

**T.C.**  
**BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL DİYABET**  
**OLUŞTURULAN SIÇANLARDA FUKOKSANTİNİN**  
**HİPOKAMPUS ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SEVDENUR UZUN**

**TEZ DANIŞMANI**

**Dr. Öğr. Üyesi Ömür Gülsüm DENİZ**

**BOLU, OCAK - 2025**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sevdenur UZUN tarafından hazırlanan “STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN SIÇANLARDA FUKOKSANTİNİN HİPOKAMPUS ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 3/01/2025

### Jüri Üyeleri

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ömür Gülsüm DENİZ

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ömür Gülsüm DENİZ

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Aslıhan ŞAYLAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes SÖZEN

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

### İmza

.....

.....

.....

.....

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı**

**Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL**  
**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü**  
**ETİK BEYAN**

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu ve Şablonuna uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
  - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
  - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulundan 2023/13 sayılı ile etik izin alınmıştır.

.....  
**SEVDENUR UZUN**

## ÖZET

**STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSSEL DİYABET OLUŞTURULAN  
SIÇANLARDA FUKOKSANTİNİN HİPOKAMPUS ÜZERİNE  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SEVDENUR UZUN  
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖMÜR GÜLSÜM DENİZ)  
BOLU, OCAK - 2025**

**XI + 64 sayfa**

Çalışmanın amacı, diyabetin sebep olduğu hipokampus hasarına fukoksantin (FX) etkisinin ortaya konulmasıdır. Çalışmada, 40 adet 220-250 g, 2-4 aylık *Wistar albino* erkek sıçan Kont (Kontrol), D (Diyabet), D+FX, FX ve dimetil sülfoksit (DMSO) (Çözücü) olmak üzere rastgele eşit sayıda (n=8) 5 gruba ayrıldı. D ve D+FX grupları için 50 mg/kg dozunda streptozotosin (STZ), intraperitoneal tek doz uygulanarak diyabet modeli oluşturuldu. D grubu sıçanlara deney süresince başka bir işlem uygulanmazken, 28 gün boyunca Kont grubuna 1 ml/kg serum fizyolojik, D+FX ve FX grubu sıçanlara 50 mg/kg FX, DMSO grubu sıçanlara ise 1 ml/kg %0,1 DMSO intraperitoneal olarak uygulandı. 28 gün süren çalışmanın 16-20. günlerinde Barnes Maze testi için öğrenme testleri yapıldı ve 28. gün sonuçlar alınıp 29. gün sıçanlar sakrifiye edildi. Anestezi altında intrakardiyak kan alınıp sakrifiye edilen sıçanların beyinleri çıkarılarak, sağ hemisfer rutin histolojik takip sonrası bloklandı. Alınan kesitler histopatolojik ve stereolojik analizler için krezil violet ile immünohistokimyasal analizler için ise Kaspaz-3 ile boyandı. Ayrıca, Cavalieri prensibi ile hipokampus hacmi stereolojik olarak değerlendirildi. Bunlara ek olarak, sol hemisferde apoptozis için; sitokrom (Cyt)-c, Anneksin V, Kaspaz-3, Bcl-2 ilişkili X (Bax) ve B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) gen ekspresyonlarına moleküler analizlerle bakıldı. Ayrıca serum örneklerinde total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS) ölçülerek, oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı. Elde edilen analizler sonucu; D grubunda total hipokampus, CA1+CA2 ve CA3 bölgelerinde hacimde azalma ( $p<0,01$ ), nöronların diziliminde düzensizlik ve koyu boyalı sitoplazmaya sahip piramidal hücreler izlendi. D+FX grubunda ise bu etkilerin tersine çevrilerek hipokampus hacminde artış ( $p<0,01$ ) ve çok sayıda düzgün sınırlara sahip sağlıklı nöronlar saptandı. Ayrıca, moleküler analizlerle diyabet aracılı apoptoz miktarının arttığı ( $p<0,05$ ), yapılan Barnes Maze davranış testinde diyabetin hafızada bozukluğa neden olduğu ortaya konuldu ( $p<0,01$ ). Bu kapsamda FX'in ise diyabette oksidatif stresi azalttığı ( $p<0,01$ ), bozulan bilişsel hafızayı iyileştirdiği, apoptozu azalttığı ve nöroprotektif etki gösterdiği saptandı.

Sonuç olarak, FX uygulamasının diyabetin hipokampus üzerindeki olumsuz etkilerini belirgin bir şekilde azalttığı ortaya konulmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Diyabet, Fukoksantin, Hipokampus, Stereoloji, Apoptozis

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FUCOXANTHIN ON THE HIPPOCAMPUS IN RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES INDUCED BY STREPTOZOTOCIN

MSC THESIS

SEVDENUR UZUN

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY

(SUPERVISOR: ASSISTANT PROFESSOR ÖMÜR GÜLSÜM DENİZ)

BOLU, JANUARY 2025

XI + 64 pages

The aim of the present study was to determine the effect of fucoxanthin (FX) on hippocampus damage caused by diabetes. In the study, 40 male *Wistar albino* rats weighing 220-250 g and aged 2-4 months were randomly divided into 5 equal groups (n=8) as Cont (Control), D (Diabetes), D+FX, FX and dimethyl sulfoxide (DMSO) (Solvent). A diabetes model was created by intraperitoneal administration of a single dose of 50 mg/kg streptozotocin (STZ) for groups D and D+FX. No other procedure was applied to rats in group D during the experiment, while 1 ml/kg physiological serum was administered to rats in the Cont group, 50 mg/kg FX to rats in groups D+FX and FX, and 1 ml/kg 0.1% DMSO was administered intraperitoneally to rats in the DMSO group for 28 days. Learning tests were performed for the Barnes Maze test on days 16-20 of the 28-day study, and the results were obtained on day 28 and the animals were sacrificed on day 29. The brains of the rats, which were sacrificed after intracardiac blood was drawn under anesthesia, were removed, and the right hemisphere was blocked after routine histological follow-up. The sections were stained with cresyl violet for histopathological and stereological analyses and with Caspase-3 for immunohistochemical analyses. In addition, hippocampus volume was evaluated stereologically with Cavalieri principle. In addition, cytochrome (Cyt)-c, Annexin V, Caspase-3, Bcl-2 associated X (Bax) and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) gene expressions were examined with molecular analyses for apoptosis in the left hemisphere. In addition, total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS) were measured in serum samples, and oxidative stress index (OSI) were calculated. As a result of the analyses obtained; In the D group, a decrease in the total hippocampus, CA1+CA2 and CA3 regions volume ( $p<0.01$ ), irregularity in the arrangement of neurons and pyramidal cells with dark-stained cytoplasm were observed. In the D+FX group, these effects were reversed and an increase in hippocampus volume ( $p<0.01$ ) and healthy neurons with regular borders were detected. In addition, molecular analyses revealed that the amount of diabetes-mediated apoptosis increased ( $p<0.05$ ), and the Barnes Maze behavioral test revealed that diabetes caused memory impairment ( $p<0.01$ ). In this context, it was determined that FX reduced oxidative stress in diabetes ( $p<0.01$ ), improved impaired cognitive memory, decreased apoptosis and had a neuroprotective effect.

As a result; it was revealed that FX application significantly eliminated the deleterious effects of diabetes on the hippocampus.

**KEYWORDS:** Diabetes, Fucoxanthin, Hippocampus, Stereology, Apoptosis

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>v</b>
<b>TABLO LİSTESİ .....</b>	<b>viii</b>
<b>FOTOĞRAF LİSTESİ .....</b>	<b>ix</b>
<b>KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ .....</b>	<b>x</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hipokampus.....	3
1.1.1 Hipokampus Embriyolojisi.....	3
1.1.2 Hipokampus Anatomisi .....	4
1.1.3 Hipokampus Histolojisi .....	5
1.2 Diabetes Mellitus .....	6
1.2.1 Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması.....	7
1.2.2 Diabetes Mellitus ve Bilişsel Bozulma.....	8
1.3 Fukoksantin .....	9
1.3.1 Fukoksantin Antidiyabetik Etkileri .....	10
1.3.2 Fukoksantin Nöroprotektif Etkileri .....	11
1.4 Oksidatif Stres ve Antioksidan İlişkisi .....	11
1.5 Oksidatif Stres İndeksi.....	12
1.6 Apoptozis .....	12
1.6.1 Apoptozis Regülasyonu.....	13
1.6.1.2 Bax/Bcl-2.....	13
1.6.1.3 Cyt-c .....	13
1.6.1.4 Anneksin V .....	14
1.6.1.5 Kaspaz-3 .....	14
1.7 Stereoloji.....	14
1.7.1 Cavalieri Prensibi .....	15
<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
2.1 Deney Hayvanları .....	17
2.1.1 Deney Gruplarının Oluşturulması .....	17
2.1.2 Deney Gruplarına Uygulanan İşlemler.....	17
2.2 Solüsyonların Hazırlanması.....	19
2.2.1 Fukoksantin Hazırlanması .....	19
2.2.2 Streptozotosin Hazırlanması.....	19
2.3 Diyabet Modelinin Oluşturulması .....	19

2.4 Davranış Testi .....	19
2.4.1 Barnes Maze .....	20
2.5 Sakrifikasyon ve Dokuların Alınması .....	21
2.6 Rutin Histolojik İşlemler .....	22
2.6.1 Doku Takip İşlemi ve Bloklama.....	22
2.6.2 Kesit Alma.....	23
2.6.3 Krezil Violet Boyama İşlemi.....	23
2.7 Stereolojik Analizler .....	24
2.8 İmmünohistokimyasal Boyama .....	24
2.9 Biyokimyasal Analiz .....	24
2.10 Moleküler Analizler .....	25
2.10.1 Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	25
2.11 İstatistiksel Analiz.....	27
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>28</b>
3.1 Stereolojik Bulgular.....	28
3.1.1 CA1+CA2 Bölgesi Hacim Bulguları.....	28
3.1.2 CA3 Bölgesi Hacim Bulguları.....	29
3.1.3 Total Hipokampus Hacim Bulguları .....	30
3.2 Histopatolojik Bulgular .....	30
3.2.1 CA1 Bölgesi İçin Elde Edilen Histopatolojik Bulgular.....	31
3.2.2 CA2 Bölgesi İçin Elde Edilen Histopatolojik Bulgular.....	32
3.2.1 CA3 Bölgesi İçin Elde Edilen Histopatolojik Bulgular.....	34
3.3 İmmünohistokimyasal Bulgular.....	35
3.4 Açlık Kan- Glukoz Düzeyine Ait Bulgular .....	36
3.5 Vücut Ağırlığı Bulguları.....	37
3.6 Davranış Testi Bulguları.....	38
3.7 Moleküler Analiz Bulguları .....	38
3.7.1 Cyt-c .....	39
3.7.2 Kaspaz-3 .....	39
3.7.3 Anneksin V .....	40
3.7.4 Bax.....	41
3.7.5 Bcl-2 .....	41
3.8 Biyokimyasal Analiz Bulguları .....	42
3.8.1 Serum TAS Bulguları .....	42
3.8.2 Serum TOS Bulguları .....	43
3.8.3 OSI Bulguları.....	44
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>45</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>53</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>64</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1. Hipokampus alt alanlarının şematik gösterimi .....	3
Şekil 1.2. Diyabette bilişsel bozunmaya aracılık eden mekanizmalar .....	9
Şekil 1.3. Fukoksantin molekül yapısı.....	10
Şekil 1.4. Serbest radikallerin birbirine dönüşümünün şematik gösterimi .....	11
Şekil 1.5. Cavaileri prensibinin sıçan beyin dokusunda uygulanışının şematik gösterimi.....	15
Şekil 1.6. Cavalieri yöntemini anlatan temsili bir kesit görüntüsü .....	16
Şekil 2.1. Deney işleyişi zaman gösterge çizelgesi .....	19
Şekil 3.1. Hipokampusun CA1+CA2 bölge hacminin tüm gruplar arasında değişimini gösteren grafik.....	28
Şekil 3.2. Hipokampusun CA3 bölge hacminin tüm gruplar arasında değişimini gösteren grafik.....	29
Şekil 3.3. Total hipokampus hacminin tüm gruplar arasında değişimini gösteren grafik. ....	30
Şekil 3.4. Tüm gruplarda hipokampus bölgesindeki kaspaz 3 immünoreaktivitesi için IIDI değerleri.....	36
Şekil 3.5. Tüm gruplarda açlık kan şekeri düzeylerini gösteren grafik .....	36
Şekil 3.6. Tüm gruplarda vücut ağırlık değişimlerini gösteren grafik.....	37
Şekil 3.7. Tüm gruplarda Barnes maze davranış deney düzeneğinde sıçanların hedefi bulma süresini gösteren grafik .....	38
Şekil 3.8. Cyt c gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik .....	39
Şekil 3.9. Kaspaz-3 gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	40
Şekil 3.10. Anneksin V gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	40
Şekil 3.11. Bax gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik .....	41
Şekil 3.12. Bcl 2 gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik .....	42
Şekil 3.13. Tüm gruplarda TAS seviyelerini gösteren grafik .....	43
Şekil 3.14. Tüm gruplarda TOS seviyelerini gösteren grafik .....	43
Şekil 3.15. Tüm gruplarda OSI değerlerini gösteren grafik.....	44

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.1.</b> Diyabetin sınıflandırılması ve özellikleri.....	7
<b>Tablo 2.1.</b> Deney grupları ve uygulanan işlemler. ....	17
<b>Tablo 2.2.</b> Rutin histolojik doku takip prosedürü.....	22
<b>Tablo 2.3.</b> Krezil violet boyama protokolü .....	23
<b>Tablo 2.4.</b> Mevcut çalışmada kullanılan primer detayları.....	27



# FOTOĞRAF LİSTESİ

## Sayfa

<b>Fotoğraf 2.1.</b> Barnes maze test düzeneğine ait görüntüler .....	20
<b>Fotoğraf 2.2.</b> Test sırasında kullanılan kamera ve yazılım sistemleri.....	21
<b>Fotoğraf 2.3.</b> Deney sonunda sıçanlardan çıkarılan beyin dokuları.....	22
<b>Fotoğraf 3.1.</b> Hipokampusun CA1 bölgesinde krezil violet ile boyanmış kesitlerde piramidal nöronlar .....	32
<b>Fotoğraf 3.2.</b> Hipokampusun CA2 bölgesinde krezil violet ile boyanmış kesitlerde piramidal nöronlar .....	33
<b>Fotoğraf 3.3.</b> Hipokampusun CA3 bölgesinde krezil violet ile boyanmış kesitlerde piramidal nöronlar .....	34
<b>Fotoğraf 3.4.</b> Tüm gruplarda hipokampus kesitlerine ait kaspaz-3 immünohistokimyasal reaktivitesini gösteren görüntüler .....	35

## KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

<b>A<math>\beta</math></b>	: Amiloid Beta
<b>BAİBÜ</b>	: Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
<b>BDNF</b>	: Beyin Kaynaklı Nötrotrofik Faktör
<b>CA</b>	: Cornus Ammonis
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>ChAT</b>	: Kolin Asetiltransferaz
<b>CSF</b>	: Koloni Stimüle Edici Faktör
<b>Cyt-c</b>	: Sitokrom c
<b>D</b>	: Diyabet
<b>DEHAM</b>	: Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
<b>DG</b>	: Dentat Girus
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>FS</b>	: Fosfotidilserin
<b>FX</b>	: Fukoksantin
<b>Glut4</b>	: Glukoz Taşıyıcı 4
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>IDF</b>	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
<b>IGF</b>	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
<b>Kont</b>	: Kontrol
<b>LTP</b>	: Uzun Vadeli Potansiyasyon
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit
<b>OH<sup>-</sup></b>	: Hidroksil
<b>OSI</b>	: Okidatif stres indeksi
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>STZ</b>	: Streptozotosin
<b>TAS</b>	: Total Antioksidan Seviyesi
<b>TBI</b>	: Travmatik Beyin Hasarı
<b>TNF</b>	: Tümör Nekrozis Faktör
<b>TOS</b>	: Total Oksidan Seviyesi
<b>UCP</b>	: Uncoupling Protein
<b>VPA</b>	: Valproik Asit

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve bu tezin oluşma sürecinde bilgi ve tecrübesiyle her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ömür Gülsüm DENİZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Süreç boyunca yanımda olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Doç. Dr. Tülin FIRAT'a ve her zaman için bizlerden bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Aslıhan ŞAYLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda bulunan moleküler analizlerde ve akademik yaşamımda sunduğu katkı ve değerli bilgileriyle sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Hayriye SOYTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman yardımlaşarak çalışmalarını beraber yürüttüğümüz arkadaşım Atınç KALAYCI'ya, bana her konuda destek veren patoloji laboratuvarının bir çalışanı olan kıymetli Hülya OKUMUŞ'a, bu süreçte manevi desteğine ek olarak çizimleriyle katkıda bulunan arkadaşım Zeynep Ece AYTAR'a teşekkür ederim. Yaşamım ve eğitimim boyunca sevgi ve destekleriyle benimle olan sevgili annem, babam ve aileme anlayışları ve varlıkları için, son olarak benim için çok kıymetli arkadaşlarıma destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tezi, 223S588 proje numarası ile TÜBİTAK tarafından "1002-A Hızlı Destek Programı" kapsamında desteklenmiştir.

# 1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), yol açtığı insülin direnci ile karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında komplikasyonlar meydana getirerek uzun vadede birçok hayati organda bozulmalara sebep olan kronik metabolik bir hastalıktır (Alfheaid vd., 2023). Kronik hiperglisemi; yetersiz insülin sentezi veya bozulmuş insülin yararlanımı nedeniyle vücudun glukozu metabolize edemediği, diyabetle ilişkili bir durumdur (Alfheaid vd., 2023; Harrison vd., 2006). Bu durum kan damarları başta olmak üzere sinirler, beyin, diğer doku ve organlarda kronik hasarla birlikte işlev bozukluğu meydana getirir (You vd., 2021). İnsidansı ve sebep olduğu ikincil komplikasyonların fazlalığına ek olarak tedavi süresinin uzun olması göz önüne alındığında; DM'nin dünya çapında sağlık sistemi üzerinde hem maddi hem insan gücü açısından büyük bir yük oluşturduğu açıktır. Bu sebepten dolayı diyabet hastalığının komplikasyonlarını hafifletecek çalışmaların yapılması son derece önemlidir.

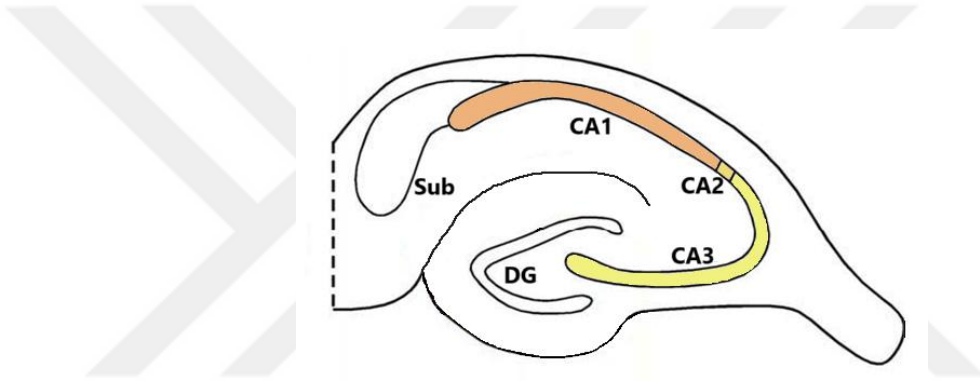
Diyabette meydana gelen kronik hipergliseminin temel enerji kaynağı glukoz olan beyin dokusunu birincil derecede etkilemesi olağandır. Konuyu bu çerçevede ele aldığımızda; bilişsel bozukluğa sahip hastalar ile diyabet arasında yakın bir ilişkinin varlığı açıkça görülebilir. Bu ilişkinin temeline baktığımızda ise diyabet aracılı bilişsel bozulmada; kronik hiperglisemi kaynaklı Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ürünlerinin artışı immün hücre reaksiyonunu tetikleyerek, nötrofil infiltrasyonu ve mikroglia aktivasyonu aracılığıyla nöroinflamasyonu kalıcı hale getirir ve bu durum nöronal apoptoza sebep olur (Jafari Anarkooli vd., 2008; Yonguc vd., 2015). Beynimizin hafıza merkezi olarak bilinen hipokampus bölgesinde ortaya çıkan hiperglisemi kaynaklı serbest radikal artışı, antioksidan savunmada bozuklukla birlikte hipokampal hasara neden olmaktadır. Apoptotik stres hipokampusta proapoptotik protein olan Bcl-2 ilişkili X (Bax) ekspresyonunu artırarak ve B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ekspresyonu azaltır ve sitokrom c (Cyt-c) salınımını teşvik eder, kaspaz-3,9,8 ekspresyonu artarak hiperglisemi aracılı toksisite ile nöronların apoptozunu meydana getiren transkripsiyon faktörü ve gen ekspresyonu indüklenmiş olur (He vd., 2017; Jafari Anarkooli vd., 2008; Ortiz vd., 2022). Hipokampal nörogenezde meydana gelen bu durumun bilişsel bozulmaya sebebiyet verdiği düşünülmektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalarla DM'nin beyinde insülin direnci meydana getirdiği, hipokampusta yeni nöron sayısında

azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Bonds vd., 2020; El-Sayed vd., 2022). Başka bir çalışmada ise bilişsel bozukluğun hipokampus hacmindeki azalma ile de ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur (Y.-W. Zhang vd., 2015). Hayvan ve insan ile yapılan pek çok çalışma diyabetin; bilişsel bozulma, hipokampus hacmi, toplam antioksidan düzeyleri gibi parametrelerde olumsuz etkilerini göstermiştir (Sadeghi vd., 2016; Uzar vd., 2012; You vd., 2021).

Karotenoidler hücrel redoks seviyelerini ve immün yanıtı düzenleyen, gen ekspresyonu, hücrenin büyüme ve gelişmesinde önemli katkıları olan meyve ve sebzelerde bulunan pigmentlerdir (Park vd., 2020). Yenilebilir kahverengi deniz yosunu, diatom ve bazı mikro alg türlerinden elde edilen karotenoidlerin alt sınıfı ksantofillere dahil olan fukoksantin (FX) moleküler yapısındaki allenik bağ ve 5,6-mono epoksit yapılarıyla güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olup; anti-obezitik, anti-diyabetik, anti-kanser, anti-inflamasyon özellikleri vardır (Y. Zhang vd., 2018). FX anti-diyabetik etkiyi adipokinlerin salgılanması uyararak veya glukoz kullanımı ile ilişkili glukoz taşıyıcı 4 (GLUT4) proteinin işlevini düzenlemek gibi çeşitli mekanizmalar ile sağlamaktadır (Aslanbay & İmamoğlu, 2021). FX'in anti-diyabetik etkisinin yanı sıra Alzheimer ve Parkinson gibi deneysel modellerde nörodejeneratif bozuklukların başlamasını geciktirdiği ve nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir (N. Li vd., 2022). Literatürde FX'in beyinde nöroprotektif etkileri üzerinde durulsa da spesifik olarak hipokampus üzerindeki etkilerine ilişkin bilgiler kısıtlı sayıda karşımıza çıkmaktadır (Bae vd., 2020; Maeda vd., 2009; Oliyaei vd., 2021). Diyabetin başta hipokampus bölgesi olmak üzere merkezi sinir sistemi üzerindeki olumsuz etkileri yadsınamaz. Son yıllarda tedavi amaçlı doğal bitkisel ürünler aranmakta ve bu alandaki çalışmalar dikkat çekmektedir. Diyabetin multisistemsel bir hastalık olduğu ve beraberinde çok sayıda sağlık problemine yol açabileceği göz önüne alındığında multiprotektif bir etki gösteren FX'in bu etkileri tersine çevirebileceğini düşünmekteyiz. İyi bir anti-diyabetik ve nöroprotektif rol sergileyen FX'in diyabetik hipokampus hasarındaki etkisi daha önce çalışılmamıştır. Bu kapsamda, bu çalışmada antioksidan kapasitesiyle oksidatif stresi engelleyerek ve diyabetin hafifletilmesine yardımcı olarak multiprotektif bir etki sağlayacağını düşündüğümüz FX'in diyabetik sıçan hipokampusu üzerindeki etkilerinin kapsamlı bir şekilde incelenmesi amaçlanmıştır.

## 1.1 Hipokampus

Hipokampus hafıza ve öğrenme ile ilgili çalışmalarda sıklıkla karşımıza çıkan beyin bölümüdür. Özellikle kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüşmesi olarak tanımlayabileceğimiz nöronal plastisite ve öğrenmede kritik role sahiptir (Lagali vd., 2010). Limbik sistemin bir parçasını oluşturan gri cevher tabakası olan hipokampus, gelişim sırasında telensefalonun dorsal kısmında çoğalan hücrelerden oluşmuştur (Roelink, 2000). Yapısında cornus ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerini barındırır. CA bölgesinde bulunan büyük piramidal nöronlar ve bu nöronların uzun apikal dendritleri karakteristik bir dizilim gösterirler. Buradaki morfolojik ve işlevsel yönden farklılık gösteren bölümler CA1, CA2, CA3 ve DG olarak sınıflandırılmıştır (Arushanyan & Beier, 2008). (Şekil1.1)



**Şekil 1.1.** Hipokampus alt alanlarının şematik gösterimi (Burwell & Agster, 2008'den modifiye edilmiştir)

Çevreden gelen duyu uyarılarının algılanması, işlenmesi ve uygun tepkinin verilmesinde bir köprü işlevine sahiptir (Bilim, 2018). Yeni bellek oluşumu hipokampustaki nöronların birbiriyle oluşturduğu sinapslar ile mümkün kılınır. Uzamsal bellek olarak adlandırılan canlıların çevresini bir harita biçiminde hafızada depolaması, kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızanın işlenmesi ile yakından ilişkilidir. Hipokampus uzamsal belleğin muhafaza edildiği ana beyin bölümüdür (Güner, 2018). Mekân ile geçmiş deneyimler arasında bağlantı sağlar, ek olarak bireyin duyu ve davranışlarında da önemli role sahiptir.

