak moleküler mekanizmalar şunlardır; insülin ve insülin reseptörlerinde bozukluk, amiloid peptidler, NFT ve hiperfosforile tau proteini, Protein Kinaz B (PKB/Akt) ve Glikojen Sentaz Kinaz 3 (GSK3), ileri glikasyon son ürünleri

(AGE) ve O-bağlı N-asetil Glukozamin (O-GlcNAc), IDE (İnsulin Degrade Eden Enzim), ApoE4, oksidatif stres ve inflamasyon, kan beyin bariyeri hasarı (KBB), obezite ve serbest yağ asitleri[53].

Ekstraselüler matriks (ESM) molekülleri, beyinde ekstraselüler boşluğu dolduran, yetişkin beyin hacminin yaklaşık %20' sini oluşturan, nöronal gelişme, plastisite ve patofizyolojide önemli rol oynayan moleküllerdir. Nöronların yüzeyini çevreleyen retiküler formasyona sahip perinöronal ağların yapısında bulunan lektikanlar, MSS spesifik brevikan, nörokan, agrekan (kıkırdakta bol miktarda bulunur), versikan (bazal membran ve kan damarlarını içeren tüm dokuların yakınında bulunur) içerir. Bu moleküller, diğer ECM komponenetleri ile etkileşimde ve doğru hidrodinamik yapılanmanın devamlılığının sağlanmasını sağlayıp, yaralanmalar sonrası iyileşme sürecinde ve hastalık proseslerinde çok önemli rol oynarlar. Merkezi sinir sisteminde (MSS) uygun miktar ve lokasyonda bulunan kondroit sülfat proteoglikanlarının korunması, beyindeki fonksiyonların doğru bir şekilde yerine getirilmesi ve muhtemelen nöronal ölüm ve hayatta kalma arasında ki dengenin kurulmasını da etkiler[66,67].

Lektikanlar, proteoglikanlar ve diğer matriks proteinleri üzerinde seçici rol oynayan ekstraselüler proteaz aileleri ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) ve inhibitörleri vardır. MSS' de matriks proteinlerinin miktarındaki değişiklikleri meydana getiren bu proteazlar nöronal aktiviteyi düzenlerler. Ekstarselüler matriks kompozisyonunda ve volümünde yaşa bağlı değişiklikler, en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıklardan birisi olan Alzheimer hastalığının başlangıcı ve gelişiminde en önemli parametrelerden biridir. En son yapılan çalışmalara göre ekstraselüler matriks ve proteazları, hafıza, öğrenme ve plastisitenin en önemli regülatörleridir[68].

Yapılan bu çalışmada, yüksek yağlı diyet ve streptozotosin enjeksiyonu ile tip 2 diyabet modeli geliştirdiğimiz ratlarda, beyin ekstraselüler matriks moleküllerini kodlayan Alzheimer hastalığı patofizyolojisi ile de ilişkili olduğu düşünülen ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Diabetes Mellitus

2.1.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi

Diabetes Mellitus, pankreas tarafından yeterli insülin üretilemediğinde ve/veya insülinin biyolojik etkinliğindeki defektler sonucu meydana gelen insülin direnci nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı sürekli tıbbi bakım gerektiren kronik bir metabolizma hastalığıdır. Diyabette görülen kronik hiperglisemi, uzun dönemde vücudun çeşitli organlarında, özellikle göz, böbrekler, sinirler ve kan damarlarında fonksiyon bozukluklarına neden olur[1].

Diyabet artık refah düzeyi ile ilişkili olmayıp, hızlı kentleşme, sağlıksız diyetler ve giderek artan hareketsiz yaşam sonucu küresel ve toplumsal felakete dönüşmektedir. International Diabetes Federation'nın (IDF) 2017 yılında yayınladığı diyabet atlasına göre, dünyada 425 milyondan fazla insan diyabetli ve bu insanların üçte biri 65 yaş üstü bireylerden oluşuyor. 20 yaşın altındaki çocuk ve ergenlik çağına girmiş tip 1 diyabetli kişi sayısının ise, 1 milyonu aştığı tahmin ediliyor. Eğer herhangi bir önlem alınmazsa, dünyadaki diyabetli birey sayısının 2045 yılında %48 oranında artarak 629 milyona ulaşacağı düşünülüyor[2].

Tüm dünyada 20-79 yaş aralığında yaklaşık 4 milyon insanın 2017 yılında diyabet ve komplikasyonları nedeniyle öldüğü bildirilmiştir. Aynı zamanda 20-79 yaş aralığında diyabet kaynaklı ölümlerin oranının yaklaşık %46.1'ini 60 yaş altı bireyler oluşturmaktadır. Diyabetten dolayı ölenlerin oranının enfeksiyon hastalıkları (HIV/AIDS; 1.1 milyon, tüberküloz; 1.8 milyon, malarya; 0.4 milyon) sebebiyle ölenlerden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir[2].

2017 yılı sağlık masrafları değerlendirildiğinde, diyabet ve ilgili komplikasyonların tedavisi için yapılan sağlık harcamaları, 2015 yılında yapılan istatistiğe kıyasla %8 oranında artmış olduğu ve 727 milyar dolara ulaştığı bildirilmiştir. Bu durum, ülkelerin sosyo ekonomik gelişimine büyük bir yük getirmektedir[2,3].

IDF 6. Diyabet atlasına göre (2013), Türkiye Avrupa' da diyabetin en yüksek oranda görüldüğü ilk beş ülke arasında 3. Sırada yer alırken, IDF 8. Diyabet atlası (2017) verilerine göre de 2045 yılında 629 milyona ulaşması beklenen diyabetli birey

nüfusunun 11.2 milyonunu Türkiye' de ki diyabetli bireylerin oluşturacağı ve bu nüfusa katkıda bulunan ilk 10 ülke arasında yer alacağı rapor edilmiştir[2,4]. Ülkemizde 1997-1998 yılları arasında yapılan Türkiye Diyabet, Obezite ve Hipertansiyon Epidemiyolojisi (TURDEP-I) çalışmasında 20 yaşın altında 24.788 kişi incelenmiş ve diyabet oranı %7.2, bozulmuş glikoz toleransı (BGT) %6.7 bulunmuştur. 2010 yılında yapılan TURDEP-II çalışmasına göre incelenen 26.499 kişide Türkiye 'de ki diyabet oranı 12 yıllık süreçte %90'lık bir artış göstererek %13.7' ye, BGT oranı ise %108 oranında artarak %13.8' e yükselmiştir.[5,6].

2.1.2. Tanı Kriterleri

Diyabetin erken tanısı uzun dönemde ortaya çıkabilecek komplikasyonların önlenmesini amaçlar. Diyabet için tanı kriterleri 1979 yılında National Diabetes Data Group (NDDG) ve 1985 yılında (World Health Organization) WHO önerilerine göre düzenlendi. Daha sonra bu kriterler revize edildi. Hemen hemen her yıl yeni literatür bilgileri taranarak diyabet için tanı kriterlerinin güncel kalması sağlanmaktadır. Son yıllarda kabul edilen kriterler çizelge 1' de verilmiştir.

Çizelge 1. Diyabet için tanı kriterleri[7]

1.	Diyabetin klasik semptomları poliuri, polidopsi, kilo kaybı gibi klasik bulgulara ek olarak, herhangi bir zamanda ölçülen plazma glikoz konsantrasyonunun 200 mg/dl (11,1 mmol/l) veya daha üzerinde olması.
2.	En az 8 saat açlık sonrasında ölçülen plazma glikoz seviyesinin 126 mg/dl (7,00 mmol/dl) veya üzerinde olması.
3.	WHO tarafından tanımlanan Oral Glikoz Tolerans Testinde (OGTT), 75g glikoz oral yolla verildikten sonra, 2. saat ölçülen plazma glikoz değerinin ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) olması.

HbA1c (glikolize hemoglobin), 2-3 aylık süreçteki ortalama kan glikoz seviyesini yansıtması nedeniyle kronik hiperglisemi için marker olarak kullanılır. Önceden kabul edilen tanı kriterlerinde HbA1c testi standardizasyon eksikliğinden dolayı kullanılmazken, pek çok epidemiyolojik çalışma sonuçları değerlendirildikten

sonra, Uluslararası Uzman Komite 'nin de tavsiyesi üzerine tanıda kullanılmaya başlandı[11]. Amerikan Diyabet Birliği tarafından 2010 yılında revize edilen Diyabet ve bozulmuş glikoz regülasyonu için yeni tanı kriterleri Çizelge 2' de yer almaktadır.

Çizelge 2. Diyabet ve bozulmuş glikoz regülasyonu için yeni tanı kriterleri[11].

Tanı testi	**Normal**	**BAG** (Bozulmuş açlık glikozu) **BGT** (Bozulmuş glikoz toleransı)	**KGBT** (Kombine glikoz tolerans bozukluğu)	**Diyabet**
APG (Açlık plazma glikoz düzeyi)	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	≥125 mg/dl
OGTT (Oral Glikoz Tolerans Testi)	<140 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	≥200 mg/dl
HbA1c				≥%6.5

2.1.3. Sınıflandırılması

Diyabetin klinik olarak kontrol altına alınabilmesi, epidemiyolojik ve klinik araştırmalar yapılabilmesi için diyabetin çeşitli biçimlerini tanımlamak amacıyla uygun bir sınıflandırma sistemine gereksinim duyulmuştur. Bu doğrultuda ilk kez 1979 yılında National Diabetes Data Group tarafından yayınlanan ve 1980 yılında World Health Organization Expert Committe tarafından onaylanan sınıflandırmada diyabet; insüline bağımlı diyabet (IDDM), insüline bağımlı olamayan diyabet (NIDDM) ve diğer tipler olmak üzere üçe ayrılmıştır[7]. Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association [ADA]) 1998 yılında hastalığın etiyolojisini de göz önünde bulundurarak diyabeti, 4 genel kategoride toplamıştır[8].

1. **Tip 1 Diyabet**

   Beta [β] hücre hasarı nedeniyle net bir insülin eksikliği vardır.

2. **Tip 2 Diyabet**

   İnsülin direnci zemininde ilerleyen insülin sekresyonu bozukluğu vardır.

3. **Gestasyonel Diyabet**

   Gebeliğin 2. veya 3. trimestırında ortaya çıkan karbonhidrat intoleransı vardır.

4. **Diğer Spesifik Tipler**

   A- Beta Hücre Fonksiyonunun Genetik Defektleri

   B- İnsülin Etkisinin Genetik Defektleri

   C- Ekzokrin Pankreas Hastalıkları

   D- Endokrinopatiler

   E- Enfeksiyonlar

   F- İlaç ve Kimyasal Maddelerle Oluşan Diyabet

   G- İmmün Kaynaklı Nadir Diyabet Formları

   H- Diyabetle Birlikte Görülebilen Diğer Genetik Sendromlar[9]

Bir bireyin sahip olduğu diyabet tipinin belirlenmesi, genellikle tanı konulduğu anda ki mevcut durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterir ve tek bir kategoriye dahil etmek mümkün olmamaktadır. Klinik tablo ve hastalığın ilerleyiş şekline göre diyabet tipleri oldukça değişiklik gösterir. Yapılan kohort çalışmaları ile birlikte, tip 2 diyabetin sadece yetişkin bireylerde, tip 1 diyabetinde sadece çocuklarda görüldüğüne dair genel kanı yıkılmıştır[8]. Diyabetin birçok türü olduğu halde, tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90' nı tip 2 diyabet oluşturur[2,10].

2.2. Tip 2 Diyabet

2.2.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi

Diyabet yüzyıllardır bilinen bir hastalık olmasına rağmen etiyolojisinde ve patolojisinde hala karanlık noktalar vardır. Bu durum özellikle Tip 2 diyabet için geçerlidir. Tüm diyabet olgularının %90-95'ni oluşturan Tip 2 diyabet, geçmişte ''insüline bağımlı olmayan diyabet'' veya ''erişkin diyabeti'' olarak isimlendiriliyordu. Tip 2 diyabette nisbi insülin eksikliği ve insülin direnci görülür[12]. Genellikle orta yaş ve sonrasında ortaya çıkar ve yaşlanma ile görülme olasılığı artar. Son yıllarda beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzının değişmesi ve artan obezite oranları nedeniyle çocukluk ve ergenlik dönemlerinde de tip 2 diyabet sıklığı artmaktadır[13].

Tip 2 diyabet, insülin etkisinin mutlak veya nisbi azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara sebep olan kronik hiperglisemik heterojen bir grup metabolizma bozukluğu içerir. Başka bir deyişle tip 2 diyabet, insülin

sekresyonunda bozukluk ya da insülin etkisine karşı direnç veya her iki durumun bir arada bulunması ile, hiperglisemiyle karakterize metabolik bir hastalıktır[14].

Tip 2 diyabetli hastalarda görülen insülin direnci ile birlikte insülin artışı veya eksikliği, hastaların her birinde farklı derece ve şiddetlerde olabilmektedir[15]. Uluslararası diyabet federasyonu (IDF) diyabet atlası verilerine göre, 2 diyabetli yetişkinden 1'ine (%46.5) teşhis konulmamış yani diyabetli olduğunu bilmiyor[3]. Bu hastalık, hiperglisemi durumu yavaş yavaş geliştiği ve klasik diyabet semptomları başlangıçta farkedilebilecek şiddette olmadığı için çoğunlukla erken evrelerde teşhis edilemez. Tanısı konulmamış tip 2 diyabetli hastalarda mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişme riski artıyor[12].

2.2.2. Tip 2 Diyabet Patofizyolojisi

Patoloji bakış açısıyla Tip 2 diyabet plazma glikoz seviyesinin yüksek seyretmesi ile tanısı konulan heterojen bir bozukluktur. Hiperglisemi, insülinin işlevinde veya salınımında bir azalmaya bağlıdır. Glikoz homeostazisi dikkate alındığında klinik açıdan tip 2 diyabet aşağıdaki sıra ile gelişen ve hastalığın farklı evrelerini temsil etmesi olası 3 patofizyolojik durum ile karakterizedir[16].

- İnsülin duyarlılığında azalma veya insülin direnci
- Göreceli insülin yetersizliği ile birlikte pankreas beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğu
- Karaciğerde glikoz üretiminde artış[16]

2.2.2.1. İnsülin Direnci

Klinik olarak insülin direnci; normal kan şekeri durumunun devam etmesi için gerekli olan insülin seviyesinin olması gerekenden daha yüksek seyretmesi anlamına gelir. Hücresel seviyede insülin direnci ise, metabolik (karbohidrat, protein, lipit metabolizması) ve mitojenik (büyüme, farklılaşma, DNA sentezi, gen transkripsiyonunun düzenlenmesi) hücresel fonksiyondaki insülin etkisinde, insülinin reseptöre bağlanmasından dowstream son substrata kadar olan yolcuğunda, bir defekt meydana gelmesi olarak tanımlanır[17]. İnsülin etkisine normal biyolojik yanıt, insülin seviyesine, insülin salınım hızına ve insülinin dolaşımda kalış süresine bağlıdır.

İnsülinin biyolojik etkinliği için, pankreas beta hücrelerinden salınıp, portal ven aracığı ile sistemik dolaşıma katılması, dolaşımdan dokular arası boşluğa gecmesi ve hedef dokuların hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ve hormonal etkinlik için bir seri post reseptör olayı başlatması gerekmektedir[18].

İnsülin, glikozu kas ve yağ dokusuna taşıyarak, glikojen olarak depolanmasını veya enerji üretmek için okside olmasını sağlar. İnsülin direnci durumunda perifer dokulardan glikoz alımı için daha fazla insülin gerekir. Karaciğerde glikoneogenez ve glikojenoliz bozulur ve glikoz üretimi artar. Glikozun hücre içine alınmasının azalması veya kaybolması durumunda kan glikoz seviyesinin artması sonucu insülin sekresyonu uyarılır, hiperglisemi ve hiperinsülinemi meydana gelir. İnsülinin karaciğer, kas ve yağ doku gibi hedef dokulardaki etkilerine karşı direnç meydana gelir, hepatik glikoz sentezi artar. Kas ve yağ dokusuna insülin aracılı glikoz girişi azalır[19,20].

Tip 2 diyabetli obez bireylerin yaklaşık %90'nında insülin direnci olduğu belirlenmiştir. Obez bireylerde insülin direnci gelişiminin, diyabet ortaya çıkmadan çok daha önce meydana geldiği gözlenmiştir[21]. Glisemik kontrolü düzenli olabilen tip 2 diyabetli hastalar olduğu gibi, düşük seviyede insülin duyarlılığı olan diyabet olmayan bireylerde vardır. İnsülin direnci düzeyi kişiden kişiye, populasyondan populasyona farklılık gösterir ve zamanla artar. Bu farklılığın temel sebebi yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları ve genetik alt yapıdır[22].

İnsülin direnci kas, karaciğer ve yağ hücrelerinde metabolik anormallikler yumağı şeklinde ortaya çıkar. Biyokimyasal bir bozukluk, insülin hassasiyeti olan dokularda glikoz transportunu azaltır, insülin sinyalinde bozulma beraberinde insülin direncini meydana getirir. Direnç gelişimi sonucu karaciğerde glikoz üretimi baskılanamaz, bu durum yağ lipolizinin baskılanmasını engeller ve serbest yağ asitlerinin transhepatik portal iletimi yükselir. Yağ ve kas hücrelerinde glikoz transportu sağlayan GLUT 4 (Glikoz taşıyıcı tip 4), tip 2 diyabet olmayan obez bireylerde %40 oranında azalmışken, tip 2 diyabetli obez bireylerde %85 oranında azalmıştır. İnsülin reseptörüne insülin bağlanınca insülin reseptör substrat -1 (IRS-1) tirozin rezidülerinden fosforillenir. Obezitenin insüline dirençli yağ hücreleri, serbest yağ asitlerinin genel dolaşımda yükselmesi ve/veya intramiyoselüler trigliserit birikmesi yoluyla kaslar insülin direnci kazanır. İnsülin direnci gelişimine katkıda bulunan adipoz dokuda yer alan sitokinler tanımlanmıştır. Obezite' de, bu adipositokinlerin (TNF-α [tumor nekrosis

faktor-alfa] ve IL-6 [interlökin-6]) aşırı salınımı ve yağ dokudan adiponektin, leptin, rezistin gibi adiposit düzenleyici maddelerin salınımında bozulma meydana gelir ve insülin direnci ortaya çıkar[21,23].

İnsülinin hücre içine alınmasını sağlayan reseptörlerden PPARγ (peroksizom proliferatör aktif reseptör gama) agonistleri, insülin direnci durumunda, karaciğer, çizgili kas ve yağ dokusu hücrelerinde glikoz transportunu artırarak, glikoz kullanımını ve insülin duyarlılığını artırırlar. Yağ depolanmasını artırarak, plazmada serbest yağ asidi seviyesini azaltırlar. PPARγ 'da bir mutasyon meydana gelirse insülin bağlanması ve kinaz aktivitesi bozulur ve insülin direnci meydana gelir[24].

2.2.2.2. Beta (β) Hücre Yoğunluğunda ve Fonksiyonunda Azalma

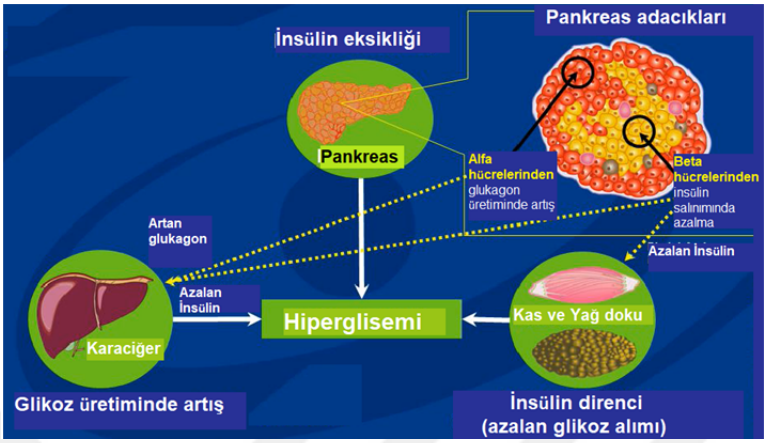
Tip 2 diyabette β hücre disfonksiyonu, progresif ilerleyen ve hastalığın gidişatını etkileyen bir durumdur. β hücrelerinin normal yoğunlukta ve fonksiyonda olması, β hücreleri tarafından salgılanan, insülinin görevli olduğu metabolik yolaklar açısından kritik rol oynar. Yapılan bir çalışmada tip 2 diyabette β hücre kitlesinin yaklaşık olarak %60 oranında azaldığı ve buna paralel olarak glikoz ile uyarılan insülin salgısında azalma meydana geldiği rapor edilmiştir. β hücre kitlesinin azalmasına, pankreas adacıklarında biriken adacık amiloid polipeptidinin (IAPP-amilin)' de neden olabileceği önerilmiştir. Hastalığın etiyolojisinde β hücre kitlesinden ziyade β hücre disfonksiyonu rol oynar[25,26].

Kronik hiperglisemi, oksidatif stres ve inflamasyona sebep olur bunun sonucunda apoptoz artar ve insülin sekresyonu azalır. Endoplazmik retikulum stresinin de tip 2 diyabetteki β hücre apoptozisinden sorumlu olduğu bulunmuştur.

İnflamasyon nedeniyle artan sitokin seviyesi, obezite, insülin direnci, doymuş yağ ve kolesterol oranı yüksek besinlerin aşırı tüketimi ve serbest yağ asitleri β hücreleri üzerinde toksik etki yaratır[27]. Diyetle alınan ya da lipolizle ortaya çıkan dolaşımdaki doymuş serbest yağ asitleri oranı ile β hücre hasarı ve insülin direnci arasında çok güçlü bir ilişki vardır. Hiperglisemi durumu sürekli olduğunda, dolaşımdaki doymuş serbest yağ asitlerinin artışı, β hücrelerinde hasara sebep olan glikolipotoksisiteyi uyarır, ardından insülin sekresyonunda azalma meydana gelir[26].

Talep edilen insülini karşılamak için β hücreleri replikasyon ve neogenez ile sayılarını arttırır. İnsülin direnci β hücrelerinin fizyolojisini ve kompensasyonunu bozar,

sağlıklı yaşam, dengeli beslenme, düzenli egzersiz ile β hücre disfonksiyonunun önüne geçilebilir[26].



Şekil 1. Tip 2 diyabet patofizyolojisi[27]

2.2.3. Tip 2 Diyabet Genetiği

Tip 2 diyabetin belirtileri 40 yaş üstünde ortaya çıksa da, sağlıksız beslenme ve sedanter yaşam ile ilişkili olsa da genetik faktörlerin patofizyolojide temel rol oynadığı tespit edilmiştir. Farklı sosyal ortamlarda büyüyen ikizlerden birinde tip 2 diyabet görüldüğünde, diğerinde de sonraki yıllarda hastalık meydana gelme olasığı çok yüksektir. Bu nedenle genetik predizpozisyon temel bir belirteçtir ve diyabetik fenotipin oluşmasına çok büyük katkıları vardır. Bununla beraber yaşam tarzı ve diğer sosyal değişkenlerin hastalığın başlangıcı ve olası koruyucu stratejilerin uygulanma şansı üzerine güçlü etkileri vardır[16].