### 1.1.1 Hipokampus Embriyolojisi

İnsanda hipokampus yapısı lateral telensefalik vezikül ile birlikte gelişir. İkinci ayın ortasında serebral hemisferin duvarında endodermal hücre tabakası koroid pleksusu meydana getirir. Embriyonik 13-14. haftalarda koroid fissürün dış

parçasında bulunan nöral progenitor hücrelerin göçü ve çoğalmasıyla hipokampus gelişimi başlar. Başlangıçta geniş ve sığ olan hipokampal fissür dentat girus boyunca uzanır. Dentat girusun fimbrial ucunda hücre proliferasyonu ve granüler hücre tabakasının gelişmesiyle hipokampal fissür belirgin ve derin bir hal alarak cornu ammonise doğru yönelir. 15-16. haftalarda cornus ammonis ve DG laminalarının iç içe geçmesi ve katlanması ile artık bilaminar yapıdadır. Gelişimin erken evresinde iki lamina devamlı iken ependimal katmandan hücre göçü nedeniyle dentat girusun boyutunun artması, cornus ammonis'e doğru büyümesiyle burada birincil hücre tabakası, glutamaterjik uyarıcı piramidal nöronlar meydana gelir. Piramidal nöronlar CA boyunca bulunsa da bu bölgeyi CA1'den CA3'e farklı morfolojik ve genetik özelliklere sahip bölgelere böler. Nöroepitelyumdan köken alan piramidal hücre öncülleri, radial glialarca yönlendirilerek içten dışa doğru ammonik tabakaya göç ederler (Humphrey, 1967; Lagali vd., 2010; Songur vd., 2001). CA'ya eklenen bu büyüme, hemisferin medial duvarının lateral ventriküle doğru çıkıntı yapmasına neden olur. DG iç bükey hale gelir ve oluşan asimetri ile CA'nın medial ucunun alt tarafına doğru kayar (Erdoğan, 2013). Gangliyonik çıkıntılardan GABAerjik internöronlar, hipokampusa göç ederek fonksiyonel sinapslar geliştirirler. CA3 bölgesindeki piramidal nöronlar CA1 bölgesi piramidal nöronlarıyla Schaffer kollateral olarak adlandırılan afferent aksonları oluşturur. CA3 piramidal hücre dendritleri doğumdan sonra olgunlaşmaya devam ederek dentat girusun granül nöronlarının aksonu olan yosunsu liflerden sinaptik ileti alır. Granüler hücreler dentat girusun primer hücre katmanıdır ve %85'i doğum sonrası oluşur. Hipokampal fissür derinleştğinde dentat girusun moleküler katmanı ile cornu ammonisin moleküler katmanı arasında dağınık hücrelerden oluşan üçgen bir bölge birikir. Burada hipokampus iki laminayı birbirine kenetleyen U şekilli son konumuna ulaşır (Erdoğan, 2013; İzci & Erbaş, 2015; Lagali vd., 2010).

### **1.1.2 Hipokampus Anatomisi**

Hipokampus lateral ventrikülün alt boynuz tabanında yerleşik, ventriküle ve hemisferin alt kısmına bakan sırasıyla konveks ve konkav yüzeylere sahip, 5 ila 8 cm uzunluğunda gri cevher tabakasından oluşan bir yapıdır. İntraventriküler katlantı olarak karakterize edilen hipokampus, CA ve medialinde eşlik eden dentat girustan oluşur. CA'nın yapısının büyüklüğü düşünüldüğünde, hipokampus terimi ile ifade edilen yaygın olarak bu yapıdır. Hipokampus makroskopik olarak baş

gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölüme ayrılabilir (Duvernoy, 1998). Ön taraf yani baş kısmında bulunan geniş ve düz kısım “pes hippocampi”, bu yapının uç kısmında bulunan parmaksı çıkıntılar ise “digitationes hippocampi” adını alır. Gövdesi serebral pedinkülü saran inferior boynuza eşlenik olarak uzanır. Kuyruk ise makroskopik olarak posterior yerleşik ventriküler atriyumun medialini birleştirerek biter. Hipokampusun baş bölgesi beyinde amigdaloid nükleuslarca parsiyel olarak sarılırken, diğer ucu parahipokampal girusla kaynaşır. Lateral ventriküle bakan alveus hippocampi olarak isimlendirilen yüzü, hipokampus nöronlarının aksonlarınca oluşturulan ince bir ak madde ile örtülüdür. Konkav yüzeyinde önden arka tarafa uzanan beyaz renkli ince bant halinde fimbrial hippocampi bulunur. DG ve hipokampusu bölen bu fimbrial hippocampi arka ve yukarı doğru uzanarak forniksi oluşturacak olan krus fornisis olarak devam ederken; ön ucu olan uncus, gyri hippocampide beyaz cevher içinde sonlanır (İzci & Erbaş, 2015; Pradip Chauhan vd., 2021; Songur vd., 2001).

DG, önde unkusa doğru sürekli, arkada fasciola cinera ile devamlı olarak hipokampusun medial yüzünde zincir halinde kortikal çıkıntılardan meydana gelir. Hipokampal sulkus, medialde dentat girusu parahipokampal girusun subikulumundan ayıran yapıdır. DG’yi saran forniks fimbriyası, fimbrio-dentat sulkus ile dentat girustan ayrılır (Erdoğan, 2013; Pradip Chauhan vd., 2021).

### 1.1.3 Hipokampus Histolojisi

Hipokampus 3 ana kısma ayrılmaktadır. Bunlar; CA (esas hipokampus), DG ve subikulumdur. Bu üç kısmın tamamı hipokampal formasyonu oluşturur (Koç Okudur, 2013).

CA, hücresel morfolojik farklılıklara dayanarak sırasıyla subikulum ve DG’ye en yakın olarak; CA1, CA2, CA3, bölgelerine ayrılmıştır. CA4’teki nöronlar CA3’ün hillus bölgesine ait hücrelerdir (Szabo & Hennerici, 2014).

Hipokampal yapının mikroskopik düzeyde hücresel dizilimi incelendiğinde 7 tabakadan oluşur:

1. Alveus: Ventrikülün yüzeyine bakan en derin bölgedir. Piramidal nöronların aksonları sınırlayıcı yüzeyi oluşturur. Bu alan fimbraya giden aksonları içerir.
2. Stratum Oriens: Piramidal nöron bazal dendritleri ve internöronlar mevcuttur.

3. Stratum Piramidele: Hipokampusu kendine özgü formunu veren, büyük piramidal nöronların ve golgi tip II hücrelerin bulunduğu tabakadır. Piramidal nöronların bazal ve apikal dendritleri Stratum Lucidum'a ulaşırken, aksonları stratum oriens yoluyla ilerleyerek alveusa ulaşır.
4. Stratum Lusidum: CA3 bölgesine özel olan bu tabaka yosunsu (mossy) lifler ve motor piramidal nöronları içerir.
5. Stratum Radiatum: Bu bölgede Schaffer kollateral bağlantıları ve nöronların ara dendritleri bulunur.
6. Stratum Lakünozum: En ince tabakadır, Schaffer kollaterali içerir.
7. Stratum Molekölare: Piramidal nöronların apikal dendritlerini saran tabakadır (Bilim, 2018; Raisman vd., 1965).

## 1.2 Diabetes Mellitus

DM; insülin direnci sonucu karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasında ve nihayetinde birçok hayati organda meydana getirdiği uzun vadeli komplikasyonlarla bozulmalara sebep olan kronik metabolik bir hastalıktır. DM'de, vücutta insülin üretimi veya yararlanımında meydana gelen bozulma sonucu glukoz metabolize edilemez ve nihayetinde kronik hiperglisemiye neden olur (Alfheaid vd., 2023). Bu durum vücutta kan damarları başta olmak üzere sinirler, beyin ve diğer doku ve organlarda kronik hasarla birlikte işlev bozukluğu meydana getirir (You vd., 2021).

DM, günümüzde dünya nüfusunun yaklaşık %6'lık bir kısmını etkileyen metabolik bir rahatsızlıktır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 20-79 yaş arası erişkinlerden oluşan 578 milyon insanın 2030'da bu hastalığa yakalanmasını beklemekte (IDF, 2019), 2045 yılında ise dünyada diyabetin en çok görüldüğü 10 ülke arasına Türkiye'nin de girmesi beklenmektedir (Saeedi vd., 2019). DM hastalarının sağlık harcamaları en az 966 milyar dolardır ki bu miktar yetişkinlere yapılan sağlık harcamalarının %9'unu oluşturmaktadır. Türkiye için baktığımızda yetişkinlerin %15,9'u diyabete sahiptir ve diyabetin kişi başı maliyeti ise 1,044 dolara ulaşmaktadır (Diabetes, 2021). Tedavi süresinin uzun olması ve çok sayıda ikincil komplikasyonlar göz önüne alındığında; DM, dünya çapında sağlık sistemi üzerinde hem maddi hem de insan gücü açısından büyük bir yük oluşturmaktadır.

Bu sebeplerden ötürü WHO başta olmak üzere dünya çapında çeşitli sağlık kurum ve kuruluşları hastalığın önlenmesi ve tedavisi için çalışmalar yapmaktadır.

### **1.2.1 Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması**

Otorite sahibi pek çok kurum ve kuruluş DM için çeşitli sınıflandırmalar yapmıştır. Bu sınıflandırmalar incelendiğinde DM genel olarak 4 ana gruba ayrılmıştır. Bunlar karşılaşımla sıklığına göre sırasıyla; Tip 2 diyabet, Tip 1 diyabet ve gestasyonel diyabete ek olarak nadir olarak görülen spesifik nedenlere bağlı diyabetten oluşmaktadır (Tablo 1.1).

**Tablo 1.1.** Diyabetin sınıflandırılması ve özellikleri (American Diabetes Association, 2006; American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2023)

---

#### **1. Tip 1 diabetes mellitus**

Diyabet hastalarının %5-10'unu oluştururlar. Otoimmün hastalık olarak tanımlanır. Pankreasta insülin üretimi yapan  $\beta$  hücrelerinin T hücrelerce yıkılıp otoantikor oluşmasıyla meydana gelir. Genetik temelli olsa da toksin, virüs ve diyet gibi çevresel etmenlerinde hastalığın ortaya çıkmasında etkisi büyüktür. Hastaların büyük çoğunluğunda hastalık 30 yaşından önce başlar.

#### **2. Tip 2 diabetes mellitus**

Tüm diyabet hastalarının %85-90'ını oluştururlar. Üretilen insülinin yetersizliği ve/veya reseptör duyarlılığının azalmasıyla meydana gelir. Hücreler tarafından insülinin kullanılmaması ile karakterizedir. Hastalık 40-45 yaşından sonra sıklıkla görülür. Tip 2 diyabet görülme riski bireylerin yaş, kilo ve fiziksel aktivite eksikliğiyle artmaktadır.

#### **3. Gestasyonel diyabet**

İlk kez gebelikle birlikte ortaya çıkan diyabet çeşididir. Maternal ve fetal açıdan klinik önemi yüksektir. Genellikle gebelik sonrası kan glukoz değerleri normale dönmekle birlikte, altta yatan  $\beta$  hücre disfonksiyonunun bir göstergesi olduğu için ilerleyen zamanlarda annenin tip 2 diyabet geliştirmesi olağandır.

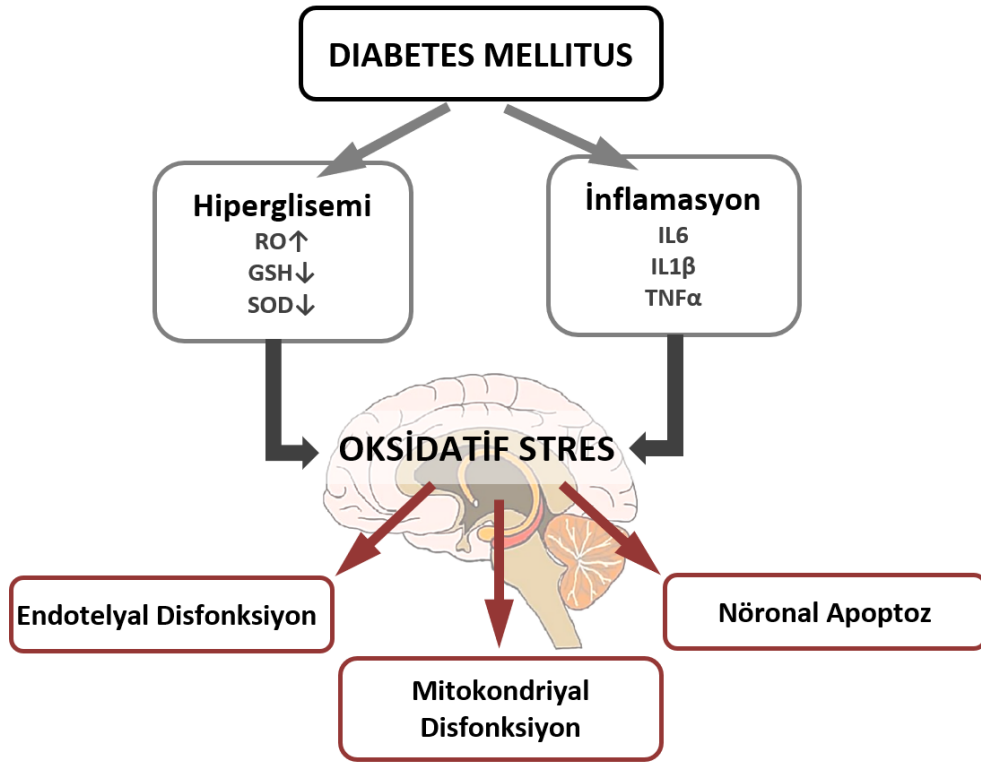
#### **4. Spesifik nedenlere bağlı diyabet**

Tüm diyabetiklerin %1'ini oluşturur. Nadir görülen bazı hastalıklarla ortaya çıkmaktadır. Bunlar; akut pankreatit, kistik fibrozis, transplasyon sonrası diyabet, yenidoğan diyabeti ve bazı genetik hastalıkların sebep olduğu diyabetler olarak sıralanabilir.

---

### 1.2.2 Diabetes Mellitus ve Bilişsel Bozulma

DM multisistemsel bir hastalık olup insülin mekanizmasının bozulmasıyla en çok etkilenen organlardan biri de glukoz ana enerji kaynağı olan beyindir. DM kaynaklı kronik inflamasyonda hipokampus ve serebral korteks bölgeleri, nöronlarında yaygın olarak bulunan insülin reseptörleri dolayısıyla, negatif etkinin en çok görüleceği alanlardır. Kronik hiperglisemi, enerji metabolizmasındaki bozuluktan kaynaklanan metabolik stres aracılığıyla reaktif oksijen türlerinin üretimini artırır ve oksidatif strese neden olur (Al-Kuraishy vd., 2020) (Şekil 1.2). Hafıza ve öğrenme için kritik bu bölgelerin apoptozdan etkilenmesiyle bilişsel bozulmalara sebebiyet verebilir (Jafari Anarkooli vd., 2008; Sima & Li, 2005; Yonguc vd., 2015). DM ayrıca beyindeki insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) sinyal mekanizmasında bozukluklara neden olarak Alzheimer'a sebep olabilecek; moleküler, biyokimyasal bozukluk ve histopatolojik lezyonlara yol açar (Sastre vd., 2017). DM'si olan hastalar bilişsel bozukluklara daha yatkındır, demans riski 1,5 kat daha fazladır (Geijselaers vd., 2015). Buna rağmen diyabet hastalarında sıkça görülen bilişsel bozulmalar dikkate alınmayarak; tedavi yaklaşımları yalnızca kan glukoz seviyelerinin düzenlenmesine yöneliktir. Oysa diyabetik hastanın yaşam koşullarını iyileştirecek ve yan etkilerin hafifletilmesine dair çalışmaların yapılması da son derece önem arz etmektedir. Diyabetin günümüzde olduğu gibi gelecekte de dünyada en çok görülen sağlık sorunlarının başında gelecek olması ve aynı şekilde diyabet artışıyla korelasyon gösteren Alzheimer benzeri hafıza ile ilgili hastalıkların da daha sık görülmesi konunun önemini arttırmakta ve bu alanda çalışmaların gerekliliğini açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 1.2. Diyabette bilişsel bozunmaya aracılık eden mekanizmalar

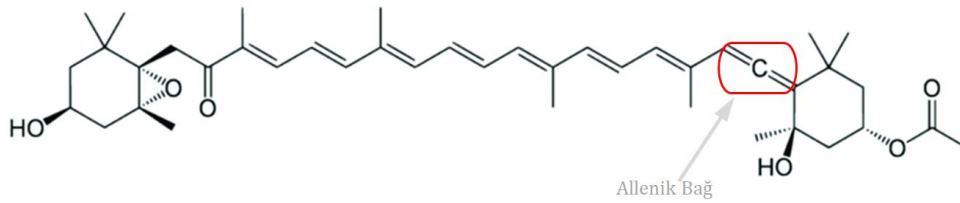
### 1.3 Fukoksantin

Doğal pigment maddesi olarak bakteri, mantar, bitki ve alglerde bulunan karotenoidler organizmayı aşırı ışık maruziyetinin zararlı etkilerinden korur. Doğada bulunan 600'ün üzerindeki karotenoid çeşidinin sağlık üzerinde çeşitli faydaları vardır. Yapılan araştırmalar karotenoidlerin; hücrel redoks seviyeleri, immün cevap, gen ekspresyonu, hücrenin büyüme ve gelişmesi gibi mekanizmaları düzenlediğini göstermektedir (Park vd., 2020).

Karotenoidlerin hidroksil grubu içeren alt sınıfı olan ksantofiller, karotenlere göre daha hidrofilik yapıdadır. Kahverengi deniz yosunu, diatom ve bazı mikroalg türlerinden elde edilen bir ksantofil olan FX'in moleküler yapısında nadir görülen bir allenik bağ ve 5,6-mono epoksit yapılarına sahiptir (Aslanbay & İmamoğlu, 2021; Terasaki vd., 2022) (Şekil1.3). Kimyasal formülü  $C_{42}H_{58}O_6$ 'dır. Tetraterpen oksijen içeren bir bileşiktir, fotosentez için hayati öneme sahip bir moleküldür (N. Li vd., 2022). FX'in sahip olduğu moleküler yapısı sayesinde birçok metabolik aktivitesi mevcut olup; anti-obeziye, anti-kanser, anti-inflamasyon özellikleri vardır (Y. Zhang vd., 2018). Bunlara ek olarak farklı diyabet modellerinde yapılan çalışmalarda anti-diyabetik etkilerinin ve nörodejeneratif

bozukları geciktirici etkilerinin olduğu da görülmüştür (Bae vd., 2020; N. Li vd., 2022).

İnsan plazmasında FX'in ana metabolik formu fukoksantinoldür. Amarouciaxanthin A, karaciğer ve yağ dokusunda görülen bir diğer metabolik formudur. Yaklaşık olarak %5 ila 10'u ince bağırsakta sindirilirken geri kalan çoğunluğu FX formuyla kalın bağırsağa ulaşır ki bu durum beyin sağlığını etkileyen mikrobiyotayı seçici bir şekilde beslediği için beyin fonksiyonlarının geliştirilmesi ve iyileştirilmesinde önemli bir rol oynar (N. Li vd., 2022). Toksikite çalışmalarında FX'in insan ve rodentler üzerinde herhangi bir yan etkisi görülmemiştir. Bu bağlamda FX için in vivo çalışmalarda farelerde 2000 mg/kg gibi çok yüksek konsantrasyonun tek doz olarak uygulanmasından sonra bile yalnızca minimal yan etkiler görülmüştür (Yang vd., 2022).



**Şekil 1.3.** Fukoksantin molekül yapısı

FX, toplam karotenoid üretiminin %10'undan fazlasını oluşturur ki bu deniz yosunlarından elde edilen en bol miktarda deniz karotenoididir (L. Zhang vd., 2017). Avrupa'dan Asya'ya dek uzanan birçok ülkede bulunan farklı türdeki alglerde 0,3 ila 18,6 mg FX/g kuru ağırlık olarak bulunabilmektedir (Terasaki vd., 2022). Ülkemizde de Güneydoğu Karadeniz pigment dinamiğini incelemek amacıyla yapılan çalışmada, öne çıkan pigmentlerden FX miktarının 2,94 µg/L'ye kadar ulaşabildiği görülmüştür (Genç, 2018).

### 1.3.1 Fukoksantin Antidiyabetik Etkileri

FX'in umut verici bir antidiyabetik molekül olduğu son yıllarda yürütülen kapsamlı çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu antidiyabetik etkiyi TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi adipositokinlerin salgılanmasını, ayrıca beyaz yağ dokusunda MCP-1'in mRNA ekspresyonunu düzenleyerek (Oliyai vd., 2021) ve iskelet kas hücrelerinin membranlarında bulunan glukoz kullanımı ile ilişkili glukoz taşıyıcı 4 (GLUT4)

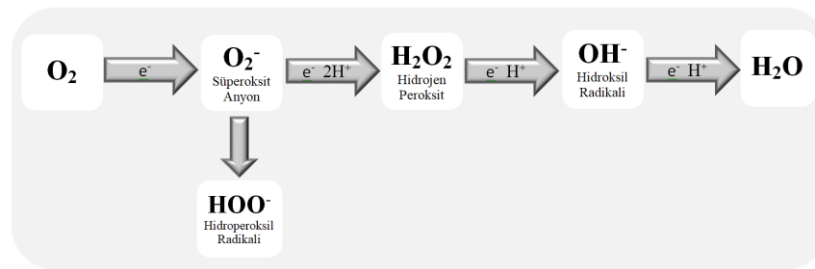
proteinin işlevini düzenlemek gibi çeşitli mekanizmalar ile de sağlamaktadır (Maeda vd., 2009).

### 1.3.2 Fukoksantin Nöroprotektif Etkileri

Deneyisel modeller ile oluşturulan Alzheimer ve Parkinson hastalığında FX'in etki mekanizması incelendiğinde amiloid beta ( $A\beta$ ), tau gibi yayılma özelliğine sahip fibrillere bağlanarak birikimlerini engellediği, inflamatuvar faktörlerin varlığını azalttığı, mitokondri membranında meydana gelen hasarı düzelterek oksidatif stresi engellediği görülmüştür (N. Li vd., 2022). Ayrıca FX'in beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve kolin asetiltransferaz (ChAT) ekspresyonunu regüle ederek kemirgenlerde bilişsel bozukluğu azalttığı görülmüştür (Xiang vd., 2017). Yapılan pek çok çalışmada FX'in nöronlarda apoptozu inhibe ederek sağ kalımı arttırdığı gösterilmiştir (Chen vd., 2023).

### 1.4 Oksidatif Stres ve Antioksidan İlişkisi

ROS canlılarda doğal fizyolojik süreçlerin bir parçası olarak ortaya çıkar. Ancak yüksek konsantrasyonlarda ROS, antioksidan savunma mekanizması tarafından nötralize edilemeyerek hücrel mekanizmanın bozulmasına sebebiyet verebilir. Hücre içinde başlıca 3 ana ROS bulunur. Bunlar; serbest radikallerden süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidroksil ( $OH^-$ ) radikali, serbest olmayan radikallerden ise hidrojen peroksittir ( $H_2O_2$ ).  $OH^-$  molekülü oksidasyon kapasitesi en yüksek radikaldir.  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  hücrel komponentleri direkt olarak okside edemezken fenton veya Haber-Weiss reaksiyonu aracılığıyla oluşan hidroksil radikalının biyomoleküllere verdiği hasar oldukça yüksektir. (Birben vd., 2012; Çobanoğlu, 2011) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Serbest radikallerin birbirine dönüşümünün şematik gösterimi (Mongirdiené vd., 2022'den modifiye edilmiştir)

ROS'un yüksek kimyasal aktiviteleri denge halinde olan oksidan/antioksidan dengesinin bozulması ve hücrede oksidatif stres olarak tanımlanır. Artmış oksidatif stres hücresel komponentlerin stabilitesini tehdit eden bir unsurdur. Bu durum protein, lipid ve hatta nükleik asitler gibi makromoleküllerin yapısında pek çok hasara sebebiyet verebilir (Birben vd., 2012). Vücudun metabolik aktivitesinin bozulmasına yol açar (Janion vd., 2022). Özellikle oksidatif stresin kronik bir hal aldığı durumlarda bu bozunmaların önüne geçebilmek amacıyla antioksidan kullanımı çok yaygındır. Kullanılan antioksidan hücre içinde oksidan-antioksidan dengesinin yeniden kurulmasına yardımcı olarak hasarı azaltıp onarım sağlayabilmektedir. İyi bir antioksidan serbest radikalleri temizler, metal şelasyonu ile fenton reaksiyonlarını regüle eder, hasar oluşan dokuları ve diğer bozunmaya uğramış antioksidan mekanizmalarını onarır (Çobanoğlu, 2011). Bu özelliklerin hepsine sahip olan bir molekül ideal bir antioksidan olarak görülmektedir.

### **1.5 Oksidatif Stres İndeksi**

Oksidanların neden olduğu oksidatif stresi ölçmek için birçok yöntem bulunmaktadır. Genellikle araştırmalarda oksidatif stres varlığı bir veya birkaç serum oksidan/antioksidanı ölçülerek gösterilmektedir. Ancak her oksidan/antioksidanın ayrı ayrı serumdan eldesi hem zaman alıcı hem de yorucu bir işlem olabilmektedir. Buna ek olarak bu yöntemle; serumda henüz bilinmeyen oksidan/antioksidanların varlığı ve bu bileşiklerin sinerjetik bir etkiye sahip olup olmadığı hala bilinemez (Wu vd., 2017). Vücudun oksidatif stres durumunu belirlemek için serum veya plazmadan oksidan veya antioksidan moleküllerin toplam olarak eldesi "Total oksidan durum" (TOS) ve "total antioksidan durum" (TAS) olarak ifade edilir. Oksidan/anti-oksidan dengesi; "Oksidatif stres indeksi" (OSI) denilen TOS'un TAS'a bölünüp 0,1 ile çarpılması ile hesaplanır (Erel, 2005; Uzar vd., 2012). TOS ve TAS değerleri çok daha kapsamlı bir ölçüm olduğundan dolayı vücuttaki oksidatif stresin daha kesin bir belirteci olabilir (Wu vd., 2017).

### **1.6 Apoptozis**

1970'te elektron mikroskopik düzeyde zarla çevrili yoğun sitoplazma parçacıklarının görülmesi ile büzülme nekrozu kavramıyla ilk tanımlanması yapılmıştır. Daha sonra doğal fizyolojinin bir parçası olarak, hassas bir denge ile

kontrolünün sağlandığı anlaşılınca Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972’de apoptozis kavramı ile tanımlanmıştır (Kerr, 2002).

### **1.6.1 Apoptozis Regülasyonu**

Apoptozis stres ve gelişimsel sinyaller dahil olmak üzere hücre içi ve dışı uyarılarla yönetilen bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Gelişimde yapım yıkım dengesinin kurulmasında fizyolojik bir önem arz etmektedir. Ortamda tümör nekrozis faktör (TNF), koloni stimüle edici faktör (CSF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi faktörlerinin azalması hücre dışından apoptozisi tetikleyen unsurlardır. Sitokinler, hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı, DNA hasarıyla aktive olan p53 geni, onkojenler ise hücreyi apoptozise götüren hücre içi uyarılardır (Akşit & Bildik, 2008). Organizmada apoptozisi indükleyen ve inhibe eden pek çok sayıda gen bulunmakta ve bunlar belirli yollarla birbirini kontrol etmektedir.

#### **1.6.1.2 Bax/Bcl-2**

Apoptoz regülasyonunda görevli Bcl-2 gen ailesinin üyesi olan proteinler; proapoptotik (Bax, Bak, BH3 proteinleri), anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, Bcl-w) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır (Roufayel, 2017). Bax ve Bcl-2 proteinlerinin komplike ilişkisi hücrenin sağkalım veya ölüm kararının verilmesinde merkezi bir rol oynar. Bax ve Bcl-2 arasındaki denge hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirler. Sağlıklı hücrelerde Bax proteini anti-apoptotik proteinlerce inaktif formda tutulur ve Bax’ın mitokondriyal dış zarı geçirgenleştirmesi önlenir. Hastalık durumunda bu denge bozularak sağlıklı hücrenin apoptoza gitmesi veyahut kanserli hücrenin apoptozdan kaçmasına sebebiyet verebilir (Brady & Gil-Gómez, 1998).

#### **1.6.1.3 Cyt-c**

Cyt-c, kaspaz-3’ü aktive eden kompleksin önemli bir parçasıdır. Apoptozisin başlangıç evresinde iç mitokondriyal zardan salınarak birtakım sitozolik proteinlerin yapısına katılıp apoptozu başlatan öncül formun aktif form olan kaspaz-9’a dönüşümüne sebep olur. Mitokondriyal zardan Cyt-c salınımı proapoptotik Bax tarafından başlatılabilir (Skulachev, 1998).

#### **1.6.1.4 Anneksin V**

Anneksinler, kalsiyum bağımlı zar bağlayıcı proteinlerdir. Çeşitli patolojik olayların endojen düzenleyicisidir. Anneksin V apoptoziste plazma membranında bulunan fosfotidilserine (FS)  $Ca^{+2}$  bağımlı bir şekilde bağlanır (Ungethüm vd., 2011). Beyin dokusunda Alzheimer benzeri bilişsel hastalıklar sırasında anneksin V düzeyinde artış gözlenmiştir (Sohma vd., 2013).

#### **1.6.1.5 Kaspaz-3**

Kaspazlar sistein proteazların üyesidir. Memelilerde 18 çeşit kaspaz keşfedilmiştir. Kaspaz-3 hedef proteinlerin parçalanmasına aracılık eden moleküldür (Eskandari & Eaves, 2022). Hücrede mitokondriyal membranın geçirgenliği bozulduktan sonra aktifleşir. Aktive olduğunda Kaspaz-3 ve 7'nin mitokondri bütünlüğünü daha da bozduğu bilinmektedir. Bu durum bize kaspaz-3'ün Cyt-c salınımına bağımlı olduğunu gösterir. Regülsayonu Bcl-2 protein ailesi tarafından sağlanır (Liang vd., 2001; Porter & Jänicke, 1999).

### **1.7 Stereoloji**

Histolojik analizlerde son yıllarda çok fazla kullanılan stereoloji, biyolojik yapıların 3 boyutlu yapısına ait geometrik ve nicel verilerin 2 boyutlu görüntü üzerinden elde edilmesini sağlayan bir bilim dalıdır (West, 2012). Stereolojinin temel prensipleri morfometrik çalışmalarda gerçek değere hata kaynaklarından uzaklaşarak ulaşmayı sağlayan “tarafsızlık” ve en az iş yükü ile bu sonuçlara ulaşmayı amaçlayan “etkinlik”tir (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

Güvenilir verilerin eldesi için örneklemin doğru yapılması birinci basamaktır. Biyolojik bilimlerde yapılan çalışmaların birçoğunda incelemeler ilgilenilen yapının en iyi görüldüğü, en düzgün boyanmış preparatlar seçilerek yapılmaktadır. Bütün bu nedenlerden ötürü incelemelerden elde edilen verilerin gerçek değere yakınlığı tartışmalı bir hal almaktadır. Stereolojik çalışmalarda “sistemik rastgele örnekleme” metodu kullanılmaktadır. Yapının bileşenlerine ayrılarak inceleneceği durumlarda bu yöntemle örnekleme oluşturularak yapının tüm bileşenlerine aynı olasılıkla örnekleme şansı verilmiş olur (Gundersen & Jensen, 1987). Bu sayede ilgilenilen yapının değerlendirilmesi tarafsız ve güvenilir bir şekilde yapılır.

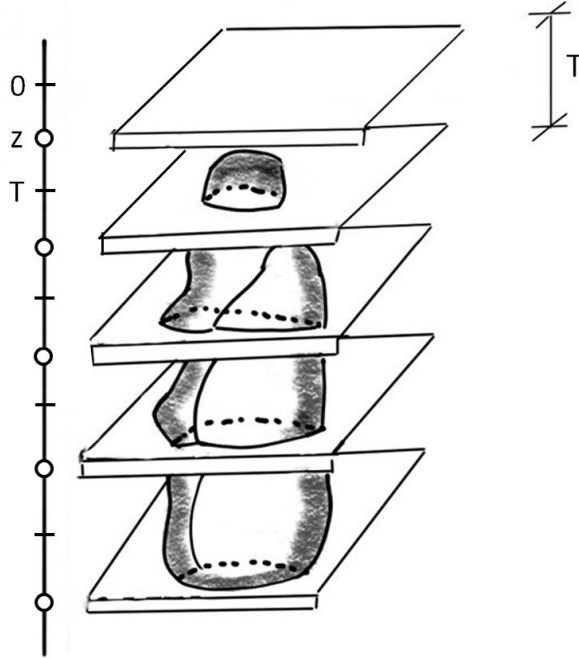
### 1.7.1 Cavalieri Prensibi

Stereoloji alanında elde edilen verilerin matematiksel ispatlara dayandırılmış pek çok farklı yöntemi vardır. İtalyan matematikçi Buonaventura Cavalieri (1598-1647) tarafından bulunan Cavalieri prensibi stereolojik yöntemlerde hacim hesaplamak için en sık kullanılan yöntemlerden birisidir (Canan vd., 2002).

Bu prensibe göre; hacmi hesaplanmak istenen rastgele şekilli bir yapının tümü eşit ve birbirine paralel kesitlere ayrılır. Her bir kesitin aynı yöne bakan yüzey alanı hesaplanır. Düzlemler arası mesafe (T) ve nesneyi sistematik rastgele bir şekilde bölen kesit alanlarının toplam değeri (SA) çarpımı bize yapının hacmini tarafsız bir yöntemle elde etmemizi sağlar (Gundersen & Jensen, 1987) (Şekil 1.5).

$$V_{\text{ref}} = \sum T \times SA$$

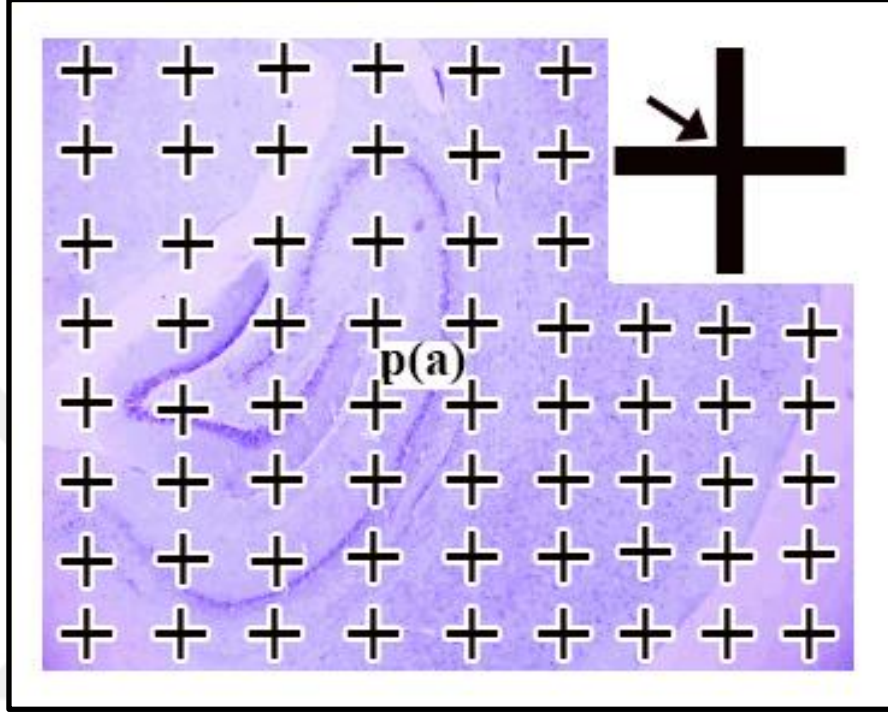
$V_{\text{ref}}$ : ilgilenilen yapının toplam veya referans hacmini, T: kesit kalınlığını SA: kesitlerdeki yapı izdüşümünün toplam alanını ifade etmektedir.



**Şekil 1.5.** Cavaileri prensibinin sıçan beyin dokusunda uygulanışının şematik gösterimi. Başlangıç düzleminde (0) T mesafesince ayrılan sistematik düzlemler z konumunda sistematik rastgele olarak örneklenmiş olur (Cruz-Orive, 1997'den modifiye edilmiştir)

Cavalieri prensibinde kesitlerde yüzey alanı hesaplanırken noktalı alan cetveli kullanılır. Noktalı alan cetveli sistematik bir biçimde dizili, aralarında sabit uzaklık bulunan noktalardan oluşur. Bu cetvelde bulunan dört noktanın arasında

kalan alan bir birim alanı ( $P(a)$ ) ifade eder. İlgilenilen alan üzerine noktalı alan cetveli rastgele koyulup, kesitteki ilgilenilen alana isabet eden noktaların sayısı bu kesitte ilgilenilen alanın tarafsız bir biçimde temsil edilmesini sağlar (İkinci Keleş, 2019) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Cavalieri yöntemini anlatan temsili bir kesit görüntüsü.  $P(a)$ : bir noktanın temsil ettiği alan

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1 Deney Hayvanları

Bu çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu tarafından 17.05.2023 tarihli, 2023/13 numaralı kararla onaylanmıştır. Çalışma BAİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DEHAM) temin edilen 2-4 aylık 220-250 gram ağırlığında 40 adet erkek *Wistar albino* cinsi sıçan kullanılarak yürütülmüştür. Deney başlayana kadar sıçanlar DEHAM tarafından 24°C±2 sıcaklıklarda 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü ve nem %60-70 olan ortamda ad libitum olarak beslenilerek bakılmıştır. Tüm deney süresince yapılan işlemler sırasında, deney hayvanlarının refahı ve etik ilkeler göz önünde bulundurulmuştur.

#### 2.1.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada sıçanlar her grupta 8 sıçan olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Tüm gruplardaki gerekli sıçan sayısını belirlemek amacıyla Minitab (versiyon 16) bilgisayar programı kullanılarak güç analizi testi yapılmıştır. Rastgele oluşturulan grupların ikisi STZ (streptozotosin) enjeksiyonu ile diyabetik hale getirilmiş ve diyabetik sıçanlardan oluşan D ve D+FX grupları oluşturulmuştur. Sağlıklı sıçanlardan ise Kont, FX, DMSO (Çözücü) olmak üzere kalan 3 grup oluşturulmuştur. Böylece deney 5 grup üzerinden yürütülmüştür.

#### 2.1.2 Deney Gruplarına Uygulanan İşlemler

Deney gruplarına uygulanan işlemler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.1). Deney işleyiş sürecine ait zaman gösterge çizelgesi ise Şekil 2.1'de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Deney grupları ve uygulanan işlemler

#### 1. Kontrol Grubu

Bu grupta bulunan sıçanlara enjeksiyonun oluşturduğu stresi ölçmek için 28 gün boyunca 1 ml/kg serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Çalışmanın başında ve sonunda bu gruptaki sıçanların vücut ağırlıkları ve açlık kan glukoz değerleri ölçülmüştür.

---

## **2. Diyabet Grubu**

Bu grupta bulunan sıçanlara deney başlamadan 3 gün önce tek doz 50 mg/kg dozunda STZ enjeksiyonu yapılarak diyabet modeli oluşturulmuş sonrasında deney süresi boyunca herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Çalışmanın başında ve sonunda bu gruptaki sıçanların vücut ağırlıkları ve açlık kan glukoz değerleri ölçülmüştür.

## **3. Diyabet + Fukoksantin Grubu**

Bu grupta bulunan sıçanlara deney başlamadan 3 gün önce tek doz 50 mg/kg dozunda STZ enjeksiyonu yapılarak diyabet modeli oluşturulmuş sonrasında 28 gün 50 mg/kg dozunda %0,1 DMSO içinde çözünmüş FX intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Çalışmanın başında ve sonunda bu gruptaki sıçanların vücut ağırlıkları ve açlık kan glukoz değerleri ölçülmüştür.

## **4. Fukoksantin Grubu**

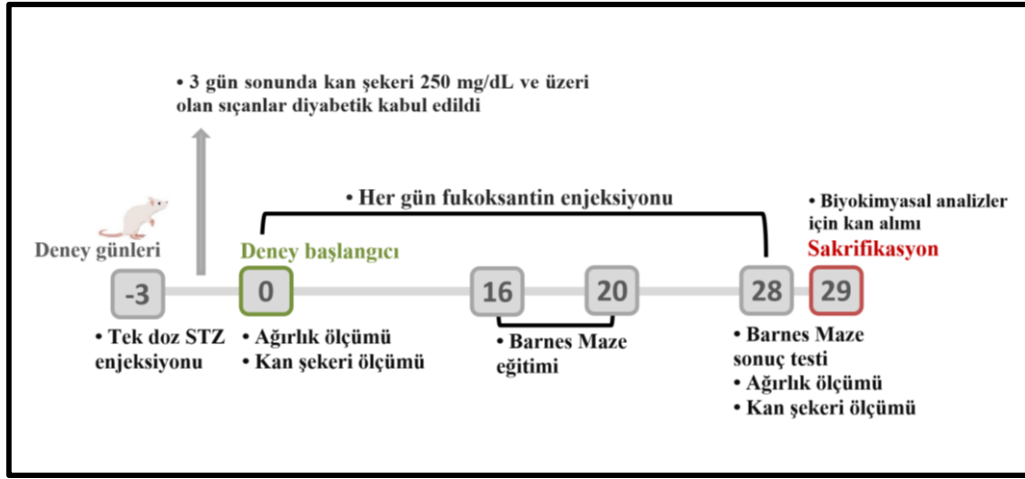
Bu grupta bulunan sıçanlara 28 gün boyunca 50 mg/kg dozunda %0,1 DMSO içinde çözünmüş FX intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Çalışmanın başında ve sonunda bu gruptaki sıçanların vücut ağırlıkları ve açlık kan glukoz değerleri ölçülmüştür.

## **5. DMSO (Çözücü) Grubu**

Bu grupta bulunan sıçanlara 28 gün boyunca %0,1 DMSO intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Çalışmanın başında ve sonunda bu gruptaki sıçanların vücut ağırlıkları ve açlık kan glukoz değerleri ölçülmüştür.

---

Deney süresince sıçanlara uygulanan işlemler ve hafıza testi Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi DEHAM bünyesinde; sıçan dokuları alındıktan sonra histopatolojik, stereolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizler Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda; moleküler analizler ise Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel, Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (BETUM) bünyesinde yapılmıştır.



Şekil 2.1. Deney işleyişi zaman gösterge çizelgesi

## 2.2 Solüsyonların Hazırlanması

### 2.2.1 Fukoksantin Hazırlanması

Deney süresince D+FX ve FX gruplarına 50 mg/kg dozunda %0,1 DMSO içinde çözülmüş FX (Fucoxanthin, Cayman, 13068) 1 ml olarak 28 gün boyunca uygulanmıştır.

### 2.2.2 Streptozotosin Hazırlanması

Çalışmada diyabet yapılacak gruplarda diyabet modeli oluşturmak için 50 mg/kg dozunda STZ (Streptozotocin, Cayman, 13104) 0,1 M sitrat tamponu (pH: 4,0) içerisinde çözdürülerek 1 ml intraperitoneal tek doz olarak uygulanmıştır.

## 2.3 Diyabet Modelinin Oluşturulması

Deney hayvanlarına STZ enjeksiyonundan sonraki ilk 12-24 saatte hipoglisemiye önlemek için içme suyuyla birlikte %5 glikoz verildi (Tufekci & Kaplan, 2023). 72 saatin ardından kan glukoz değeri 8-10 saatlik açlık ardından Lifecheck Compact TD4283 glikometre kullanılarak sıçanların kuyruk veninden alınan kan ile ölçüldü. Her sıçandan 3 tekrarlı ölçüm alınmasının ardından açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dL ve üzerinde olan sıçanlar diyabetik kabul edilip çalışmaya dahil edilmiştir.

## 2.4 Davranış Testi

Çalışmamızda, diyabetin neden olduğu bilişsel bozunma ve FX'in diyabetik beyinde muhtemel nöroprotektif etkinliğini araştırmak amacıyla sıçanlar Barnes Maze testine tabi tutulmuştur. Davranış testleri, Bolu Abant İzzet Baysal

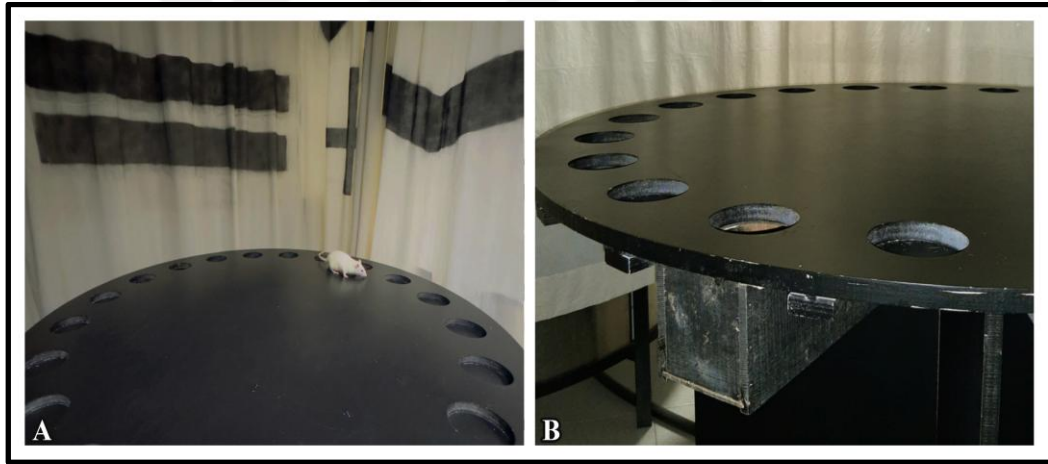
Üniversitesi DEHAM’da uygun materyal kullanılarak yapıлып, tüm gruptaki sıçanların davranışları kamera ile kayıt altına alınmıştır.

#### 2.4.1 Barnes Maze

Deneyin 16. gününden itibaren tüm sıçanlar bilişsel aktivitelerini ölçmek için Barnes Maze testine tabi tutulmuştur. Aşağıda belirtilen protokolde test uygulanarak, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Barnes Maze testi; eğitim ve test aşaması olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Ün & Büyüksulu, 2018).

Eğitim aşamasında sıçanlar test masasının üzerine koyularak, ses ile bir dış uyaran oluşturulmuştur. Deney hayvanının altında çekmece bulunan deliği bulup girmesiyle ses kapatılmıştır. Böylece hayvan çekmecenin güvenli alan olduğunu öğrenmiş olur. Sıçanların altında çekmece bulunan deliği 2 dakika içerisinde bulamaması durumunda hedef noktayı öğrenmesi için yardım edilerek, hayvanın nazikçe yönlendirilmesiyle güvenli alana girmesi sağlanmıştır (Fotoğraf 2.1).



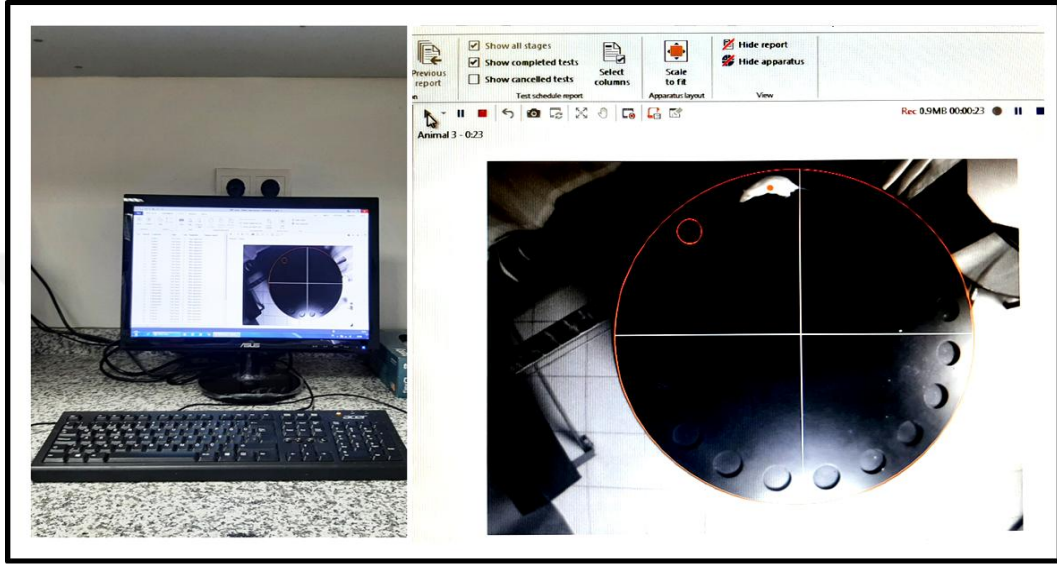
**Fotoğraf 2.1.** Barnes maze test düzeneğine ait görüntüler

(A): etrafında farklı şekiller yer alan test masasını gösterirken, (B): test masası üzerinde güvenli alan olarak nitelendirilen kutuyu göstermektedir

Eğitim süresi deneyin 16. gününde başlatılıp 21. güne kadar uygulanmıştır. Eğitimin birinci gününde; test masası %70 alkol ile temizlenerek, yüzey kuruduktan sonra ilk gruptan birinci hayvan deney masasının merkezine koyularak dış uyarıcı ses açılıp kayıt başlatılmıştır. Hayvanın çekmeceyi bulmasıyla da dış ses ve kayıt otomatik olarak sonlanmıştır. Bu işlemler her bir deney hayvanı için 5 gün boyunca günde 3'er defa tekrarlanmıştır. Grup ortalamasının maksimum 10-15 saniye

aralığında olmasıyla o grubun güvenli alanı öğrendiği kabul edilmiştir. Ardından 7 gün boyunca hiçbir deneme yapılmadan beklenmiştir (Ün & Büyüksu, 2018).

Deneyin 28.günü test aşaması için deney hayvanları tekrardan Barnes Maze testine tabi tutulmuştur. Sonuçlar yine kamera ile kayıt altına alınarak deney hayvanlarının öğrendiklerinin ne kadarını hatırladıkları belirlenmiştir (Fotoğraf 2.2).



**Fotoğraf 2.2.** Test sırasında kullanılan kamera ve yazılım sistemleri

## 2.5 Sakrifikasyon ve Dokuların Alınması

Tüm gruplar deney sonunda ağırlık ve kan glukoz değerleri ölçümü sonrası 29. günde ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) intraperitoneal uygulanarak anestezi altında sıçanlar sakrifiye edildi. Biyokimyasal analizler için intrakardiyak kan alımı sonrası hızla çıkarılan beyin dokularının (Fotoğraf 2.3) sağ hemisferi histolojik çalışma için %10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonunda tespit edilirken, moleküler analizler için sol hemisfer DNase-RNase free tüplere koyularak -80 °C'ye kaldırıldı. Alınan kan dokuları sarı kapaklı tüplere koyularak 15 dakika 4000 rpm santrifüj edildikten sonra serum kısmı biyokimyasal analizler için alınarak -80 °C'ye kaldırıldı.



**Fotoğraf 2.3.** Deney sonunda sıçanlardan çıkarılan beyin dokuları

## 2.6 Rutin Histolojik İşlemler

### 2.6.1 Doku Takip İşlemi ve Bloklama

Fiksasyon için %10'luk tamponlanmış nötral formalin içerisine alınan beynin sağ hemisferleri fiksasyon tamamlandıktan sonra akan musluk suyu altında 2 saat bekletilerek formalin uzaklaştırılmış ve ardından rutin doku takip prosedürü uygulanmıştır (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2.** Rutin histolojik doku takip prosedürü

Takip Aşaması	Solüsyon	Süre
Dehidratasyon	% 70 Alkol	1 gece
	% 80 Alkol	1 saat
	% 96 Alkol	1 saat
	% 96 Alkol	1 saat
	% 100 Alkol	1 saat
	% 100 Alkol	1 saat
Şeşaflaştırma	Ksilen	1 saat
	Ksilen	30 dakika
Parafinizasyon	Parafin (65°C)	45 dakika
	Parafin (65°C)	45 dakika

Takip aşaması tamamlandığında Leica EG1120 parafin tankı kullanılarak beyin dokularının koronal düzlemde bloklama işlemi yapıp numaralandırılmıştır.