Yapılan popülasyon, aile ve ikiz temelli çalışmalardan, tip 2 diyabetin kalıtım oranının %20-80 aralığında değiştiği tahmin edilmektedir. Tip 2 diyabetli bir ebeyvene sahip bir kişinin hastalığa yakalanma riski %40 iken, her iki ebeveynde tip 2 diyabetli ise bu oran %70'e yükselmektedir. Çalışmalar 35-60 yaş aralığında bireyler ile sınırlandırıldığında yaşamın ileriki dönemlerinde diyabet gelişme riski açısından çevresel faktörlerin çok önemli roller oynadığını işaret eder. Bu kalıtımın önemli bir oranını diyabetten ziyade obezite yansıtır çünkü obezite, Tip 2 diyabet oluşumunda temel etmendir[28].

Tip 2 diyabet riskinin genetik mimarisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Otoimmün olmayan tip 2 diyabetin çok küçük bir kısmından (≤%5) MODY (gençlerde

tek gene bağlı kalıtım gösteren diyabet) monogenik form sorumludur. Monogenik formda Hepatosit nükleer faktör 1A (HNF1A) ve Glikokinaz (GCK) genlerinde mutasyona çok sık rastlanır. Tip 2 diyabetin gelişiminde, monogenik kalıtımdan ziyade pek çok gen ve çevresel faktörün kompleks ilişkisinin rol oynamasından dolayı poligenik ve multifaktöriyel kalıtıma sahip olduğu belirtilmiştir[29].

2.2.4. Risk Faktörleri

Tip 2 diyabet gelişimi, popülasyonlara ya da bireylere göre değiştiği için aynı risk faktörlerinden bahsetmek zordur. Bunun yanısıra etnik köken, genetik alt yapı ve yaşam tarzı hastalığın gelişiminde belirleyici bir rol oynar. Risk faktörlerinin belirlenmesi, diyabet taramasında hastalığın meydana gelmesini veya ilerlemesini engelleyici önlemlerin alınması konusunda yönlendirici etkiye sahiptir. Tip 2 diyabetin erken teşhis ve tedavisi, bu hastalık ile ilişkili makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların önlenmesi konusunda avantaj sağlar. Hastalığın gelişimi için en yüksek riske sahip kişiler, aile öyküsü, ileri yaş, fiziksel inaktivite ve obezite gibi risk faktörlerinden birine veya birkaçına sahiptir. Hipertansiyon, yüksek trigliserit seviyesi, düşük HDL (yüksek dansiteli lipoprotein) kolesterol gibi metabolik anomaliler de tip 2 diyabet için risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Gestasyonel diyabet öyküsü olan, 4 kilogramdan fazla doğum ağırlığına sahip bebek dünyaya getiren, bozulmuş glikoz toleransına sahip bireyler de tip 2 diyabet için riskli gruplar arasında yer alır[30].

Farklı ülkelerde ve etnik gruplarda yürütülen GWAS (Genom wide association study) çalışmalarında, tip 2 diyabete hassasiyet kazandıran ve risk teşkil eden yaklaşık 75 gen lokusu tanımlanmıştır ve bu risk oranını arttıran lokuslara her geçen gün bir yenisi eklenmektedir[31].

2008 yılında başlatılan İnsan Bağırsak Yolu Metagenom projesi (MetaHIT) ile bağırsak mikrobiyatası genomundaki farklılığın %50'ye kadar yükseldiği ve bu farklılıklar incelenerek de Tip 2 diyabet için risk değerlendirilmesinin yapılabileceği rapor edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada bakterilerin sayısından ziyade, bakteriler arasındaki dengenin daha önemli olduğu vurgulanmıştır [31,32].

Sedanter yaşam, alkol ve sigara kullanımı gibi çevresel faktörlerin yanısıra yapılan büyük ölçekli epidemiyolojik çalışmalar tip 2 diyabet için en önemli risk faktörünün obezite olduğunu göstermiştir[31].

2.2.4.1. Obezite

Obezite, her geçen gün daha fazla kalori alımı sonucu, kronik kalori alımı dengesizliğinin sebep olduğu aşırı vücut ağırlığı ile karakterize bir durum olarak tanımlanır[33]. Batı toplumlarında obezite oranının dramatik bir artış sergilediği, bununla birlikte obezite ile ilişkili hastalıkların oranında artış olduğu ve hatta bazı bilim adamları tarafından obezitenin insan ırkı fenotipini yavaş yavaş değiştirdiği öne sürülmektedir. Obezite, hipertansiyon ve dislipidemi ile birlikte tip 2 diyabet ve koroner hastalıklar için bir risk faktörüdür[34]. NHANES (Ulusal beslenme ve sağlık araştırmaları-ABD) 2015-2016 verilerine göre, obezite oranı yetişkinler arasında %39,8'e yükselmiş olup, 40-59 yaş aralığında ki bireylerde görülme oranı %42,8 iken, 20-39 yaş aralığındaki bireylerde bu oran %35,7' dir[35].

Obezite için tanı kriterleri; bel çevresi genişliği erkeklerde ≥102 cm, kadınlarda ≥88 cm olması, açlık glikozu ≥100 mg/dl olması, kan basıncı ≥130/85 mm-Hg, trigliserit seviyesi ≥150 mg/dl ve HDL seviyesinin erkeklerde <40mg/dl, kadınlarda ise <50mg/dl olması şeklinde belirlenmiştir. Bu tanı kriterlerinin tamamı insülin direnci ile ilişkilidir[34]. İnsülin direncinin temel sebeplerinden birisi olan abdominal yağlar, subkutan adipoz doku (SCAT; %80) ve viseral adipoz doku (VAT; erkeklerde %10-20, kadınlarda %5-10) şeklinde ikiye ayrılır. SCAT ve VAT farklı metabolik, endokrin ve immün fonksiyon sergiler. VAT, periferal, hepatik insülin direnci ve metabolik sendromun önemli bir belirleyicisidir. İnsan ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda VAT oranında azalmanın, insülin hassasiyeti ve glikoz toleransında artış sağladığı bulunmuştur[36]. İnsülin direnci ve ardından Tip 2 diyabetin meydana geldiği patogenezisde VAT iki şekilde rol oynar. İlk olarak VAT artışı serbest yağ asitleri (FFA) salınımında artışa sebep olur. Artan VAT direk olarak portal vene sızar, FFA üretiminde artış karaciğere FFA akışında bir artışa sebep olur. Karaciğerde yükselen FFA seviyesi sonucunda insülinin hepatik glikoz üretimini baskılamak için glikoneogenezi yönlendirme yeteneği azalır. İkinci olarak da VAT, yağ depolayan organlarda hem lokal hem de sistemik rol oynayan yağ ve glikoz metabolizmasını düzenleyen adipokinlerin (TNF-α, IL-6, cannabinoid (CB)-1, 11β hidroksi steroid dehidrojenaz (11β-HSD-1), plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1)) sinyal proteini salgısında endokrin ve immün bir organ olarak davranır[34]. Viseral yağ ve insülin direnci

arasındaki potansiyel ilişki, önceden teşhis edilmiş T2D' li hastalarda kilo kontrolü veya azaltılması ihtiyacını vurgular.

2.2.5. Deneysel Tip 2 Diyabet Modelleri

Dünya genelinde diyabet oranlarında meydana gelen artış, multifaktoriyel bir hastalık olan tip 2 diyabet gelişiminin anlaşılması, önlenebilmesi ve antidiyabetik ajanların geliştirilebilmesi konusunda bilim dünyasını yoğun araştırmalar yapmaya yönlendirmiştir. Bu amaç doğrultusunda rodent modelleri sıkça kullanılır. İki geniş kategoride sınıflandırılan bu modeller, genetik olarak uyarılan spontan diyabet modelleri ve deneysel olarak uyarılan spontan olmayan diyabet modelleri şeklindedir. Spontan olmayan deneysel tip 2 diyabet modelleri, düşük maliyet, kolay uygulama, geliştirme ve ulaşılabilirlikten dolayı daha fazla tercih edilir. 30 yılı aşkın süredir farmakolojik tarama ve diyabet ile ilişkili mekanizmaların araştırıldığı deneylerde kullanılan ve deneysel olarak uyarılan tip 2 diyabet rodent modelleri şunlardır; STZ/Alloksan rat modeli, neonatal STZ/alloksan rat modeli, kısmi pankreatektomik model, uzun dönem yüksek yağlı diyet (High Fat Diet-HFD) modeli, HFD-STZ model, nikotinamid STZ model, intrauterin gelişme geriliği modeli, STZ ile uyarılan progresif diyabetik model, monosodyum glutamat ile uyarılan model[37]. En uygun T2D rodent modeli geliştirmek mümkün olsaydı bu modelin, masrafsız, kolay uygulanan, biyokimyasal olarak kan profili (açlık glikozu, serum insülin, lipid profili, karaciğer enzimleri, vd.) ve patogenezi (nöral, retinal, renal ve kardiak fonksiyon) açısından insandaki tip 2 diyabete en yakın özellikleri barındırması gerekirdi. Şu anda tüm bu karakteristik özellikleri gösteren bir model henüz geliştirilememiştir[37,38].

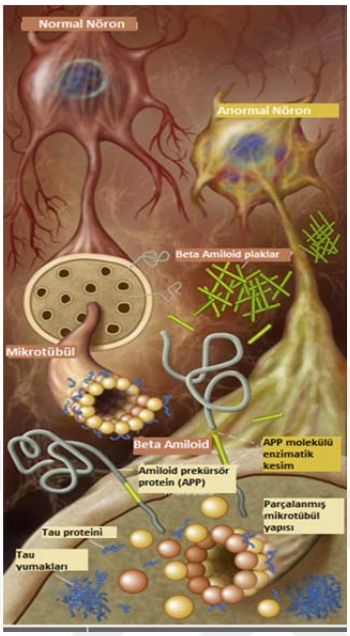
HFD-STZ modelde yüksek yağlı diyet, diyabetik durumu gösteren senaryoda ilk sahneyi meydana getiriyor veya var olan durumu daha da kötüleştiren bir tablo yaratıyor. HFD ve düşük doz STZ' nin kombine olarak uygulanması, daha kısa sürede uzun süreli HFD, T2D modelindekine benzer bir diyabet patolojisi geliştirmek için kullanılıyor. Bu nedenle genetik olarak uyarılan T2D modelleri yanısıra, HFD-STZ rodent modeli bugün T2D araştırmalarında çok yaygın bir kullanıma sahiptir. HFD ve kimyasal bir uyarıcının kombine kullanımında, HFD ile insülin direnci gelişimi, STZ ile de kısmi pankreatik yıkım sağlanarak hızlı şekilde T2D modeli geliştirmek amaçlanıyor[37].

2.3. Alzheimer Hastalığı (A. H.)

Alzheimer hastalığı nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik bozukluklara sebep olan ilerleyici ve sinir sistemini yozlaştırıcı, geri dönüşümsüz bir beyin hastalığıdır. Demansın en yaygın sebebi olup, tüm demans vakalarının yaklaşık %60-80'ni Alzheimer hastalığı oluşturur. Alzheimer birliği 2017 verilerine göre, Amerika' da 5.5 milyon insanın Alzheimer tipi demansa sahip olduğu, yine 5.4 milyon insanın da Alzheimer olduğu rapor edilmiştir. İnsan ömrünün uzaması ile birlikte yaşlı populasyondaki artış sonucu 2050 yılına kadar her 85 kişiden birinde Alzheimer hastalığı meydana gelmesi beklenmektedir[42,43]. Bellek bozuklukları özellikle yakın geçmişi hatırlayamama ve unutkanlık Alzheimer hastalığının en sık rastlanan bulgularıdır. Bunun yanı sıra hafıza sorunları, konuşmada güçlük, kişinin günlük aktivitelerini yapmasına engel olan bilişsel işlev bozuklukları hastalığın kliniğe yansımalarıdır[42]. Alzheimer hastalığında beyindeki patolojik değişiklikler, herhangi bir klinik semptom meydana gelmeden yaklaşık 20 yıl önce başlar. Alzheimer hastalarını tedavi etmek için kullanılan mevcut ilaçlar semptomları hafifletebilir, ancak şu anda AH ilerlemesini durdurabilecek veya yavaşlatabilecek tedavi yoktur. Ayrıca, AH hastaları genellikle eş zamanlı olarak Tip 2 diyabet veya kardiyovasküler hastalıklar gibi başka hastalıklara da sahiptir ve bu durum moleküler düzeyde patojenik süreçleri etkileyerek AH semptomlarını ve ilerlemesini kötüleştirebilir[44].

Morfolojik olarak hastalık beyin atrofisi ve serebral ventriküllerde genişleme ile karakterizedir. Biyokimyasal açıdan bakıldığında en net ve tutarlı bulgu, kolinerjik sistemin bir eksikliği, azalan kolin asetiltransferaz ve diğer kolinerjik belirteçler ile belirlenir. Histolojik olarak AH, ölü ve hasar görmüş nöronlarla çevrili Aβ peptid içeren yoğun bir protein çekirdekten oluşan serebral plaklar olarak adlandırılan hücre dışı plaklar ile karakterizedir. AH' nın diğer tipik histopatolojik özelliği ise, esas olarak mikrotübülle ilişkili tau proteinin, hiperfosforile bir formu tarafından oluşturulan nöronlar içindeki nörofibriler yumaklardır (Şekil.2). Bu bulgulara ek olarak nöron ve sinaps kaybı gözlenir. Çoğu AH olgusu sporadik olarak meydana gelirken, hastaların yaklaşık %5'i, otozomal dominant gen mutasyonlarının bir sonucu olarak hastalığın erken dönemde meydana gelen AH formuna sahiptir[45]. APP, presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) genlerinde meydana gelen mutasyonlar, ailesel tip AH' dan sorumludur. Bu genlerin mutant formları, senil plakların temel komponenti olan Aβ42

üretimini arttırır. Nöronal lipit homeostazisi, nöron hasarı tamiri, sinapto-dendritik bağlantıların devamlılığı ve nörotoksinlerin temizlenmesine katkı sağladığı düşünülen Apolipoprotein E'nin ε4 alleli (APOE ε4)' de AH için bir diğer risk faktörüdür[49].



Şekil 2. Alzheimer Hastalığı Patolojisi[47]

2.3.1. Alzheimer Hastalığı Patolojisi (AB ve NFT)

Alzheimer hastalığı gelişiminin yavaşlatılabilmesi ve uygun tedavi yaklaşımının izlenebilmesi, hastalığın patofizyolojisinin anlaşılmasına dayanır. Alzheimer'lı hastaların otopsi verilerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda hastalığın patolojisinde amiloid plaklar ve nörofibriller yumakların varlığı ortak bulgu olarak tespit edilmiştir. Bu hücre dışı plakların ve hücre içi yumakların yoğunluğu ve dağılım şekli de hastalığın progresyonuna göre değişim göstermektedir[46].

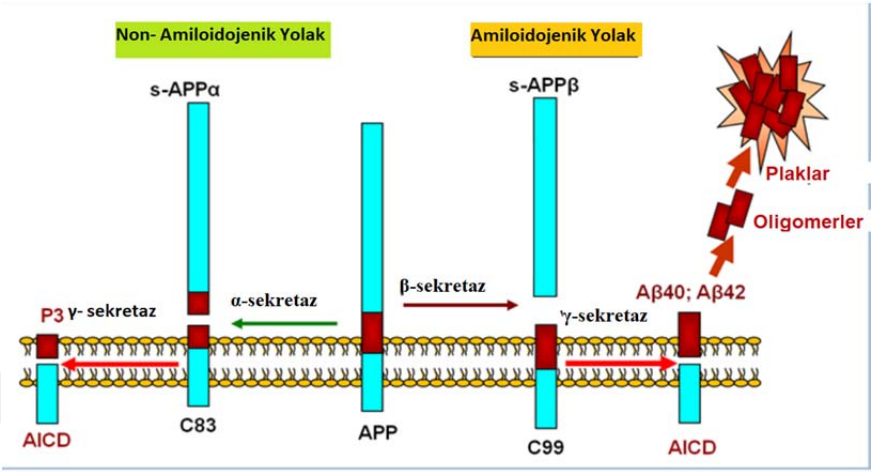
Alzheimer hastalığında, küçük bir peptid olan Aβ proteinin, uzun, çözülemeyen fibril formunun, hipokampus ve neokorteksde hücre dışı yerleşimli varlığı söz konusudur. Senil plaklar olarak bilinen Aβ plakları içinde mikroglia hücreleri, etrafında ise distrofik nöritler yer alır. Aβ; integral membran proteini Amiloid Prekürsör Proteinin (APP) proteolizi ile oluşan bir proteindir ve bu olay nöronal aktivite ile düzenlenmektedir. Proteolitik aktivite, γ-sekretaz, β-sekretaz ya da α-sekretazın enzimatik aktiviteleri ile gerçekleşir. Yapılan ilk çalışmalarda APP kesiminin intramembranal düzenlenmesinde Aβ oluşumunun bir membran hasarı varlığında

(hidrofobik membran tabakasının suya erişim için proteolize izin verdiği) meydana geldiği varsayılıyordu. Ancak daha sonra Aβ'nın ekstraselüler sıvıda, serebrospinal sıvıda ve plazmada bulunması ve APP kesimi ile normal olarak üretilmesinin anlaşılması ile bu varsayım çürütüldü[47].

Senil plaklar içinde büyük oranda hidrofobik ve kümelenme eğilimi gösteren Aβ42 ve az miktarda APP' nin normal kesimi ile oluşan Aβ40 yer alır. APP' nin proteoliz işlemi Amiloidojenik ve Non-amiloidojenik yolak ile gerçekleşir. APP'nin, hücre içinde karboksi ucu, membran içinde 28 aminoasitlik kısmı ve hücre dışındada da amino ucu vardır. α-sekretaz ile kesim sonucunda çözülebilir parça α-APPs ekstraselüler boşluğa geçer. α-APPs' nin hücre kültürlerinde nörotrofik ve nörokoruyucu olumlu etkileri belirlenmiştir. 83 aminoasitlik karboksi terminal parça (C-83), transmembran kısımda γ-sekretaz ile proteolize uğrar ve p3 (Aβ17-40) ve AICD (APP hücre içi alan) oluşur. Normal şartlarda gerçekleşen bu yolağa non-amiloidojenik yolak denir. β-sekretaz APP'yi amino ucundan keser, bunun sonucunda β-APPs ve 99 aminoasitlik karboksi terminal parça (C99) meydana gelir. γ-sekretaz ise C99'u karboksi terminalinden keser ve bu kesim sonucunda Aβ ve AICD oluşur. Meydana gelen Aβ' lar 40-42 aminoasit uzunluğunda olup, amiloidojenik olanı 42 aminoasit uzunluğundaki Aβ42'dir. Aβ42, dağınık plaklar şeklinde çöker ve zamanla yoğun nörotik plaklara dönüşür (şekil-3)[48,52]. Alzheimer'lı hastaların beyinlerinde Aβ oluşumu oksidatif stres ve inflamatuvar cevabı uyararak bilişsel fonksiyon bozukluklarına katkıda bulunur. APP' de meydana gelen bir mutasyon ya toplam Aβ üretimini ya da Aβ42 üretimini arttırır. A.H. 'da α-sekretaz yolu inhibe olurken bu dengenin β ve γ sekretaz yoluna kaydığı ileri sürülmektedir[49].

Hücre iskeletinin yapısında bulunan mikrotübüller, transport ve nörotransferde görevli akson ve dendritlerin formasyonundan sorumlu önemli bir hücresel bileşendir. Mikrotübüllerin stabilizasyonu ve dinamiği mikrotübül asosiyasyon proteini (MAP) ile düzenlenir. Mikrotübül dinamiğinde temel rol oynayan tau proteinleri, MAP ailesinin bir üyesidir. Alzheimer patolojisinde tau proteininin hiperaktif kinazlar ve hipoaktif fosfatazlar ile hiperfosforilizasyonu gerçekleşir ve mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozar. Serbest ve çözülebilen hiperfosforile tau, çift sarmal çözülemeyen filamentler ile polimerleşir ve zamanla intranöronal nörofibriller yumaklara (NFY) dönüşür. Hastalığın son dönemlerinde görülen bilişsel bozuklukta kötüleşmenin ciddiyeti, amiloid

depozisyonunun yanı sıra NFY miktarı ile de ilişkilidir. Ekstraselüler matriks bileşeni olan heparan sülfat proteoglikanları, Alzheimer' da demansın başladığı erken dönemde NFY ile bir arada bulunduğu, aynı zamanda heparan sülfat bileşenlerinin NFY oluşumunda anahtar bir role sahip olduğu belirlenmiştir[50,53,54].



Şekil 3. Amiloid prekürsör proteininin proteolizi[52]

2.4. Tip 2 Diyabet ve Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı ve tip 2 diyabet endüstrileşmekte olan ülkelerde çok fazla sayıda insanı etkileyen önemli hastalıklardır. Her iki hastalık için de hastalık gelişimini önlemeye ve tedaviye yönelik hedefler barındıran çok fazla çalışma yapılmış ve halen çalışmalar sürdürülmektedir. Bu çalışmalarda sürpriz bir şekilde her iki hastalığında dejeneratif süreçlerinde yer alan ortak moleküler mekanizmalar tespit edilmiştir. Diyabetin gelişimi ile ilgili moleküler defektler, Alzheimer hastalığını da içeren tüm demans tiplerinde demans gelişim riskini 2-3 kat arttırmaktadır[55]. Beyin atrofisi, orta şiddette bilişsel bozukluk, beyin ak madde anormalliklerinin sebeplerinden birisinin de diyabet olduğu bulunmuştur. T2D'de görülen kronik insülin direnci, demans ve AH meydana gelme riskini arttırır. T2D'li hastalarda AH meydana gelme riski, diyabet olmayanlara nazaran 2 kat artmıştır. Merkezi sinir sisteminde insülin, insülin reseptörleri (İR) ve onun substratları beynin spesifik bölgelerinde bulunur. İnsülin, sinaptik plastisite ve nörotransmitter salınımı ile düzenlenen öğrenme ve hafıza formasyonunda önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmalarda diyabetik hastalardaki defektif insülin sinyalinin, sinaptik fizyolojide olumsuz bir durum ortaya çıkardığı bulunmuştur. İnsülin sinyal yolağındaki diğer pek çok molekülünde normal sinaptik

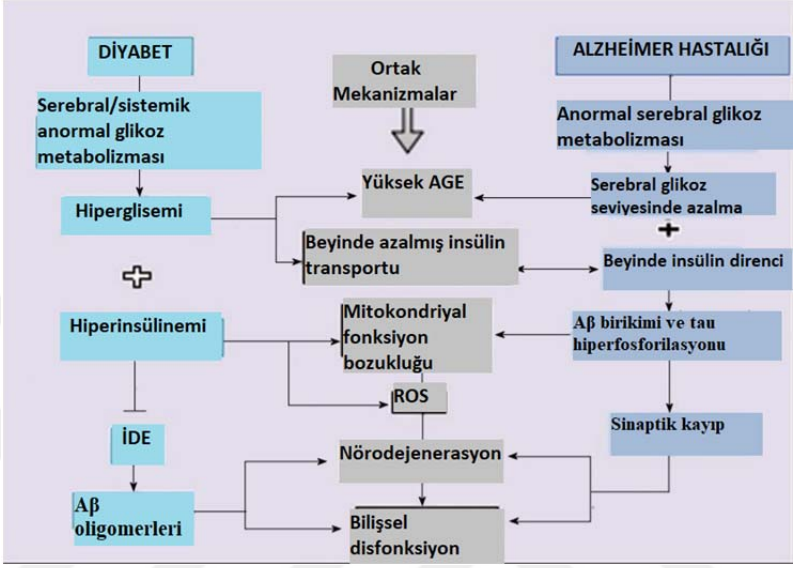
fizyoloji için elzem olduğu vurgulanmıştır. Beynin farklı bölgelerinde İR varlığı insülin sinyali ve sinaptik plastisite arasındaki ilişki için ipucu teşkil eder. Rodentlerde yapılan çalışmalarda Morris su tankı ile yapılan hafıza testlerinden sonra İR' nin upregüle bulunması bu verileri desteklemektedir. Postmortem AH'na sahip bir kişinin beyninde insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve onun reseptörlerine ait mRNA seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Alzheimer'lı hastalarda periferal glikoz hassasiyetinde bozulma, plazma ve serebrospinal sıvıda insülin seviyesinde yükselme olduğu rapor edilmiştir[56].