### 2.6.2 Kesit Alma

Yapılan pilot çalışmanın ardından sistematik rastgele örnekleme için belirlenen 1/12 oranında 5 mikron kalınlığında kesitler stereolojik analizler için alınırken, 1/24 oranında histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler için alınmıştır. 45° C'lik su banyosuna atılarak numaralandırılmış pozitif şarjlı lamlara alınmıştır. Kesitler alınırken Leica RM212RT mikrotom kullanılmıştır.

### 2.6.3 Krezil Violet Boyama İşlemi

Krezil violet boyama için (Cresyl violet (acetate) ROTH, 7651) toz boya kullanıldı. Öncelikle stok krezil violet boya hazırlamak için 0,2 gr krezil violet tartılarak 50 ml distile suda çözüldü.

Buffer solüsyonunu (pH: 3,5) hazırlamak için 282 ml 0,1 M asetik asit çözeltisi içerisine 18 ml 0,1 M sodyum asetat çözeltisi eklendi.

Hazırlanan buffer solüsyonunun içerisine 30 ml krezil violet stok solüsyonu koyularak boya hazırlandı. Boyama işlemi 60 °C'lik etüvde gerçekleştirildi (Tablo 2.3).

**Tablo 2.3.** Krezil violet boyama protokolü

<b>Solüsyon</b>	<b>Süre</b>
Ksilen	20 dakika
Ksilen	20 dakika
% 100 Alkol	5 dakika
% 100 Alkol	5 dakika
% 96 Alkol	5 dakika
% 80 Alkol	5 dakika
% 70 Alkol	5 dakika
Distile Su	3 dakika
Krezil violet (60°C)	8 dakika
Distile Su	4 dakika
% 70 Alkol	1-2 dakika
% 96 Alkol	1 dakika
% 100 Alkol	10 kez daldır çıkar
Ksilen	30 dakika
Ksilen	30 dakika

## 2.7 Stereolojik Analizler

Pilot çalışma ile belirlenen 1/12 oranında 5 mikron kalınlığında alınan kesitler krezil violet boyama işlemine tabi tutuldu. Preparatlardan ilgili alanın kamera ataçmanlı Nikon Eclipse 80i light fotomikroskop ile fotoğrafları çekildi. Noktalı alan cetveli ile her bir kesit için ölçümler yapılarak CA1+CA2 ve CA3 alan hacimleri ayrı ayrı analiz edildi.

## 2.8 İmmünohistokimyasal Boyama

Hipokampus dokusunda apoptozisi göstermek için Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği, ticari kitte öngörülen standart prosedüre göre uygulanmıştır. Primer antikor olarak, aktif caspase-3 (Anti-Caspase-3 antibody (ab4051)) kullanıldı. Boyama sonrası immünohistokimyasal analiz ışık mikroskopik inceleme ile yapıldı. Semi-kantitatif inceleme yöntemi olarak immünreaktive gösteren hücrelerin boyama derecesi  $20 \mu\text{m}^2$  ve 10 rastgele seçilmiş mikroskopik alanda tarafsız bir değerlendirme ile yapılmıştır. Alanların kamera ataçmanlı Nikon Eclipse 80i light fotomikroskop ile görüntüleri elde edildi. Kaspaz-3 (+) boyanmış hücreler sayılarak, toplam hücre sayısına bölündü. Her kesit için ortalama altı farklı alan değerlendirildi. Boyalı hücre yok; 0, <%25 boyalı hücre; 1, %25-%50 boyalı hücre; 2 ve >%50 boyalı hücre: 3. Bu skorlamaya göre boyanma yoğunluğu: yok; 0, düşük; 1, orta; 2 ve şiddetli: 3 şeklinde skorlandı. Her kesit için immün boyama yoğunluk dağılım indeksi (IIDİ), boyalı hücreler ve boyama yoğunluğunun çarpımıyla hesaplandı. İlgili formüle göre her kesit için hesaplanan IIDİ altı alanın ortalamasıdır (Okur & Sağır, 2021).

## 2.9 Biyokimyasal Analiz

TAS düzeyleri ticari olarak temin edilebilen kitler (Relassay, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Yöntemde ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) antioksidan konsantrasyon ve kapasitesine göre antioksidanlar tarafından renksizleştirilir. Bu renk değişimi, 660 nm'de absorbanstaki değişim olarak ölçülerek, sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L olarak elde edilir.

TOS düzeyleri ticari olarak temin edilebilen kitler (Relassay, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Bu yöntemde Ferrik iyon, asidik bir ortamda ksilenol turuncusu ile kompleks üreterek renkli spektrofotometrik olarak ölçülebilen değişim, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarıyla ilişkilendirilerek, sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  eşdeğeri/L olarak elde edilir.

OSI değeri TOS ve TAS değerlerinin birbirine oranlanıp 0,1 ile çarpımı sonucu elde edilir. Hesaplama için TAS değeri µol/L dönüştürüldü. Ardından OSI değeri şu formüle göre hesaplanmıştır (Erel, 2005).

$$\text{OSI (rastgele birim)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{ol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L})}{\text{TAS } (\mu\text{ol Trolox eşdeğeri/L})} \times 0,1$$

## 2.10 Moleküler Analizler

Deney hayvanlarından dişeke edilen beyin dokularının sol hemisferinde yer alan hipokampus yapıları izole edilerek moleküler analizler için DNase-RNase free tüplere koyulmuş ve hızlıca -80 °C'ye kaldırılmıştır.

Elde edilen dokulardan RNA izolasyonu yapılarak, cDNA sentezlenmiş, Bax, Bcl-2, Cyt-c, Kaspaz-3 ve Anneksin V genlerinin ekspresyon düzeylerine Real-Time PCR ile bakılmıştır.

### 2.10.1 Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

**RNA izolasyonu için;** doku örnekleri havanda sıvı azot yardımıyla parçalandı. Parçalanmış doku tüplere alınarak üzerine 500 µL PureZOL (BioRad, 7326890) eklenerek homojenizasyonu sağlandı. Tüpler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip, üzerine 100 µL kloroform koyulup 15 saniye alt üst edilerek elde çalkalandı. 3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüpler 15 dakika 4°C ve 12.000 rpm'de (Hettich/Mikro 220 R) santrifüj edildi.

Süpernatantta meydana gelen şeffaf renkli üst faz otomatik pipet yardımıyla yeni tüpe alınıp üzerine 500 µl %100 izopropanol eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası yeniden 15 dakika 4 °C ve 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pelleti nükleik asitler oluşturur. Süpernatant ise dikkatli bir şekilde tüp ters çevrilerek uzaklaştırıldı.

Yıkama yapmak için pellet üzerine 1 ml %75 etanol koyularak kısa süreli vorteks (Benchmark) yapıldı. Ardından 5 dakika 4 °C ve 7.500 rpm'de santrifüj edildi. Sonrasında dikkatli bir şekilde etanol uzaklaştırılarak tüpler kapakları açık şekilde ters çevrilerek etanolün oda sıcaklığında uçması beklendi. Elde edilen RNA 50 µL double distile suda (ddH<sub>2</sub>O) çözünmesi sağlanıp, cDNA sentezine kadar -80 °C'ye (Panasonic/MDF-4334-PE) kaldırıldı.

İzole edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için NanoDrop (Thermo Scientific/2000) ile 260 ve 280 nanometre dalga boylarında

absorbans değerleri ölçüldü. A260/A280 oranı  $2,0\pm 0,1$  değerine yakın olan RNA'lar saf olarak kabul edilerek çalışılmaya devam edildi.

**cDNA sentezi;** iScript cDNA sentez kiti (BioRad, 1708890) kullanılarak yapılmıştır. PCR tüpüne koyulacak totalde 20  $\mu\text{L}$  hacmi; 5  $\mu\text{L}$  cDNA mix, hesaplanan miktarda (x) RNA ve  $15-x$   $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O oluşturmaktadır. x değeri ölçülen RNA konstantrasyonuna göre her bir örnek için 1000 nanogram ağırlığında RNA olacak şekilde hesaplamalar yapıldı.

Tüpler termal döngü cihazına (BioRad C1000 Touch) yerleştirilerek 5 dakika 25 °C, 20 dakika 46 °C, 1 dakika 90 °C olan cihaz protokolü başlatıldı. Süre sonunda tüpler cihazdan alınarak sentezlenen cDNA kalitesini ölçmek için NanoDrop ile 260 ve 280 nanometre dalga boylarında absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de (Panasonic) saklanmıştır.

**Kantitatif Eř Zamanlı PCR (qRT-PCR) için;** SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad, 1725271) kullanılmıştır. RT-PCR deneyleri için test edilecek hedef gen bölgelerine yüksek özgülükle bağlanan primerler tasarlanarak oligo tasarımı Amplify programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Erime sıcaklıkları (T<sub>m</sub>) ve birincil dimer oluşumu gibi özellikler aynı program kullanılarak incelenmiştir (Tablo 2.4). Bu kapsamda, qRT-PCR için total hacim 10  $\mu\text{L}$  olacak şekilde her bir kuyucuğa; 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 2  $\mu\text{L}$  forward ve reverse içeren primer karışımı, 5  $\mu\text{L}$  2X SYBER Green ve 1  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O koyuldu. Üzeri plate kapatma filmi (BioRad PX1) ile örtülerek plate santrifüj cihazına koyularak reaksiyon hacminin karışması ve kuyucukların dibine inmesi sağlandı. Daha sonrasında plate Real-Time PCR cihazına (Alt Modül: BioRad C1000 Touch; Üst Modül: BioRad CFX96) yerleştirildi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için izlenen prosedür 95°C 5 dakika, [95°C 15 sn, 60°C 30 sn, 72°C 30 sn]x40, 72°C 5 dakika şeklinindedir.

**Tablo 2.4.** Mevcut çalışmada kullanılan primer detayları

Primer İsmi	Primerler (5'-3')	Tm °C
Bcl-2-F	ATGGGGTGAACCTGGGGGEGGATTG	66
Bcl-2-R	TTTCATATTTGTTTGGGGCAGGTC	59
Bax-F	GAGAGGATGGCTGGGGAGAC	63
Bax-R	GGTGAGCGAGGCGGTGAGGACT	68
Sitokrom-c-F	TGGACAGCCCCGATTTAAGT	57
Sitokrom-c-R	TCAATAGGTTTGAGGCGACAC	58
Kaspaz-3-F	TTTTGGAACGAACGGACCTG	57
Kaspaz-3-R	TGTCTCAATACCGCAGTCCA	57
Anneksin V-F	GAGTACTGCCTGTCTCTCGG	61
Anneksin V-R	GTCGGTCAGGAGTAGGCTG	61
GAPDH-F	ACCACCATGGAGAAGGCTGG	61
GAPDH-R	CTCAGTGATGCCCAGGATGC	61

**qRT-PCR sonuçlarının analizi sırasında;** komperatif  $\Delta\Delta CT$  yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde  $\Delta\Delta CT = CT_{(hedef\ gen)} - CT_{(housekeeping\ gen)}$  formül doğrultusunda hesaplamalar yapılmıştır. Örnekler arası farklılık ve olası pipetaj hatalarının önüne geçilmesi amacıyla, bir housekeeping gen olan GAPDH kullanılarak normalizasyon gerçekleştirilmiştir.

## 2.11 İstatistiksel Analiz

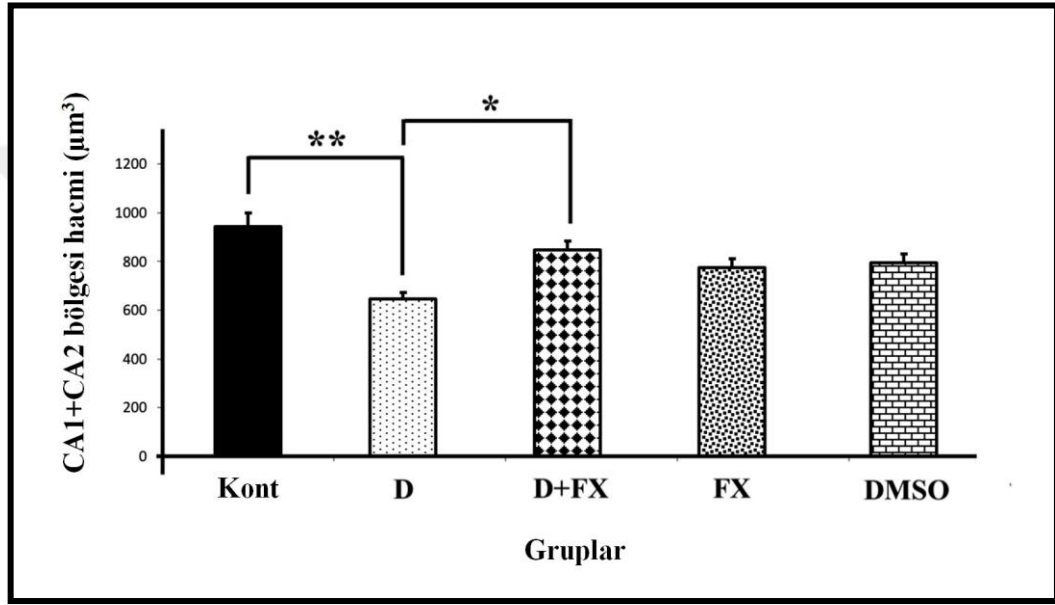
Çalışmamızdan elde ettiğimiz gruplara ait sayısal verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS version 21.0 analiz programı kullanılmıştır. Verilerin normal dağılım varsayımına uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Ölçümle belirtilen sürekli değişkenlerin kıyaslanmasında normal dağılıma uyan veriler One-Way ANOVA ve Post-hoc test olarak Bonferroni testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Normal dağılım göstermeyen çoklu grupların kıyaslanması ise Kruskal-Wallis analizi ve Post-hoc test olarak Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde  $P < 0.05$  olduğunda aradaki farkın istatistikî olarak anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Stereolojik Bulgular

##### 3.1.1 CA1+CA2 Bölgesi Hacim Bulguları

CA1+CA2 alanından stereolojik analizlerle elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirilmesi sonucu oluşturulan grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1).

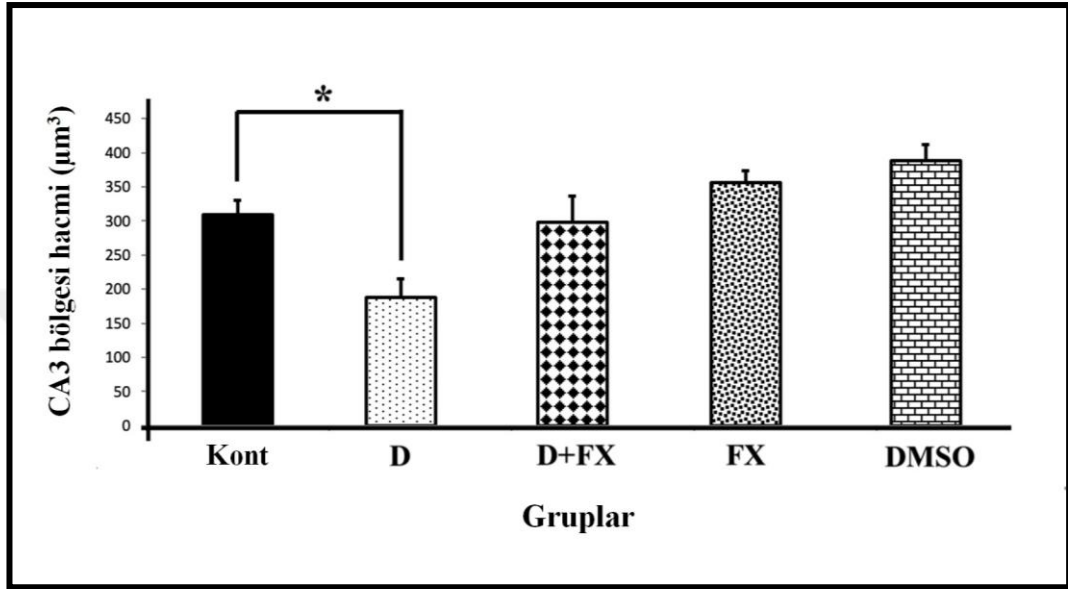


**Şekil 3.1.** Hipokampusun CA1+CA2 bölge hacminin tüm gruplar arasında değişimini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p < 0,01$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*\*\*” ile gösterilirken,  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*” ile gösterilmiştir.

Grupların hipokampus CA1+CA2 bölgesindeki stereolojik hacim ölçümlerinin istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda; D grubunun CA1+CA2 hacminin Kont grubunun CA1+CA2 hacmine göre ileri derecede anlamlı miktarda azaldığı görülmüştür ( $p < 0,01$ ). Ayrıca D+FX grubuna ait CA1+CA2 hacmi, D grubuna ait CA1+CA2 hacmiyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Buna ek olarak Kont grubu ile D+FX grubunun CA1+CA2 hacmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0,05$ ). Ayrıca Kont grubuna ait CA1+CA2 hacmiyle FX ve DMSO grupları kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.2 CA3 Bölgesi Hacim Bulguları

CA3 bölgesine ait stereolojik analizlerle elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirilmesi sonucu oluşturulan grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 3.2)

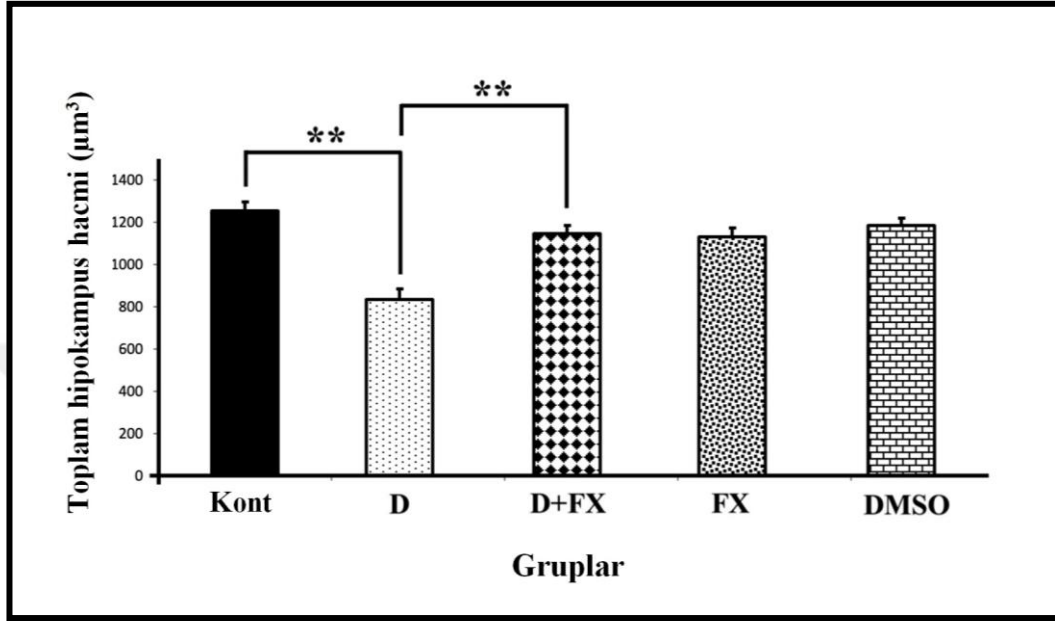


**Şekil 3.2.** Hipokampusun CA3 bölge hacminin tüm gruplar arasında değişimini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*” ile gösterilmiştir.

Grupların hipokampus CA3 bölgesindeki stereolojik hacim ölçümlerinin istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda; D grubunun CA3 hacminin Kont grubunun CA3 hacmine kıyasla anlamlı miktarda azaldığı görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Buna ek olarak D+FX grubunun CA3 hacminin D grubuna oranla arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir ( $p > 0,05$ ). Ek olarak Kont, D+FX, FX ve DMSO gruplarının CA3 hacimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.3 Total Hipokampus Hacim Bulguları

Stereolojik analizlerle elde edilen bulgularla total hipokampus hacminin istatistiksel değerlendirilmesi sonucu oluşturulan grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. Total hipokampus hacminin tüm gruplar arasında değişimini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*\*” ile gösterilmiştir.

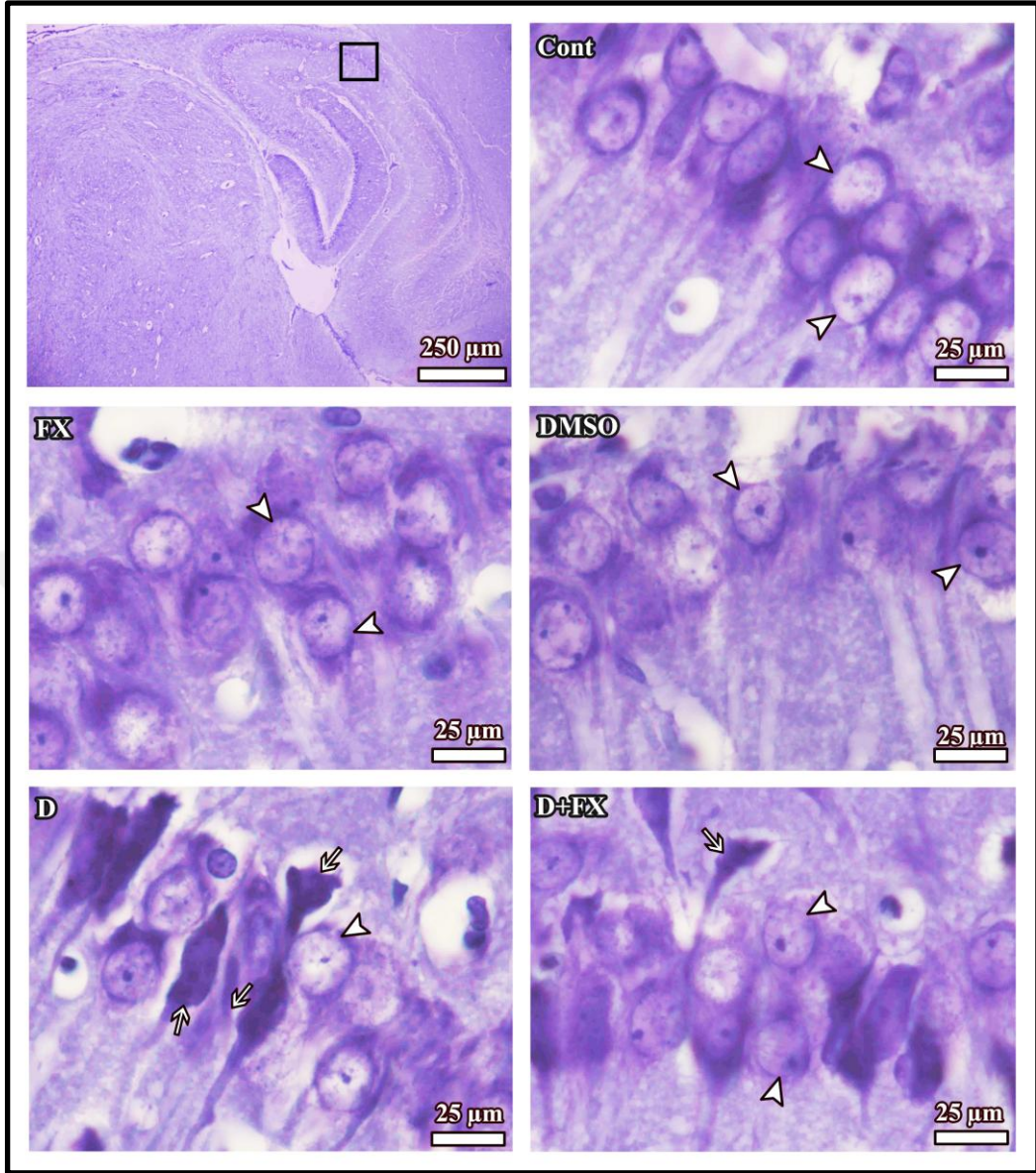
Hipokampusta gruplara ait total hipokampus hacminin stereolojik analizinin istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda, D grubunun total hipokampus hacminin Kont grubunun total hipokampus hacmine göre ileri derecede anlamlı miktarda azaldığı görülmüştür ( $p<0,01$ ). D+FX grubunun D grubuna kıyasla total hipokampus hacmi istatistiksel olarak ileri derecede artış göstermiştir ( $p<0,01$ ). Buna ek olarak Kont, D+FX, FX ve DMSO gruplarının total hipokampus hacimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).

### 3.2 Histopatolojik Bulgular

Tüm deney gruplarından elde edilen hipokampus kesitleri krezil violet ile boyanmış olup, ışık mikroskopunda incelemeler yapılmıştır. İncelemeler sonucunda elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur:

### 3.2.1 CA1 Bölgesi İçin Elde Edilen Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik değerlendirme için krezil violet boyalı kesitlerde hipokampus yapısı incelendi. Tüm grupların CA1 bölgesinin incelenmesiyle elde edilen histolojik bulgularda; Kont, FX, DMSO gruplarına ait kesitlerde, CA1 bölgesinin genel histolojik yapısının normal görünümde olduğu ve herhangi bir patolojik ize rastlanmadığı görüldü. Nöronlar normal yapıda izlenmiş olup, piramidal nöronların sitoplazma sınırlarının net olduğu gözlemlendi. D grubuna ait kesitlerin incelenmesi sonucunda; hipokampusun CA1 bölgesinde hücresel yoğunluğun Kont grubuna kıyasla bariz bir biçimde daha az olduğu saptanmıştır. Dejenerasyona uğramış nöronların sayısı normal yapıdaki piramidal nöronlara kıyasla daha fazla miktarda izlenmiştir. Ek olarak D grubunda hücrelerin sınırları net olarak saptanamayan, yapısal bozukluğa uğramış, koyu boyalı sitoplazmaya sahip nöronlar gözlemlenmiştir. Ayrıca, D+FX grubunun CA1 bölgesinde yapılan incelemelerde; D+FX grubunda sağlıklı nöron belirteci olan sitoplazma ve çekirdek sınırları net olarak izlenebilen yapılar D grubuna kıyasla çok daha fazla miktardaydı (Fotoğraf 3.1).

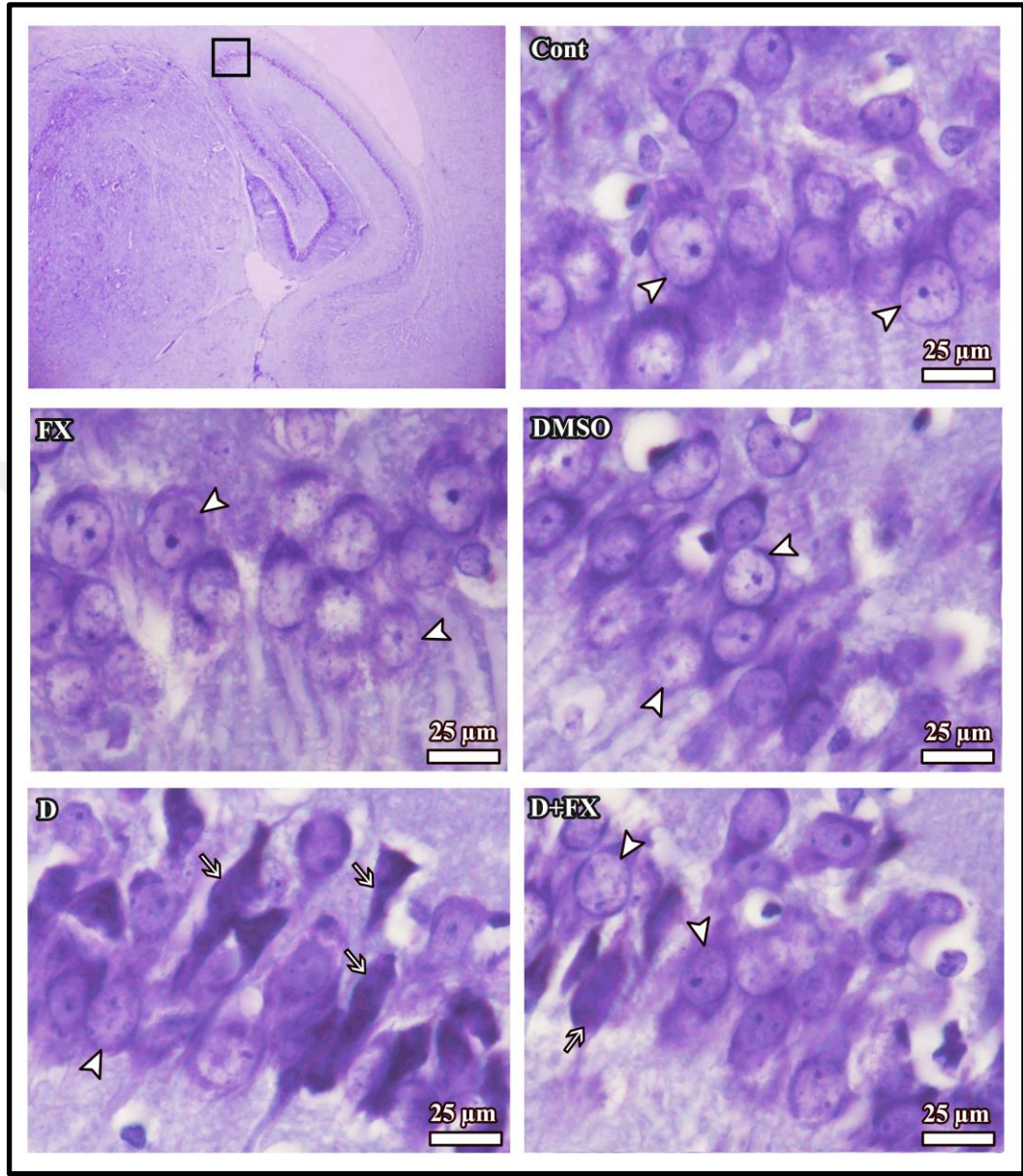


**Fotoğraf 3.1.** Hipokampusun CA1 bölgesinde krezil violet ile boyanmış kesitlerde piramidal nöronlar görülmektedir. **Ok başı:** sağlıklı nöronlar, **ok:** dejenere nöronlar. Orijinal büyüme: X100

### 3.2.2 CA2 Bölgesi İçin Elde Edilen Histopatolojik Bulgular

Tüm grupların CA2 bölgesinin incelenmesiyle elde edilen histolojik bulgularda; Kont, FX, DMSO gruplarına ait kesitlerde, CA2 bölgesine ait normal morfolojiye sahip hücreler izlenmiştir. D grubuna ait kesitlerde ise CA1 bölgesinde olduğu gibi önemli miktardaki hücre kaybı ve dejenerasyonu dikkat çekmektedir. D+FX grubunun CA2 bölgesinde yapılan incelemelerde; sitoplazması koyu boyalı

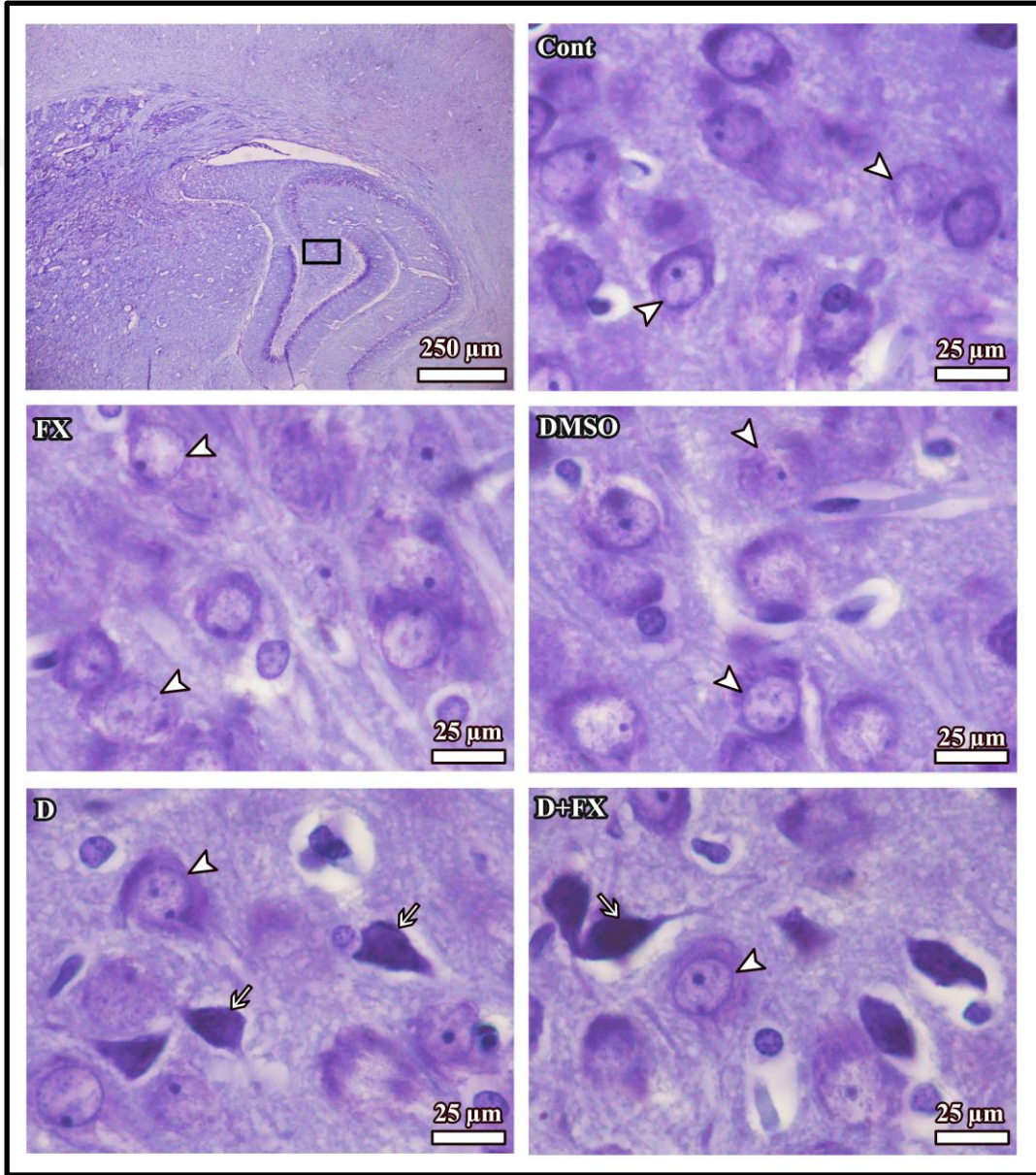
nöronların arasında perikaryon ve çekirdek sınırları net olarak izlenebilen nöronların miktarı D grubuna kıyasla önemli miktarda daha fazlaydı (Fotoğraf 3.2).



**Fotoğraf 3.2.** Hipokampusun CA2 bölgesinde krezil violet ile boyanmış kesitlerde piramidal nöronlar görülmektedir. **Ok başı:** sağlıklı nöronlar, **ok:** dejenere nöronlar. Orijinal büyüme: X100

### 3.2.1 CA3 Bölgesi İçin Elde Edilen Histopatolojik Bulgular

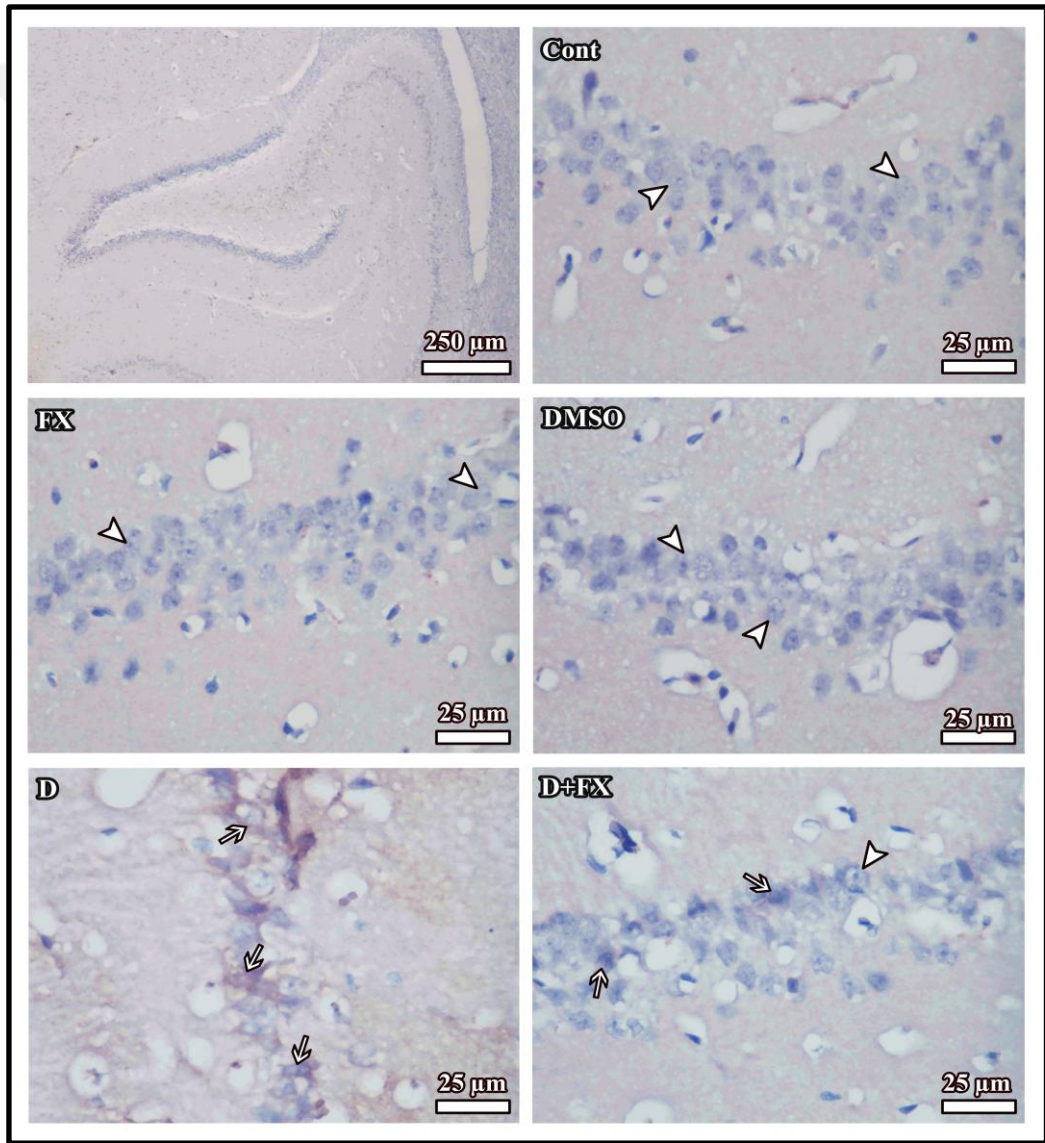
CA3 bölgesinden elde edilen histolojik bulgularda; Kont, FX, DMSO gruplarına ait kesitlerde ışık mikroskobu altında genel morfolojik yapıya sahip ökromatik özellikte, sitoplazma ve çekirdek sınırları net nöronlar gözlenmiştir. D grubunun CA3 bölgesinde ise nöronların koyu boyalı, sınırları tam belirgin olmayan dejenere yapıda olduğu saptanmıştır. D+FX grubunun CA3 bölgesi incelendiğinde ise; sağlıklı görünümdeki nöronların D grubuyla karşılaştırıldığında daha fazla olduğu gözlemlendi (Fotoğraf 3.3).



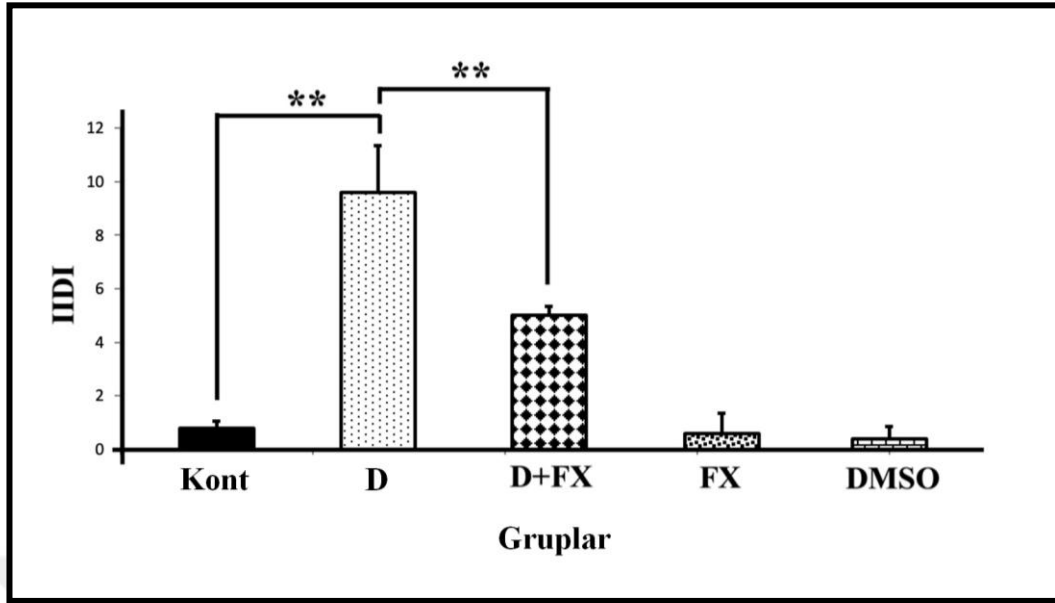
**Fotoğraf 3.3.** Hipokampusun CA3 bölgesinde krezil violet ile boyanmış kesitlerde piramidal nöronlar görülmektedir. **Ok başı:** sağlıklı nöronlar, **ok:** dejenere nöronlar. Orijinal büyüme: X100

### 3.3 İmmünohistokimyasal Bulgular

Kaspaz-3 boyama yöntemi kullanılarak yapılan immünohistokimyasal değerlendirme ile hipokampusta CA1 bölgesinde apoptotik hücrelerin varlığı değerlendirildi. Apoptozise uğrayan hücreler kahverengi boyanırken sağlıklı hücrelerde boyanma gözlemlenmemiştir. Elde edilen bulgulara göre; Kont, FX, DMSO ve D+FX gruplarına göre D grubunda kaspaz-3 pozitif hücre sayısı oldukça fazlaydı. Bu kapsamda D+FX ve D grupları karşılaştırıldığında, D+FX grubunda D grubuna oranla kayda değer bir miktarda azalmış kaspaz-3 pozitif hücre izlenmiştir (Fotoğraf 3.4). Hücrelerde kaspaz-3 aktivitesi IIDI hesaplanarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.4).



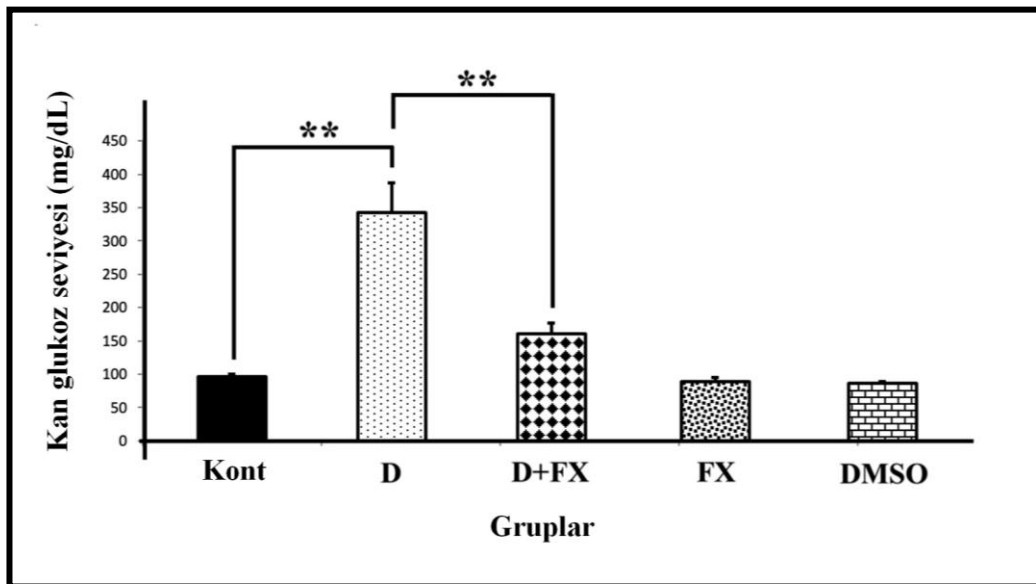
**Fotoğraf 3.4.** Tüm gruplarda hipokampus kesitlerine ait kaspaz-3 immünohistokimyasal reaktivitesini gösteren görüntüler. Hipokampustaki hücreler kaspaz-3 antikoruyla işaretlendi ve pozitif reaksiyon gösterenler kahverengi olarak gözlemlendi. **Ok başı:** Kaspaz-3 ile boyanmamış hücreler, **Ok:** Kaspaz-3 ile pozitif olarak boyanmış hücreler



Şekil 3.4. Tüm gruplarda hipokampus bölgesindeki kaspaz-3 immünoreaktivitesi için IIDI değerleri.  $p < 0,01$  düzeyindeki farklılıklar “\*\*” ile gösterilmiştir

### 3.4 Açlık Kan- Glukoz Düzeyine Ait Bulgular

Deneyin son günü, deney hayvanları kuyruk veninden alınan kan ile elde edilen açlık kan glukoz değerlerinin istatistiksel analizi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 3.5).

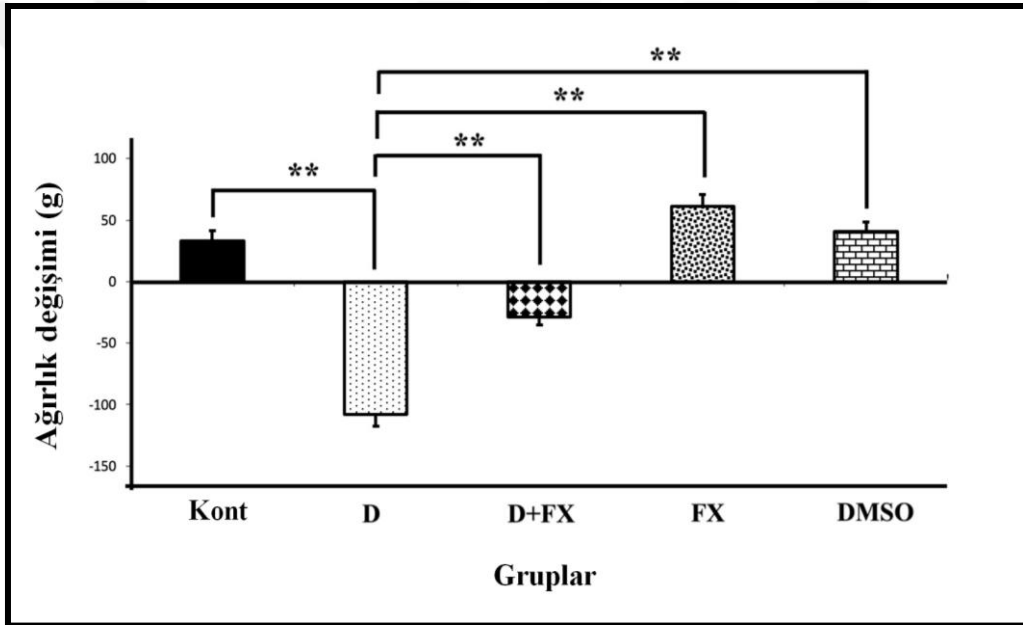


Şekil 3.5. Tüm gruplarda açlık kan şekeri düzeylerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p < 0,01$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*\*” ile gösterilmiştir

Deney sonunda ölçülen kan glukoz miktarlarında D grubunun değerleri diyabetik aralıktaydı. Bu kapsamda, D grubu Kont grubu ile karşılaştırıldığında ileri derecede artmış kan glukoz düzeyine sahip olduğu görülmüştür ( $p<0,01$ ). FX uygulanmasının ise D+FX grubunda kan şekerini  $p<0,01$  düzeyinde düşürdüğü tespit edilmiştir. Kont, FX ve DMSO gruplarının kan-glukoz düzeyleri arasında ise anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

### 3.5 Vücut Ağırlığı Bulguları

Grupların deney başlangıcında ve sonunda ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen verilerden vücut ağırlık değişimleri hesaplanarak bu değerlerin istatistiksel analizi sonucunda aşağıdaki grafik elde edilmiştir (Şekil 3.6).

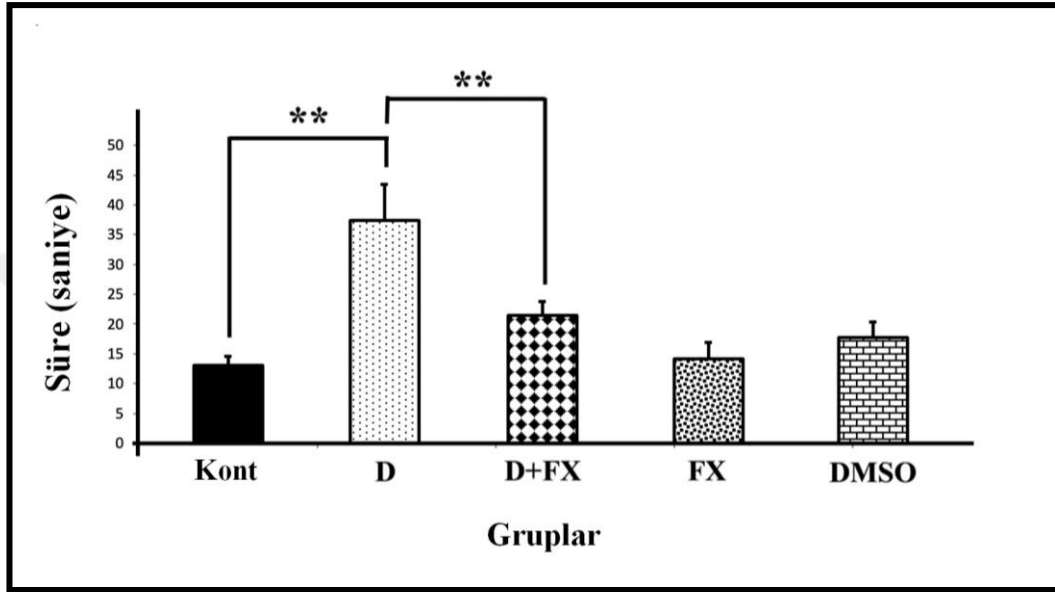


Şekil 3.6. Tüm gruplarda vücut ağırlık değişimlerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*\*” ile gösterilmiştir

Deney süresince Kont, FX ve DMSO gruplarına kıyasla D grubunda ağırlıkta azalma izlenmiştir ( $p<0,01$ ). Buna ek olarak, FX uygulanan diyabetik grupta (D+FX) ağırlık kaybının D grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ileri derece anlamlı düzeyde daha az olduğu görülmüştür ( $p<0,01$ ).