AH ve T2D arasındaki ilişkiye ilk kanıt teşkil eden çalışma 1980 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada Alzheimer tipi demansa sahip hastalarda glikoz tolerans testi yapılmış ve hipoglisemik durumda beyinde mevcut olan anormalliklerin daha hafif olduğu tespit edilmiştir[56]. 2005 yılında Brown Üniversitesinde ki bir grup araştırmacı, ratlarda beyin insülin sağlayıcılarını blokladıktan sonra AH patolojisi geliştiğini gözlemlemişler ve beyin diyabeti kavramını ''Tip 3 Diyabet'' olarak adlandırmışlardır. Aynı grup daha sonraki çalışmalarında asetil kolin homeostazisi ve bilişsel bozukluk arasında yakın bir ilişki olduğunu, insülin hassasiyeti durumunda bu etkilerin ortaya çıkmadığını rapor etmişlerdir[57,58]. 2011 yılında yapılan bir çalışmada insülin sinyalindeki patojenik değişikliler, Aβ agregasyonu, oksidatif stres, inflamasyon ve glikoz metabolizması anormalliklerinin AH ve T2D'de ki patolojik tabloya sebep olduğunu rapor etmişlerdir. STZ ile uyarılan diyabetik rat modelinde tau hiperfosforilasyonu ve bilişsel fonksiyonda azalma olduğunu göstermişlerdir[59]. 1980 yılından günümüze kadar yapılan pek çok çalışmada bu iki hastalık arasında ortak moleküler ve hücresel mekanizmalar olduğu vurgulanmış, glikoz homeostazisi ve insülin sinyalinin bu iki hastalık arasında köprü görevi gördüğü belirlenmiştir[56].

2.4.1. Tip 2 Diyabet ve Alzheimer Hastalığında Ortak Patofizyolojik Mekanizmalar

AH ve T2D arasında ortak homeostatik mekanizmalardan dolayı çok fazla dikkat çekici kanıt olmasına rağmen tavuk yumurta sorunsalı gibi hangi hastalığın diğerine sebep olduğu gizemini korumaktadır. Bu gizemi çözmek için dönüm noktası niteliğinde pek çok çalışma yapılmıştır. T2D'li hastalarda ve deneysel modellerde orta şiddette bilişsel bozukluk, demans ve AH gelişme riskinin daha yüksek olduğu

belirlenmiştir. Alzheimer'lı hastalar ve hayvan modellerinde, intranasal insülin tedavisi sonrası bilişsel performans önemli derecede artmıştır. Klinik ve deneysel çalışmalar sonucunda AH ve T2D'in ortak moleküler ve biyokimyasal mekanizmalara sahip olduğu bulunmuştur. Bu mekanizmalardan bazıları şekil 4' yer almaktadır.



Şekil 4. Alzheimer hastalığı ve Diyabette ortak mekanizmalar. (İDE: İnsülin degrade eden enzim, Aβ: Amiloid beta, AGE: İleri glikasyon son ürünleri, ROS: Reaktif oksijen türleri) [56]

Alzheimer hastalığı ve Tip 2 diyabette yer alan ortak fizyolojik mekanizmalar arasında; yaşa bağlı prosesler, dejenerasyon, yüksek kolesterol seviyesi, metabolik hastalıklar, Aβ agregasyonu, glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) aktivitesinde artış, oksidatif stres ve inflamasyon cevabında artış, APOε4 alleli ile korelasyon, gliseraldehit kökenli ileri glikasyon son ürünleri (AGE) yer almaktadır[57].

2.4.1.1. İnsülin ve İnsülin Reseptörlerinde Bozukluk

İnsülin sinyalinde bozulma Alzheimerda ki bilişsel bozukluklardan kısmen sorumludur. İnsülin reseptör hassasiyetinden dolayı, merkezi sinir sisteminde insülin direnci gelişir ve AH'da tekrarlayan bir şekilde görülen bozukluklardan bir tanesidir. Bu durum Aβ ve tau ekspresyonu ve metabolizmasını etkiler. İnsülin ve insülin reseptörü; olfaktori bulb, serebral korteks, hipokampus, hipotalamus, amigdala ve septum olmak üzere beyinde bol miktarda eksprese olur (Şekil 5). İnsülin; gıda alımı ve vücut ağırlığını düzenleyen bir nöromodülatör gibi davranır. Nörotransmitterleri serbest bırakarak ya da geri alarak öğrenme ve hafıza gelişimi süreçlerinde etkilidir.

Hipotalamusta bulunan insülin ve insülin reseptörleri (İR) vücut enerji homeostazını regüle eder. Hipokampus ve serebral kortekste bulunan insülin ve IR bilişsel fonksiyonlarla yakından ilişkilidir. İnsülin; reseptör uyarımı veya inhibisyonunu düzenler, ayrıca uzun süreli bellekte sinyal uyarım kaskadını tetikler. İnsülin sinyalinin sinaptik plastisite de rol oynadığı gösterilmiştir. IR' nin bozulmasına; bilişsel bozukluğa sahip tip 2 diyabetli hastalarda ve beyin dejenerasyonu gelişen Alzheimerlı hastalarda sıkça rastlanmaktadır. Alzheimerlı ve Parkinsonlu hastaların beyinlerinde IR ekspresyonu azalır. Alzheimerlı ve Alzheimerlı olmayan kontrol grubu bireylerin beyin kortikal bölgeleri kıyaslandığında AH'da, IR ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. İnsülin ve IR ekspresyonu yaşlanma ile birlikte azalır. Beyin insülin sinyalinde ki bu bozukluk kendine özgü gelişim ve yayılım sergilediği için; bazı bilim adamları tarafından ''Tip 3 Diyabet'' olgusunun gelişimini sağlamıştır. Bazı bilim adamları da AH' nı ''beyinde insülin direnci'' olarak tanımlamıştır[60].

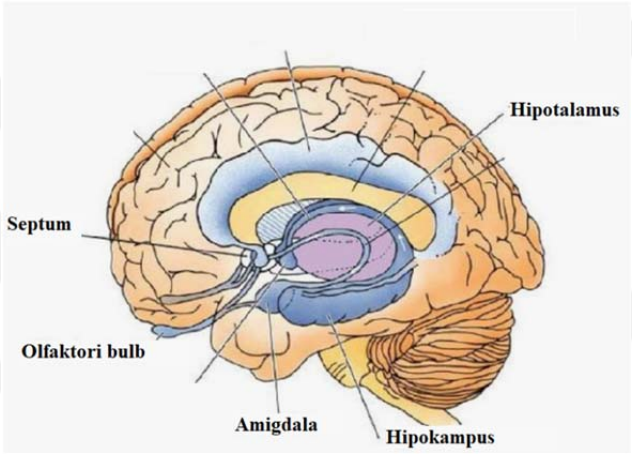
APOE, Alzheimerlı hastalarda hastalık belirteci olmasının yanı sıra bu hastalar için hafıza üzerinde etkili insülin aktivitesini de düzenler. APOE ε4 alleli olmayan hastalarda insülin hassasiyeti daha düşüktür ve yüksek insülin durumlarında insülin uyarımı ile gelişen hafıza iyileşmesi gözlemlenmiştir. APOE ε4 allellerinden bir tanesine sahip hastalarda düşük insülin seviyesinde, insülin uyarımı ile gelişen hafıza iyileşmesi ve insülin degrade eden enzim (IDE) seviyesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu yüzden serebral insülin sinyali yolaklarında ki bozulma, beyin yaşlanma sürecinde ve AH patolojisinde etkilidir[57].

Alzheimerlı hastaların beyinlerinde yapılan histopatolojik çalışmalarda kontrol grubuna kıyasla, hipokampusde IDE ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bu azalış yalnızca APOE ε4 alleline sahip alzheimerlı hastalarda gözlemlenmiştir. APOE ε4 alleli T2D 'li hastalarda AH riskini büyük oranda arttırmaktadır[57].

Yaşlanan beyin; hiperglisemi, oksidatif stres, ileri glikasyon son ürünlerinin birikimi sonucu hasar görür. Hiperglisemik rodentlerin beyninde sinaptik ve kognitif bozukluklar meydana geldiği gözlemlenmiştir. Aşırı glikasyon beyinde önemli olan, yapısal ve fonksiyonel proteinlere zarar verir[56].

Çeşitli çalışmalarda insülinin yanı sıra IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü)' in, Alzheimer hastalığının moleküler ve hücresel mekanizması üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. İnsülin, IR, IGF-1 ve reseptörleri, IGF-1' e bağlanan protein (IGFBP)

rodent ve insan beyninde ortak olarak bulunmaktadır. İnsülin ve IGF-1, kan beyin bariyerinden geçebilir ve beyinde lokalize olurlar. Yapısal ve fonksiyonel homoloji gösteren insülin ve IGF-1; nörofizyolojik gelişimde de benzer roller üstlenir. Bu yüzden IGF-1' in nöronal aktivitede ki reseptör düzenlemesi, IGF-1'i AH için de önemli kılar. IGF-1 sirkülasyonu düşük olan mutant farede yaşamın başlangıcında beyinde, Aβ seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Tam tersine Aβ seviyesi düşük olan yaşlı farede serum IGF-1 seviyesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ratlarda yapılan bir çalışmada, hipokampuste Aβ seviyesi üzerine IGF-1 infüzyonu etkisi incelendiğinde, yetişkin ratlarda genç olanlara oranla Aβ seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir[61].



Şekil 5. İnsülin ve insülin reseptörünün eksprese olduğu beyin kısımları.

2.4.1.2. Amiloid Peptidler

AH' da meydana gelen nöro-dejenerasyonun Aβ birikimine sebep olduğu kanıtlanmıştır. Benzer bir şekilde T2D'de pankreasta ki beta hücrelerinde ki kaybın, pankreas adacıklarında amiloid depolanmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Aβ, APP (amiloid prekürsör protein) kesim ürünüdür. Benzer şekilde adacıklarda ki amiloid, adacık amiloid polipeptidinden (IAPP) köken alır. APP ve IAPP öncül proteinleri %90 benzerdir[57,62]. Bu benzerlik, T2D ve AH arasında güçlü bir ilişki olduğunu ve benzer fizyolojik belirtilere sahip olduklarını doğrular. Bu Aβ plakları toksik etkiye sahiptir ve inflamatuvar proseslerde nörotoksisiteye sebep olur. Diyabetli hastaların pankreas adacıklarında IAPP agregatları ortak olarak gözlemlenir. T2D'li hastaların langerhans adacıklarında ki anormallikler, β hücre kayıpları ile karakterize edilir. Transgenik fare modellerinde IAPP aşırı eksprese olur. Diyabetli hastalarda pankreasta IAPP agregatları

gelişir. Tam tersi olarak IAPP ekspresyonun bozulması insülin sekresyonunda artışa ve dolayısı ile glukoz toleransına sebep olur. Patolojik benzerlikler, IAPP ve APP protein yapılarının %90 benzer olması, AH ve T2D de insülin direnci ve insülin salgısının artışının ilişkili olması şaşırtıcı değildir. T2D li bireylerde muhtemelen demans da gelişir[57].

IAPP; besin alımı ve vücut ağırlığını düzenler. Rodentlerde beyinde ve hipotalamusun bazı kısımlarında bulunur. Renal fonksiyonları da düzenler. Katlanmasında ki problemler sonucu beta hücreleri hasar görür. Kalsiyum konsantrasyonunun azalması ve pH artışı gibi çevresel ve kimyasal değişiklikler sonucu amiloid fibril formasyonuna dönüşür. Yanlış katlanmış pro-IAPP, lizozom tarafından normal kesime karşı dirençlidir. T2D'te kronik olarak glukoz ve serbest yağ asitleri yükselir ve amiloid fibril formasyonu artar. IAPP toksik amiloid formasyonu sonucu beta hücrelerinde apoptoz uyarılır. Adacık amiloid artışına beta hücre fonksiyonunun bozulması, glukoz homeostazının bozulması, adacık hücre yoğunluğunun azalması eklenir. Yaşlanma ile birlikte adacık hücrelerinde amiloid formasyonu artar. Son yapılan çalışmalarda diyabet olmayan yaşlı bireylerde de amiloid agregatları bulunmuştur. Yemek sonrası glukoz seviyeleri de yüksektir. Bu yüzden ada hücrelerinde ki amiloid formasyonu yaşlanmaya bağlı glikoz metabolizmasının bozulmasında önemli rol oynar. IAPP amiloid birikimine diğer bazı bileşenlerde eşlik eder. APOE (Apolipoprotein E), heparan sülfat proteoglikan, (HSPG), serum amiloid beta bileşenleri gibi peptidler T2D ve AH'da önemli rol oynar[57].

İnsülinin plazma Aβ seviyesi üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda, insülin infüzyonu sonrası normal yaşlı bireyler ve Alzheimerlı bireylerin insülin ve Aβ seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda Alzheimerlı hastaların plazma insülin ve Aβ seviyeleri daha yüksek bulunmuştur. Sağlıklı bireylerde insülin infüzyonu plazma Aβ seviyesini azaltırken, Alzheimerlı hastalarda arttırmıştır. Bu sonuçlar Alzheimer durumunda insülin degradasyonunun azaldığı ve insülinin tetiklediği plazma Aβ seviyesinin arttığını göstermektedir[63].

2.4.1.3. NFT ve Hiperfosforile Tau Proteini

İnsülin reseptörlerinin aktivasyonu AH bulgularının başında gelen tau hiperfosforilasyonunu tetikler. Beyin insülin reseptörleri olmayan bir farede,

hiperinsülinemik bir durumda insülin reseptör sinyali ve tau fosforilasyonu tamamen iptal olmuştur. Bu durum serebral insülin reseptörlerinin hedefinin periferal insülin olduğunu göstermektedir. Her iki hastalıkta da (Glikojen Sentaz Kinaz 3) aktivasyonu söz konusudur. GSK-3 bir serin/treonin kinaz olup, glikojen biyosentezinde insülin ile aktifleşen glikojen sentazı inaktive ederek sınırlayıcı bir rol oynar. GSK-3 izoformu olan GSK-3 β özellikle tau hiperfosforilasyonu ile ilişkilidir. Her iki hastalıkta da tedavi yaklaşımında GSK-3 inhibitörleri kullanılır [57,64].

2.4.1.4. Protein Kinaz B (PKB/Akt) ve Glikojen Sentaz Kinaz 3 (GSK3)

PKB, insülin sinyalinin nörokoruyucu fonksiyonu için önemli bir moleküldür. Üç farklı izoformu vardır (α, β, γ). PKB γ (Akt3) nöronlarda eksprese olur. Nörotoksik durumlarda PKB aktivasyonu, nörokoruyuculuk yapar. PKB'nin nörokoruyuculuğu, proapoptotik ve antiapoptotik moleküller aracılığı ile olur. GSK3, PKB yolağının aşağı kısmında yer alır ve tüm beyin bölgelerinde yoğun bir şekilde ifade olur. İnsülin sinyali GSK3 fosforilasyonu ve inhibisyonunu uyarır. Bu yüzden T2D'de insülin sinyalinde azalma, GSK3 aktivitesinde de artış meydana gelir. GSK3, tau hiperfosforilayonu yanı sıra amiloid plakların oluşumuna katkıda bulunduğu için tip 3 diyabette PKB aktivitesi azalır, GSK3 aktivitesi artar (şekil 6)[55,56].

2.4.1.5. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE) ve O-bağlı N-asetil Glukozamin (O-GlcNAc)

İleri glikasyon son ürünleri, protein, lipit ve nükleik asitlerin amino grupları ile fruktoz, galaktoz ve glikozun karboksil grupları arasındaki enzimatik olmayan glikasyon sonucu oluşan reaktif heterojen ürünlerdir. AGE'ler çeşitli dokularda ve hücrelerde diğer protein ve lipitler ile çarpraz bağlar yaparak enzimatik regülasyonu ve membran yapılarını bozarlar. AGE formasyonu ve birikimi normal yaşlanma sürecinde meydana gelen bir olay olup, diyabet tablosunda ciddi anlamda hızlanır. Hiperglisemi, AGE formasyonu ve birikimine eşlik eder, AGE formasyonunda ki artış AH'lı hastalarda da gözlemlenmiştir. AGE; AH'nın en önemli patolojik bulguları arasında yer alan Aβ glikasyonunda ki artış sonucu oluşan Aβ birikimi, tau proteininin glikasyon artışı ile oluşan tau hiperfosforilasyonu ürünü gibi ürünleri de içerir. AGE ve AGE reseptörleri (RAGE) diyabetik vasküler komplikasyonların da gelişiminde çok önemli

rol oynar. Kronik hiperglisemi ve oksidatif stresin bir arada bulunması AGE oluşumu ile sonuçlanır. AGE'ler inflamatuvar hücreler üzerindeki RAGE'lere bağlanarak oksidatif stres ve inflamasyona sebep olurlar. Aynı zamanda AGE'in RAGE'e bağlanması diyabetik vasküler komplikasyonların gelişimini uyarır. İmmüno-histokimyasal çalışmalar NFT ve senil plaklarda AGE'lerin var olduğunu göstermiştir. Kortikal nöronlarda ve serebral damarlarda AGE'lerin bulunması bilişsel bozuklukların şiddeti ile ilişkilendirimiştir[57].

Glikoz seviyesinin kronik olarak artışı, hücreler üzerinde toksik etki yaratabilir. Çünkü glikoz hücrede protein glikasyonunun düzenlenmesi ile ilşkilidir. Glikoz hücre için enerji kaynağı olmasının yanısıra proteinlerin fonksiyonel düzenlenmesi ve hücre sinyalizasyon sisteminde de görevlidir. Bu düzenleme de ki denge, fosforilasyon ve O-GlcNAc ile sağlanır. Glikoz konstantrasyonunda ki değişim bu dengeyi olumsuz etkiler. Hiperglisemi ve hiperinsülinemi ile birçok hücre tipinde ki pek çok proteinin O-GlcNAc oluşumu artar. O-GlcNAc artışı, kas doku ve adipositlerde insülin sinyalini engeller. Yağ ve kas hücrelerinde GlcNAc tranferazın (OGT) aşırı eksprese olması ile hedeflenen farelerde diyabet ortaya çıktığı görülmüştür[57,65].

Yaşlı nöronlarda glikoz kullanımının azalması ile AH'nın hızlandığına dair hipotez yıllardır pek çok çalışmada yer almıştır. Kalori kısıtlaması yapılan farelerle yapılan çalışmalarda tau proteinlerinde hipo-GlcNAc ve hiperfosforilasyonunun ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu etkinin kalorili beslenme ile tersine döndüğünü belirlenmiştir. Alzheimer patolojisi ile ilişkili proteinlerin hemen hemen hepsi O-GlcNAc veya fosforilasyon ile düzenlenir. AH'lı hastaların beyinlerinde O-GlcNAc azaldığı bulunmuştur[57].

Vücuttaki glikoz seviyesi, hücresel metabolizma üzerinde sadece enerji kaynağı olmasının haricinde daha fazla anlam ifade eder. O-GlcNAc hücre sinyalizasyonunda çok önemlidir. O-GlcNAc bozulması hücre yolakları üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Mevcut olan AH tablosunu da kötüleştirme yönünde çok büyük etkilere sahiptir. Hücresel tamir mekanizması, protein sentezi, transkripsiyon ve apoptoz mekanizmalarının bozulması süregelen dejeneratif prossese eklenebilir ya da aynı zamanda diyabet varlığında nöronal dejenerasyonu uyarabilir[57].

2.4.1.6. IDE (İnsulin Degrade Eden Enzim)

İnsülin ve Aβ metabolizmasında, insülin Aβ sekresyonunu stimüle eder, insülin degrade eden enzim (IDE) ile rekabete girerek ekstraselüler Aβ degredasyonunu inhibe eder. IDE' nin Aβ ve insülin olmak üzere iki substratı vardır. Bunlardan birisi AH, diğeri T2D ile birebir ilişkilidir. IDE nöronal ve mikroglial hücrelerde, Aβ seviyesinin düzenlenmesinde temel rol oynar. IDE eksik fare modeli ve normal bir farenin beyin membran fonksiyonları ve primer nöronal kültürleri kıyaslandığında, IDE eksik fare modelinde Aβ degredasyonunun %50 azaldığı gözlenmiştir. Aynı zamanda IDE eksik farede, serebral endojen Aβ birikimi, hiperinsülinemi ve glukoz intoleransı artmıştır[66].

2.4.1.7. ApoE4

Glikoz ve insülin metabolizmasında ki düzensizliklerin yanı sıra diyabetin karakteristik özelliklerinden birisi de dislipidemidir. ApoE4; lipid metabolizmasında çok önemli rol oynar. Bu gen AH genetiğinde var olan genlerden birisi olduğu için diyabet ve AH arasında bir ilişki olduğunu gösterir. ApoE ε4 allelini heterozigot taşıyan bir bireyin AH' na yakalanma riski beş kat artmıştır, homozigot olması durumunda ise risk artışı %50-90 oranında olmaktadır. ApoE ε4 alleli, diğer ApoE izoformlarına oranla daha fazla Aβ birikimine sebep olur, plakların ortadan kaldırılması ve oksidatif strese karşı korunma azalır. Bu yüzden ApoE ε4 alleli taşıyan T2D'li hastaların AH'na yakalanma riski daha yüksektir[66].

2.4.1.8. Oksidatif Stres ve İnflamasyon

Normal bir insan vücudu reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengeyi devam ettirme potansiyeline sahiptir. Bu dinamik sistemde meydana gelen herhangi bir bozukluk bilişsel bozukluğun eşlik ettiği metabolik sendromun meydana gelmesine neden olur. Diyabetik bireylerde sağlıklı bireylere kıyasla daha oksidatif bir çevre mevcuttur. Hiperglisemik durumda hücrede NADPH azalır, polyol yolağı ile sorbitol meydana gelir. Bunun sonucunda da antioksidan kapasite azalır. AGE'lerin RAGE'lere bağlanması ile de ROS üretimi artar. ROS üretimi insülin sinyalini bozar, stres yolağı aktifleşir dolayısı ile hastalık tablosunu kötüleştiren birbirini tetikleyen bu iki olay arasında kısır döngü meydana gelir. Alzheimer hastalığında ise, oksidatif stres ve Aβ agregasyonu birbirini tetikleyen bir

diğer kısır döngüdür. Oksidatif stres, Aβ dinamiğini kontrol eder ve agregat formu oluşturur. Aβ plakları serbest radikallerin bir kaynağı gibi davranır ve beyni nörodejenerasyona sürükler[56].

İnflamasyon cevabı, birbirleriyle ilişkili mekanizmaları aktifleştiren savunma sistemi için bir hayli maliyetli ve fazlasıyla kompleks bir sistemdir. Vücudun, tehdit unsuru oluşturan bir çevrenin üstesinden gelebilmek için devreye soktuğu telafi mekanizması olan inflamatuvar sistem pek çok faktör ve herhangi bir tehdit ile savaşacak özelleşmiş hücreler içerir. Diyabetik hastalarda IR (insülin reseptörü), Alzheimer hastalarında ise nöronal fonksiyon bozukluğunda çok kritik bir rolü vardır. Alzheimerlı hastalarda yapılan çalışmalarda TNF-α, IL-6, IL-1β gibi proinflamatuvar sitokinlerin arttığı rapor edilmiştir. Diyabetli hastalarda yükselen TNF-α düzeyi, IRS-1 (insülin reseptörü substrat-1) fosforilasyonu için çeşitli stres kinazları aktifleştirir ve insülin sinyalini bozar. İnsülin sinyalinde bozulma, nöronların normal fonksiyon sergilemesine engel olur[56,67].