### 3.6 Davranış Testi Bulguları

Tüm gruplardaki sıçanlar deney planında bulunduğu şekilde Barnes Maze testine tabi tutulmuştur. Öğrenme eğitimi aşamasından 7 gün sonra yapılan sonuç testinden elde edilen verilerle sıçanların öğrendiğini ne kadar hatırladığı belirlenmiştir. Sıçanların güvenli alanı bulma süreleri aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Tüm gruplarda Barnes maze davranış deney düzeneğinde sıçanların hedefi bulma süresini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p < 0,01$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*\*” ile gösterilmiştir

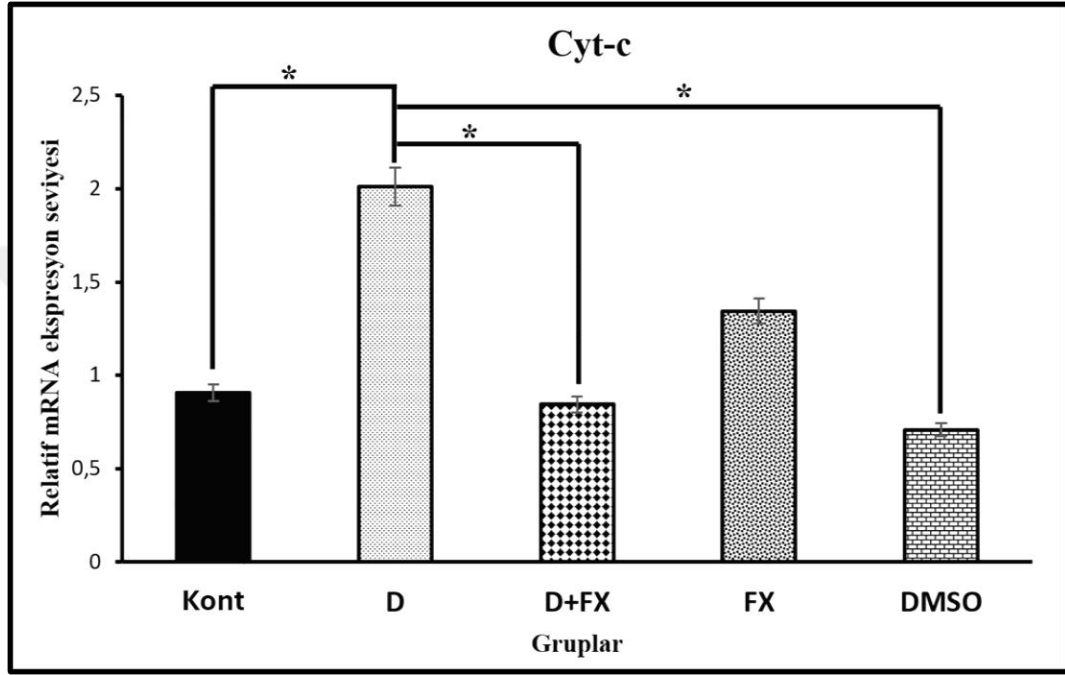
Deneyin son günü elde edilen verilerin istatistiksel analizi sonucunda; D grubunun güvenli alanı bulma süresinin, Kont grubunun güvenli alanı bulma süresinden istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı şekilde daha uzun olduğu görülmüştür ( $p < 0,01$ ). Benzer şekilde D grubu ile D+FX grubunun güvenli alanı bulma süresi karşılaştırıldığında, D+FX grubunda bu sürenin ileri derecede anlamlı düzeyde daha kısa olduğu görülmüştür ( $p < 0,01$ ). Ayrıca Kont, D+FX, FX ve DMSO gruplarının güvenli alanı bulma süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir ( $p > 0,05$ ).

### 3.7 Moleküler Analiz Bulguları

Çalışmada moleküler olarak apoptozis için Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Cyt-c ve Anneksin V relatif gen ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Tüm genler House keeping gen olan GAPDH'e göre her grupta ayrı ayrı gen ekspresyon seviyeleri bakımından analiz edilmiştir.

### 3.7.1 Cyt-c

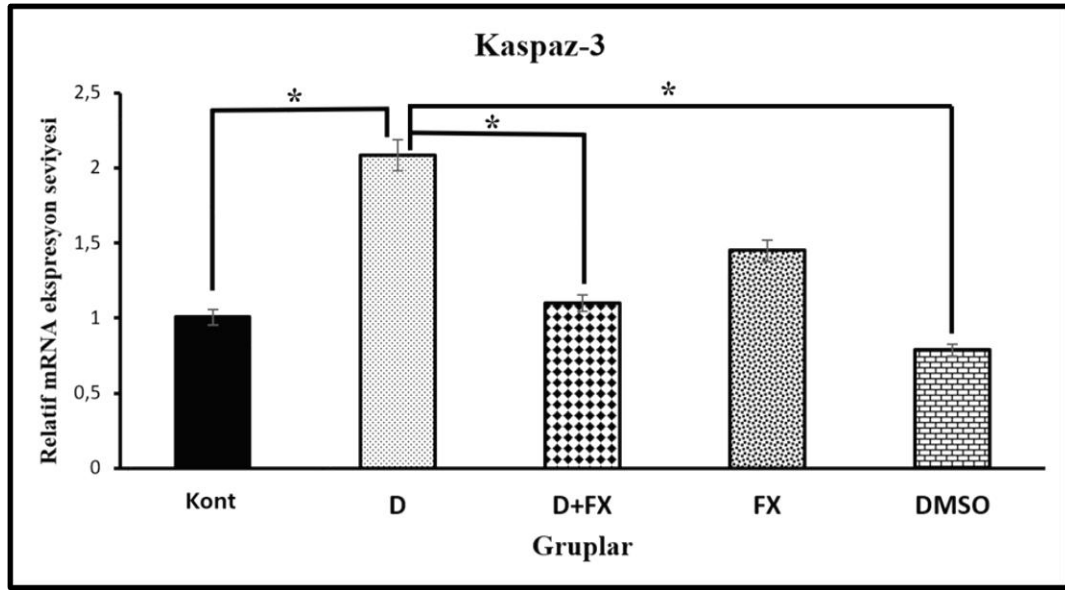
Kontrol gen (House keeping gen GAPDH)'e göre değerlendirildiğinde her gruptaki Cyt-c gen ekspresyon seviyesi Kont grubunda 0,91 kat, D grubunda 2,01 kat, D+FX grubunda 0,85 kat, FX grubunda 1,34 kat, DMSO grubunda 0,7 kat daha fazla eksprese edilmiştir. D grubunda Cyt-c gen ekspresyon seviyesi Kont, D+FX, ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha fazladır ( $p<0,05$ ) (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Cyt-c gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*” ile gösterilmiştir

### 3.7.2 Kaspaz-3

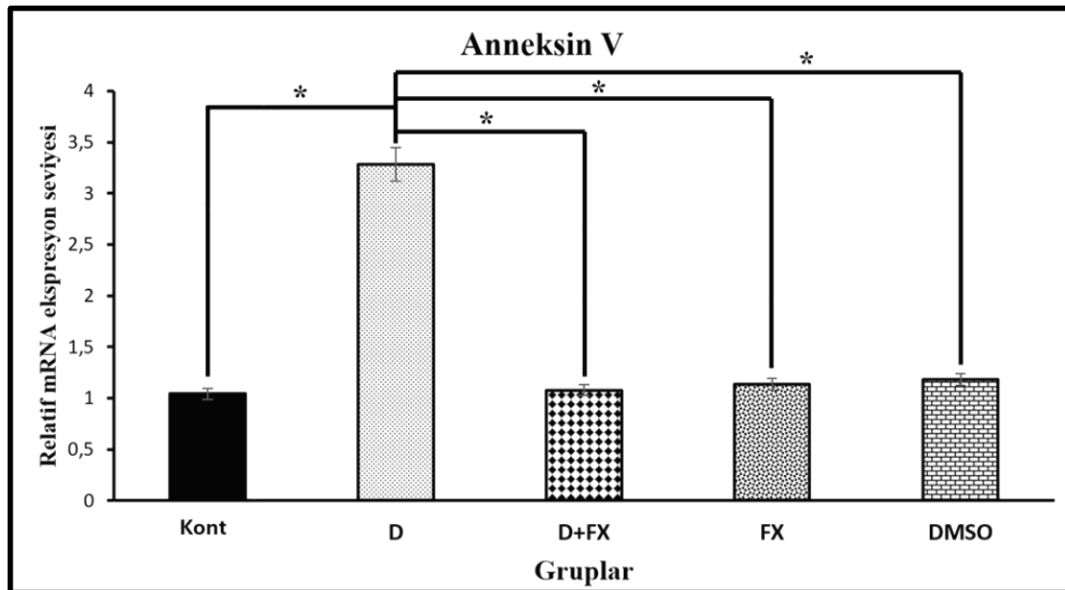
Kontrol gen (House keeping gen GAPDH)'e göre değerlendirildiğinde her gruptaki kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesi Kont grubunda 1,0067 kat, D grubunda 2,2 kat, D+FX grubunda 1,09 kat, FX grubunda 1,5 kat, DMSO grubunda 0,6 kat daha fazla eksprese edilmiştir. D grubunda Kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesi Kont, D+FX ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha fazladır ( $p<0,05$ ) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Kaspaz-3 gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*” ile gösterilmiştir

### 3.7.3 Anneksin V

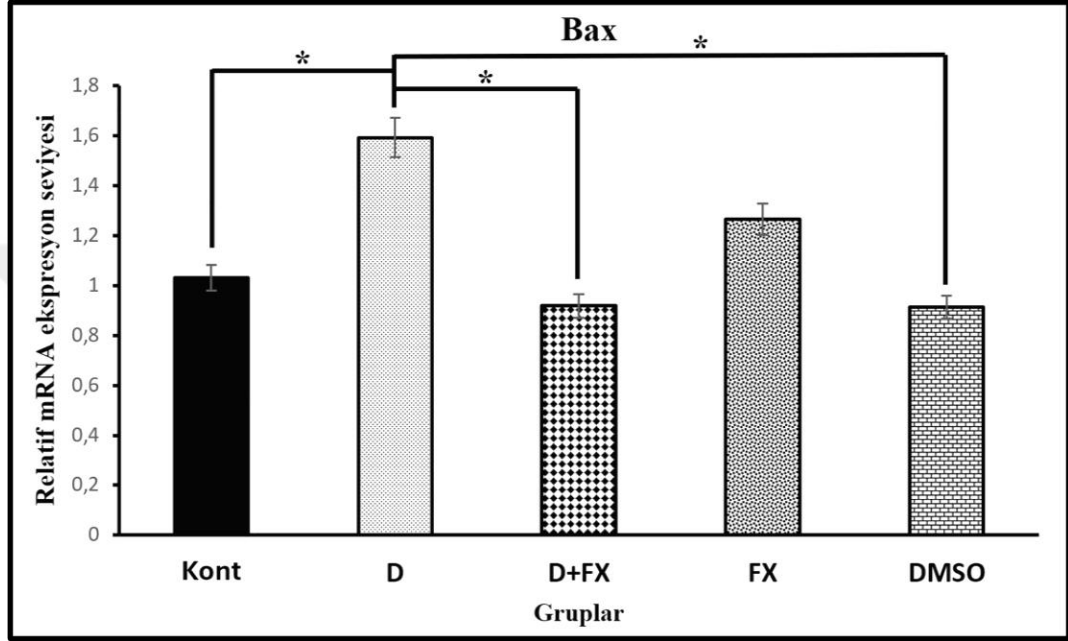
Kontrol gen (House keeping gen GAPDH)’e göre değerlendirildiğinde her gruptaki Anneksin V gen ekspresyon seviyesi Kont grubunda 1,08 kat, D grubunda 3,2 kat, D+FX grubunda 0,95 kat, FX grubunda 1,08 kat daha fazla eksprese edilmiştir. D grubunda Anneksin V gen ekspresyon seviyesi Kont, D+FX, FX ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha fazladır ( $p < 0,05$ ) (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Anneksin V gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*” ile gösterilmiştir

### 3.7.4 Bax

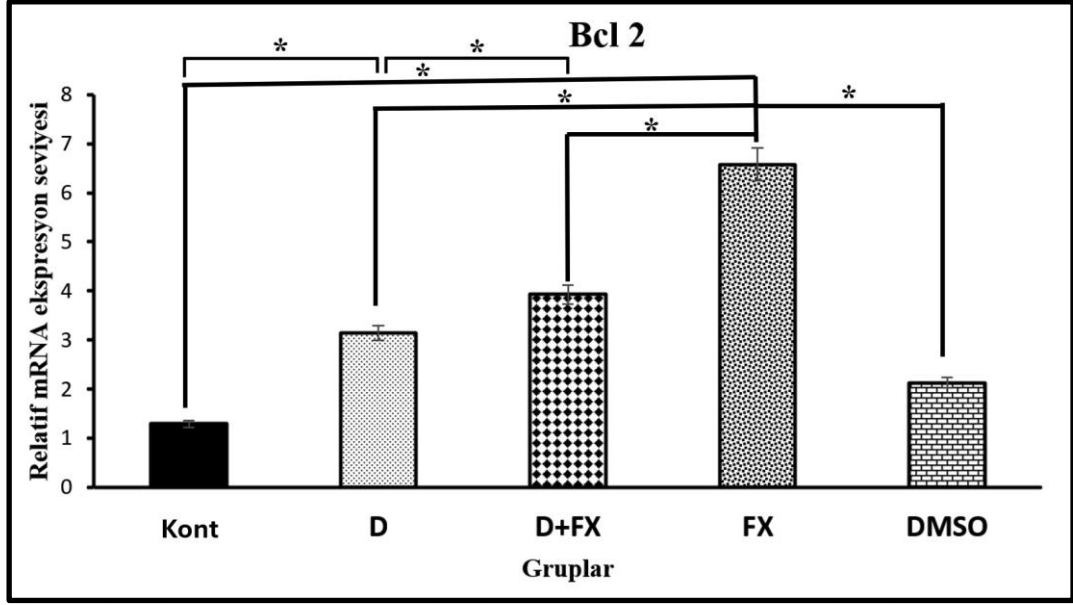
Kontrol gen (House keeping gen GAPDH)'e göre değerlendirildiğinde her gruptaki Bax gen ekspresyon seviyesi Kont grubunda 1,03 kat, D grubunda 1,6 kat, D+FX grubunda 0,9 kat, FX grubunda 1,2 kat, DMSO grubunda 0,9 kat daha fazla eksprese edilmiştir. D grubunda Bax gen ekspresyon seviyesi Kont, DMSO ve D+FX grubundan anlamlı olarak daha fazladır. ( $p<0,05$ ) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Bax gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*” ile gösterilmiştir

### 3.7.5 Bcl-2

Kontrol gen (House keeping gen GAPDH)'e göre değerlendirildiğinde her gruptaki Bcl-2 gen ekspresyon seviyesi Kont grubunda 1,3 kat, D grubunda 3,1 kat, D+FX grubunda 3,9 kat, FX grubunda 6,6 kat, DMSO grubunda 2,1 kat daha fazla eksprese edilmiştir. FX grubunda Bcl-2 gen ekspresyon seviyesi Kont, D, D+FX ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha fazladır ( $p<0,05$ ) (Şekil 3.12).



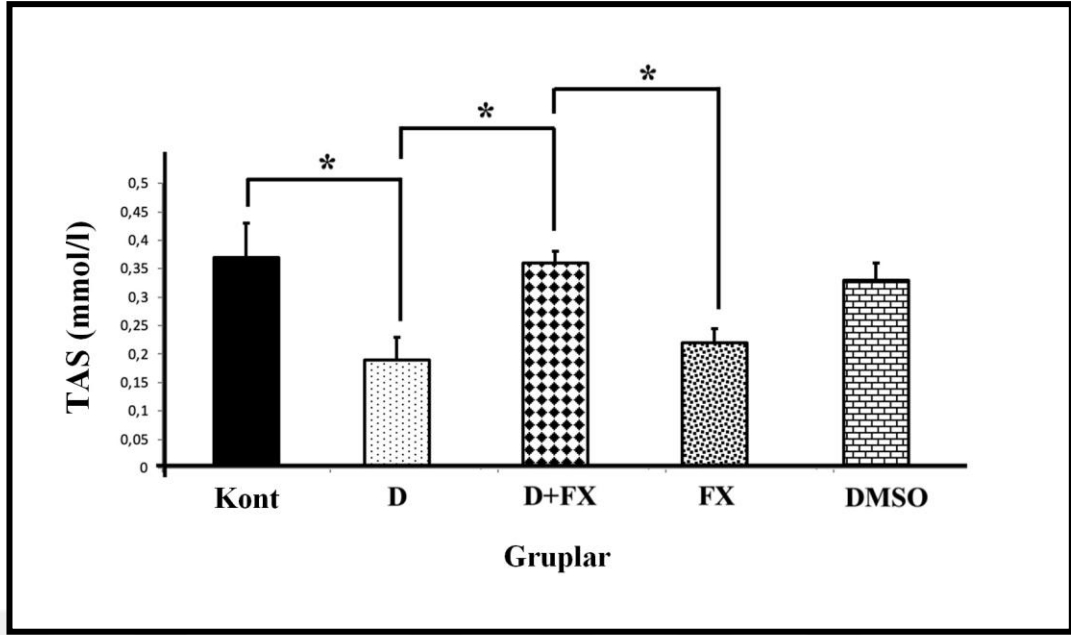
Şekil 3.12. Bcl-2 gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*” ile gösterilmiştir

### 3.8 Biyokimyasal Analiz Bulguları

Tüm gruplarda oksidan ve antioksidan miktarlarının ölçülmesi için serum örneklerinden TAS ve TOS analizleri yapılarak OSI değeri hesaplanmıştır. Elde edilen sayısal verilerin istatistiksel değerlendirilmesi yapılarak aşağıdaki grafikler elde edilmiştir.

#### 3.8.1 Serum TAS Bulguları

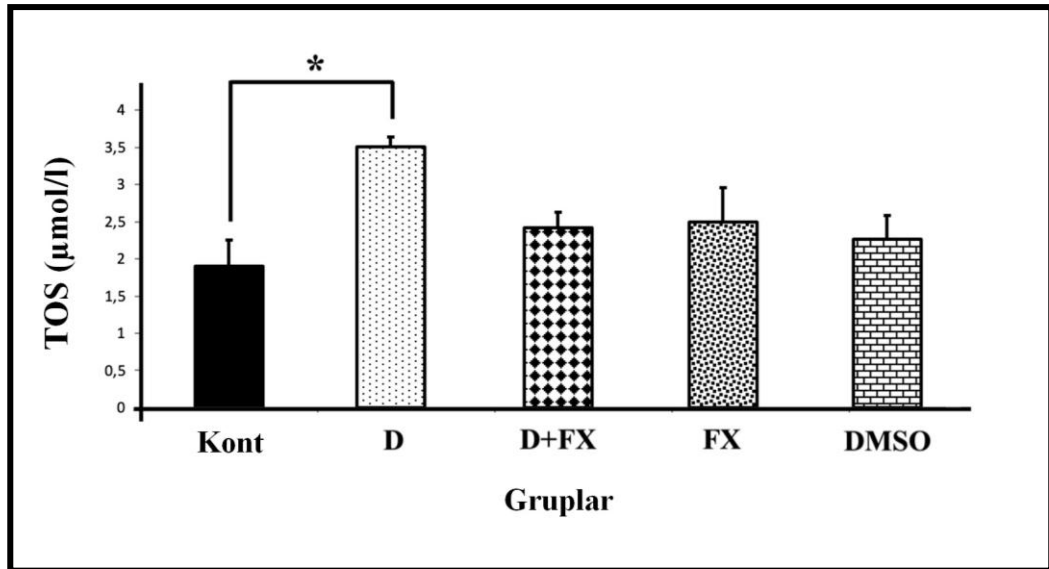
Kont grubu ile karşılaştırıldığında D grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde TAS değerinde bir azalma meydana gelmiştir ( $p < 0,05$ ). D grubu ile D+FX grubu karşılaştırıldığında ise anlamlı şekilde TAS seviyesinde bir artış gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Kont ve D+FX grubundaki TAS seviyeleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p > 0,05$ ). FX grubundaki TAS seviyesinin D+FX grubuna kıyasla daha az olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ancak Kont ve FX grubunun TAS değerleri arasında istatistiki anlamda bir fark izlenmemiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Tüm gruplarda TAS seviyelerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*” ile gösterilmiştir

### 3.8.2 Serum TOS Bulguları

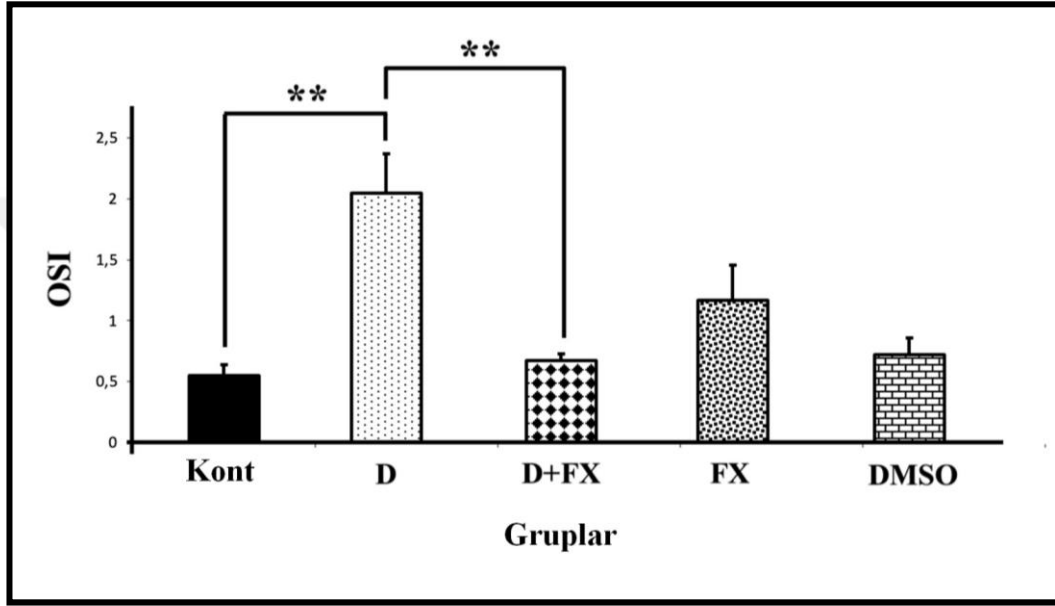
Kont grubu ile karşılaştırıldığında D+FX, FX ve DMSO grubunun TOS seviyeleri benzer düzeylerdeydi ( $p > 0,05$ ). Ancak D grubunun TOS değerleri Kont grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış gözlemlendiği görülmüştür ( $p < 0,05$ ) (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Tüm gruplarda TOS seviyelerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*” ile gösterilmiştir

### 3.8.3 OSI Bulguları

TAS ve TOS değerleri yapılan analizlerle elde edildikten sonra OSI değeri hesaplanmıştır. Elde edilen bulgularda; D grubu OSI değerinin Kont grubuna kıyasla ileri derecede anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür ( $p<0,01$ ). Antioksidan maddenin uygulandığı D+FX grubunda ise OSI değerinin D grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ( $p<0,01$ ) (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Tüm gruplarda OSI değerlerini gösteren grafik. İstatistiksel olarak  $p<0,01$  düzeyinde anlamlı olan farklılıklar “\*\*” ile gösterilmiştir

## 4. TARTIŞMA

Kronik seyirli, kalıtsal kökenli olan ve günümüzde beslenme bozuklukları, hareketsizlik gibi birçok sebeple insidansı artan diyabet hastalığının gelecekte de küresel çapta karşılaşılan en temel sağlık problemi olacağı öngörülmektedir. Prevalans artışıyla birlikte hastalığın görüldüğü yaş grubu ortalaması da giderek küçülmektedir. Bu durum; sağlık sistemi ve insan yaşamı üzerinde maddi ve manevi birçok kayba sebebiyet vermektedir. Bu bağlamda; diyabetin insan yaşamı üzerindeki etkilerini hafifletecek araştırmalar yürütülerek bu sorunlarla baş etmenin yolları aranmaktadır.

Hiperglisemi poliol yolu aktivasyonu ile ileri glikasyon son ürünlerinin artışına yol açar. Glikasyon; lipid, protein ve hatta nükleik asitlerin yapısında istenmeyen çapraz bağlar oluşturmasıyla bazı temel moleküllerin işlevine engel olur. Özellikle proteinlerin glikasyonunda moleküler konformasyon bozularak, enzimatik aktivite değişir ve hücre metabolizma işleyiş mekanizması sekteye uğramış olur (Chuah vd., 2013; Singh vd., 2014). Ek olarak inflamatuvar hücrelerin reseptörlerine bağlanarak NFκB artışıyla sistemik olarak inflamasyon ve oksidatif strese neden olurlar. Yapılan çalışmalarda diyabet ve Alzheimer hastalarında görülen nöropatinin altında sinir hücresinin akson ve Schwann hücrelerinde meydana gelen glikasyonun olduğu görülmüştür (Sugimoto vd., 1997). Hipergliseminin serbest radikal üretimini tetikleyerek oksidatif stresi arttırdığı yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Al-Kuraishy vd., 2020).

Glukoz metabolizmasında bozuklukla karakterize multisistemsel bir hastalık olan diyabet seyirinde kuşkusuz en çok etkilenen organlardan birisi de ana enerji kaynağı glukoz olan beyindir. Diyabetle birlikte ortaya çıkan glukoz toksisitesi; mikrovasküler bozunmalara, periferik sinir hasarına ve doğrudan hipokampusta nöronlar üzerinde tahribata neden olabilmektedir. Diyabet ile seyreden bilişsel bozukluk günlük yaşamı olumsuz etkileyen temel sorunlardan birisidir. Çalışmamızda ana araştırma konusu bu bağlamda şekillenmiştir. STZ ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda diyabetin hipokampus üzerinde meydana getirdiği hasar ve antioksidan madde olan FX ile bu hasarın önüne geçilip geçilemeyeceği kapsamlı bir biçimde araştırılmıştır. Sonuç olarak diyabetin hipokampusta hacimsel düzeydeki etkisi stereolojik; hücresel düzeydeki etkisi histopatolojik ve immünohistokimyasal analizlerle incelenmiştir. Bu etkinin

mekanizmasını ortaya koymak amacıyla biyokimyasal ve moleküler analizler yapılmış ve bulgular davranış testi sonuçlarıyla desteklenerek ortaya koyulmuştur.

Diyabete sahip bireylerde hafif bilişsel bozukluktan bunamaya kadar pek çok hafıza problemi yaşanmaktadır. Beyin glukoza duyarlı bir organdır ve glukoz metabolizmasında kritik rol oynayan insülin reseptörleri hipokampusta bol miktarda bulunur. Callisaya ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada diyabet, sözel akıcılık, sözel bellek ve işleme hızında düşüşle ilişkilendirilmiştir ayrıca diyabete sahip hastalarda toplam beyin hacminin daha düşük olduğu gösterilmiştir (Callisaya vd., 2019). Zhang ve ark. diyabetli hastalarda hipokampal alt alanları inceledikleri çalışmada toplam hipokampus hacminin diyabetli hastalarda daha düşük olduğunu; özellikle CA1 ve subikulum bölgelerinde azalmanın daha bariz bir şekilde ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Buna ek olarak yüksek miktardaki glikolizlenmiş hemoglobin olan HbA1c seviyesi düşük bilişsel performans ve hipokampus atrofisi ile ilişkilendirilmiştir (Y.-W. Zhang vd., 2015). Yapılan çalışmalar diyabet aracılı olarak oluşan oksidatif stresin beyin hasarında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Al-Kuraishy vd., 2020; You vd., 2021). Oksidatif stresin inhibisyonu için kullanılan çeşitli antioksidan maddelerin bu durumu tersine çevirebildiği Feng ve ark. ve Olufunmilayo ve ark. tarafından yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Feng vd., 2023; Olufunmilayo vd., 2023). Hipokampus dokusunda uyarıcı aminoasit reseptörlerinin yoğun miktarda bulunması dolayısıyla ilgili doku oksidatif stres ve nörodejeneratif bozukluklara daha yatkındır (D. Liu vd., 2013). Bizim çalışmamızdaki bulgular da literatür ile uyum sağlamaktadır. Yapılan stereolojik analizlerden elde edilen verilerde diyabetik grupta hipokampus hacminde azalma ortaya koyulmuştur.

CA3 bölgesinde nöronlar glutamat ve GABA nörotransmitterlerini kullanarak sinaps oluşturmaktadır. Buna ek olarak CA3'te yoğun olarak bulunan yosunsu lifler kimyasal sinaplara ek olarak elektriksel sinapslar da oluşturmaktadır (Cherubini & Miles, 2015). CA1 bölgesindeki sinaptik iletiminde uzun vadeli potansiyasyonun (LTP) indüksiyonu N-metil-D-aspartik asit (NMDA) nörotransmitterleri ile sağlanmaktadır. Yüksek frekanslı sinaptik uyarım, NMDA'ya bağımlı  $Ca^{+2}$  girişiyle LTP'yi teşvik eder buna bağımlı olarak; LTP dendritik uzantıların hacim, baş ve boyun çapı gibi morfolojik ve yoğunluğu gibi nicel özelliklerine olumlu yönde etki eder (Rubio vd., 2013). CA1 ve DG'a giden afferent nöronların LTP'si büyük çoğunlukla NMDA'ya bağlıdır ve bundan ötürü

postsinaptik modifikasyonlardan daha fazla etkilenir. CA3 bölgesinde bulunan yosunsu lifler ile indüklenen CA3'te LTP, NMDA reseptöründen bağımsız olarak presinaptik olarak ifade edilir (Kamal vd., 1999). Bu bölgelerdeki indüksiyon farkı çalışmamızda da ortaya koyduğumuz CA1 bölgesinde CA3 bölgesine göre daha fazla hacim kaybı meydana gelmesini açıklayabilir.

Zhao ve ark. yaptığı çalışmada tip 1 diyabetin hipokampus hacmine etkisi stereolojik analizlerle incelenmiş; diyabet grubunda CA1 bölgesinde hacim kaybı istatistiksel olarak anlamlıyken, total hipokampus hacminde gruplar arasında anlamlı bir fark çıkmamıştır. Diyabetik sıçanların CA1 nöronlarında kromatinin agregre olduğu, mitokondri kristallarının şişmiş yapıda izlendiği transmisyon elektron mikroskopik düzeyde yapılan ultrastrüktürel incelemeler ile ortaya koyulmuştur. Meydana gelen morfolojik bozunmanın sinaptik yarı ve veziküllerin değişimine neden olarak sinaptik plastisitenin bozulmasına sebebiyet verdiği düşünülmüştür (Zhao vd., 2016). Martínez-Tellez ve ark., yaptığı çalışmada; deneysel diyabet oluşturulan hayvanların beyin dokusunda aksonal dejenerasyon, demiyelizasyon, glial hücrelerde hasar ve nöronal atrofi varlığı ortaya koyulmuş, CA1 bölgesindeki piramidal nöronların dendritik uzantılarının kısalması ve dendritik dikenlerin azalmasının en yoğun şekilde gerçekleştiği görülmüştür (Martínez-Tellez vd., 2005).

Hipertansif sıçanlardan kültüre edilmiş nöronlarda FX'in koruyucu etkisi Ikeda ve ark. tarafından çalışılmış; FX'in diyabetin komplikasyonu olarak da sıklıkla karşımıza çıkan serebrovasküler hastalıklarda nöron hasarını azalttığı görülmüştür (Ikeda vd., 2003). Bazı çalışmalarda FX'in GABA'yı azaltıp glutamati artırarak nöroprotektif etki sağladığı bildirilmiştir (Anand vd., 2024; Dhama vd., 2021). Çalışmamızda hipokampusta D grubunda meydana gelen hacim kaybının FX tedavisi ile önemli ölçüde tersine çevrilebileceği gösterilmiştir. Ayrıca sunulan tez çalışmasında güvenilir ve kantitatif bir yöntem olan stereolojik yöntemlere dayandırılarak yapılan hipokampus hacim ölçümü literatüre diyabetik hipokampus hacmine FX'in etkisi hakkında yeni bir bilgi kazandırılmasını sağlamıştır.

Mitokondride bir iç membran proteini olan ve membran potansiyelini düşürerek ROS üretimini sınırlandıran Uncoupling Protein (UCP) proteinlerinin azalması nöronal ölüme yol açabilir. Abdul-Rahman ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada oluşturulan diyabet hayvan modelinde hipokampus dokusunda UCP2 gen ekspresyonunda aşağı yönlü azalma gözlemlenmiştir (Abdul-Rahman vd.,

2012). Ayrıca uzun süreli hiperglisemi durumunda oksidatif strese korunmak için pankreas beta hücrelerinde UCP2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Affourtit & Brand, 2008). Yapılan pek çok çalışma ile de artan ROS, oksidatif stres ve yüksek miktardaki glukoz toksisitesi ile hücrelerin UCP2'nin mRNA düzeyinde ifadesini artırarak başa çıkmaya çalıştığı ortaya konulmuştur (Souza vd., 2011). Yapılan çalışmalarda UCP proteinlerinin obezite, hiperglisemi ve diyabette fizyolojik bir savunma mekanizması olarak karşımıza çıktığı görülmektedir (Jezek, 2002). Bu durum UCP proteinlerinin diyabetin kronik komplikasyonlarında ve beyinde koruyucu bir rol aldığını göstermektedir.

FX'in antiobezite özelliği araştırılırken, UCP regülasyonu aracılığıyla beta oksidasyonu sağladığı da ortaya konmuştur (Maeda, 2013). Yapılan çalışmalar bize FX'in çeşitli dokularda UCP'yi arttırdığını göstermektedir (Woo vd., 2009). Mattiasson ve ark. yürüttüğü bir çalışmada UCP-2'nin nöronal ölümü ve beyinde meydana gelen işlevsel bozuklukları hafiflettiği gösterilmiştir (Mattiasson vd., 2003). FX'in aynı etkiyi beyin dokusunda göstermiş olması ve diyabetik hiperglisemiden etkilenen nöronları UCP aracılı olarak, ROS miktarını azaltıp, korumuş olması muhtemeldir. Ancak bu konuda literatürdeki bilgiler sınırlı olduğundan FX'in diyabetik beyinde UCP ekspresyonunu inceleyen yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sinir hücrelerinde çevresel ve genetik faktörlerin yanı sıra serbest radikaller ile meydana gelen oksidatif stres nörodejenerasyonun en güçlü sebebidir. Oksidatif stres aynı zamanda Alzheimer, Parkinson ve diğer yaşa bağlı nörolojik hastalıkların temel sebebidir (Uttara vd., 2009). Yapılan bir çalışmada; yaşa bağlı hafıza bozuklukları, hipokampal nöronlarda oksidatif stresin yol açtığı ölümle ilişkilendirilmiştir (Nicolle vd., 2001). İçeriğindeki yüksek FX miktarıyla dikkat çeken kahverengi deniz yosununun sıçanlarda hipokampal nöronların fonksiyonel gelişimini desteklediği ortaya koyulmuştur (Maqueshudul Haque Bhuiyan vd., 2015). Bir başka çalışmada Lin ve ark., P13K/Akt yolu aktivasyonu ve ERK yolu inhibisyonu ile FX'in  $\beta$ -oligomer aracılı nörotoksisiteyi azalttığını gözler önüne sermiştir (Lin vd., 2017).

FX'in; hiperglisemi, obezite ve tümörlerde önleyici bir farmakolojik etkisi vardır (Y. Zhang vd., 2018). Bu ajanın obezitede ve STZ ile oluşturulan diyabette meydana gelen hiperglisemiyi önemli ölçüde hafiflettiği ortaya koyulmuştur (Oliyai vd., 2021; X. Zhang vd., 2024). Çalışmamızda da kan glukoz değerlerinin

analizinde FX verilen diyabetik grubun kan-glukoz değerinin D grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Bu bulgular bize alışmamızda FX'in antidiyabetik etkilerinin literatürle uyumlu şekilde görüldüğünü göstermektedir. Kan-glukoz seviyelerindeki düşüş aynı zamanda oksidatif stresin de azalmasına sebep olarak diyabetik nöronal hasarı hafifletmiş olabilir.

X.S. Zhang ve ark. yaptığı bir çalışmada subaraknoid kanama modelinde Nissl boyamada nrodejenarasyon görülürken FX'in hayatta kalan nöron sayısını artırdığı ortaya koyulmuştur (X.S. Zhang vd., 2020). J. Liu ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada Parkinson hastalığının deneysel modelinde farelerde beyin dokusunda dopaminerjik nöronlarda kayıp meydana gelirken; FX ile müdahalenin dopaminerjik nöron sayısını doza bağlı olarak arttırdığını göstermiştir (J. Liu vd., 2022). Anand ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Hematoksilen-Eozin boyalı serebral korteks preparatları üzerinde yapılan incelemelerde Valproik asit uygulanan grupta büzüşmüş nöron ve yoğun bir şekilde nöroglial hücreler izlenirken; 200 mg/kg FX uygulanmasıyla nöron ve nöroglia hücrelerinin normal yapısına geri döndüğü grlmştir (Anand vd., 2024).

Çalışmamızda FX verilen diyabetik grupta yapılan ışık mikroskop incelemelerde hipokampus nöronlarının sağlıklı morfolojik görünümde oldukları gözlendi. Hücrelerin dizilimi, sitoplazmik hücre sınırları ve çekirdek ayrımı net olarak yapılabilmekteydi. Bu durum bizlere; literatürle uyumlu olarak nöron yapılarının FX aracılı olarak korunduğunu ve D grubunda izlenen patolojilerin bu grupta izlenmemesi FX'in diyabetik hipokampus hasarlarına karşı nöroprotektif bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Ancak nadirde olsa izlenen piramidal nöronlardaki büzülme bize bazı alanlarda diyabet aracılı doku hasarının devam ettiğini, uygulanan doz ve sürede tam iyileşmenin mümkün olmadığını göstermektedir. Bu konu ile ilgili süre ve doz ayarlamaları yeniden yapılarak yeni çalışmalar planlanabilir.

Diyabetin son glikasyon ürünlerinin artışıyla vücuttaki antioksidan sistemleri bozduğu bilindiğinden kandaki TAS ve TOS seviyeleri ölçülerek OSI hesaplanmıştır. Sonuçlar; alışmamızda TOS düzeyleri diyabetik gruplarda yüksek, FX ile tedavi edilen grupta ise tedavi edilmeyen gruba göre anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. Buna ek olarak diyabetik grupta TAS'ın azalması hiperglisemi ve lipid peroksidasyonuna ile ilişkilendirilebilir. Bu sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında; tedavi grubunda TOS değerinin dşmesininin FX'in

antioksidan ve serbest radikalleri temizleme özelliği ile gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Uzar ve ark. yaptığı bir çalışmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diyabetik sıçanların siyatik sinir ve beyin dokusunda yüksek TOS, azalmış TAS ve buna bağlı olarak OSI değerinde artış gözlemiştir (Uzar vd., 2012). Sıçanlarda VPA ile oluşturulan otizm modelinde korteks ve serebellumda GSH ve SOD seviyelerinde meydana gelen azalma FX ile tersine çevrilmiştir (Anand vd., 2024). Başka bir çalışmada, serebral iskemi-reperfüzyon hasarında sıçan beyinde ROS birikiminin FX dozuna bağlı olarak azaldığı izlenmiştir (Hu vd., 2018). Dağsuyu ve ark. yaptığı bir çalışmada, diyabetik sıçanların beyin ve beyincik dokusunda ROS ve TOS düzeyleri kontrol grubuna göre büyük oranda artmış, TAS değeri ise önemli ölçüde azalmıştır. Metformin tedavisi bu etkileri tam tersine çevirmiştir (Dagsuyu vd., 2023). Sonuçlarımızda FX uygulanan diyabetik grupta FX'in metformine benzer etkiler gösterip, anti-hiperglisemik ve antioksidan özellikleriyle TAS değerlerinde diyabetik gruba göre artış ve TOS değerlerinde azalmayı sağlamıştır.

Apoptozda görev alan önemli bir proteaz olan kaspaz-3 apoptoz belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Kaspaz-3 varlığı hücrenin geri dönüşümsüz olarak apoptoza girdiğini gösteren önemli bir moleküldür (Nna vd., 2020). Kaspaz-3 nörodejeneratif hastalıklarda beyin dokusunun kaybına neden olan apoptozda kaspaz kaskadında kritik bir moleküldür (Ünver Saraydin vd., 2021). Diyabetik hipokampus dokusunda CA1 bölgesinde yapılan incelemede kaspaz 3 (+) ve kaspaz 7 (+) hücre sayısının kontrol grubundan daha fazla olduğu gösterilmiştir (Ünver Saraydin vd., 2021). Yapılan bir çalışmada, STZ ile diyabet modeli oluşturulan sıçanların beyin ve hipokampus dokusunda Bax ve kaspaz-3 ekspresyonu artarken, Bcl-2, Bcl-xl gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonu düşmüştür (Jafari Anarkooli vd., 2008; C. Li vd., 2017). Çalışmamızda incelenen immünohistokimyasal bulgularımızda literatürle uyumlu olarak D grubunda CA1 bölgesinde yoğun bir kaspaz-3 aktivitesi görülmüştür. Bu durum bizlere apoptozis varlığını göstermektedir. Bu kapsamda, literatürdeki pek çok çalışma FX'in antioksidan ve nöroprotektif özelliklerine vurgu yapmaktadır. Bulgularımız mevcut araştırmalarla uyumlu olup FX'in diyabetik hipokampus üzerindeki nöroprotektif etkisi bu çalışma ile kapsamlı bir şekilde gösterilmiştir.

Bcl-2 protein ailesinin üyesi olan Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 hücre apoptozunu incelemede kullanılan temel moleküllerdir. Meng ve ark. yaptığı western blot

analizleriyle diyabet grubunda kontrole göre ifadesi artmış Bax, ifadesi azalmış Bcl-2 ve Cyt-c, ayrıca kaspaz-3 ifadesinde artışla diyabetin apoptozu indüklediğini bildirmiştir (Meng vd., 2017). Tavşanlar üzerinde yürütülen yenidoğan hipoksik beyin hasarında Anneksin V birikiminin hipoksik grupta daha fazla olduğu görülmüştür (D'Arceuil vd., 2000). Beyin hasarında Anneksin V ifadesinin arttığı ve Anneksin V'in apoptozis ilişkili yüzey molekülü olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Sohma vd., 2013). Çalışmamızda gruplar değerlendirildiğinde hipokampus dokusunda diyabet aracılı olarak apoptozisin arttığı ve FX'in diyabetik gruba uygulanması sonucu apoptoz miktarının azaldığı görülmüştür.

Literatürde diyabetik beyin hasarında FX'in apoptozis üzerindeki etkisini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Zhang ve ark. çalışmalarında yaptığı travmatik beyin hasarında (TBI) bölünmüş kaspaz-3 ekspresyon seviyesinin arttığı ve FX uygulaması ile apoptoz indeksinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca FX'in azalmış Bcl-2 ve artmış Bax üzerinde regülasyon sağlayarak TBI kaynaklı apoptozu azalttığı bildirilmiştir (L. Zhang vd., 2017, 2023). FX'in iskemik felç modelinde intraserebroventriküler uygulanmasının farelerde Bcl-2 ekspresyonu artırarak Bax, Cyt-c salınımı ve Kaspaz-3'ü azaltarak apoptozu tersine çevirdiği görülmüştür (Hu vd., 2018). Çalışmamızda Bcl-2 ekspresyonu Kont grubuna kıyasla D grubunda artmıştır. Bcl-2 ekspresyon seviyesinin tüm gruplar arasında FX grubunda en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. Buna ek olarak çalışmamızda FX'in anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunu artırarak nöronal hücreleri STZ ile oluşturulmuş deneysel diyabet aracılı apoptozdan koruduğunu Cyt-c, kaspaz-3 ve Bcl-2/Bax değerlerine bütün olarak bakarak söyleyebiliriz. Tüm bu moleküler bilgiler ışığında sonuç olarak; FX uygulamasının diyabetin hipokampus üzerindeki olumsuz etkilerini önemli ölçüde ortadan kaldırdığı gözler önüne serilmiştir. Bu kapsamda, FX'in diyabetik sıçanların hipokampus bölgesinde Kaspaz-3, Bax, Cyt-c gen ekspresyon seviyelerini azaltarak ve Bcl-2 gen ekspresyon seviyesini artırarak apoptozisi minimize ettiği söylenebilir.

Literatürdeki mevcut bilgiler diyabete sahip kişilerin ilerleyen yaşlarda demansa yakalanma riskinin neredeyse 2 kat fazla olduğunu göstermektedir (Cheng vd., 2012). Yüksek glukoz seviyesinin uzun süreli seyrinin hipokampusta mikro bozunmalar aracılığıyla bilişsel kayba yol açtığını gösteren çalışmalar vardır (Kerti vd., 2013). Ancak hala hipergliseminin yol açtığı bilişsel bozunmaların hangi patolojik yollarla gerçekleştiği kesin olarak bilinmemektedir. X.S. Zhang ve ark.,

çalışmasında subaraknoid kanamaya bağlı oluşan oksidatif hasarda Morris Water Maze testinde farelerin kaçış gecikmelerinin daha uzun olduğu ve platformu bulmak için daha uzun mesafe harcadıkları ve bu durumların FX uygulamasıyla tersine çevrildiği görülmüştür (X.-S. Zhang vd., 2020). Xiang ve ark., yaptığı bir çalışmada A $\beta$  oligomerlerinin hipokampal enjeksiyonuyla farelerde ortaya çıkan öğrenme ve hafıza bozukluklarının FX ile tersine çevrildiğini göstermiştir. Bu etkiyi FX'in; BDNF ve ChAT ekspresyonunda aşağı yönlü regülasyonu ve makrofaj benzeri davranışla vücut atıklarını toplayıp, toksik oligomerlerin sinaptik plastisiteyi bozmasının önüne geçmesiyle sağladığı düşünülmektedir (Xiang vd., 2017). FX'in skopolamin aracılı bilişsel bozulmada mekansal öğrenme ve hafıza bozukluklarını ve otizmle ilişkili bilişsel eksiklikleri iyileştirdiği yapılan Morris Water Maze test sonuçları ile ortaya koyulmuştur (Anand vd., 2024; Lin vd., 2016). Bu kapsamda çalışmamızda FX'in hafıza bozuklukları ve mekansal öğrenmeyi iyileştirdiği yapılan Barnes Maze davranış testi ile ortaya koyulmuştur. Bu bilgiler ışığında, hipokampus nöronlarında FX'in serbest radikalleri temizleyen antioksidan etkisiyle diyabette meydana gelen bilişsel bozunmayı önemli ölçüde tersine çevirdiğini düşünmekteyiz.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda STZ ile oluşturulan deneysel diyabetin hipokampus üzerindeki etkileri ve FX'in bu bağlamdaki rolü kapsamlı bir araştırma sonucunda ortaya koyulmuştur. Bu bulgular ışığında;

STZ ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde hipokampusta hacim kaybı meydana geldiği stereolojik analizler sonucunda görülmüştür.

Sıçan hipokampusunda krezil violet ile boyanan kesitlerde diyabetin nöron yapısında ve nöronların diziliminde bozunmalara sebebiyet verdiği histopatolojik olarak ortaya koyulurken, immünohistokimyasal değerlendirmelerle gözlenen apoptotik hücre yoğunluğu bu bulguları desteklemiştir. Buna ek olarak yapılan moleküler analizlerde diyabet aracılı apoptoz miktarının arttığı izlenmiştir.

Değerlendirilen histolojik ve moleküler bulgulara ek olarak diyabetin bilişsel hafıza fonksiyonlarına etkisi de incelenmiştir. Barnes Maze davranış testi sonucuna göre diyabetin hafızada bozukluğa neden olduğu kanısına varılmıştır.

FX kullanımının diyabette görülen yüksek kan-glukoz değerlerini düşürdüğü, oksidatif stresi azalttığı, bozulan bilişsel hafızayı iyileştirdiği, apoptozu azalttığı ve nöroprotektif etki gösterdiği görülmüştür.

Yapılan bu çalışmanın sonucunda; antioksidan madde olan FX'in kullanımının diyabette meydana gelen ikincil komplikasyonların hafifletilmesini sağlayabildiği açıkça gösterilmiştir. Çalışmamızda FX kullanımının faydalı etkileri görülse de kısıtlamalar da bulunmaktadır. İleriki çalışmalarda FX uygulamasının farklı dozlarda verilmesi ile en etkin dozun belirlenmesi sağlanabilir. Buna ek olarak moleküler analizler sonucunda FX'in tek başına uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hipokampusta meydana getirdiği apoptoz miktarındaki artışın altında yatan mekanizmalara dair literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır ve bu konunun araştırılmaya değer olduğu kanısındayız. Bu bağlamda; farklı

hayvanlar, farklı laboratuvarlar, farklı süreler, farklı dozlar ve farklı yöntemleri içeren daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abdul-Rahman, O., Sasvari-Szekely, M., Ver, A., Rosta, K., Szasz, B. K., Kereszturi, E., & Keszler, G. (2012). Altered gene expression profiles in the hippocampus and prefrontal cortex of type 2 diabetic rats. *BMC Genomics*, *13*, 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-81>
- Affourtit, C., & Brand, M. D. (2008). On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1777*(7-8), 973-979. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.022>
- Akşit, H., & Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *19*(1), 55-63.
- Alfheaid, H. A., Alhowail, A. A., Ahmed, F., Zaki, A. K. A., & Alkhaldy, A. (2023). Effect of various intermittent fasting protocols on hyperglycemia-induced cognitive dysfunction in rats. *Brain Sciences*, *13*(2), 165. <https://doi.org/10.3390/brainsci13020165>
- Al-Kuraisy, H. M., Sami, O. M., Hussain, N. R., & Al-Gareeb, A. I. (2020). Metformin and/or vildagliptin mitigate type II diabetes mellitus induced-oxidative stress: The intriguing effect. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, *11*(3), 142-147. [https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR\\_18\\_20](https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_18_20)
- American Diabetes Association. (2006). Standards of medical care in diabetes—2006. *Diabetes Care*, *29*, s4-s42. <https://doi.org/10.2337/diacare.29.s1.06.s4>
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2023). 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care*, *47*, S20-S42. <https://doi.org/10.2337/dc24-S002>
- Anand, P., Kaur, A., & Singh, S. (2024). Fucoxanthin mitigates valproic acid-induced autistic behavior through modulation of the AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, *967*, 176335. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176335>
- Arushanyan, É. B., & Beier, É. V. (2008). The hippocampus and cognitive impairments. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, *38*(8), 751-758. <https://doi.org/10.1007/s11055-008-9043-0>
- Aslanbay, B., & İmamoğlu, E. (2021). Doğal ürün fukoksantin trendleri. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *38*(1), 117-124. <https://doi.org/10.12714/egejfas.38.1.15>
- Bae, M., Kim, M.-B., Park, Y.-K., & Lee, J.-Y. (2020). Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1865*(11), 158618. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158618>
- Bilim, P. (2018). *Maternal uygulanan valproik asit ve triphenyl fosfitin yavru sıçanların ergenlik dönemlerindeki davranışsal ve hipokampal değişikliklere etkisi* [Yüksek Lisans Tezi, Ege üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. <https://gcris.ege.edu.tr/handle/11454/59934>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bonds, J. A., Shetti, A., Stephen, T. K. L., Bonini, M. G., Minshall, R. D., & Lazarov, O. (2020). Deficits in hippocampal neurogenesis in obesity-dependent and -independent type-2 diabetes mellitus mouse models. *Scientific Reports*, *10*(1), 16368. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73401-9>

- Brady, H. J. M., & Gil-Gómez, G. (1998). Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(6), 647-650. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00006-5)
- Burwell, R. D., & Agster, K. L. (2008). *Anatomy of the hippocampus and the declarative memory system*. 47-66. <https://doi.org/10.1016/B978-012370509-9.00117-0>
- Callisaya, M. L., Beare, R., Moran, C., Phan, T., Wang, W., & Srikanth, V. K. (2019). Type 2 diabetes mellitus, brain atrophy and cognitive decline in older people: A longitudinal study. *Diabetologia*, 62(3), 448-458. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4778-9>
- Canan, S., Şahin B., Odacı E., Ünal B., Aslan H., Bilgiç S., Kaplan S. (2002). Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: Cavalieri Prensipli. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2002;22(1 Suppl 1) 7-14
- Chen, Y., Lu, H., Ding, Y., Liu, S., Ding, Y., Lu, B., Xiao, J., & Zhou, X. (2023). Dietary protective potential of fucoxanthin as an active food component on neurological disorders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(8), 3599-3619. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08249>
- Cheng, G., Huang, C., Deng, H., & Wang, H. (2012). Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: A meta-analysis of longitudinal studies. *Internal Medicine Journal*, 42(5), 484-491. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2012.02758.x>
- Cherubini, E., & Miles, R. (2015). The CA3 region of the hippocampus: How is it? What is it for? How does it do it? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00019>
- Chuah, Y. K., Basir, R., Talib, H., Tie, T. H., & Nordin, N. (2013). Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *International Journal of Inflammation*, 2013, 403460. <https://doi.org/10.1155/2013/403460>
- Cruz-Orive, L. M. (1997). Stereology of single objects. *Journal of Microscopy*, 186(2), 93-107. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1997.1380695.x>
- Çobanoğlu, S. (2011). *Deneysel ateroskleroz oluşturulmuş sıçanlarda L-Argininin, TAS, TOS ve oksidatif stres indeksine etkisi* [Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. <http://dspace.trakya.edu.tr/xmlui/handle/trakya/1391>
- Dagsuyu, E., Koroglu, P., Gul, I. B., Bulan, O. K., & Yanardag, R. (2023). Oxidative brain and cerebellum injury in diabetes and prostate cancer model: Protective effect of metformin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37(10), e23440. <https://doi.org/10.1002/jbt.23440>
- D'Arceuil, H., Rhine, W., de Crespigny, A., Yenari, M., Tait, J. F., Strauss, W. H., Engelhorn, T., Kastrup, A., Moseley, M., & Blankenberg, F. G. (2000). Annexin V imaging of neonatal hypoxic brain injury. *Stroke*, 31(11), 2692-2700. <https://doi.org/10.1161/01.STR.31.11.2692>
- Dhami, M., Raj, K., & Singh, S. (2021). Neuroprotective Effect of Fucoxanthin against Intracerebroventricular Streptozotocin (ICV-STZ) Induced Cognitive Impairment in Experimental Rats. *Current Alzheimer Research*, 18(8), 623-637. <https://doi.org/10.2174/1567205018666211118144602>
- Diabetes*. (2021). International Diabetes Federation. <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html> Erişim tarihi: Şubat 2024
- Duvernoy, H. M. (2005). *The Human Hippocampus: Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI*. 3rd edition. *AJNR: American Journal of Neuroradiology*, 26(10), 2702.

- El-Sayed, N. S., Elatrebi, S., Said, R., Ibrahim, H. F., & Omar, E. M. (2022). Potential mechanisms underlying the association between type II diabetes mellitus and cognitive dysfunction in rats: A link between miRNA-21 and Resveratrol's neuroprotective action. *Metabolic Brain Disease*, 37(7), 2375-2388. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01035-z>
- Erdoğan, E. (2013). *Hipokampüsün yapı, işlevler ve bağlantıları*. hipokampüsün yapı, işlevler ve bağlantıları. <https://www.beyincerrahisi.org/TR,1193/hipokampusun-yapi-islevler-ve-baglantilari.html> Erişim tarihi: Eylül 2024
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103-1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
- Eskandari, E., & Eaves, C. J. (2022). Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *The Journal of Cell Biology*, 221(6), e202201159. <https://doi.org/10.1083/jcb.202201159>
- Feng, J., Zheng, Y., Guo, M., Ares, I., Martínez, M., Lopez-Torres, B., Martínez-Larrañaga, M.-R., Wang, X., Anadón, A., & Martínez, M.-A. (2023). Oxidative stress, the blood-brain barrier and neurodegenerative diseases: The critical beneficial role of dietary antioxidants. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(10), 3988-4024. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.07.010>
- Geijselaers, S. L. C., Sep, S. J. S., Stehouwer, C. D. A., & Biessels, G. J. (2015). Glucose regulation, cognition, and brain MRI in type 2 diabetes: A systematic review. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 3(1), 75-89. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70148-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70148-2)
- Genç, N. (2018). *Güneydoğu Karadeniz'de pigmente dayalı fitoplankton boy gruplarının fotik bölge dinamiği* [Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Su Ürünleri Anabilim Dalı]. <http://acikerisim.erdogan.edu.tr/xmlui/handle/11436/161>
- Gundersen, H. J., & Jensen, E. B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, 147(Pt 3), 229-263. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x>
- Güner, M. A. (2018). Diyabet hastalarında hipokampus hacimlerinin araştırılması. [Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi / Tıp Fakültesi]. <https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12575/88182>
- Harrison, F. E., Reiserer, R. S., Tomarken, A. J., & McDonald, M. P. (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & Memory*, 13(6), 809-819. <https://doi.org/10.1101/lm.334306>
- He, X., Sun, J., & Huang, X. (2017). Expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 in hippocampus of rats with diabetes and subarachnoid hemorrhage. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(1), 873-877. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5438>
- Hu, L., Chen, W., Tian, F., Yuan, C., Wang, H., & Yue, H. (2018). Neuroprotective role of fucoxanthin against cerebral ischemic/reperfusion injury through activation of Nrf2/HO-1 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1484-1489. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.088>
- Humphrey, T. (1967). The development of the human hippocampal fissure. *Journal of Anatomy*, 101(Pt 4), 655-676.
- IDF *Diabetes Atlas 9th edition*. (2019). International Diabetes Federation. <https://diabetesatlas.org/atlas/ninth-edition/> Erişim tarihi: Haziran 2024
- Ikeda, K., Kitamura, A., Machida, H., Watanabe, M., Negishi, H., Hiraoka, J., & Nakano, T. (2003). Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development of cerebrovascular diseases in

- stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30(1-2), 44-48. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03786.x>
- İkinci Keleş, A. (2019). Sağlık alanında kullanılan kantitatif yöntem, *Stereoloji. Dicle Tıp Dergisi*, 46(3), 615-621. <https://doi.org/10.5798/dicletip.536434>
- İzci, Y., & Erbaş, Y. C. (2015). Hipokampus: Yapısı ve fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg*, 25(3), 287-295. [https://norosirurji.dergisi.org/pdf/pdf\\_TND\\_1095.pdf](https://norosirurji.dergisi.org/pdf/pdf_TND_1095.pdf)
- Jafari Anarkooli, I., Sankian, M., Ahmadpour, S., Varasteh, A. R., & Hagher, H. (2008). Evaluation of Bcl-2 family gene expression and caspase-3 activity in hippocampus STZ-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes Research*, 2008(638467), 1-6. <https://doi.org/10.1155/2008/638467>
- Janion, K., Strzelczyk, J. K., Walkiewicz, K. W., Biernacki, K., Copija, A., Szczepańska, E., & Nowakowska-Zajdel, E. (2022). Evaluation of malondialdehyde level, total oxidant/antioxidant status and oxidative stress index in colorectal cancer patients. *Metabolites*, 12(11), 1118. <https://doi.org/10.3390/metabo12111118>
- Jezek, P. (2002). Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins—UCPn. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(10), 1190-1206. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00061-4](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00061-4)
- Kamal, A., Biessels, G.-J., Urban, I. J. A., & Gispen, W. H. (1999). Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: Impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. *Neuroscience*, 90(3), 737-745. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00485-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00485-0)
- Kerr, J. F. R. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182, 471-474. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00457-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00457-2)
- Kerti, L., Witte, A. V., Winkler, A., Grittner, U., Rujescu, D., & Flöel, A. (2013). Higher glucose levels associated with lower memory and reduced hippocampal microstructure. *Neurology*, 81(20), 1746-1752. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000435561.00234.ee>
- Koç Okudur, S. (2013). *Ratlarda Hipokampus ve Subventriküler Zonda Hücresel Senesens Üzerine Kurkuminin Etkisi* [Tıpta Uzmanlık, Dokuz Eylül Üniversitesi]. [https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/579185/yokAcikBilim\\_10018965.pdf?sequence=-1&isAllowed=y](https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/579185/yokAcikBilim_10018965.pdf?sequence=-1&isAllowed=y)
- Lagali, P., Corcoran, C., & Picketts, D. (2010). Hippocampus development and function: Role of epigenetic factors and implications for cognitive disease. *Clinical Genetics*, 78(4), 321-333. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01503.x>
- Li, C., Che, L.-H., Ji, T.-F., Shi, L., & Yu, J.-L. (2017). Effects of the TLR4 signaling pathway on apoptosis of neuronal cells in diabetes mellitus complicated with cerebral infarction in a rat model. *Scientific Reports*, 7(1), 43834. <https://doi.org/10.1038/srep43834>
- Li, N., Gao, X., Zheng, L., Huang, Q., Zeng, F., Chen, H., Farag, M. A., & Zhao, C. (2022). Advances in fucoxanthin chemistry and management of neurodegenerative diseases. *Phytomedicine*, 105, 154352. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154352>
- Liang, Y., Yan, C., & Schor, N. F. (2001). Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene*, 20(45), 6570-6578. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204815>
- Lin, J., Huang, L., Yu, J., Xiang, S., Wang, J., Zhang, J., Yan, X., Cui, W., He, S., & Wang, Q. (2016). Fucoxanthin, a Marine Carotenoid, Reverses Scopolamine-Induced Cognitive Impairments in Mice and Inhibits Acetylcholinesterase in Vitro. *Marine Drugs*, 14(4), 67. <https://doi.org/10.3390/md14040067>

- Lin, J., Yu, J., Zhao, J., Zhang, K., Zheng, J., Wang, J., Huang, C., Zhang, J., Yan, X., Gerwick, W. H., Wang, Q., Cui, W., & He, S. (2017). Fucoxanthin, a marine carotenoid, attenuates  $\beta$ -amyloid oligomer-induced neurotoxicity possibly via regulating the PI3K/Akt and the ERK pathways in SH-SY5Y cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 6792543. <https://doi.org/10.1155/2017/6792543>
- Liu, D., Zhou, Y., Liang, E., Li, W., Lin, W., Chen, F., & Gao, W. (2013). Neuroprotective effects of the Chinese Yi-Qi-Bu-Shen recipe extract on injury of rat hippocampal neurons induced by hypoxia/reoxygenation. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.046>
- Liu, J., Lu, Y., Tang, M., Shao, F., Yang, D., Chen, S., Xu, Z., Zhai, L., Chen, J., Li, Q., Wu, W., & Chen, H. (2022). Fucoxanthin prevents long-term administration l-DOPA-induced neurotoxicity through the ERK/JNK-c-Jun system in 6-OHDA-lesioned mice and PC12 cells. *Marine Drugs*, 20(4), 245. <https://doi.org/10.3390/md20040245>
- Maeda, H. (2013). 13 Anti-obesity and anti-diabetic activities of algae. İçinde H. Domínguez (Ed.), *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (453-472). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.2.453>
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Murakami-Funayama, K., & Miyashita, K. (2009). Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Molecular Medicine Reports*, 2(6), 897-902. [https://doi.org/10.3892/mmr\\_00000189](https://doi.org/10.3892/mmr_00000189)
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 75, 469-486. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000400006>
- Maqueshudul Haque Bhuiyan, M., Mohibbullah, Md., Hannan, Md. A., Hong, Y.-K., Choi, J.-S., Choi, I. S., & Moon, I. S. (2015). Undaria pinnatifida promotes spinogenesis and synaptogenesis and potentiates functional presynaptic plasticity in hippocampal neurons. *The American Journal of Chinese Medicine*, 43(03), 529-542. <https://doi.org/10.1142/S0192415X15500330>
- Martínez-Tellez, R., Gómez-Villalobos, M. de J., & Flores, G. (2005). Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Research*, 1048(1-2), 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.048>
- Mattiasson, G., Shamloo, M., Gido, G., Mathi, K., Tomasevic, G., Yi, S., Warden, C. H., Castilho, R. F., Melcher, T., Gonzalez-Zulueta, M., Nikolich, K., & Wieloch, T. (2003). Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nature Medicine*, 9(8), 1062-1068. <https://doi.org/10.1038/nm903>
- Meng, Y., Wang, W., Kang, J., Wang, X., & Sun, L. (2017). Role of the PI3K/AKT signalling pathway in apoptotic cell death in the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(5), 2417-2422. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4259>
- Mongirdienė, A., Skrodenis, L., Varoneckaitė, L., Mierkytė, G., & Gerulis, J. (2022). Reactive oxygen species induced pathways in heart failure pathogenesis and potential therapeutic strategies. *Biomedicines*, 10(3), 602. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030602>
- Nicolle, M. M., Gonzalez, J., Sugaya, K., Baskerville, K. A., Bryan, D., Lund, K., Gallagher, M., & McKinney, M. (2001). Signatures of hippocampal oxidative stress in aged spatial learning-impaired rodents. *Neuroscience*, 107(3), 415-431. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00374-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00374-8)

- Nna, V. U., Bakar, A. B. A., Ahmad, A., & Mohamed, M. (2020). Diabetes-induced testicular oxidative stress, inflammation, and caspase-dependent apoptosis: The protective role of metformin. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 126(5), 377-388. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1543329>
- Okur, Z. H., & Sağır, D. (2021). Effects of cellular phone electromagnetic field exposure on the hippocampi of rats in childhood and adolescence. *Neurological Sciences and Neurophysiology*, 38(2), 135. [https://doi.org/10.4103/nsn.nsn\\_206\\_20](https://doi.org/10.4103/nsn.nsn_206_20)
- Oliyaie, N., Moosavi-Nasab, M., Tamaddon, A. M., & Tanideh, N. (2021). Antidiabetic effect of fucoxanthin extracted from *Sargassum angustifolium* on streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic mice. *Food Science & Nutrition*, 9(7), 3521-3529. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2301>
- Olufunmilayo, E. O., Gerke-Duncan, M. B., & Holsinger, R. M. D. (2023). Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants*, 12(2), 517. <https://doi.org/10.3390/antiox12020517>
- Ortiz, G. G., Huerta, M., González-Usigli, H. A., Torres-Sánchez, E. D., Delgado-Lara, D. L., Pacheco-Moisés, F. P., Mireles-Ramírez, M. A., Torres-Mendoza, B. M., Moreno-Cih, R. I., & Velázquez-Brizuela, I. E. (2022). Cognitive disorder and dementia in type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 13(4), 319-337. <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i4.319>
- Park, H.-A., Hayden, M. M., Bannerman, S., Jansen, J., & Crowe-White, K. M. (2020). Anti-apoptotic effects of carotenoids in neurodegeneration. *Molecules*, 25(15), 3453. <https://doi.org/10.3390/molecules25153453>
- Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 6(2), 99-104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>
- Pradip Chauhan, M., Kinjal Jethwa, M., Ashish Rathawa, M., Girish Chauhan, B. D. S., & Simmi Mehra, M. (2021). The Anatomy of the Hippocampus. In R. Pluta (Ed.), *Cerebral Ischemia. Exon Publications*, 17-30. <https://doi.org/10.36255/exonpublications.cerebralischemia.2021.hippocampus>
- Raisman, G., Cowan, W. M., & Powell, T. P. S. (1965). The extrinsic afferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain*, 88(5), 963-996. <https://doi.org/10.1093/brain/88.5.963>
- Roelink, H. (2000). Hippocampus formation: An intriguing collaboration. *Current Biology: CB*, 10(7), 279-281. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00407-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00407-3)
- Roufayel, R. (2017). Regulation of stressed-induced cell death by the Bcl-2 family of apoptotic proteins. *Molecular Membrane Biology*, 33(6-8), 89-99. <https://doi.org/10.1080/09687688.2017.1400600>
- Rubio, F. J., Ampuero, E., Sandoval, R., Toledo, J., Pancetti, F., & Wyneken, U. (2013). Long-term fluoxetine treatment induces input-specific LTP and LTD impairment and structural plasticity in the CA1 hippocampal subfield. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 66. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00066>
- Sadeghi, A., Hami, J., Razavi, S., Esfandiary, E., & Hejazi, Z. (2016). The Effect of Diabetes Mellitus on Apoptosis in Hippocampus: Cellular and Molecular Aspects. *International Journal of Preventive Medicine*, 7, 57. <https://doi.org/10.4103/2008-7802.178531>


- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., Williams, R., & IDF Diabetes Atlas Committee. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *157*, 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
- Sastre, A. A., Vernooij, R. W., Harmand, M. G.-C., & Martínez, G. (2017). Effect of the treatment of Type 2 diabetes mellitus on the development of cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2017*(6), Art. No.: CD003804. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003804.pub2>
- Sima, A. A. F., & Li, Z. (2005). The effect of c-peptide on cognitive dysfunction and hippocampal apoptosis in type 1 diabetic rats. *Diabetes*, *54*(5), 1497-1505. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1497>
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, *18*(1), 1-14. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1>
- Skulachev, V. P. (1998). Cytochrome *c* in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Letters*, *423*(3), 275-280. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00061-1)
- Sohma, H., Imai, S., Takei, N., Honda, H., Matsumoto, K., Utsumi, K., Matsuki, K., Hashimoto, E., Saito, T., & Kokai, Y. (2013). Evaluation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and dementia with lewy bodies. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *5*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00015>
- Songur, A., Özen, O. A., & Sarsılmaz, M. (2001). Hipokampus. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri*, *21*, 427-431.
- Souza, B. M. de, Assmann, T. S., Kliemann, L. M., Gross, J. L., Canani, L. H., & Crispim, D. (2011). The role of uncoupling protein 2 (UCP2) on the development of type 2 diabetes mellitus and its chronic complications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, *55*, 239-248. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302011000400001>
- Sugimoto, K., Nishizawa, Y., Horiuchi, S., & Yagihashi, S. (1997). Localization in human diabetic peripheral nerve of N $\epsilon$ -carboxymethyllysine-protein adducts, an advanced glycation endproduct. *Diabetologia*, *40*(12), 1380-1387. <https://doi.org/10.1007/s001250050839>
- Szabo, K., & Hennerici, M. G. (2014). *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (s. 161). <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-02568-2>
- Terasaki, M., Murase, W., Kamakura, Y., Kawakami, S., Kubota, A., Kojima, H., Ohta, T., Tanaka, T., Maeda, H., Miyashita, K., & Mutoh, M. (2022). A Biscuit Containing Fucoxanthin Prevents Colorectal Carcinogenesis in Mice. *Nutrition and Cancer*, *74*(10), 3651-3661. <https://doi.org/10.1080/01635581.2022.2086703>
- Tufekci, K. K., & Kaplan, S. (2023). Beneficial effects of curcumin in the diabetic rat ovary: A stereological and biochemical study. *Histochemistry and Cell Biology*, *159*(5), 401-430. <https://doi.org/10.1007/s00418-022-02171-4>
- Ungethüm, L., Kenis, H., Nicolaes, G. A., Autin, L., Stoilova-McPhie, S., & Reutelingsperger, C. P. M. (2011). Engineered Annexin A5 Variants Have Impaired Cell Entry for Molecular Imaging of Apoptosis Using Pretargeting Strategies. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(3), 1903-1910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.163527>

- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65-74. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>
- Uzar, E., Alp, H., Cevik, M. U., Firat, U., Evliyaoglu, O., Tufek, A., & Altun, Y. (2012). Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurological Sciences*, 33(3), 567-574. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0775-1>
- Ün, İ., & Büyüksulu, N. (2018). Maternal monosodium glutamate intake influences the learning ability of the offspring of sprague dawley rats. *ACTA Pharmaceutica Scientia*, 56(4), 107. <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05628>
- Ünver Saraydin, S., Özdenoglu Kutlu, B., & Saraydin, D. (2021). Effects of diabetes on apoptosis and mitosis in rat hippocampus. *Biotechnic & Histochemistry*, 96(6), 460-467. <https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1818827>
- West, M. J. (2012). Introduction to Stereology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(8), 843-851. <https://doi.org/10.1101/pdb.top070623>
- Woo, M.-N., Jeon, S.-M., Shin, Y. C., Lee, M.-K., Kang, M. A., & Choi, M.-S. (2009). Anti-obese property of fucoxanthin is partly mediated by altering lipid-regulating enzymes and uncoupling proteins of visceral adipose tissue in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(12), 1603-1611. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900079>
- Wu, R., Feng, J., Yang, Y., Dai, C., Lu, A., Li, J., Liao, Y., Xiang, M., Huang, Q., Wang, D., & Du, X.-B. (2017). Significance of Serum Total Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Colorectal Cancer. *PLOS ONE*, 12(1), e0170003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170003>
- Xiang, S., Liu, F., Lin, J., Chen, H., Huang, C., Chen, L., Zhou, Y., Ye, L., Zhang, K., Jin, J., Zhen, J., Wang, C., He, S., Wang, Q., Cui, W., & Zhang, J. (2017). Fucoxanthin Inhibits  $\beta$ -Amyloid Assembly and Attenuates  $\beta$ -Amyloid Oligomer-Induced Cognitive Impairments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(20), 4092-4102. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00805>
- Yang, M., Xuan, Z., Wang, Q., Yan, S., Zhou, D., Naman, C. B., Zhang, J., He, S., Yan, X., & Cui, W. (2022). Fucoxanthin has potential for therapeutic efficacy in neurodegenerative disorders by acting on multiple targets. *Nutritional Neuroscience*, 25(10), 2167-2180. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2021.1926140>
- Yonguc, G. N., Dodurga, Y., Adiguzel, E., Gundogdu, G., Kucukatay, V., Ozbal, S., Yilmaz, I., Cankurt, U., Yilmaz, Y., & Akdogan, I. (2015). Grape seed extract has superior beneficial effects than vitamin E on oxidative stress and apoptosis in the hippocampus of streptozotocin induced diabetic rats. *Gene*, 555(2), 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.052>
- You, Y., Liu, Z., Chen, Y., Xu, Y., Qin, J., Guo, S., Huang, J., & Tao, J. (2021). The prevalence of mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus patients: A systematic review and meta-analysis. *Acta Diabetologica*, 58(6), 671-685. <https://doi.org/10.1007/s00592-020-01648-9>
- Zhang, L., Hu, Z., Bai, W., Peng, Y., Lin, Y., & Cong, Z. (2023). Fucoxanthin ameliorates traumatic brain injury by suppressing the blood-brain barrier disruption. *iScience*, 26(11), 108270. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108270>

- Zhang, L., Wang, H., Fan, Y., Gao, Y., Li, X., Hu, Z., Ding, K., Wang, Y., & Wang, X. (2017). Fucoxanthin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE and Nrf2-autophagy pathways. *Scientific Reports*, 7(1), 46763. <https://doi.org/10.1038/srep46763>
- Zhang, X., Dong, J., Yin, H., Chen, L., He, Y., Qin, Q., Zhou, Y., Fan, M., & Wang, D. (2024). Exploiting fucoxanthin mono-carrier nanoparticles to modulate digestion and metabolic regulation in an obesity model. *Food Bioscience*, 57, 103466. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103466>
- Zhang, X.-S., Lu, Y., Tao, T., Wang, H., Liu, G.-J., Liu, X.-Z., Liu, C., Xia, D.-Y., Hang, C.-H., & Li, W. (2020). Fucoxanthin Mitigates Subarachnoid Hemorrhage-Induced Oxidative Damage via Sirtuin 1-Dependent Pathway. *Molecular Neurobiology*, 57(12), 5286-5298. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02095-x>
- Zhang, Y., Xu, W., Huang, X., Zhao, Y., Ren, Q., Hong, Z., Huang, M., & Xing, X. (2018). Fucoxanthin ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and insulin resistance in diabetic mice partially through IRS-1/PI3K/Akt and AMPK pathways. *Journal of Functional Foods*, 48, 515-524. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.048>
- Zhang, Y.-W., Zhang, J.-Q., Liu, C., Wei, P., Zhang, X., Yuan, Q.-Y., Yin, X.-T., Wei, L.-Q., Cui, J.-G., & Wang, J. (2015). Memory Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus Correlates with Reduced Hippocampal CA1 and Subiculum Volumes. *Chinese Medical Journal*, 128(4), 465. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.151082>
- Zhao, F., Li, J., Mo, L., Tan, M., Zhang, T., Tang, Y., & Zhao, Y. (2016). Changes in Neurons and Synapses in Hippocampus of Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Rats: A Stereological Investigation. *The Anatomical Record*, 299(9), 1174-1183. <https://doi.org/10.1002/ar.23344>

# EKLER

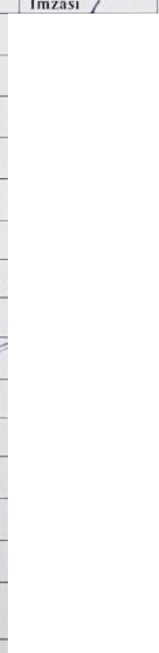
## EK 1: Etik Kurul İzin Belgesi

 T.C.  
**BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**  
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 16 26.5/2023  
Konu: Kararlar

BASVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda fukoksantin hipokampus üzerine etkinliğinin araştırılması.
	ARAŞTIRMANIN İNGİLİZCE ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Investigation of the effect of fucoxanthin on the hippocampus in rats with experimental diabetes induced by streptozotocin.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Dr.Öğr.Üyesi Ömür Gülsüm DENİZ
	DiĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Yük.Lis.Öğr.Sevdenur UZUN, Dr.Öğr.Üyesi Hayriye SOYTÜRK
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi.

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2023/13	Tarih (Date): 17.05.2023
	Dr.Öğr.Üyesi Ömür Gülsüm DENİZ'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın 40 adet sıçan ile gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcutun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmzası /
Prof.Dr. İdris TÜREL (Başkan)	Farmakoloji AD. Öğretim Üyesi	BAİBU Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Seyit Ali KAYIŞ (Başkan Yardımcısı)	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD Öğretim Üyesi	BAİBU Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cerrahi AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Uğur ÜYETÜRK (Üye)	Uroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Mustafa DİLEK (Üye)	Çocuk Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr. Ayhan ÇETİNKAYA (Üye)	Fizyoloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr. Özgür Mehmet YİS (Üye)	Biyokimya AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye SOYTÜRK (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Dr.Öğr. Üyesi Canan AKÜNAL TÜREL (Üye)	Nöroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr.Öğr.Üyesi Ömer Faruk BOYLU (Üye)	Ağız Diş ve Çene Cerrahisi AD Öğretim Üyesi	BAİBU Diş Hekimliği Fakültesi	
Veteriner Hekim Enes EĞİLMEZ (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	BAİBÜ Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Veteriner Hekim Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLU BEYPİLİÇ AŞ.	
Av.Cihan YAVUZ (TC.Üyesi)	Avukat	Aşağı Soku Mah. Şair Şinasi Sok. Ayşe Hanım Apt.24/6 BOLU	