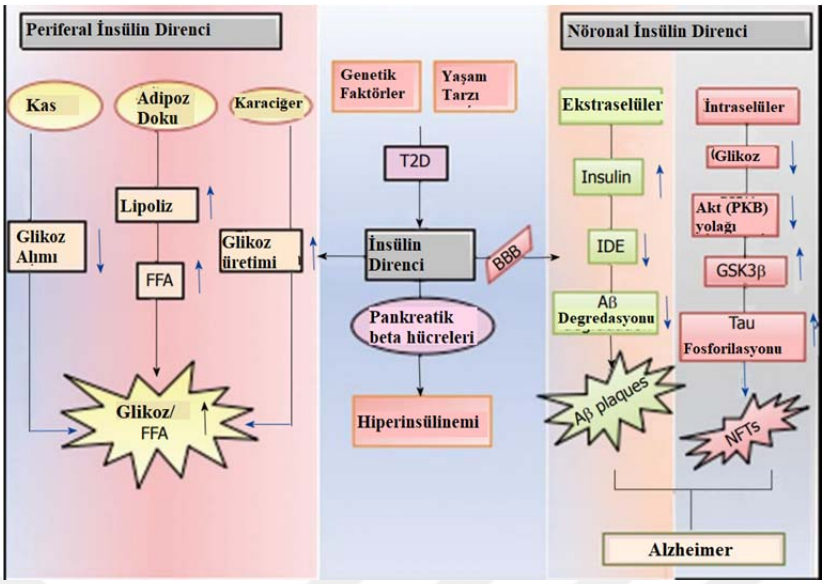
2.4.1.9. Kan Beyin Bariyeri Hasarı (KBB)

Kan beyin bariyeri, beyin mikrovasküler endotelyal hücrelerinden oluşur, son kısmında da astrositler ve perisitler yer alır. Bu endotelyal hücreler sıkı bağlantılı proteinler ve yapısal proteinler ile birbirlerine birleşik halde bulunur. Yaşlanmaya bağlı olarak kan beyin bariyerinin zarar gördüğü tespit edilmiştir. Hasarlı KBB ile ilişkili perisitlerin var olmasının, orta şiddette bilişsel bozukluk ile korele olduğu rapor edilmiştir. KBB bütünlüğünün azalması, doymuş yağ ve kolesterolce zengin diyet ile beslenen ratlarda gözlemlenmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlarda hipokampal bilişsel fonksiyon bozukluğuna eşlik eden artmış KBB geçirgenliği belirlenmiştir[64]. Başka bir çalışmada ise lipit seviyesini düşüren ajanlar ve anti-inflamatuvar ajanların kullanımı ile yüksek yağlı diyete bağlı KBB hasarının geriye döndürülebildiği rapor edilmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenen farenin serebral korteksinde yer alan damarları incelendiğinde şaperon, enzim ve transport görevi yapan anahtar proteinlerin downregüle olduğu gösterilmiştir. Obezite ve diyabette KBB bütünlüğünde bozulma, A.H' da görülen merkezi sinir sistemi inflamasyonu ve oksidatif stres ile ilişkilidir[69].

2.4.1.10. Obezite ve Serbest Yağ Asitleri

Obez ve fazla kilolu birey sayısı dünya çapında alarm verecek boyuta ulaşmış olup, 2030 yılına kadar fazla kilolu birey sayısının 1,35 milyar, obez birey sayısının ise 573 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Yüksek yağlı diyet ile beslenme, obezite ve fazla kilonun temel nedenidir. Serbest yağ asitlerinin kronik bir şekilde dolaşımda yer alması, insülin direncinde de önemli rol oynayan inflamasyon ve pek çok zararlı etkinin nedeni olduğu bulunmuştur (şekil-6). Metabolik sendroma sahip vakalarda kan beyin bariyerini aşan yağ asitlerinin ve birikiminin, kilo kaybı ile azaldığı tesbit edilmiştir. Yüksek yağlı diyet immün sistem aracılı bir mekanizma ile A.H patogenezini uyarır. Lipopolisakkaritlerde tespit edilen toll like reseptör kinaz 4 (TLR4) proteini, doymuş yağ asidi gibi hareket eder. TLR4 aktivasyonu astrositlerde sitokin üretimine sebep olur. Doymuş yağ asitleri hipotalamusta TLR4 aracılı inflamatuvar cevabı uyarır. Serbest yağ asitlerinin invitroda Alzheimerda görülen amiloid ve tau filamentlerinin bir araya gelerek toplanmasını uyardığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalar doymuş yağ asitlerinin KBB noktasında glial aktivasyonu direk olarak etkilediğini göstermektedir[69].

Mekanizma olarak obezite ve T2D' te; hiperglisemi, insülin direnci, oksidatif stres, ileri glikasyon son ürünlerinin birikimi ortak olduğu için, AH risk gelişimi açısından benzerdirler. Populasyon temelli yapılan çalışmalarda, 70 yaşında ki bireylerde vücut kitle indeksinde ki her %1'lik artışın AH riskini %36 arttırdığı tesbit edilmiştir. Bel çevresi ve hipokampal atrofi arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur. Bel çevresi geniş olan Alzheimerlı hastalarda, HDL (High Density Lipporotein) seviyesi düşük, glukoz ve trigliserit konsantrasyonu yüksek bulunmuştur. Son dönemde yapılan bir çalışmaya göre; leptin beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu için, leptin sinyalinde ki bozukluğunda T2D ve AH arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için kullanılabileceğini göstermiştir[66].



Şekil 6. Periferal ve nöronal insülin direnci komplikasyonları (T2D: Tip 2 diyabet, FFA: serbest yağ asidi, PKB: protein kinaz B, GSK3B: Glikojen sentaz kinaz 3B, IDE: İnsülin degrade eden enzim, KBB: Kan beyin bariyeri, NFT: Nörofibriller tau proteini)[56].

2.5. Beyin Ekstraselüler Matriksi ve Alzheimer İlişkisi

Ekstraselüler matriks (ESM) molekülleri, beyinde ekstraselüler boşluğu dolduran, yetişkin beyin hacminin yaklaşık %20' sini oluşturan, nöronal gelişme, plastisite ve patofizyolojide önemli rol oynayan moleküllerdir. Beyin ESM'si bol miktarda glikozaminoglikan olarak adlandırılan uzun lineer polisakkaritlerden oluşur. Beyin ESM'si ya difüze ya da kondanse formdadır. Kondanse formda perinöronal ağlar (PNN), difüze formda perisinaptik boşluklar bulunur. ESM her iki formda da yetişkin beyninde nöronal plastisiteyi sınırlayan moleküler fren gibi davranır. Çünkü nöronal plastisite beyin ESM'sinin enzimatik parçalanması ya da genetik manüpülasyonu ile düzenlenebilir. Glikozaminoglikanlar, nöronal plastisite ve rejenerasyon için spesifik olmayan fiziksel bir bariyer olarak değerlendirilir. Fakat son dönemde yapılan çalışmalarda, ESM moleküllerinin, birbirleriyle ve onlara bağlanan diğer moleküller ile olan spesifik ilişkileri ile nöronal fonksiyonu düzenlemede aktif bir rol oynadıkları öne sürülmektedir[70].

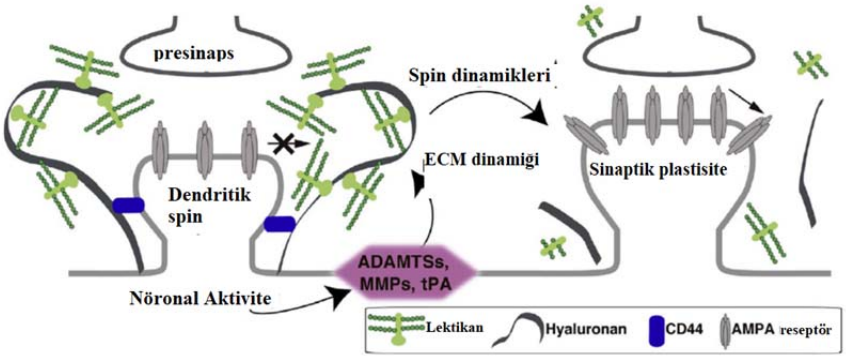
Glikozaminoglikanlar polimerize formda olup, tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşurlar. Kompozisyonları ve disakkarit üniteleri arasındaki glikozidik bağlara göre glikozaminoglikanlar; kondroitin sülfat (CS), heparan sülfat (HS), keratan sülfat (KS) ve hyaluronan olmak üzere 4 sınıfa ayrılır. Proteoglikanların (PG) kovalent

olarak bağlanması ile CSPG, HSPG, KSPG oluşur. Hyaluronan ise serbest glikozaminoglikandır, protein çekirdeği bulunmaz[70].

Merkezi sinir sistemi ESM'si diğer dokuların ESM'si ile benzer özellikler taşıdığı halde, pek çok yönden kendine has özellikler taşıması dolayısı ile tektir. MSS' de az miktarda kollojen ve diğer fibril formundaki moleküller vardır. Diğer kısımlar ise; hyaluronan, glikoprotein (tenascin C/R) ve kondroitin sülfat ailesinden lektikan olarak isimlendirien proteoglikanlardan oluşur. Nöronların yüzeyini çevreleyen retiküler formasyona sahip perinöronal ağların yapısında bulunan lektikanlar, MSS spesifik brevikan, nörokan, agrekan (kıkırdakta bol miktarda bulunur), versikan (bazal membran ve kan damarlarını içeren tüm dokuların yakınında bulunur) içerir. Bu moleküller, diğer ECM komponentleri ile etkileşimde ve doğru hidrodinamik yapılanmanın devamlılığının sağlanmasında beyin yapısı için çok önemlidir. Bu moleküller ve bunların sentezlediği bileşenlerin yaralanmalar sonrası iyileşme sürecinde ve hastalık proseslerinde çok önemli rolleri vardır. Merkezi sinir sisteminde uygun miktar ve lokasyonda bulunan kondroit sülfat proteoglikanlarının korunması, beyindeki fonksiyonların doğru bir şekilde yerine getirilmesi ve muhtemelen nöronal ölüm ve hayatta kalma arasında ki dengenin kurulmasını da etkiler. Lektikanların aminoterminal ucuna hyaluronan, karboksi terminal ucuna tenascin bağlanır. MSS gelişimi esnasında önemli oranda matriks değişimi meydana gelir. Gelişim esnasında ESM direk olarak nöronal ve glial göçü ve farklılaşmayı, nörogenezi, aksonal büyümeyi etkiler ayrıca sinaptogeneze rehberlik eder[71].

Hyaluronan ve CSPG 'den oluşan difüze ESM ile dolu olan perisinaptik boşluk nöronal plastisiteyi düzenler. Hyaluronan sinaps formasyonu ve plastisitesini, bir transmembran protein olan hem nöronların hem de glia hücrelerinin dendritik spin lerinde yer alan CD44 reseptörleri aracılığı düzenler[70]. Sinaptik ve nörit plastisitesinde, MSS bağlı proteoglikanlar bilinmektedir fakat nasıl ortaya çıktıkları ve matrikse dönüşümlerinin nasıl düzenlendiği ile ilgili çok az şey bilinmektedir. Lektikanlar, proteoglikanlar ve diğer matriks proteinleri üzerinde seçici rol oynayan ekstraselüler proteaz aileleri vardır. Bu protein aileleri; ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) ve MMP (matriks metalloproteinaz)' dir. MMS' de matriks proteinlerinin miktarındaki değişiklikleri meydana getiren bu proteazlar nöronal aktiviteyi düzenlerler. Bu enzimlerin yanısıra spin dinamiğinin

uyarılması ile doku plazminojen aktivatörü (tPA)' da ESM dinamiğinde rol oynayan bir diğer enzimdir. Presinaptik ekstraselüler matriksi oluşturan lektikanlar ve hyaluronanlar, dendritik spinleri stabilize eder aynı zamanda AMPA reseptörlerinin lateral difüzyonunu sınırlandırırlar. Ekstraselüler proteazların (MMP, ADAMTS, tPA) aktiviteleri ile spin dinamiği ve yapısal olarak yeniden şekillenmesi sağlanır. Hyaluronan sinaptik plastisiteyi kendisine bağlanan CD44 reseptörü ile gerçekleştirir. (şekil 7)[70,71].



Şekil 7. Presinaptik ECM ve sinaptik plastisite. (tPA: doku plazminojen aktivatörü, ADAMTS: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, MMP: matrix metallo proteinase)[70].

Ekstraselüler proteazlar tarafından PNN (prenöronal ağ) degredasyonun düzenlenmesi hastalık prosesinde önemlidir. PNN normalde oksidatif strese karşı koruyucu bir kalkan görevi üstlenir. Nörodejeneratif bir hastalık durumunda bu rolünü kaybeder. Ekstraselüler matriks kompozisyonunda ve ESM volümünde yaşa bağlı değişiklikler, en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıklardan birisi olan Alzheimer hastalığının başlangıcı ve gelişiminde en önemli parametrelerden biridir. En son yapılan çalışmalara göre ekstraselüler matriks ve proteazları, hafıza, öğrenme ve plastisitenin en önemli regülatörleridir. Epilepsi, şizofreni, bağımlılık ve demans gibi farklı nörolojik hastalıklarla da ilişkili olabilecekleri öne sürülmüştür. Beyin fonksiyonu veya disfonksiyonunun anlaşılmasında ve nörolojik hastalıkların moleküler mekanizmasını hedefleyen terapötik yaklaşımda bu prosesleri düzenleyen mekanizma ve moleküller kritik bir öneme sahiptir. Alzheimer hastalığında görülen amiloid beta plakları genellikle nöroinflamasyon ile oluşur. Tau yumakları, aksonal transportta ve nöronal iletişimde genel bir kayıp söz konusu olduğunun işaretidir. Bunun yanısıra amiloid

betanın çözünebilir formu da bulunur, çeşitli oligomerler ve fibriller meydana getirir. ADDL (amiloid beta kökenli difüze olabilen ligandlar)' ler hücre yüzeyinde çeşitli reseptörlere bağlanarak sinaptik aktivitenin bozulmasına neden olurlar. Tüm bu faktörler nörodejenerasyona sebep olur. Heparan sülfat proteoglikanları (HSPG), Aβ ve ADDL bağlanan en yaygın protein sınıflarından biridir. Bu aile perlekan, agrin, kollagen IVIII ve glipikan, sindekan alt ünitelerini içerir. Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalarda, beyin parankimasında senil plakların içeriğindeki Aβ depolarında, serebrovasküler Aβ depolarında ve NFT'lere bağlanmış olarak bulunan HSPG molekülleri gösterilmiştir. Tüm HSPG molekülleri Aβ plaklarının bir komponenti olarak bulunmuştur[72].

Alzheimer hastalığında CSPG'lerin rolü çok çeşitlidir. CSPG'lerin hem Aβ plaklar hem de nörofibriller yumaklarla bir arada bulunması nedeniyle, bu yapıların oluşmasında aracı moleküller olabilecekleri önerilmektedir. In vitro çalışmalar CSPG ve glikozaminoglikanların Aβ formasyonunu yönlendirdiğini, GAG'lar Aβ' ya bağlanarak, Aβ fibrillerinin proteolizini engellediğine dair çalışma sonuçları vardır. Astrositik CSPG üretimi için, Aβ çok güçlü bir uyarıcıdır. Bu CSPG' ler özellikle nöronal büyüme prosesini inhibe eder. Alzheimerlı beyinde akson yoğunluğunu azaltır ve sinaptik kayba sebep olur.

2.5.1. ADAMTS4 Geni

ADAMTS molekülleri hem MSS hem de dışında yapılan pek çok çalışmada inflamatuvar ve anti-anjiyogenik özellikleri olan, invitroda makrofaj invazyonu, monosit, makrofaj farklılaşması ve aktivasyonuna sahip moleküller olarak tanımlanmıştır. Araştırmalar ışığında ADAMTS'lerin, sinir sistemi fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerinde spesifik rol oynadığı söylenmektedir. ADAMTS'ler; spinal kord, beyin sapı, hipokampus, striatum ve korteksin dahil olduğu merkezi sinir sistemi boyunca eksprese olurlar. ADAMTS'lar proteolitik aktivasyon gerektiğinde işlevsel bir proteaz üretebilir ya da endojen TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)'ler tarafından inhibe edilebilir. ADAMTS spesifik lektikan fragmentleri seviyesindeki değişiklikler, proteinaz aktivitesindeki değişikliklere işaret eder. Beyinde eksprese olan ve lektikanları kesme yeteneğinde olan ADAMTS' ler, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS8 ve ADAMTS9 dur[71].

ADAMTS ailesi üyesi olan ADAMTS4 geni insanda, 1. kromozomun q23.3 bölgesinde yer alır, 837 aminoasitten oluşur ve moleküler ağırlığı 90.2 kilodaltondur. Prodomain, metalloproteinaz domaini, dis-integrin benzeri domain, sisteince zengin domain ve trombospondin tip 1 tekrar domaini (TSR) ve ara domainden oluşur. Trombospondin domaini ile proteoglikanların hücre yüzeyine bağlanır. Preprotein olarak kodlanan bu gen C-terminal uçtan işlenerek proteaz aktivitesi kazanır. Kıkırdakta bulunan temel proteoglikan olan agrekan ve beyin ESM spesifik proteoglikan olan brevikan kesiminden sorumludur[73].

ADAMTS'lerin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi üzerine çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Azheimerlı hastalarda ADAMTS ailesi üyesi genlerin ekspresyon profilleri taranarak hastalığın patogenezinin anlaşılması ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi konusunda yol gösterici olmaktadır[74]. Yapılan bir çalışmada Aβ verilen sıçan astrosit kültüründe ADAMTS4 mRNA seviyesi yüksek bulunmuştur[75]. Başka bir çalışmada Alzheimerlı hastaların postmortem beyin örneklerinde ADAMTS1 ve ADAMTS5 protein seviyeleri incelendiğinde, ADAMTS1'in artmış olduğu fakat ADAMTS5'in değişmediği gözlemlenmiş. Pehlivan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Alzheimerlı hastaların postmortem beyin örneklerinde immünohistokimyasal boyama sonucunda, nöronlarda, glia hücrelerinde ve nörofibrillerde ADAMTS4'ün, glia hücreleri ve astrositlerde ise ADAMTS9'un belirgin bir şekilde boyandığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada ADAMTS4 ve ADAMTS5 açısından alzheimerlı hastalar ve sağlıklı bireyler kıyaslandığında, her iki proteinde de sağlıklı bireylere kıyasla Alzheimerlı bireylerde az da olsa bir azalma olduğu tespit edilmiştir[76].

Yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalığında, ADAMTS gen ailesine ait genlerin ekspresyonlarında bozulmalar olduğu önerilmektedir. ADAMTS genleri tarafından kodlanan enzimler, beyin hücrelerinin normal fizyolojik fonksiyonları için hizmet ediyorken, bir bozukluk meydana gelmesi durumunda nörodejeneratif prosese katkıda bulunurlar. Bu sebeple son dönemde yapılan çalışmalar, Alzheimer hastalığının en önemli bulgularından biri olan Aβ plakları ve ADAMTS enzimlerini de içeren metalloproteinazların disfonksiyonu arasındaki ilişkiye odaklanmıştır.

2.5.2. RELN Geni

Reelin proteinini kodlayan RELN geni insanda 7. kromozomun q22.1 bölgesinde bulunur. 3460 aminoasitten oluşur ve moleküler ağırlığı 388,4 kilodaltondur. Memelilerde evrimsel süreçte yüksek derecede korunmuş ekstraselüler sinyal proteinidir. Reelin beyin gelişimi ve fonksiyonları için önemli olan ve büyük oranda beyinde eksprese olan bir glikoproteindir. Ayrıca hafıza ve öğrenmeyi kapsayan nöronal fonksiyonlar için de elzem bir moleküldür.

Reelin, iki ana bölgede proteolitik işleme tabi tutulur. Bu proteolitik fragmantasyonun fizyolojik fonksiyonu hala tam olarak anlaşılmamasına rağmen, mevcut veriler, reelinin N-terminalinin (N-R2) protein homodimerizasyonu ve sinyalleşmesi için gerekli olduğunu, merkez bölgenin ise (R3-6), ApoER2 (apolipoprotein receptor 2) ve VLDLR (very-low-density lipoprotein receptor) için bağlanma birimi olduğu aynı zamanda reelin oligomerizasyonunda ve amiloid öncü proteini (APP) ile etkileşimde yer aldığını göstermektedir. Uygun protein katlanması ve tam sinyalleşme aktivitesi için ise C-terminal fragmanı (R7-C) gereklidir (Şekil 8) [74,77,78].



Şekil 8. Reelin geni ve proteolitik işlenmesi[77].

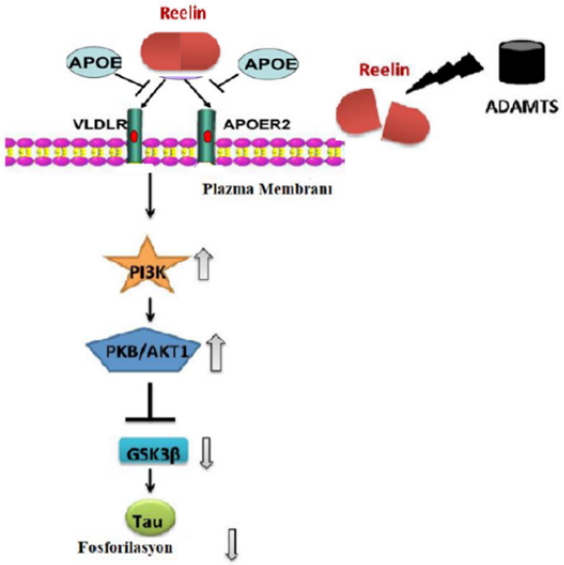
İn-vitro yapılan çalışmalarda reelinin N terminal fragmentinin agregat oluşturma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. N terminal ucu eksik olan reelin fragmentlerinin fonksiyonel dimerlerden daha büyük protein kompleksleri oluşturabildikleri ancak stabil olmadıkları yapılan in-vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Transgenik Alzheimerlı farelerle yapılan çalışmalarda reelinin proteolitik kesiminde, yaşlanma sürecinde ki agregasyonu hızlandırabileceği yönünde değişiklikler olduğu gösterilmiştir [77,78].

Reelin aktivitesinin azalması Alzheimer gibi nöropsikiyatrik hastalıkların başlangıcı ile ilişkilendirilmektedir. Reelin ekspresyonunun azalmasının, amiloidojenik APP işlenmesi, Aβ plakları ile ilişkili sinaptik fonksiyon bozukluğu, tau

hiperfosforilasyonu ve nörofibriller yumak oluşumu üzerinde etkileri olduğu belirlenmiştir[74].

İnflamasyon ile uyarılabilen proteaz olarak bilinen ADAMTS4'ün, wild tip farelerde immün sistem aktif olduğunda reelin agregasyonununda ki hızlanma ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir[77]. Yapılan bir çalışmada, Alzheimerlı hastaların serebrospinal sıvılarında kontrol grubu sağlıklı bireylere kıyasla proteolitik reelin fragmentlerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise transgenik Alzheimerlı farelerde ADAMTS4 ve ADAMTS5'in reelini hem C hem de N terminalden kesebildiği gösterilmiştir[74].

ADAMTS4 izoformları arasında p50 N terminalden, p75 ise her iki uçtan keser. Bu sonuçlar reelin eksikliğinin, tau hiperfosforilasyonu ve nörofibriller yumakların artışı ile ilşkili olduğunu göstermektedir. Reelin, VLDRL ve ApoER2 reseptörlerine bağlanarak insülin sinyali yolağındaki PI3K ve PKB'yi aktive eder ve GSK3β inhibisyonunu uyarır. GSK3β, tau fosforilasyonunu düzenleyen enzimdir. APOE varlığında reelinin lipoprotein reseptörlerine bağlanması inhibe olur. Özellikle Alzheimer için risk faktörü olan APOE ε4 alleli bu reseptörlere bağlanmada reelin ile rekabete girer. Alzheimer durumunda ADAMTS'nin reelin proteolizi sonucu, reelin seviyesi azalır, tau fosforilasyonu artar. (şekil 9)[78]. Alzheimer'lı insan beyninde bu proteazların ve nörodejeneratif hastalıklarda ki reelin aracılı düzenlenmelerinin daha iyi anlaşılması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.



Şekil 9. Tau fosforilasyonunun ADAMTS ve reelin aracılı düzenlenmesi (PKB: protein kinaz B, GSK3β: Glikojen sentaz kinaz 3β, PI3K: Fosfotidilinositol 3 kinaz, ADAMTS: Bir disintegrin ve trombospondin motifi içeren metalloproteinaz, VLDRL: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü, ApoER2: apolipoprotein receptor 2)[74,78].

2.5.3. TIMP3 Geni

Matriks metalloproteinazlar (MMP)'ler, ekstraselüler matriks proteinlerini degrade eden çinko bağımlı endopeptidaz ailesidir. MMP'ler morfogenez, yara iyileşmesi, doku hasarını takip eden tamir, patolojik hastalıklar (kanser, diyabet), nörodejeneratif hastalıklarda dinamik rol oynar. Doku inhibitörü metalloproteinaz ailesi (TIMP) üyesi proteinler çok az bir özelleşme ile MMP'lere bağlanarak onların proteaz aktivitelerini inhibe ederler. Yetişkin dokularında doku hasarı sonrası MMP tarafından ESM parçalanması meydana gelir. Bu proses patofizyolojik cevap ve doku tamiri açısından önemlidir. MMP aktivitesindeki artışı takiben nöronal hasar beyin ödemi oluşumunu ve inflamasyonu uyarır ve sonuç olarak nöronlar degrade olur. Kafa travmaları, iskemi, inflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklar sonrası MMP paralel olarak TIMP ekspresyonu da artar. TIMP üretiminin MMP'ler üzerindeki inhibitör etkisinden dolayı, TIMP'lerin MMP aktivitesindeki artış ile tetiklenen sinir sistemi hasarını önlediği düşünülür[79,80].

TIMP ailesinin dört alt tipi vardır. TIMP1, ön beyin iskemisi sonrası hipokampal formasyonda artış gösterdiği, kimyasal uyarımlı iskemi meydana getirilen hipokampüs kültüründe ise nöronları ekzitotoksisiteden (aşırı nörotransmitter salınımı sonucu nöron ölümü) koruduğu gösterilmiştir. TIMP2 ise, PC12 hücre serilerinde ve kortikal nöronlarda nörit (bir nöronun hücre gövdesinden herhangi bir çıkıntıya karşılık gelen

akson veya dendrit olabilen kısım) büyümesi ve farklılaşmayı yönlendirdiği gösterilmiştir. TIMP3, serebral iskemiyi takiben kortikal nöronların dejenerasyonunda artış gösterdiği ve nöronal apoptozu düzenlediği gösterilmiştir. TIMP4'ün beyindeki rolü hakkında ise çok fazla bilgi bulunamamıştır[80].

TIMP ailesi üyesi olan TIMP3 geni, insanda 22. Kromozomun q12.3 bölgesinde yer alır. Bu gen tarafından kodlanan protein 211 aminoasitten oluşur ve moleküler ağırlığı 24.1 kilodaltondur[81]. TIMP3 ilk olarak tavuk fibroblastlarında transformasyon uyarıcı protein olarak keşfedilmiştir. ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5'in proteolitik aktiviteleri endojen TIMP3 tarafından kontrol edilir. TIMP3 N-terminal domaini ile inhibitör aktivitesini gerçekleştirir. TIMP3'ün ESM kondroitin sülfat proteoglikanları ile etkileşimi (agrekan gibi) ekstraselüler ADAMTS enzimlerinin inhibisyonunu sağlar. Yapılan çalışmalarda kanser gelişiminin çeşitli safhalarında da TIMP3 aktvitesinde bozulmalar gözlenmiştir[82].

2.5.4. BCAN Geni

Kondroitin sülfat proteoglikanlarından lektikan ailesi üyesi olan brevikanı kodlayan BCAN geni insanda 1. Kromozomun q23.1 bölgesinde yer alır. Brevikan beyin ekstraselüler matriks formasyonunda görevlidir. 911 aminoasitten oluşur ve moleküler ağırlığı 99.1 kilodaltondur. Bu protein gliomalarda yüksek seviyede eksprese olur, beyin tümörlerinde hücrenin büyüme ve motilitesinden sorumludur. Alternatif splaysing ile çok farklı varyantları meydana gelir. Alzheimer hastalığındaki bilişsel bozukluklardan sorumlu karakteristik lezyonlarda yaygın olarak görülen nöropillerde (anormal nörit) brevikan ekspresyonu yüksek düzeyde bulunmuştur[83].

Nöronlarda, astrositlerde, mikroglia hücrelerinde sadece matriks proteinleri değil aynı zamanda onları proteolize eden MMP ve ADAMTS enzimleri de eksprese olur. Brevikan MMP ve ADAMTS tarafından farklı bölgelerden kesilir dolayısı ile farklı fragmentler meydana getirirler. Brevikan ESM proteazlarının büyük bir kısmı tarafından kesilebilir. Brevikan özellikle ADAMTS4 (agrekanaz 1) tarafından spesifik bir bölgeden kesilir. Bunun sonucu olarak da ESM difüze forma dönüşür. ADAMTS4 proteolitik aktivitesi ile, ESM'nin difüze forma dönüşmesi nöronal aktivite ile düzenlenir, bu yüzden de ADAMTS4'ün sinaptik plastisitede önemli rol oynadığı söylenebilir. Ekstraselüler matrikste brevikanın, yapısal plastisite üzerindeki inhibitör

etkisinden dolayı sinapsları stabilize ettiği önerilmektedir. Yapılan bir çalışmada ADAMTS4 tarafından proteolize uğramış brevikan fargmentlerinin sıçan beyninde hipokampüs ve korteks bölgesinde immünohistokimya yöntemi ile güçlü bir şekilde boyandığı tespit edilmiştir[84].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

Hassas Terazi	Ohous Triple Balance
Kan glikozu ölçüm cihazı ve stripleri	Accu Check Go
Mikrosantrifüj	Hettich
Soğutmalı Santrifüj	Hettich
Vorteks	Heidolph
Buz Makinesi	Hoshizaki
Azot Tankı	Taylor Wharton
Buzdolabı (-20°C)	Bosch
Buzdolabı (+4°C)	Uğur
Buzdolabı (-80°C)	New Brunswick scientific
Real Time PCR cihazı	Applied Biosystem-7500
Işık Mikroskobu	Leica DMBR

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Streptozotosin	Santaz Cruz
İnsülin	Lilly
DMEM	Gibco (Dulbecco Modified Eagle's Medium)
Rat insülin elisa kiti	Cloud-Clone
Trizol	Life Tech
Kloroform	Merck
İzopropanol	Sigma
Ethanol	Merck
DEPC	Lonza (diethyl pyrocarbonate)
First-strand cDNA sentez kiti	Life Tech
TagMan gen ekspresyon assay	Life Tech

(GAPDH, ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN)

TagMan gen ekspresyon master mix	Life Tech
Formol solüsyonu	Sigma
Cresyl violet asetat	Merck
Hematoksilen	Merck
Eozin	Merck

3.1.3. Sıçanların Temin Edilmesi ve Bakımı

Çalışmada kullanılan 40 adet Albino Wistar türü, 180-200 gram ağırlığında, 7-10 haftalık erkek sıçan, Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIBDAM)' den temin edildi. Sıçanların bakımı ve beslenmeleri çalışma süresince 22-25 ^{o}C, %40-60 rölatif nem, 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü bulunan odada gerçekleştirildi. Sıçanlar kafeslere, her kafeste 5 sıçan olacak şekilde yerleştirildi. Oda sürekli 35m^3/saatlik bir debide vantilatör aracılığı ile sürekli havalandırıldı. Deney süresi boyunca gruplara göre yüksek enerjili ve normal yemle beslenme ve taze günlük su temini sağlandı. Çalışma süresince hayvanlara uygulanan tüm müdahaleler ÇÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda yapıldı. Bu çalışmalar için 27.11.2015 tarihli, 9 sayılı toplantı kararı ile etik kurul belgesi alındı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi ve Deney Öncesi Hazırlık

Deney 4 grup ve her bir grupta 10 adet sıçan olacak şekilde dizayn edildi. Hastalık modelinin oluşturulması ve sıçanların deney periyodu sonlanmandan ölmesi ihtimaline karşın 50 adet sıçan temin edildi. Sıçanlar deney grupları ile etiketlenmiş kafeslere yerleştirildi. Deney grupları ve yapılan uygulamalar çizelge 3' de özetlenmiştir.

Çizelge 3. Deney grupları ve yapılan uygulamalar

Deney Grupları	Uygulama	Sıçan Sayısı
1. Grup	Yüksek yağlı diyet ile beslenmiş ve Streptozotosin enjeksiyonu yapılmış grup	10
2. Grup	Yüksek yağlı diyet ile beslenmiş grup	10
3. Grup	Normal diyet ile beslenmiş ve Streptozotosin enjeksiyonu yapılmış grup	10
4. Grup	Normal diyet ile beslenmiş grup	10

3.2.1.1. Çalışmada Kullanılan Yemin Hazırlanması

Yapılan çeşitli çalışmalarda obezite veya insülin direnci oluşturmak amacıyla deney hayvanlarına verilen yağ oranları %30-%58 arasında değişmektedir[39,40,41].

Toz haline getirilmiş standart pelet yem, içerisine protein kaynağı olarak %5 yağlı soya, %5 tavuk unu, enerji kaynağı olarak ise %50 iç yağı konularak karışım homojen hale getirilmiş sonrasında da pelet haline getirilerek derin dondurucuda saklanmıştır (Şekil 10). Daha önce Hazman ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı aynı yem içeriği kullanılmış olup, kullanılan iç yağı ve diğer yem içerikleri aynı kurumlardan temin edilmiştir[14]. Bu ekibin yaptırdığı yem analizi sonucunda hazırlanan yem karışımının metabolik enerji değeri 4930 kal/kg olduğu belirlenmiş olup, çizelge 4' de yapılan yem analizi sonuçları verilmiştir[14]. Her hafta taze olarak hazırlanan yem, sıçanlara besleme yapılmadan bir saat önce dondurucudan çıkarılmış ve sonrasında verilmiştir. Literatür araştırmaları ve Hazman ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı yağlı diyet içeriği göz önünde bulundurularak hazırlanan HFD, ratların yeme alışma süreci dikkate alınarak içerikteki yağ oranı yavaş yavaş arttırılarak uygulanmıştır. Ratların 1 hafta sonunda %50 iç yağı içeren yeme tamamen uyum sağladığı gözlemlenmiştir.



Şekil 10. Yüksek yağlı yem hazırlanması

Çizelge 4. Standart yem ve yüksek yağlı yem içerikleri[14]

	Yağ (%)	**Protein (%)**	**Karbonhidrat (%)**	**Diğer Maddeler (%)**	**Enerji düzeyi (kal/kg)**
Standart pellet yem	4,1	17	76,4	2,5	2600
Yüksek yağlı yem	57,3	13,6	30,1	1,5	4930

3.2.1.2. Streptozotosin Hazırlanması

Steril koşullar altında pH'sı 4.5 olan 0.1M sitrat tamponu içersinde 45 mg/ml STZ çözdürüldü. Tip 2 diyabet modeli oluşturulacak ratların ağırlıkları belirlendikten sonra ağırlıklarına uygun olacak hacimlerde STZ 45 mg/kg oranında ratlara kuyruk veninden verildi.

3.2.1.3. İnsülin Çözeltisinin Hazırlanması

Yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlarda streptozotosin enjeksiyonu öncesinde insülin tolerans testi için kullanılmak üzere insülin çözeltisi hazırlandı. Hızlı etkili (humolog) insülinden 1ml (100 IU), 199 ml serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içersinde çözdürüldü. Her ml'sinde 0.5 ml insülin bulunan çözelti ratların o anki ağırlığına göre intraperitonal (i.p.) 0.5 IU/kg olarak uygulanmıştır.

3.2.2. Ratlarda İnsülin Direnci Oluşturma

Literatür taraması sonucunda sıçanlarda en hızlı ağırlık artışının 5. haftadan sonra başlayıp 20 haftalık oluncaya kadar devam ettiğinin belirlenmesi sonucunda çalışmamızda yer alan sıçanların temin edilmesinde 7-10 haftalık olması göz önünde bulunduruldu [85,14]. Deney grupları arasında yüksek yağlı diyet ile besleyeceğimiz 1. ve 2. grupta yer alan ratlara, 1 hafta boyunca yeme alışmaları için yemde ki yağ oranı yavaş yavaş arttırılarak verilmiştir. Normal diyet ile beslenen ve yüksek yağlı diyet ile beslenen tüm ratların ağırlık değişimleri haftalık olarak belirlenerek kaydedildi. Altıncı haftanın sonunda tüm ratlara insülin tolerans testi uygulandı ve insülin direnci gelişimi gözlenen ratlar tespit edildi. Literatürde yer alan çalışmalar gözönünde bulundurularak normal diyet ile beslenen kontrol grubu ratlar ile kıyaslandığında ağırlık artışı farkı en az %5 olan ve insülin tolerans testi sonucunda insülin direnci gelişimi tespit edilen yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlar obezite modeli olarak kabul edildi[14,85,87].

3.2.3. Tip 2 Diyabet Modelinin Oluşturulması

Obez olduğu kabul edilen ratlar çalışmanın sekizinci haftasının sonunda 12 saat süre ile aç bırakıldıktan sonra açlık kan glikozları ölçüldü (Accu-Check Go). Ratların ağırlık ölçümleri yapılarak, verilecek olan STZ dozları belirlendi. Daha sonra literatüre dayanarak steril koşullarda hazırlanan pH'sı 4,5 olan 0,1 M sitrat tamponunda çözünmüş 45 mg/ml STZ, 45 mg/kg dozunda sıçanlara kuyruk veninden enjekte edilmek üzere hazırlandı. Ketamin (65 mg/kg) ve ksilazin (7 mg/kg) ile anestezi altına alındıktan sonra kuyruk kısmı alkolle temizlenip kuyruk veninin yeri belirlendikten sonra tek doz enjeksiyon yapıldı. Enjeksiyondan 48 saat sonra plazma glikoz seviyeleri ölçüldü ve 300 mg/dl üzerinde olanlarda tip 2 diyabet geliştiği kabul edildi.

3.2.4. Ağırlık ve Açlık Kan Glikozu Ölçümü

Ratlara, deneyin başlangıcından itibaren haftada bir kez olmak üzere ağırlık ölçümleri yapıldı ve kaydedildi. Ölçümler öncesi bir gece aç bırakılan ratların ağırlıkları elektronik hassas terazi ile belirlendi. STZ enjeksiyonundan sonra ise yine haftada 1 kez olmak kaydıyla bir gece aç bırakılan ratların kuyruk veninden alınan bir damla kan ile Accu-check go cihazı yardımı kan glikoz seviyeleri belirlenip kaydedildi.

3.2.5. Deneyin Sonlandırılması

20 hafta sonunda ketamin ksilazin ile anestezi altına alınan ratların kalplerinden biyokimyasal analiz için kan örnekleri alındı, moleküler ve histopatolojik analizler için de beyin hipokampus dokuları izole edildi.

3.2.6. Biyokimyasal Analizler

3.2.6.1. İnsülin Tolerans Testi (ITT)

İnsülin tolerans testi, plazma glikozunun insüline karşı olan hassasiyetini ve vücudun hipoglisemiye karşı tepkisini belirlemek amacıyla yapılır. Testten 2 saat önce aç bırakılan ratlara 0,5 U/kg dozunda insülin deri altından enjekte edildi[86,87]. 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda plazma glikoz seviyeleri ölçüldü ve kaydedildi.

3.2.6.2. İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi

İnsülin seviyelerini belirlemek amacıyla ratların kan serumu örneklerinde ELISA yöntemiyle rat insülin elisa kiti (Cloud-clone) ile ölçüm yapıldı. Çalışmanın sonunda, kalpten alınan 3-5 ml kan örneği +4 ^{o}C' de 3000 x g'de santrifüj edilerek ayrılan serum örneğinden çalışma yapıldı.

3.2.7. Histopatolojik Analizler

Deney sonunda izole edilen hipokampus dokularının bir kısmı histopatolojik analizler için kullanıldı. Hipokampus dokuları %10'luk tamponlu formol solüsyonu içinde en az 24 saat tespit edildi. Tespit olan hipokampus dokuları rutin patoloji doku takip sistemi ile takip edildi (Shandon Citadel, Almanya). Dokular formol solüsyonu içinden çıkarılarak akar çeşme suyunda 6 saat süre ile yıkandı. Daha sonra sırasıyla %50, %70, %96 ve absolü alkol serilerinde 2 saat süreyle tutuldu, sonrasında 2 saat boyunca Ksilen ile muamele edilen dokular en son parafine konarak 2 saat parafinde tutulup parafin bloklara gömüldü. Parafine gömerken hipokampustan sagital kesitler alınacak şekilde bloklandı. Parafin bloklar mikrotom ile 4-5 mikron kalınlığında kesildi (Microm HM 325, Almanya) ve adeziv lam üzerine alındı. Hipokampus dokuları rutin Hematoksilen ve eozin boyamasıyla ve ayrıca sinir sistemi lezyonlarını ve nöronların histolojik durumunu net gösteren cresyl violet (Nissl boyama) boyama ile boyandı.

Cresyl violet boyaması kısaca şöyle yapıldı: Kesitlerden parafin ksilol ile uzaklaştırıldı. Alkol serilerinde dehidrate edilen (%50,70-80-96 ve absolü alkol) kesitler üzerine %0,1 lik Cresyl violet damlatıldı ve 1-2 dakika boyanması beklendi. Ardından çeşme suyu altında fazla boyanın akıtılması sağlandı. Tekrar alkol serilerinden ksilol'a kadar 2'şer dakika rehidrate edilen kesitler entellan ile kapatıldı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu (Leica DMRB, Almanya) altında çekilen dijital görüntüler üzerinden değerlendirildi ve kaydedildi.

3.2.8. Moleküler Analizler

3.2.8.1. RNA İzolasyonu

Çalışma sonrasında alınan hipokampus örnekleri izolasyon işlemi yapılana kadar -80 ^{o}C'de saklandı. Hipokampüs örneklerinden RNA izolasyonu Trizol protokolüne göre gerçekleştirilmiştir[88].

1. Buz üzerinde 50-100 mg doku örneği bistüri ile küçük parçalara ayrılır ve üzerine 1ml trizol eklenerek ependorf tüpe aktarıldı.
2. Buz üzerinde 5 dakika inkübe edildikten sonra, örnek üzerine 200 µl kloroform eklendi. Vorteks üzerinde 15 saniye karıştırıldı ve 15 dakika tekrar inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonrası +4 ^{o}C' de 13500 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası ependorfta 3 faz gözlenmiş olup, en üst faz (saydam kısım) RNA içermektedir. Bu kısım yeni bir ependorfa aktarıldı.
4. RNA üzerine 500 µl isopropanol eklendi, 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonunda +4 ^{o}C' de 13500 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
6. Santrifüj sonrası RNA, pelet halinde ependorf duvarında görünmektedir.
7. Süpernatant uzaklaştırılarak RNA peleti üzerine %75 Etanol-DEPC su karışımı eklenerek pipetaj yapıldı ve pelet kaldırıldı. Daha sonra tekrar +4 ^{o}C' de 13500 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
8. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak RNA, 5-10 dakika kurumaya bırakıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak RNA 10 dakika kurumaya bırakıldı,

peletin miktarına göre 20-50 µl DEPC su eklendi. Pipetaj yapılıp -80 ^{o}C'ye kaldırıldı.

9. cDNA sentezi yapılmadan önce RNA konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} oranı nanodrop yardımı ile ölçüldü, saflık oranları belirlendi. Elde edilen konsantrasyon sonuçları 100-600 ng/µl aralığındaydı. Nükleik asit saflığını gösteren A260/A280 oranı yaklaşık olarak 2 idi.

3.2.8.2. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi için ticari cDNA sentez kiti Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transkriptaz kiti kullanıldı. Reaksiyonda kullanılacak master mix bileşenleri ve hacimleri aşağıda gösterilmiştir. RNA miktarı 1,5 µg olacak şekilde eklenmiştir. Toplam hacim 20 µl' dir.

- 10x Tampon (2 µl)
- 25x dNTP (0.8 µl)
- 10x RT Rastgele primerler (2 µl)
- Reverse Transkriptaz Enzim (1 µl)
- Nükleaz içermeyen su (4.2 µl)

} Reaksiyon Başına Toplam Hacim: 10 µl

Termal Cycler'da belirlenen reaksiyon koşulları ise aşağıdaki gibidir.

1. Aşama: 25 ^{o}C (10 dk)
2. Aşama: 37 ^{o}C (120 dk)
3. Aşama: 85 ^{o}C (5 dk)
4. 4. Aşama: +4 ^{o}C (∞)

3.2.8.3. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real time PCR, gen ekspresyonunu görünür hale getiren, floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan transkript miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı özgün ve hassas bir çoğaltma yöntemidir. Floresan ışınım bilgisayara bağlı bir termal cycler ile monitorize edilir[89]. Çalışmamızda ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genlerinin ekspresyon analizi için tasarlanan FAM boyalı prob içeren TaqMan gen ekspresyon analiz kiti kullanılarak real time PCR reaksiyonu yapıldı. TaqMan prob

yönteminde 3 çeşit primer kullanılır. Kullanılan primerlerden iki tanesi DNA ipliği üzerinden replikasyonu başlatır. Floresan işaretli prob ise primerlerin arasından zincire bağlanır. Prob, 5' ucunda reporter (bildirici) florokrom ve 3' ucunda quencher (baskılayıcı) florokrom işaretli modifiye bazlar içerir. Amplifikasyon sürecinde 1. Primer yönünde uzayan DNA ipliği, probun 5'ucunu zincirden ayırır ve Taq polimeraz enzimi 5'-3' nükleaz aktivitesi ile floresan reporter molekülünü probdan ayırır. Quencherden ayrılan reporter molekülü floresan ışıma yapar. Her döngüde amplifikasyon arttıkça floresan ışıma da buna bağlı olarak artmaya devam eder[89].

Real time PCR için mix aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı ve 96'lık plate'e 20'şer µl olacak şekilde paylaştırıldı.

- 20x TaqMan Gene Expression Assay (1 µl)
- 2x TaqMan Gene Expression Assay Master mix (10 µl)
- cDNA örneği (2 µl)
- Nükleaz içermeyen su (7 µl)

Real time PCR cihazı için belirlenen ısı döngü koşulları ise aşağıdaki gibidir.

1. Aşama: 50 ^{o}C (2 dk)
2. Aşama: 95 ^{o}C (10 dk)
3. Aşama: 95 ^{o}C (15 sn)
4. Aşama: 60 ^{o}C (1 dk)

} 40 Döngü

Real time PCR sonucunda elde edilen ekspresyon verilerini değerlendirmek için Threshold Cycle (eşik değer döngü; CT) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülür. CT değeri üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı yansıtır. Çalışmamızda her bir gen için deney ve kontrol gruplarına ait örnekler duplike olarak çalışıldı. Reaksiyon sonucunda elde edilen verilerin ortalaması alınarak değerlendirme yapıldı. Referans gen olarak GAPDH (house keeping gen) kullanıldı. Reaksiyon sonuçları aşağıdaki formüle göre değerlendirildi[90].

ΔCT= CT hedef gen- CT referans gen

ΔΔCT= ΔCT muamele edilen- ΔCT kontrol

Ekspresyon oranı= $2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. İkiden fazla grubun sayısal ölçümlerinin genel karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırılmalarında grup içi varyansların homojen olup olmamasına göre Bonferroni veya Tamhane testleri kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak alındı. Serum insülin seviyeleri ise deskriptif (tasviri) olarak değerlendirildi. Real time PCR sonuçları fold change (katlı değişimleri) ve p değerleri dataanalysis.qiagen.com' da değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda materyal metod bölümünde anlatılan şekilde Tip 2 Diyabet modeli geliştirilen ratlarda, beyin ekstraselüler matriksinde yer alan proteinleri kodlayan ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Deneysel Tip 2 Diyabet modeli literatürde yer alan bilgiler ışığında optimize edilip, ratlara uygulanmış olup model başarı ile oluşturulmuştur. Model oluşturulduktan sonra elde edilen serum ve doku örneklerinden laboratuar analizleri yapılıp, elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular başlıklar halinde aşağıdaki gibidir.

4.1. Canlı Ağırlık Değişimi Verileri

Ratların, çalışmanın başında laboratuvara getirildikleri andan itibaren her hafta, haftada bir kez olmak üzere düzenli olarak ağırlıkları ölçülüp, kaydedilmiştir. Çalışma süresince, ratların dörder haftalık süreçde ki ağırlık değişimi verilerinin ortalamaları çizelge 5' de yer almaktadır.

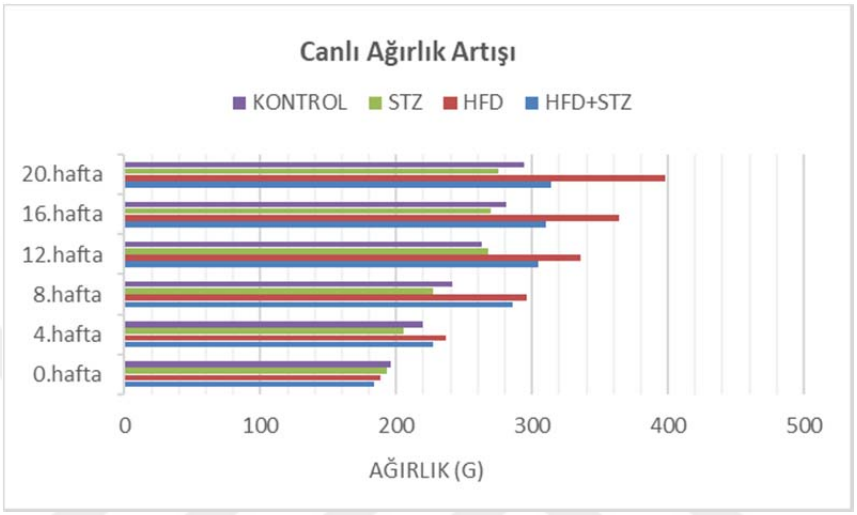
Çizelge 5. Ratların ortalama ağırlık değişimleri ($\overline{X}$: ortalama, SS : standart sapma)

Deney Grupları	**Ölçüm Zamanları**					
	0.hafta $\overline{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**4.hafta** $\overline{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**8.hafta** $\overline{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**12.hafta** $\overline{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**16.hafta** $\overline{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**20.hafta** $\overline{X} \pm SS$ **Med(min-max)**
HFD+STZ 1.Grup	**184**±23,52 189,5(135-210)	**227**±13,61 223,5(204-246)	**286**±14,92 283(267-313)	**305**±21,56 301(280-341)	**310**±21,64 314,5(268-334)	**314**±23,53 314(274-349
HFD 2.Grup	**188**±10,79 188,5(169-205)	**237**±16,64 231(218-273)	**296**±15,74 296(267-318)	**336**±10,17 334(321-350)	**364**±8,76 362(351-378)	**398**±10,34 399,5(382-412)
STZ 3.Grup	**193**±5,29 192(187-204)	**205**±5,39 204,5(198-213)	**227**±4,96 228(218-234)	**268**±5,51 268(257-275)	**270**±5,79 270,5(259-278)	**275**±7,36 274,5(266-287)
Kontrol 4.Grup	**196**±4,42 195,5(190-203)	**220**±5,16 221(208-225)	**241**±5,22 241(232-249)	**263**±4,47 263(256-269)	**281**±4,52 281,5(274-289)	**294**±6,18 293(284-304)
P değeri	p>0,001	**P<0,001**	**P<0,001**	**P<0,001**	**P<0,001**	**P<0,001**

Çalışmanın ilk haftasında rastgele seçilen sıçanlardan oluşturulan deney gruplarının ortalama ağırlıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmazken (p>0,001), çalışmanın 4. haftasından itibaren 20. haftaya kadar

ortalama ağırlıklar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur($p<0.001$).

Deneyin ikinci haftasından itibaren yüksek yağlı diyet ile beslenen HFD ve HFD+STZ gruplarının ortalama ağırlıklarında, normal diyet ile beslenen STZ ve kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmiştir.



Şekil 11. Ratların ortalama canlı ağırlık değişimleri

Yukarıda yer alan çalışma grupları arasındaki ağırlık artışı değişimini gösteren grafikte (Şekil 11), ağırlık artışının 8. haftadan sonra başladığı ve ağırlık artışının en fazla olduğu grupların HFD ve HFD+STZ grupları olduğu gözlemlenmiştir. Her iki grupta normal diyet ile beslendikleri halde, sekizinci haftada STZ enjeksiyonu yapıldıktan sonra, STZ grubunda kontrol grubuna kıyasla ağırlık artışında nispeten bir azalma gözlemlenmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenen HFD ve HFD+STZ gruplarını da kendi içinde kıyasladığımızda, yine 8. haftada ki STZ enjeksiyonundan itibaren HFD+STZ grubunun ağırlık artışında, HFD grubuna kıyasla azalma olduğu gözlemlenmiştir.

4.2. Kan Glikoz Değişimi Verileri

STZ ve HFD+STZ gruplarına çalışmanın sekizinci haftasında yapılan streptozotosin enjeksiyonundan sonra haftada 1 kez olmak kaydıyla bir gece aç bırakılan ratların kuyruk veninden alınan bir damla kan ile kan glikoz seviyeleri belirlenip kaydedildi. Aynı şekilde HFD ve kontrol grupları içinde kan glikoz seviyeleri

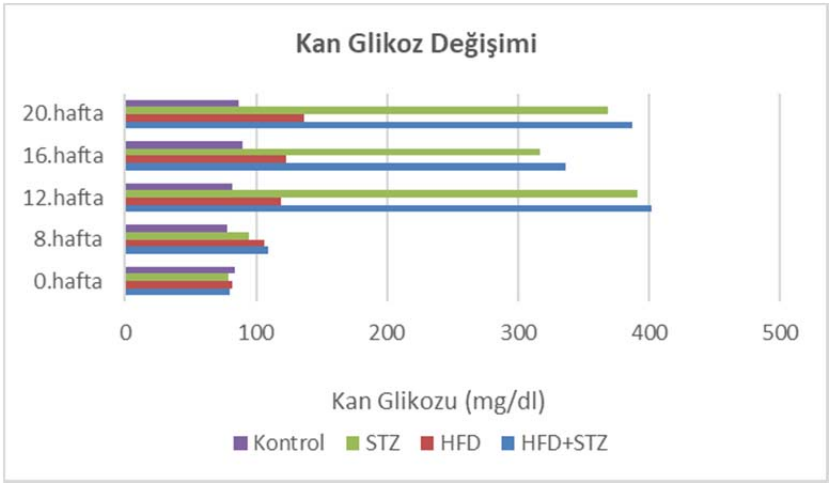
belirlenip kaydedildi. Ratların dörder haftalık süreçte ki kan glikoz değişimi verilerinin ortalamaları çizelge 6' da yer almaktadır.

Çizelge 6. Ratların ortalama kan glikoz değişimleri ($\bar{X}$: ortalama, SS : standart sapma)

Deney Grupları	Ölçüm Zamanı				
	0.hafta $\bar{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**8.hafta** $\bar{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**12.hafta** $\bar{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**16.hafta** $\bar{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**20.hafta** $\bar{X} \pm SS$ **Med(min-max)**
HFD+STZ	80±5,71	109±6,71	402±44,03	336±52,55	387±46,39
1.Grup	79(72-90)	109,5(100-119)	411,5(322-461)	321(246-418)	390(322-450)
HFD	82±7,63	106±10,24	119±5,22	123±33,97	137±4,61
2.Grup	82(72-94)	109(89-120)	119(108-127)	123(116-129)	137(129-144)
STZ	79±5,94	95±6,30	391±57,34	317±57,77	369±41,89
3.Grup	78(71-89)	94,5(86-107)	400(267-458)	313,5(197-400)	371(293-431)
Kontrol	84±5,09	78±5,98	82±4,13	90±4,29	87±5,07
4.Grup	84,5(76-92)	79,5(69-86)	82,5(74-88)	88,5(85-97)	88(76-93)
P değeri	P>0,001	**P<0,001**	**P<0,001**	**P<0,001**	**P<0,001**

Çalışmanın ilk haftasında deney gruplarının ortalama kan glikoz seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmazken (p>0,001), çalışmanın 8. haftasından itibaren 20. haftaya kadar ortalama kan glikoz seviyeleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur(p<0.001).

HFD+STZ ve STZ grubu ratlarda açlık kan glikoz seviyesi sekizinci haftada yapılan STZ enjeksiyonu ile artış göstermiş olup, kontrol grubu ve HFD grubu ratların ortalama glikoz seviyesine kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmektedir. HFD ve kontrol grubu ratların glikoz seviyelerini kendi içinde karşılaştırdığımızda ise, HFD grubu ve kontrol grubu arasındaki farkın anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir.



Şekil 12. Ratların Ortalama Kan Glikoz Değişimleri

HFD+STZ ve STZ grubu ratlarda açlık kan glikoz seviyesinin sekizinci hafta sonunda yapılan STZ enjeksiyonu ile artış gösterdiği Şekil 12' de görülmektedir. Kontrol grubu ratların glikoz seviyesi çalışma boyunca stabil iken, yüksek yağlı diyet verilen HFD grubu ratların kan glikoz seviyesinin kontrol grubuna nazaran yükselme eğiliminde olduğu gözlenmektedir (Şekil 12).

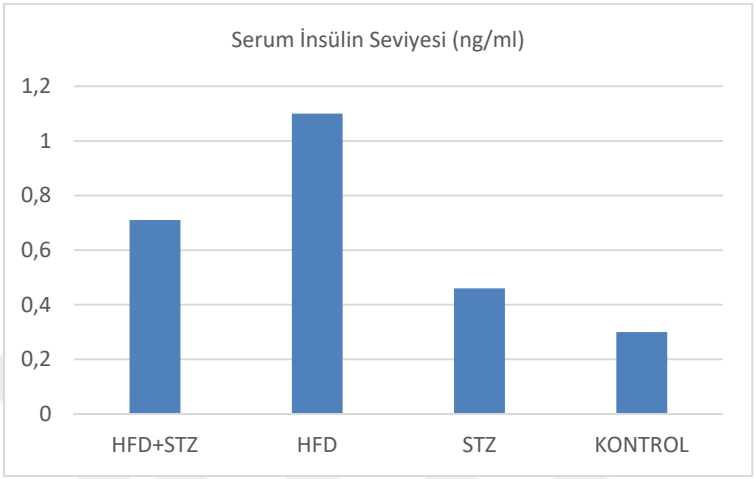
4.3. Serum İnsülin Seviyeleri

Ratlardan alınan kan örneklerinde serum insülin seviyeleri analiz edilmiştir. Elde edilen veriler çizelge 7' de görülmektedir.

Çizelge 7. Ratların Serum insülin seviyeleri

Deney Grupları	**İnsülin (ng/ml)**
HFD+STZ 1.Grup	0,71
HFD 2.Grup	1,1
STZ 3.Grup	0,46
Kontrol 4.Grup	0,30

Deney gruplarından STZ ve kontrol grubu serum insülin seviyeleri, yüksek yağlı diyet ile beslenen HFD ve HFD+STZ gruplarına nazaran daha düşüktür (çizelge 7, şekil 12)



Şekil 13. Ratların Serum İnsülin Seviyeleri Değişimleri

4.4. İnsülin Tolerans Testi (ITT)

İnsülin tolerans testi, kan glikoz seviyesinin insüline karşı duyarlılığını ya da vücudun hipoglisemiye yanıtını belirlemek için yapılır. İnsülinin yarı ömrü sıçanlarda 226-314 saniyedir[91]. Bu nedenle ilk düşmeden sonra glikoz konsantrasyonundaki farklılıklar 30. dakikaya kadar devam ettiği, 30. dakikadan sonra glikoneogenez ve glikojenoliz devreye girdiği için glikoz seviyesinde artan yönde bir değişim meydana geldiği rapor edilmiştir[92].

Altıncı haftanın sonunda tüm gruplardaki ratlara uygulanan insülin tolerans testi Hazman ve arkadaşlarının yaptığı çalışma referans alınarak insülin uygulaması öncesi kan glikoz değerleri 100 mg/dl kabul edildi[93]. Test sonucu elde edilen veriler çizelge 8' de yer almakta olup, sonuçlar istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir.

Çizelge 8. İnsülin tolerans testi sonucu kan glikoz değerleri ($\overline{X}$: ortalama, SS : standart sapma)

Deney Grupları	Ölçüm Zamanı			
	0.dakika	**30.dakika** $\overline{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**60.dakika** $\overline{X} \pm SS$ **Med(min-max)**	**90.dakika** $\overline{X} \pm SS$ **Med(min-max)**
HFD+STZ 1.Grup	100	**86**±3,23 85,5(81-91)	52±6,28 52(42-62)	48±5,29 47,5(40-57)
HFD 2.Grup	100	**88**±4,52 87(81-96)	74±4,73 74,5(67-81)	70±3,52 71(65-74)
STZ 3.Grup	100	**44**±3,36 43(40-52)	40±1,49 40(38-42)	37±1,56 37(35-39)
Kontrol 4.Grup	100	**45**±2,74 45,5 41-50	41,5±2,06 41,5 39-45	37±1,82 37 34-40

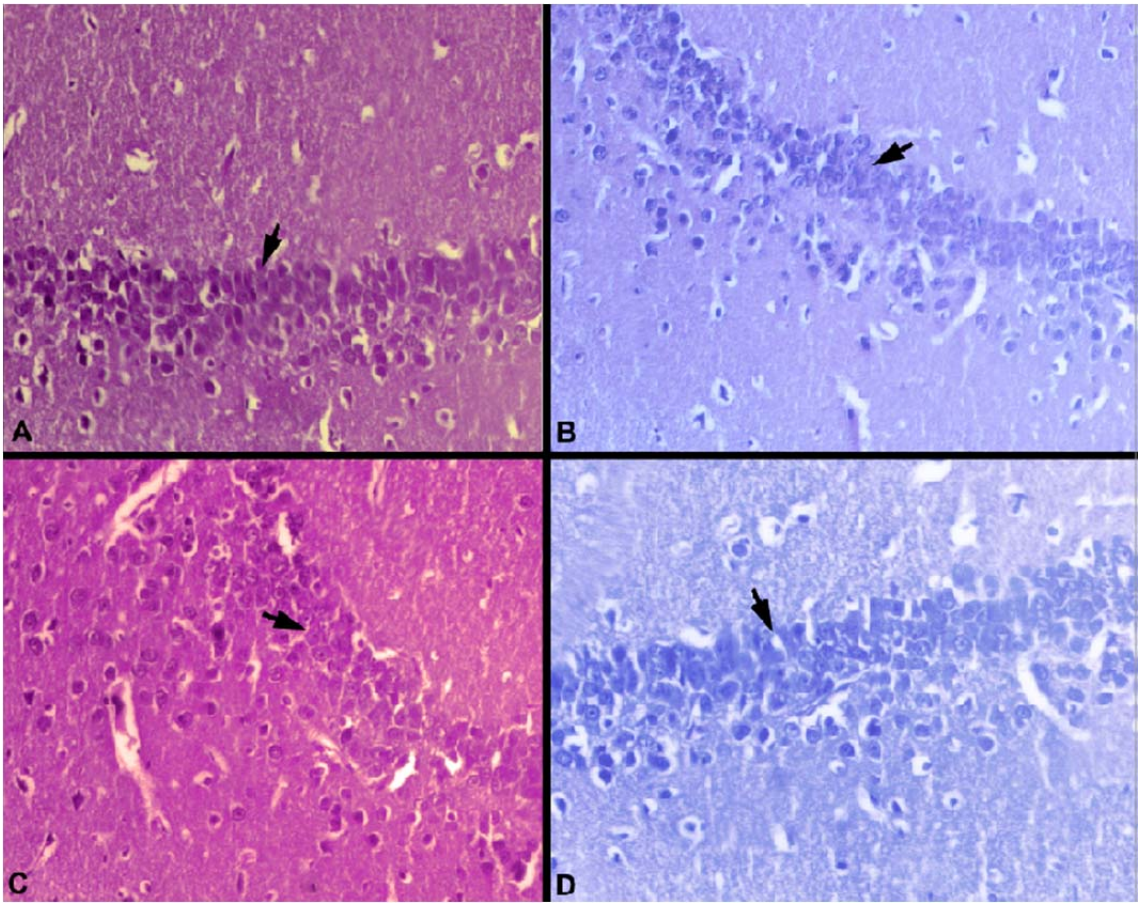
İnsülin tolerans testi sonucu organizma insüline duyarlı ise, plazma glikoz seviyesi 30 dk içersinde açlık seviyesinin %50 altına düştüğü, insülin direnci söz konusu ise de glikoz seviyesindeki azalmanın %50' den az ve düşme süresinin 30 dk' dan uzun sürdüğü belirtilmiştir[94]. Yüksek yağlı diyet ile beslenen HFD ve HFD+STZ gruplarında kan şekerindeki düşme ilk 30 dk' da %50'den azdır. Dolayısı ile bu iki grupta insülin direncinin meydana geldiği kabul edilmiştir. Kontrol ve STZ gruplarında ise kan şekerindeki düşme %50' den fazladır. Ölçüm alınan tüm dakikalar açısından, bütün gruplar karşılaştırıldığında elde edilen veriler istatistiksel olarak da anlamlıdır (p>0,001) (çizelge 8).

4.5. Histopatolojik Analiz Sonuçları

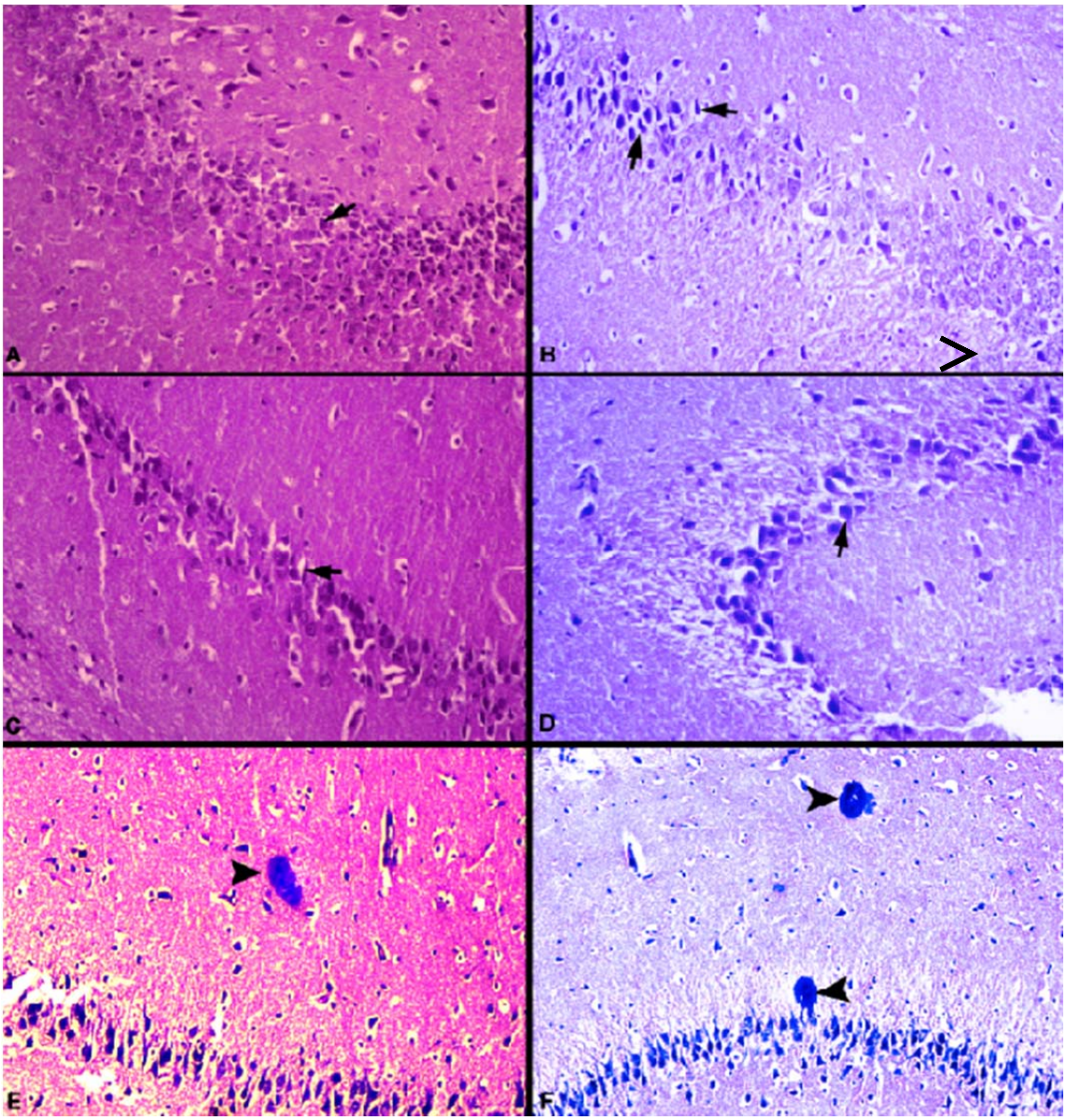
Hipokampus dokuları hipokampus formasyonunun tüm yapıları görünecek şekilde kesilen dokularda incelendi. Dentat girus, CA1, CA2, CA3 bölgeleri dikkatlice incelendi. Stratum piramidale ve stratum molekulare tabakalarındaki nöron ve astrositler histolojik olarak değerlendirildi.

HFD ve KONTROL gruplarında yer alan rat hipokampuslarında staratum piramidale ve molekulare tabakarındaki hücrelerin normal yoğunlukta ve normal boyanmalar gösterdiği gözlendi. Piramidal hücrelerin cresyl violet boyamada normal olarak boyandığı, nöron uzantılarının ve moleküler katındaki astrositlerin normal histolojik yapısında olduğu görüldü (Şekil 14).

HFD+STZ ve STZ gruplarında yer alan rat hipokampuslarında en belirgin bulgu nöronların büzüşmesiydi. Nöron büzüşmeleri cresyl violet boyamasında oldukça koyu ve küçülmüş şekilde belirgin hale gelmesiyle kendini gösteriyordu. Bu durum nöron hasarının spesifik bir bulgusudur. Ayrıca HFD+STZ grubunda yer alan hayvanlardan bazılarında moleküler tabakada plak şeklinde 3-5 piramid hücre büyüklüğünde koyu boyanma alanlarına rastlandı. Bu alanlar Hematoksilen ve eozin boyamada ve cresyl violet boyamasında oldukça belirgindi (Şekil 15).



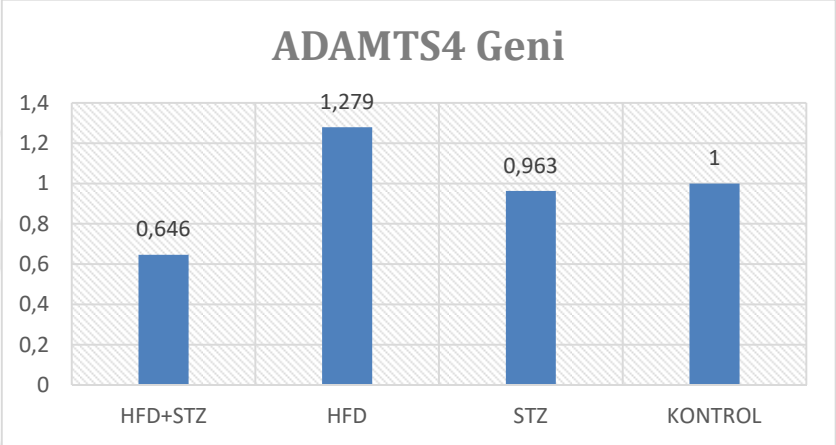
Şekil 14. A. HFD grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücreler normal görünümde (ok). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **B.** HFD grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücreler normal görünümde (ok). Cresyl violet boyama. Büyütme 200X. **C.** Kontrol grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücreler normal görünümde (ok). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **D.** Kontrol grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücreler normal görünümde (ok). Cresyl violet boyama. Büyütme 200X.



Şekil 15. A. HFD+STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücrelerden bazılarının büzüşmüş olduğu ve koyu boyandığı görünmekte (oklar). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **B.** HFD+STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki büzüşmüş (oklar) hücreler ve normal nöronlar (okbaşı). Cresyl violet boyama. Büyütme 200X. **C.** STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki hücrelerden bazılarının büzüşmüş olduğu ve koyu boyandığı görünmekte (oklar). Normal nöronlar katmanda görünmekte (okbaşı). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **D.** STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Piramidal katmandaki büzüşmüş (oklar) hücreler. Cresyl violet boyama. Büyütme 200X. **E.** HFD+STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Molekuler tabakada yer alan plak benzeri boyanmış alan (ok). Hematoksilen ve eozin boyama. Büyütme 200X. **F.** STZ grubunda yer alan rata ait hipokampus kesiti. Moleküler tabakada yer alan Cresyl violet pozitif plak benzeri alanlar (oklar). Cresyl violet boyama. Büyütme 200X.

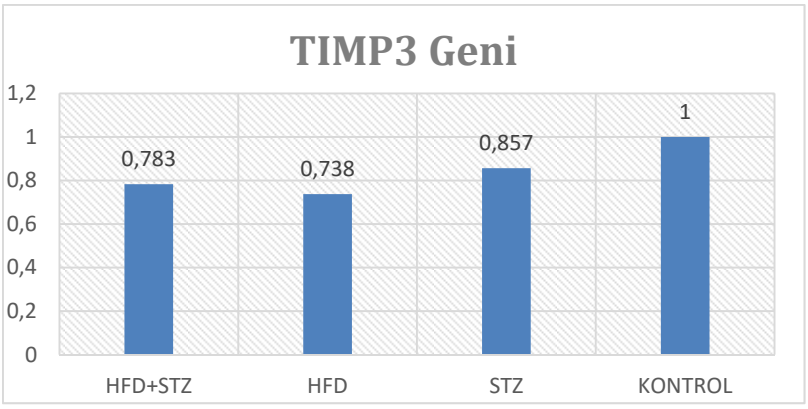
4.6. Moleküler Analiz Sonuçları

Çalışmamızda, deney gruplarımızda yer alan tüm ratların beyin hipokampus dokusundan, Alzheimer ile ilişkili olduğu düşünülen ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genlerinin ekspresyon seviyeleri Real time PCR yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen bulgular $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile analiz edilmiştir. Her bir gen için deney ve kontrol gruplarına ait örnekler duplike olarak çalışıldı. Çalışılan genler ve kontrol grubu ile karşılaştırmalı analiz verileri şekil 16,17,18 ve 19'da yer almaktadır.



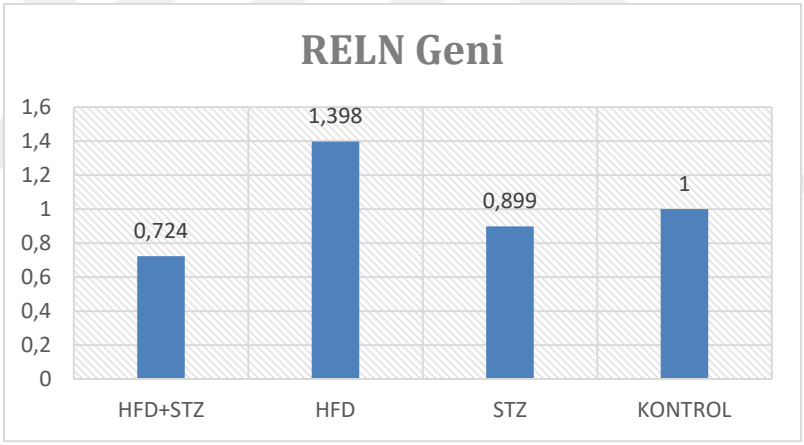
Şekil 16. ADAMTS4 geni ekspresyon analizi verileri (HFD+STZ: yüksek yağlı diyet+streptozotosin, HFD: yüksek yağlı diyet, STZ: streptozotosin)

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek yağlı diyet ve streptozotosin uygulanan HFD+STZ grubunda ADAMTS4 geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat bir azalma gözemlenirken, streptozotosin uygulanıp normal diyet ile beslenen STZ grubunda yaklaşık 1.1 kat bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak sadece yüksek yağlı diyet ile beslenen HFD grubunda kotrol grubuna oranla 1,27 kat bir artış gözlenmiştir (şekil 16, çizelge 9).



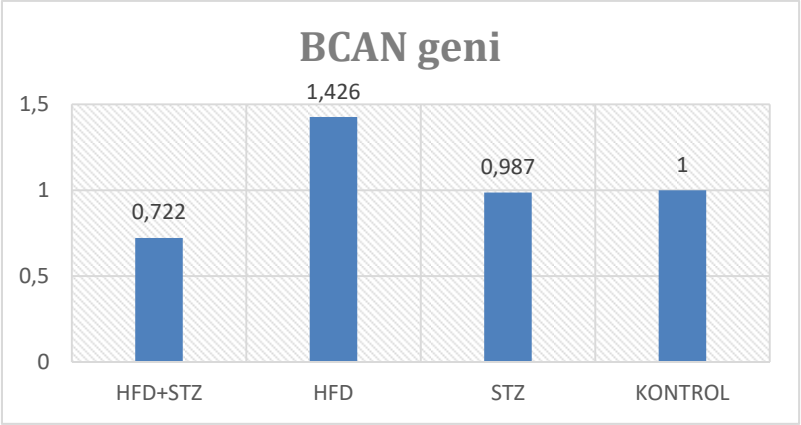
Şekil 17. TIMP3 geni ekspresyon analizi verileri (HFD+STZ: yüksek yağlı diyet+streptozotosin, HFD: yüksek yağlı diyet, STZ: streptozotosin)

TIMP3 geni açısından yapılan değerlendirmede HFD+STZ, HFD, STZ gruplarının her birinde kontrol grubuna kıyasla ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenmiştir (şekil 17, çizelge 9).



Şekil 18. RELN geni ekspresyon analizi verileri (HFD+STZ: yüksek yağlı diyet+streptozotosin, HFD: yüksek yağlı diyet, STZ: streptozotosin)

RELN geni ekspresyon seviyeleri açısından incelendiğinde, yüksek yağlı diyet ile beslenen ve streptozotosin uygulanan HFD+STZ grubunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,3 kat azalmış, sadece streptozotosin enjeksiyonu yapılan STZ grubunda ise yaklaşık 1,12 kat azalmıştır. Yüksek yağlı diyet ile beslenen HFD grubunda ise RELN geni ekspresyon seviyesi 1,39 kat artmış olup istatistiksel açıdan da bu artış önemli bulunmuştur ($p=0,0007$, $p<0,05$) (şekil 18, çizelge 9).



Şekil 19. BCAN geni ekspresyon analizi verileri (HFD+STZ: yüksek yağlı diyet+streptozotosin, HFD: yüksek yağlı diyet, STZ: streptozotosin)

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BCAN geni ekspresyon seviyesi yüksek yağlı diyet ile beslenen ve streptozotosin verilen HFD+STZ grubunda yaklaşık 1,3 kat azalmış, streptozotosin enjekte edilen ve normal diyet ile beslenen STZ grubunda da yaklaşık 1,1 kat azalmıştır. Sadece yüksek yağlı diyet ile beslenen HFD grubunda ise BCAN geni ekspresyon seviyesi 1,42 kat artmış olup istatistiksel açıdan da bu artış önemli bulunmuştur ($p=0,02$, $p<0,05$) (şekil 19, çizelge 9).

Çizelge 9. Gen Ekspresyonu Verileri

	HFD+STZ		HFD		STZ	
Gen	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	p değeri	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	p değeri	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	p değeri
ADAMTS4	0,646	0,07	1,279	0,10	0,963	0,92
TIMP3	0,783	0,51	0,738	0,43	0,857	0,15
RELN	0,724	0,83	1,398	**0,0007**	0,899	0,43
BCAN	0,722	0,18	1,426	**0.02**	0,987	0,93

5. TARTIŞMA

Tip 2 diyabet ve Alzheimer hastalığı dünya çapında yaygın olarak görülen, çok sayıda insanı etkileyen hastalıklardır. Hem tip 2 diyabet hem de Alzheimer için hastalık gelişimini önlemeye ve tedaviye yönelik hedefleri olan çok fazla çalışma yapılmış olup, hala bu çalışmalar sürdürülmektedir. Bu çalışmalarda sürpriz bir şekilde her iki hastalığında dejeneratif süreçlerinde yer alan ortak moleküler mekanizmalar tespit edilmiştir. Diyabetin gelişimi ile ilgili moleküler defektler, Alzheimer hastalığını da içeren tüm demans tiplerinde demans gelişim riskini 2-3 kat arttırmaktadır[55]. Klinik ve deneysel çalışmalar sonucunda AH ve T2D'in ortak moleküler ve biyokimyasal mekanizmalara sahip olduğu bulunmuştur[56].

Tip 2 diyabette meydana gelen insülin direnci ile demans ve azalan bilişsel fonksiyonlar arasında yakın bir ilişki olduğuna dair çok sayıda kanıt vardır. Periferal insülin direncine eşlik eden serebral insülin direnci ile birlikte demans tablosu meydana gelir. Alzheimer hastalığının iki tipik bulgusu olan amiloid plaklar ve nörofibriller yumakların meydana gelmesinde rol oynayan Aβ ve tau proteinlerinin metabolizmasını etkileyen insülin, iki hastalık arasında ki ilişkinin ortaya konmasında en belirgin köprüdür[95].

Beyin ekstraselüler matriksi (ESM), beyinde ekstraselüler boşluğu dolduran, beyin plastisitesinde ve hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynayan moleküllerdir. ESM yetişkin beyninde nöronal plastisiteyi düzenleyen moleküler bir fren gibi davranır. Çünkü nöronal plastisite beyin ESM'sinin enzimatik parçalanması ya da genetik manüpülasyonu ile düzenlenebilir[70]. Ekstraselüler matriks proteinleri üzerinde seçici rol oynayan ekstraselüler proteaz aileleri vardır. Bu protein aileleri; ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) ve MMP (matriks metalloproteinaz)' lardir. MSS' de matriks proteinlerinin miktarındaki değişiklikleri meydana getiren bu proteazlar nöronal aktiviteyi düzenlerler[71]. Ekstarselüler matriks kompozisyonunda ve ESM volümünde yaşa bağlı değişiklikler, Alzheimer hastalığının başlangıcı ve gelişiminde de rol oynayan en önemli parametrelerden biridir. En son yapılan çalışmalarda göre ekstraselüler matriks ve proteazları, hafıza, öğrenme ve plastisitenin en önemli düzenleyicileri olduğu belirlenmiştir[72].

Çalışmamızda, yüksek yağlı diyet ve streptozotosin enjeksiyonu ile tip 2 diyabet modeli geliştirdiğimiz ratlarda, beyin ekstraselüler matriks moleküllerini kodlayan Alzheimer hastalığı patofizyolojisi ile de ilişkili olduğu düşünülen ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Reed ve arkadaşları bir tip 2 diyabet modeli uyarımında öncelikle %40 kalori içeren bir diyeti yaklaşık 2 haftalık bir süreç boyunca uygulamanın ardından 50mg/kg STZ enjeksiyonu yapıyorlar. Bu şekilde geliştirilen modelde vücut ağırlığı, açlık glikoz seviyesi, serum insülin seviyesi, FFA ve trigliserit seviyesinin arttığı tesbit ediliyor. Geliştirilen modelde trigliserit seviyesindeki yükselme, insandaki T2D durumunda yaygın olarak görülen anormal lipoprotein metabolizmasının geliştirilmesinde başarılı olunduğunu gösteriyor[39]. Zhang ve ark. erkek ratlara, %30 yağ içeren HFD ve 15 mg/kg STZ uygulamışlar. Bu modelde, T2D patolojisinin ortaya çıkma süresi Reed ve ark. geliştirdiği modele kıyasla daha uzun sürmüştür[40]. Srinivasan ve ark. %58 yağ içeren (domuz yağı) ile 2 hafta boyunca besleyip daha sonra i.p. olarak çeşitli dozlarda (25, 35, 45, 55 mg/kg) STZ uygulaması yapmışlar. 35 mg/kg STZ, insandaki T2D'in biyokimyasal ve patolojik bulgularına (önemli oranda artmış glikoz intoleransı, vücut ağırlığı, hiperglisemi, total kolesterol, trigliserit ve insülin seviyesi) en benzer durumu geliştiren doz olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu modelde 10 haftalık süre boyunca hiperglisemi devam etmiştir[41]. Tüm bu diyet içeriği ve dozlar gözönünde bulundurulduğunda, böyle bir model oluşturmaya çalışırken en önemli nokta, seçilen diyetin yağ içeriği, STZ dozu ve maruz kalma süresidir. Biz de çalışmamızda %50 oranında iç yağı içeren yem ve 45mg/kg STZ dozu kullanarak Tip 2 diyabet modeli geliştirdik.

Kondroitin sülfat proteoglikanlarının degredasyonundan sorumlu ADAMTS ailesi üyesi olan ADAMTS4, merkezi sinir sistemi gelişiminde sinaptik plastisitede, yaşlanma sürecinde rol oynar. Son yapılan çalışmalarda ADAMTS4 uygulaması ile kondroitin sülfat proteoglikanlarını degrade ederek ratlarda spinal kord yaralanması sonrası aksonal rejenerasyonu sağlayan terapötik yaklaşımda umut vaad edici yararları tespit edilmiştir[96]. TIMP3'ün ESM kondroitin sülfat proteoglikanları ile etkileşimi de (agrekan gibi) ekstraselüler ADAMTS enzimlerinin inhibisyonunu sağlar[82].

Lemarchant ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada nörodejeneratif bir hastalık olan Amfitrofik lateral skleroz (ALS) hastalık modeli geliştirilen farelerle, wild tip farelere kıyasla ALS modeli erkek farelerin lumbar spinal kordlarında, hastalığın son evresinde (motor nöron kaybı ve dejenerasyonu meydana gelen evre) ADAMTS4 mRNA seviyesinin önemli derecede azaldığı, ADAMTS4 inhibitörü TIMP3'ün ekspresyon seviyesinin ise arttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, wild tip farelerde ADAMTS 1,4,5,9 proteoglikanlarının ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, wild tip farelerin spinal kord ve beyin korteksinde ADAMTS4 ekspresyon seviyesinin diğerlerine nazaran 8 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir[96]. Bizim çalışmamızda da yüksek yağlı diyet ile besleyip, STZ enjeksiyonu yaptığımız ve normal diyet uygulayıp STZ enjeksiyonu yaptığımız gruplarda, Lemarchant ve ark. 'nın yaptığı çalışma ile uyumlu olarak ADAMTS4 ekspresyonu azalmışken, yüksek yağlı diyet ile beslediğimiz obez grupta ise yüksek çıkmıştır. TIMP3 ifadesi ise her üç grupta da kontrol grubuna kıyasla düşük çıkmıştır ve Lemarchant ve ark. 'nın yaptığı çalışma ile uyumlu değildir.

Haddock ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ADAMTS1,4,5 ve TIMP3 ekspresyon seviyeleri normal ve multiple sklerozlu (MS) hastaların beyin dokusunda incelenmiş. MS' li beyin dokusunda ADAMTS1 ve ADAMTS5 ve inhibitör TIMP3 seviyesi azalmışken, ADAMTS4 seviyesi kontrol grubuna kıyasla değişmemiştir. Ancak ADAMTS4 protein seviyesi kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artmıştır. Bu çalışmaya göre ADAMTS4'ün MS prosesinde lezyon gelişiminde muhtemel bir rol oynadığı, TIMP3 seviyesinde azalmanın ise ADAMTS aracılı kesime izin vererek ESM değişimini arttırdığı ve MS'li beyinde MSS' deki patolojik olaylara katkıda bulunduğu rapor edilmiştir[97]. Nörodejeneratif bir hastalık olan MS hastalığında yapılan bu çalışmada bizim sonuçlarımız ile uyumlu olarak TIMP3 seviyesi tüm çalışma gruplarımızda azalmıştır.

Satoh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Wistar ratların serebral korteks ve hipokampüslerinden hazırlanan astrosit kültürü Aβ ile muamele edilmiş ve ADAMTS4 mRNA seviyesi incelenmiştir. Muameleli grupta, muamelesiz gruba kıyasla ADAMTS4 seviyesi 8,1 kat yüksek bulunmuştur. Bu çalışmaya göre, Aβ muamelesi sonucu artan ADAMTS4 seviyesi AD'li beyinde ESM degredasyonu meydana geldiğini gösterir. Bu enzimin aktivitesinde artış sonucu ekstraselüler matriks degredasyonu hızlanır, nöronlar ve onların sinapsları için elzem lokalizasyonları ve yapıları değişir, nöral ağ yapısı

bozulur[98]. Yapılan bu in-vitro çalışma, bizim yaptığımız in-vivo çalışma sonuçlarımız ile uyumsuzdur.

Literatürde Alzheimer ve ADAMTS seviyesinin azalması ya da artışını gösteren farklı çalışmalar vardır ve bu konuda bir uzlaşma söz konusu değildir. Pehlivan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada immünohistokimya sonuçlarına göre, Alzheimer'lı hastaların beyinlerinden alınan otopsi örneklerinde, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla ADAMTS4 ve ADAMTS5 ifadesi baskılanmış olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre ECM degredasyonu AD'li hastalarda yetersizdir ve sonuç olarak ECM bileşenlerinin fazla birikimi meydana gelir[76]. Pehlivan ve arkadaşlarının insan beyin dokusunda yaptığı çalışma verileri çalışmamız ile uyumlu olup, ADAMTS4 mRNA ifadesi kontrol grubuna kıyasla azalmış olarak bulunmuştur.

Gibb ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada travmatik beyin hasarı (TBI) oluşturulan fare modelinin hipokampusunde post-TBI' de TIMP3 seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda TIMP3'ün post-TBI'de nöro-bilişsel bozukluğu tamir edici yönde etki gösterdiği ve nöronal korumada bir fonksiyona sahip olduğunu destekleyen bulgular elde edilmiştir[99]. Çalışmamızda da TIMP3 seviyesinin Tip 2 diyabet ve obezite modeli geliştirdiğimiz ratların hipokampuslerinde düşük çıkması, Gibb ve arkadaşlarının çalışmasından yola çıkarak, ratlarda nöro-bilişsel bir bozukluk olabileceğini düşündürtmektedir.

Reelin MSS' de salgılanan ve nöronal gelişimde önemli bir rolü olan ekstraselüler glikoproteindir. Yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalının başlangıç sürecinde entorhinal korteksde (hafıza gelişiminde önemli rol oynayan beyin bölümü) reelin ekspresyonunda ve beyinde reelinin protein seviyesinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bunun yanısıra AD' nin son aşamalarında frontal korteksde reelin mRNA seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir. Bu durum reelinin hastalık sürecine katkıda bulunabileceği ya da hastalık sürecinde potansiyel dengeleyici bir molekül olabileceği şeklinde yorumlanmıştır[78].

Alzheimer hastalığında reelin aracılı sinyalleşmenin değiştiğini gösteren genetik ve biyokimyasal çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, reelin ifadesinde azalmanın sinaptik fonksiyon, hücre iskeleti stabilitesi ve aksonal transportu bozarak AD başlangıcı ve gelişimine katkıda bulunduğu öne sürülmüştür[100]. Çalışmamızda da reelin mRNA seviyesi tip 2 diyabet modeli geliştirdiğimiz ratlarda azalmış olarak

bulunmuş olup, bu çalışma ile uyumlu sonuçlar elde edilmesi, Alzheimer hastalığı başlangıcı ya da gelişimine tip 2 diyabetin sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Reelini hem C terminalden hem de N terminalden kesen ve inflamasyon ile uyarılan bir proteaz olan ADAMTS4'ün varlığı ile, wild tip farelerde immün savunmada reelin agregasyonunda bir hızlanma olduğu gösterilmiştir. Reelin ile birlikte eksprese olan endojen ADAMTS4 ve ADAMTS5 inhibitörleri TIMP1 ve TIMP3'ün reelin proteolitik kesimini blokladığı gösterilmiştir[77].

Yapılan bir çalışmada 16 aylık yaşlı ve 4 haftalık genç wild tip farelerin hipokampus lizatlarında reelin proteolitik kesiminde herhangi bir farklılık gözlenmezken, genç farelerde reelin N terminal agregatları daha küçük iken, yaşlı farelerin hipokampuslerinde N terminal agregat büyüklüğünde oldukça farklılık gözlenmiştir. Bu çalışmada, yaşa bağlı uygun protein degredasyonunda ki azalmanın reelini de etkileyebileceği ve agregat oluşturma eğiliminde olan N terminal fragmentlerin internöronal birikiminin meydana geldiği öne sürülmüştür[101]. Genellikle orta yaş ve sonrasında ortaya çıkan tip 2 diyabetinde, yaşlanma sürecinde beyinde meydana gelen bu değişimler ile birlikte ve birbirlerini tetikleyerek hastalık süreçlerini hızlandırıp, ilerletebileceğini düşündürmektedir.

Kondroitin sülfat proteoglikanlarından lektikan ailesi üyesi olan brevikan, beyin ekstraselüler matriks formasyonunda görevlidir[83]. Valenzuela ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada brevikan kesiminin sinaptik plastisitede çok önemli rol oynadığı dolayısı ile ekstraselüler matriks homeostazı açısından da önemli olduğu bulunmuştur[84]. Brevikan kesimi sonrası oluşan brevikan fragmentlerinin sinyalizasyon açısından bilgilendirici olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre entorhinal korteks yaralanmaları sonrası dentat gyrus'un yeniden şekillenmesinde brevikanın proteolitik prosesi oldukça önemlidir[102]. Yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalığında amiloid plakların yapısında yer alan brevikan temelli aksonal kabuğun kaybolması ile paralel olarak sinaps kaybı ile ilişkili olduğu bulunmuştur[103]. Bu çalışma ile uyumlu olarak brevikan' ı kodlayan BCAN geninin ifade düzeyi tip 2 diyabet modeli geliştirdiğimiz ratlarda azalmış olup, Alzheimer hastalığında görülen dejeneratif süreci hızlandırabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlarda ağırlık artışı ile birlikte insülin direnci meydana getirildi. Buna paralel olarak kan glikoz seviyesi ve insülin seviyesinde artış ile T2D gelişimine zemin hazırlayan ve en önemli risk faktörü olan obezite modeli meydana getirildi. Obezite sonrası, T2D gelişim süresini kısaltmak amacı ile pankreas beta hücrelerini tahrip eden STZ uygulaması yapıldı. Bu şekilde T2D patofizyolojisinde yer alan insülin direnci ve beta hücre hasarı taklit edilerek deneysel T2D modeli geliştirildi. Tip 2 diyabet modeli geliştirilen ratlarda, beyin ekstraselüler matriks moleküllerini kodlayan Alzheimer hastalığı patofizyolojisi ile de ilişkili olduğu düşünülen ADAMTS4, TIMP3, RELN, BCAN genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1. Deneyin ikinci haftasından itibaren yüksek yağlı diyet ile beslenen HFD ve HFD+STZ gruplarının ortalama ağırlıklarında, normal diyet ile beslenen STZ ve kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmiştir($p<0.001$).
2. HFD+STZ ve STZ grubu ratlarda açlık kan glikoz seviyesi sekizinci haftada yapılan STZ enjeksiyonu ile artış göstermiş olup, kontrol grubu ve HFD grubu ratların ortalama glikoz seviyesine kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmektedir. HFD ve kontrol grubu ratların glikoz seviyelerini kendi içinde karşılaştırdığımızda ise, HFD grubu ve kontrol grubu arasındaki farkın anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$).
3. Deney gruplarından STZ ve kontrol grubu serum insülin seviyeleri, yüksek yağlı diyet ile beslenen HFD ve HFD+STZ gruplarına nazaran daha düşüktür.
4. HFD ve HFD+STZ gruplarında kan şekerindeki düşme ilk 30 dk' da %50'den azdır. Bu iki grupta insülin direncinin meydana geldiği kabul edilmiştir. Kontrol ve STZ gruplarında ise kan şekerindeki düşme %50' den fazladır. Ölçüm alınan tüm dakikalar açısından, bütün gruplar karşılaştırıldığında elde edilen veriler istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p>0,001$). Ağırlık artışı ve insülin direncinin meydana geldiğini gösteren bu veriler doğrultusunda deneysel T2D modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Ancak daha etkin, daha kısa sürede ve daha az masraflı kolay uygulanan, biyokimyasal olarak kan profili (açlık glikozu, serum insülin, lipid profili, karaciğer enzimleri, vd.) ve patogenezi (nöral,

retinal, renal ve kardiak fonksiyon) açısından insandaki tip 2 diyabete en yakın özellikleri barındıran bir deney düzeneği tasarlanabilir.

5. Histopatolojik inclemeler sonucunda HFD ve kontrol gruplarında yer alan rat hipokampuslarında, nöron uzantılarının ve moleküler katındaki astrositlerin normal histolojik yapısında olduğu görüldü. HFD+STZ ve STZ gruplarında yer alan rat hipokampuslarında en belirgin bulgu nöronların büzüşmesiydi. Nöron hasarının spesifik bir bulgusu olan, nöron büzüşmeleri gözlenmiştir. Ayrıca HFD+STZ grubunda yer alan hayvanlardan bazılarında moleküler tabakada plak şeklinde 3-5 piramid hücre büyüklüğünde koyu boyanma alanlarına rastlandı. Histopatolojik bulgular doğrultusunda beyin hipokampus dokusunda nöronal hasar oluştuğu gözlenmiştir. Ancak HFD+STZ grubu ratlarda gözlemlenen plak benzeri yapıların, Alzheimer hastalığının patofizyolojik bulgusu olan amiloid plaklar olup olmadığını belirlemek için spesifik markerlar ile immünohistokimyasal boyama yapılması daha uygun olabilir.
6. T2D' de meydana gelen periferal insülin direncine eşlik ettiği düşünülen serebral insülin direnci ayrıca insülinin Aβ ve tau metabolizmalarını etkilemesi sebebiyle, daha önceki çalışmalarda Alzheimer ile ilişkisi olduğu düşünülen ve ekstraselüler matriks proteinlerinin miktarındaki değişiklikleri belirleyerek nöronal aktiviteyi düzenleyen proteazları kodlayan ADAMTS4, TIMP3, RELN ve BCAN genlerinin seviyesi araştırılmıştır. ADAMTS4, TIMP3, RELN ve BCAN genlerinin ifadesi, HFD+STZ ve STZ gruplarında kontrole kıyasla azalmış olarak bulunmuştur. HFD grubunda ise, ADAMTS4, RELN ve BCAN genlerinin ifadesi kontrol grubuna kıyasla artmışken, inhibitör TIMP3 ifadesi azalmış olarak bulunmuştur. HFD grubunda ise RELN geni ekspresyon seviyesi 1,39 kat artmış olup istatistiksel açıdan da bu artış önemli bulunmuştur ($p=0,0007$, $p<0,05$). Yine HFD grubunda BCAN geni ekspresyon seviyesi 1,42 kat artmış olup istatistiksel açıdan da bu artış önemli bulunmuştur ($p=0,02$, $p<0,05$). Literatürde bu genlerin artışı ya da azalışı ile ilgili net bir ifade olmayıp, bu genlerin Alzheimer ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu genlerin, T2D ve Alzheimer hastalık örgüsünde hangi aşamada nasıl bir rol oynadıklarına dair yorum yapılabilmesi ve bu hastalıkların önlenmesi, tedaviye yönelik yeni yaklaşımlar benimsenebilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. **2014**; 37: 81-90.

2. International Diabetes Federation (IDF) 2017 Erişim: https://idf.org/54-our-activities/176-programme-and-abstracts.html Erişim Tarihi: 20.09.2018

3. International Diabetes Federation (IDF) 2015 Erişim: https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/13-diabetes-atlas-seventh-edition.html Erişim Tarihi: 20.09.2018

4. International Diabetes Federation (IDF) 2013 Erişim: https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/19-atlas-6th-edition.html Erişim Tarihi: 20.09.2018

5. **Satman I, Yilmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, Bastar I, Tütüncü Y, Sargin M, Dinççag N, Karsidag K, Kalaça S, Ozcan C, King H.** Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). Diabetes Care. **2002** ;25(9):1551-6.

6. **Satman I1, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N, Karsidag K, Genc S, Telci A, Canbaz B, Turker F, Yilmaz T, Cakir B, Tuomilehto J.** Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. Eur J Epidemiol. **2013**;28(2):169-80.

7. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care **2003**; 26: 5-20

8. Classification and Diagnosis of Diabetes Diabetes Care **2015**;38(1):8–16.

9. Erişim: https://www.turkdiab.org/admin/PICS/webfiles/Diyabet_tani_ve_tedavi__kitabi.pdf Erişim Tarihi: 22.09.2018

10. **Shah AD, Langenberg C, Rapsomaniki E, et al.** Type 2 diabetes and incidence of a wide range of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. The Lancet **2015**; 3(2):105-113.

11. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus American Diabetes Association Diabetes Care **2010** Jan; 33(1): 62-69.

12. Amerıcan Diabetes Associatıon standards of medıcal care in diabetes **2018**:41(1).

13. Erişim: http://www.diabetcemiyeti.org/c/turkiye-diyabet-onleme-ve-kontrol-programi Erişim Tarihi: 23.09.2018.

14. **Hazman Ö**. Oral Antidiyabetik İlaç Sitagliptin'in Oksidan-Antioksidan Denge Üzerine Etkisinin Deneysel Tip 2 Diyabet Modeli Oluşturulan Ratlarda Araştırılması. Doktora tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Afyon, **2011**.

15. **Şen M.** Tip 2 Diyabet Tedavisinde İnsülin Duyarlılık Artırıcı İlaçların Yeri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2006**.

16. **Goldstein BJ, Müller-Wieland D.** Tip 2 Diyabet. 1th. Ed. **2004**.

17. **Saini V.** Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. World J Diabetes **2010**; 1(3): 68-75.

18. **Altunoğlu E.S.** İnsülin Direnci. Istanbul Med J **2012**;13(3):137-140.

19. **Gastaldelli A.** Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Dıabetes Research and Clinical Practice. **2011**; 93:60-65.

20. **Ulu M.S, Yüksel Ş.** İnsülin Direnci. Kocatepe Medical Journal **2015**; 16:238-243.

21. **Henry R.R.** Insulin Resistance: From Predisposing Factor to Therapeutic Target in Type 2 Diabetes Clinical Therapeutics. Clin Ther. **2003**;25 :47-63.

22. **Harris MI.** Undiagnosed NIDDM: Clinical and public health issues. Diabetes Care. **1993**; 16:642-652.

23. **Garvey WT, Maianu L, Hueckstead TP, et al**. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. J Chin Invest. **1991**;87: 1072- 1081.

24. **Şenol Ş.P, Tunçtan B.** Peroksizom Proliferatör ile Etkinleştirilen Reseptörlerin İnsülin Direnci ve Septik Şok Patojenezindeki Rolü. MÜSBED **2015**;5(4):247-258

25. **Porte D, Khan E.S.** β-cell dysfunction an failure in type 2 diabetes, Diabetes, **2001**;50(1):160-163.

26. **Cerf M.E.** Beta cell dysfunction and insulin resistance Front. Endocrinol., **2013**; 4: 37.

27. Erişim: http://slideplayer.nl/slide/2005829/ Erişim Tarihi: 01.10.2018

28. **Ferrannini E.** The stunned beta cell: a brief history. Cell Metab. **2010**; 11:349–352.

29. **Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D.** The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. Annu Rev Genomics Hum Genet **2003**; 4: 257-291.

30. **Omar A.** Genetics of type 2 diabetes, World J Diabetes **2013**; 4(4): 114-123.

31. **Fletcher B, Gulanick M.** Risk Factors for Type 2 Diabetes Mellitus. J Cardiovasc Nurs **2002**;16(2):17–23.

32. **Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W.** Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention International Journal of Medical Sciences **2014**; 11(11): 1185-1200.

33. Erişim: https://www.bbc.com/turkce/haberler/2015/06/150603_vert_fut_mikrop_dengesi Erişim Tarihi: 5.10.2018.

34. **Pulgaron ER, Delamater AM.** Obesity and Type 2 Diabetes in Children: Epidemiology and Treatment. Curr Diab Rep. **2014**; 14(8): 508.

35. **Griffith ML, Younk LM, Davis SN.** Visceral Adiposity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes. American Journal of Lifestyle Medicine. **2010**;4(3):230-243.

36. **Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL.** Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, NCHS Data Brief. **2017**; 288.

37. **Barzilai N, She L, Liu BQ, et al.** Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. Diabetes. **1999**; 48:94-98.

38. **Islam S, Loots DT.** Experimental Rodent Models Of Type 2 Diabetes: A Review. Methods Find Exp Clin Pharmacol **2009**; 31(3):1-13.

39. **Kamenov, Z., Higashino, H., Todorova, M., Kajimoto, N., Suzuki, A.** Physiological characteristics of diabetic neuropathy in sucrose fed Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. Methods Find Exp Clin Pharmacol **2006**; 28(1): 13-8.

40. **Reed, M.J., Meszaros, K., Entes, L.J., Claypool, M.D., Pinkett, J.G., Gadbois, T.M., Reaven, G.M.** A new rat model of type 2 diabetes: The fatfed, streptozotocin-treated rat. Metabolism **2000**; 49(11): 1390-4.

41. **Zhang, F.L., Ye, C.Z., Li, G. et al.** The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. Exp Anim. **2003**; 52(5): 401-7.

42. **Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C.L., Ramarao, P.** Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. Pharmacol Res. **2005**; 52(4): 313-20.

43. **Ridge PG, Ebbert MT, Kauwe JS.** Genetics of Alzheimer's disease. Biomed Res Int. **2013**; 1-14.

44. **Alzheimer's Association.** 2017 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia. **2017**;13: 325–373.

45. **Haapasalo A, Pikkarainen M, Soininen H.** Alzheimer's disease: a report from the 7th Kuopio Alzheimer symposium. Neurodegener. Dis. Manag. **2015**: 5(5); 379–382.

46. **Bruno P.** Imbimbo, Jay Lombard, Nunzio Pomara. Pathophysiology of Alzheimer's Disease. Neuroimag Clin N Am. **2005**:15;727 – 753.

47. Erişim:http://discovermagazine.com/2015/march/16-cracking-the-alzheimers-code Erişim Tarihi: 8.10.2018.

48. **Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK.** The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. J Neurol Neurosurg Psychiatry. **1999**; 66:137–147.

49. **Saka E.** Alzheimer hastalığı patofizyolojisi: deneysel ve genetik bulgular turkısh journal of geriatrics. **2010**:13(3); 21-26.

50. **Haass C, Selkoe DJ.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. Nature reviews **2007**; 8:101-12.

51. **Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H.** Alzheimer's disease. Lancet **2006**;368(9533):387-403.

52. **Zhang C.** Natural Compounds That Modulate BACE-1 processing of Amyloid-beta Precursor Protein in Alzheimer's Disease. Discovery Medicine.**2012**:14(76);189-197.

53. **Gürvit H.** Sinir Sisteminin Dejeneratif Hastalıkları. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. Nöroloji. İstanbul: Nobel Matbaacılık; **2004**: 367-415.

54. **Meraz-Ríos MA, Lira-De León KI, Campos-Peña V, De Anda-Hernández MA, Mena-López R.** Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. J Neurochem. **2010**;112(6):1353-67.

55. **Cole A.R, Astell A, Green C, Sutherland C.** Molecular connexions between dementia and diabetes. Neurosciences and Biobehavioral reviews. **2007**; 31:146-1063.

56. **Sandhir R, Gupta S.** Molecular and biochemical trajectories from diabetes to Alzheimer's disease: A critical appraisal. World J Diabetes. **2015**; 6(12):1223-42.

57. **Li L, Hölscher C.** Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. Brain Res Rev **2007**; 56: 384-402

58. **De la Monte SM, Wands JR.** Alzheimer's disease is type 3 diabetesevidence reviewed. J Diabetes Sci Technol **2008**; 2: 1101-1113.

59. **Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Candeias E, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI.** Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. Brain Res **2012**; 1441: 64-78.

60. **Lester-Coll N, Rivera E.J, Soscia S.J, Doiron K, Wands J.R, de la Monte S.M.** Intracerebral streptozotocin model of type 3. J Alzheimers Dis. **2006**; 9:13-33.

61. **Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., Torres-Aleman, I.** Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat. Med.* **2002:** 8:1390–1397.

62. **Janson, J., Laedtke, T., Parisi, J.E., O'Brien, P., Petersen, R.C., Butler, P.C.** Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* **2004;** 53: 474–481.

63. **Kulstad J.J, Green P.S, Cook D.G, Watson G.S, Reger M.A, Baker L.D, Plymate S.R, Asthana S, Rhoads K, Mehta P.D, Craft S.** Differential modulation of plasma beta-amyloid by insulin in patients with Alzheimer disease. Neurology. **2006**; 66:1506–1510.

64. **Doble B.W, Woodgett J.R.** Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial–mesenchymal transitions. Cells Tissues Organs. **2007**; 85:73–84.

65. **McClain D.A, Lubas W.A, Cooksey R.C, Hazel M, Parker G.J, Love D.C. Hanover J.A.** Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2002**; 99:10695–10699.

66. **Mittal K, Katare DP** Shared links between type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease: A review. Diabetes Metab Syndr. **2016**; 10(2):9-144.

67. **Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS.** A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature **2002**; 420: 333-336.

68. **Freeman LR, Granholm AC.** Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. **2012**; 32:643–653.

69. **Qin L, Reddy PH. Common** neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta. **2017**;1863(5):1037-1045.

70. **Miyata S, Kitagawa H.** Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. Biochim Biophys Acta. **2017**;1861(10):2420-2434.

71. **Gottschall PE, Howell MD**. ADAMTS expression and function in central nervous system injury and disorders. Matrix Biol. **2015**;44-46:70-6.

72. **Morawski M, Filippov M, Tzinia A, Tsilibary E, Vargova L.** ECM in brain aging and dementia. Prog Brain Res. **2014**; 214:207-27.

73. Erişim: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000158859-ADAMTS4/tissue Erişim Tarihi: 10.10.2018

74. **Gurses MS, Ural MN, Gulec MA, Akyol O, Akyol S**. Pathophysiological Function of ADAMTS enzymes on molecular mechanism of Alzheimer's disease. Aging Dis. **2016**;7(4):479-90.

75. **Satoh K, Suzuki N, Yokota H.** ADAMTS-4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) is transcriptionally induced in beta-amyloid treated rat astrocytes. Neurosci Lett. **2000**;289: 177-180.

76. **Pehlivan S, Fedakar R, Eren B, Akyol S, Eren F, Turkmen Inanır N et al. ADAMTS4**, 5, 9, and 15 expressions in the autopsied brain of patients with Alzheimers Disease: a preliminary immünohistochemistry study. J Clin Psychopharmacol. **2015**.

77. **Krstic D1, Rodriguez M, Knuesel I.** Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and their modulators. PLoS One. **2012**;7(10):47793.

78. **Yu NN, Tan MS, Yu JT, Xie AM, Tan L.** The Role of Reelin Signaling in Alzheimer's Disease. Mol Neurobiol. **2016**;53(8):5692-700.

79. **Koyama Y, Baba A, Matsuda T.** Intracerebroventricular administration of an endothelin ETB receptor agonist increases expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -3 in rat brain. Neuroscience. **2007**;147(3):620-30.

80. **Lee JK, Shin JH, Suh J, Choi IS, Ryu KS, Gwag BJ.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) expression is increased during serum deprivation-induced neuronal apoptosis in vitro and in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a potential modulator of Fas-mediated apoptosis. Neurobiol Dis. **2008**;30(2):174-85.

81. Erişim: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP3&keywords=timp Erişim Tariri hi: 11.10.2018

82. **Turner SL, Mangnall D, Bird NC, Bunning RA, Blair-Zajdel ME**. Expression of ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5 and TIMP3 by hepatocellular carcinoma cell lines. Int J Oncol. 2012;41(3):1043-9.

83. Erişim: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCAN&keywords=bcann Erişim Tarihi: 12.10.2018.

84. **Valenzuela JC, Heise C, Franken G, Singh J, Schweitzer B, Seidenbecher CI, FrischknechtR.**Hyaluronanbased extracellular matrix under conditions of homeostati c plasticity. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **2014**;369(1654):20130606.

85. **Furnes M.W, Zhao C.M, Chen D.** Development of Obesity is Associated with Increased Calories per Meal Rather than per Day. A Study of High-Fat Diet-Induced Obesity in Young Rats, Obes Surg. **2009**; 19: 1430–1438

86. **Durham H.A, Truett G.E.** Development of insulin resistance and hyperphagia in Zucker fatty rats, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **2006**; 290(3): 652–658.

87. **Matthews D.R, Hosker J.P, Rudenskı A.S, Naylor B.A, Treacher D.F, Turner R.C.** Homeostasis model assessment: insulin resistance and β-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man, Diabetologia. **1985**; 28: 412-419.

88. **Chomczynski P, Mackey K.** Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. Biotechniques Short technical report. **1995**; 9(6):942-945.

89. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR" Turkiye Klinikleri J Med Sci **2007**;27(5):763-7.

90. **Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X.** An improvement of the 2ˆ(–delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath. **2013**; 3(3): 71–85.

91. **Canas X, et al.** Rat insulin turnover *in vivo*. Endocrinology. **1995**; 136:3871–3876.

92. **Durham H.A, Truett G.E.** Development of insulin resistance and hyperphagia in Zucker fatty rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **2006**; 290: 652–658.

93. **Hazman Ö, Çelik S.** Effects of Oral Anti-diabetic Agent Sitagliptin on Total Antioxidant and Oxidant Status in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus. Journal of Applied Biological Sciences. **2014**;8 (1): 31-37.

94. Erişim :https://www.sanalicerik.com/insulin-tolerans-testi-nedir-nasil-yapilir/ Erişim Tarihi: 15.10.2018

95. **Biessels GJ1, Kappelle LJ.** Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? Biochem Soc Trans. **2005**;33(5):1041-4.

96. **Lemarchant S, Pomeshchik Y, Kidin I, Kärkkäinen V, Valonen P, Lehtonen S, Goldsteins G, Malm T, Kanninen K, Koistinaho J.** ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Mol Neurodegener. **2016**;25;11-10.

97. **Haddock G, Cross AK, Plumb J, Surr J, Buttle DJ, Bunning RA, Woodroofe MN**. Expression of ADAMTS-1,4,5 and TIMP3 in normal and multiple sclerosis CNS White matter. Mult Scler. **2006**;12(4):386-96.

98. **Satoh K, Suzuki N, Yokota H.** ADAMTS-4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) is transcriptionally induced in beta-amyloid treated rat astrocytes. Neurosci Lett. **2000**;289(3):177-80.

99. **Gibb SL, Zhao Y, Potter D, Hylin MJ, Bruhn R, Baimukanova G, Zhao J, Xue H, Abdel-Mohsen M, Pillai SK, Moore AN, Johnson EM, Cox CS Jr, Dash PK, Pati S.** TIMP3 Attenuates the Loss of Neural Stem Cells, Mature Neurons and Neurocognitive Dysfunction in Traumatic Brain Injury. Stem Cells. **2015**;33(12):3530-44.

100. **Saez-Valero J, Costell M, Sjogren M, Andreasen N, Blennow K, Luque JM** Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. J Neurosci Res. **2003**;72(1):132–136.

101. **Knuesel I, Nyffeler M, Morme`de C, Muhia M, Meyer U, et al.** Agerelated accumulation of Reelin in amyloid-like deposits. Neurobiol Aging. **2009**;30: 697–716.

102. **Mayer J, Hamel MG, Gottschall PE**. Evidence for proteolytic cleavage of brevican by the ADAMTSs in the dentate gyrus after excitotoxic lesion of the mouse entorhinal cortex. BMC Neurosci. **2005**;6: 52.

103. **Morawski M1, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Matthews RT, Arendt T.** Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology**.** Brain Pathol. **2012**;22(4):547-61.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Kayseri' de doğdu. Arif Eminoğlu İlkokulu, Hacı Mustafa Gazioğlu Ortaokulu ve Melikgazi Mustafa Eminoğlu Lisesinde öğretimini tamamladı. Lisans eğitimini 2005-2009 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. Yüksek lisans eğitimini 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda tamamladı. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı.