

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

**DENEYSEL DİYABETİN SIÇAN BEYİN KORTEKSİNDE
MİTOJENLE AKTİVE OLAN PROTEİN KİNAZ / HÜCRE DIŞI
SİNYAL ARACILI KİNAZ YOLAĞI VE AROMATAZ ENZİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ecz. Mehtap CİNCİOĞLU

**Farmakoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. E. Pelin Kelicen**

**ANKARA
2009**

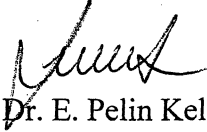
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmakoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

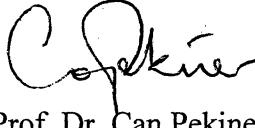
Jüri Başkanı: Prof. Dr. Yusuf Sarioğlu
Gazi Üniversitesi



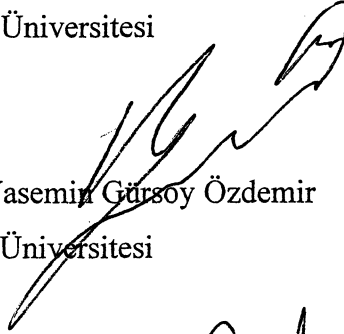
Danışman: Doç. Dr. E. Pelin Kelicen
Hacettepe Üniversitesi



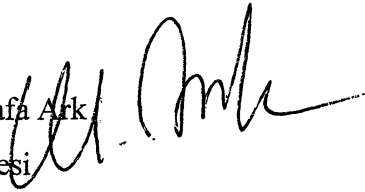
Üye: Prof. Dr. Can Pekiner
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Yasemin Gürsoy Özdemir
Hacettepe Üniversitesi

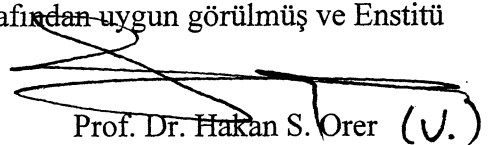


Üye: Doç. Dr. Mustafa Ark
Gazi Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer (V.)

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişilere içtenlikle teşekkür ederim.

Sayın Doç. Dr. E. Pelin Kelicen, tez danışmanım olarak yaptığım çalışmalarda yol gösterici katkılarda bulunmuş ve her zaman beni yüreklendirici olmuştur.

Sayın Uzm. Ecz. Nihan Burul-Bozkurt, laboratuvardaki tüm çalışmalarımda bana destek olmuştur.

Tez çalışmalarım süresince aile bireylerim ve arkadaşlarım sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla destek olmuşlardır.

ÖZET

Cincioğlu, M., Deneysel diyabetin sıçan beyin korteksinde mitojenle aktive olan protein kinaz/hücre dışı sinyal aracılı kinaz yolağı ve aromataz enzimi üzerine etkileri. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2009. Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde önemli olan gonadal steroid yapıdaki östrojenin üretimi için gerekli aromataz enzimi sentezinin beyinde hasardan sonra artması nöron koruyucu etkisine işaret etmektedir. Östrojenin nöron koruyucu etkileri altında yatan mekanizmalar ER α (östrojen reseptörü α)'lar veya ERX'lere bağlı olabilir. Başka bir ihtimal ise ERX'lerin IGF-I (insülin benzeri büyüme faktörü-I) gibi fosforilasyon yolaklarını değiştirmesidir. Gerçekten de ER ve IGF-IR (IGF-I reseptörü), MAP/ERK (mitojenle aktive olan protein/hücre dışı sinyal aracılı kinaz) sinyalleme yolaklarının aktivasyonunda ve nöron korumasında görev alırlar. Nöronların sağ kalımında, öğrenme ve hafızada önemli role sahip olan MAP/ERK hücre içi düzenleyici yolaklar CREBP (cAMP-cevap elementi bağlayan protein) de dahil pekçok transkripsiyon faktörünü aktive ederek gen ekspresyonunda etkilerini gösterirler. Aromataz ekspresyonu ayrıca CREBP'in CREaro (aromataz genine bağlanan cAMP-cevap elementi)'ya bağlanması üzerinden de *up-regüle* edilir. Yapılan çalışmada bu proteinlerin bu yolak ile muhtemel etkileşimini araştırmak için STZ (streptozotosin) ile oluşturulan diyabetin 4, 8 ve 12 haftalarında erkek *Sprague-Dawley* sıçanların beyin korteks ekstreleri aromataz ve p-ERK (fosforile ERK) *immünoblotting*'ine tabi tutulmuştur. Aromataz ve p-ERK ekspresyonunda kontrole göre 4 ve 8 haftalık diyabetik deneklerde anlamlı değişiklik gözlenmezken, 12 haftalık diyabetik deneklerde artış gözlenmiştir. İnsülin tedavisi 12 haftalık diyabetik tedavi gruplarındaki ekspresyon artışlarını önlemiştir. Hipergliseminin ve diyabetin diğer ikincil komplikasyonlarının aromataz ekspresyonunu ER'ler, IGF ve MAP/ERK/CREBP yolağı üzerinden arttırması muhtemeldir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer, CREBP (cAMP-cevap elementi bağlayan protein), MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz), östrojen, p-ERK (fosforile hücre dışı sinyal ilişkili kinaz).

ABSTRACT

Cincioglu, M., Effects of experimental diabetes on mitogen activated protein kinase/extracellular-signal related kinase and aromatase enzyme in rat cerebral cortex. Hacettepe University Institute of Health Sciences, M.Sc. Thesis in Pharmacology, Ankara, 2009. After injury in brain, increasing synthesis of aromatase enzyme which is involved in production of a gonadal steroid estrogen, the hormone important in the onset and progression of several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, indicates its neuroprotective effect. The mechanisms underlying the neuroprotective effects of estrogen may depend on ER α s (estrogen receptor α) or ERXs (estrogen receptor X). Yet another possibility is that ERXs alter phosphorylation cascades, such as IGF-I (insulin-like growth factor-I). Indeed, ERs and IGF-IR (IGF-I-receptor) interact in the activation of MAP/ERK (mitogen activated protein/extracellular-signal related kinase) signaling cascades and in the promotion of neuroprotection. The MAP/ERK intracellular regulatory cascade, which plays an important role in the survival of neurons, learning and memory, mediates its influence on gene expression by activating a number of transcription factors, including CREBP (cAMP-response element binding protein). Aromatase expression is also up-regulated through the binding of CREBP to CREaro. To investigate the possible interactions of these proteins with this pathway, cerebral cortex extracts of male Sprague-Dawley rats following 4, 8 and 12 weeks of STZ (streptozotocin) induced diabetes have been subjected to aromatase and p-ERK (phospho-ERK) immunoblotting. There was an increase compared with controls at 12 weeks diabetic rats in aromatase and p-ERK expression levels, whereas no significant difference has been observed at 4 and 8 weeks diabetic groups. Insulin treatment have prevented the increase in expressions at 12 weeks diabetic groups. It is likely that hyperglycemia and other seconder complications of DM induce aromatase expression via ERs, IGF and MAP/ERK/CREBP pathway.

Key Words: Alzheimer, CREBP (cAMP-response element binding protein), estrogen, MAPK (mitogen activated protein kinase), p-ERK (extracellular-signal related kinase).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Deneysel diyabet modelleri	2
2.1.1. Tip-I diyabet modelleri	2
2.1.2. Tip-II diyabet modelleri	2
2.1.3. Bozulmuş glukoz toleransı modelleri	3
2.2. STZ	3
2.2.1. STZ ile oluşturulan kimyasal diyabette biyokimyasal değişiklikler	3
2.3. Diyabet ve diyabete eşlik eden ikincil komplikasyonlar	4
2.4. Diyabetin MSS'ye etkileri ve diyabetik beyinde moleküler değişiklikler	4
2.5. RTK ve MAP/ERK sinyal yolağı	7
2.6. Beyinde MAP/ERK sinyal yolağının önemi	9
2.7. Diyabetik beyinde MAP/ERK sinyal yolağının önemi	11
2.8. Aromataz	12
2.8.1. Beyinde aromatazın önemi	12
2.8.2. Diyabetik beyinde aromatazın önemi	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Deneysel diyabet oluşturulması	15
3.2. İnsülin tedavisi uygulanması	15
3.3. Doku lizisi ve ekstre elde edilmesi	16
3.4. Ekstrelerden Western Blot yöntemiyle protein eldesi	16

3.5. Proteinlerin görünür hale getirilmesi	17
3.6. Sıyırma yöntemi (<i>Stripping</i>)	18
3.7. Kullanılan kimyasallar	18
3.8. Kullanılan cihazlar	18
3.9. Kullanılan çözeltiler	19
3.10. İstatiksel analiz ve bulguların sunumu	21
4. BULGULAR	22
4.1. Diyabetin ve insülin tedavisinin kan glukoz seviyesi ve vücut ağırlığına etkisi	22
4.2. Diyabetin aromataz enzimi üzerine etkileri	23
4.3. İnsülin tedavisinin aromataz enzimi üzerine etkileri	24
4.4. Diyabetin p-ERK enzimi üzerine etkileri	25
4.5. İnsülin tedavisinin p-ERK enzimi üzerine etkileri	26
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

AH	Alzheimer Hastalığı
APP	Amiloid Prekürsör Peptit
bkz.	Bakınız
BSA	Bovine Serum Albumin, Sığır Serum Albumini
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate, siklik Adenozin Monofosfat
CRE	cAMP-Response Element, cAMP-Cevap Elementi
CREBP	cAMP-Response Element Binding Protein, cAMP-Cevap Elementi Bağlayan Protein
diğ.	Diğerleri
DM	Diabetes Mellitus
ERE	Estrogen Receptor Element, Östrojen Reseptör Elementi
ERK	Extracellular-Signal Related Kinase, Hücre dışı Sinyal Aracılı Kinaz
ERX	Estrogen Receptor X, Östrojen reseptörü X
ER α	Estrogen Receptor α , Östrojen reseptörü α
HRP-GAM	Horseradish peroxidase-conjugated Goat-Anti Mouse
HRP-GAR	Horseradish peroxidase-conjugated Goat-Anti Rabbit
GLUT	Insulin-induced Glucose Transporter, İnsüline duyarlı Glukoz Taşıyıcı
ICER	Inducible cAMP Early Repressor, CREBP düzenleyicisinin uyarılabilir baskılayıcı izoformu
IGF-I	Insulin-like Growth Factor, İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü
IGF-IR	Insulin-like Growth Factor I Receptor, İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü I Reseptörü
JNK	c-jun N-terminal kinase, c-jun N-terminal kinaz
KBE	Kan Beyin Engeli
mA	miliAmper
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase, Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz
mRNA	mesajcı Ribonükleik Asit
MSS	Merkezi Sinir Sistemi

p-ERK	phosphorylated-Extracellular-Signal Related Kinase, fosforillenmiş-Hücre dışı Sinyal Aracılı Kinaz
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase, Fosfoinositol 3-kinaz
PVDF	Polivinilidenfluorid
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Receptor Tyrosine Kinase, Reseptör Tirozin Kinaz
SAPK	Stress-activated protein kinase, Stresle Aktive olan Protein Kinaz
STZ	Streptozotosin
STZ-D	Streptozotosin kullanılarak oluşturulan diyabetik
TBS-T	Tris-buffered Saline with Tween-20, Tris Tampon Çözeltisi ve Tween-20
V	Volt
vb.	ve benzeri

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Sinir hücresinde genel sinyal yolağı.	8
2.2. Sinir hücresinde MAPK sinyal yolağı.	9
2.3. Sinir hücresinde MAP/ERK/CREBP sinyal yolağı aktivasyonu ile antiapoptotik gen transkripsiyonu.	11
2.4. Diyabetik beyin sinir hücresinde MAP/ERK/CREBP sinyal yolağı aktivasyonu ile gen transkripsiyonu.	12
4.1. Diyabetik beyinde aromataz ekspresyonunun zamana göre değişimi.	23
4.2. Diyabetik beyinde insülin tedavisi sonrası aromataz ekspresyonundaki değişiklikler.	24
4.3. Diyabetik beyinde p-ERK ekspresyonunun zamana göre değişimi.	25
4.4. Diyabetik beyinde insülin tedavisi sonrası aromataz ekspresyonundaki değişiklikler.	26
5.1. Diyabetik beyin sinir hücresinde aromataz ile MAP/ERK/CREBP sinyal yolaklarının olası etkileşimi.	33

TABLÖLAR

	Sayfa
3.1. İlgili proteinler için kullanılan antikorlar, blok ve antikor çözetileri.	17
4.1. Deneklerin kan glukozu ve vücut ağırlık ölçümleri.	22

1. GİRİŞ

Diyabet, pankreastan insülin salıverilmesindeki yetersizliğe veya dokunun insüline yanıt verebilirliğindeki bozulmaya bağlı gelişen hiperglisemiyle tanımlanan metabolik bir hastalıktır. Diyabetin insüline bağımlı Tip I ve insülininden bağımsız Tip II olarak iki tipi tanımlanmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda diyabetin her iki tipinin de MSS (merkezi sinir sistemi)'de komplikasyonlara sebep olduğu bildirilmiştir (1). Bu komplikasyonların belirlenmesi için yapılan çalışmaların yapısal ve histopatolojik değişiklikleri göstermekten öteye geçmemesi ve moleküler düzeyde yapılan araştırmaların yetersizliği bu tez çalışmasının çıkış noktasını oluşturmaktadır.

Diyabette dolaşımdaki insülin seviyesinin azalmasının, insülinin uyardığı gonadal aromatzasyonun azalmasına ve dolayısıyla dolaşımda östrojen miktarının düşmesine neden olabileceği ileri sürülmüştür (2). Diyabet ile bu gibi endokrin fonksiyonları ilişkilendiren çalışmaların büyük bir bölümü periferde obezite ve kardiyovasküler etkilerle, MSS'de ise hipokampus üzerindeki algısal işlev bozuklukları ile sınırlı kalmaktadır (3,4). DM (Diabetes Mellitus)'nin aromataz enzimi üzerine olan etkilerinin araştırılması ise birkaç çalışmadan öteye gitmemiştir. Yapılan çalışmalarda diyabetik beyinde GLUT (insüline duyarlı glukoz taşıyıcı)'lardaki değişikliğin, IGF-IR ekspresyonundaki, tau fosforilasyonu ve ROT (reaktif oksijen türleri) seviyesindeki artışın ve hücre içi β -amiloid protein birikiminin MAP/ERK/CREBP (mitojenle aktive olan protein/hücre dışı sinyal aracılı protein kinaz/cAMP-cevap elementi bağlayan protein) etkileşimini potansiyalize ettiği bildirilmektedir (5).

Bu çalışmada diyabetik beyinde yukarıda sayılan değişikliklerin aromataz enzimi üzerine olası etkileri ve MAP/ERK/CREBP yolağı ile etkileşimi irdelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deneysel diyabet modelleri

Hayvanlar üzerinde uygulanan deneysel diyabet modelleri, diyabete eşlik eden komplikasyonların anlaşılabilmesi için gerekli bilgilerin elde edilebildiği yardımcı modellerdir.

2.1.1. Tip-I diyabet modelleri

Kimyasal modeller

STZ, alloksan, çinko şelatları (ditizon, 8-hidroksikinolin), *Rodentisid-Vacor*, diyet nitrozaminleri vb.

Spontan modeller

Bio-Breeding sıçan, *Komodo Diabetes Prone* sıçan, obez olmayan diyabetik fare, *Macaca nigra* maymunu, *Keeshand* köpeği, Çin hamsteri, kobay (*Guinea pig*), Yeni Zelanda beyaz tavşanı.

Virüsle oluşturulan modeller

Transgenik modeller

2.1.2. Tip-II diyabet modelleri

Spontan modeller

Ağır hiperglisemili modeller: db/db fare, *Rhesus* maymunu (*Macaca mulatta*), çöl kemirgenleri, kum sıçanı, *spiny* fare, *Otsuka Long- Evans Tokushima* şişman sıçanları ve Çin hamsteri (*Cricetulus griseus*).

Orta derecede hiperglisemili modeller: obez fare (Ob/Ob).

İlımlı hiperglisemili modeller: *Cohen* diyabetik faresi, *Goto-kakizaki* sıçan, *Wistar WBN/Kob* (erkek) sıçanlar.

Deneysel modeller

Kimyasal modeller (STZ, alloksan), cerrahi modeller (pankreatektomi, hipotalamik lezyon), diyet (yüksek yağlı ve şekerli diyetle beslenme), erken

malnütrisyon, hormonlar, anne karnında malnutrisyon, insülin karşıtı hormonların yüksek dozları, hiperinsülinemiye uzun süreli maruziyet vb.

Transgenik modeller

2.1.3. Bozulmuş glukoz toleransı modelleri

Şişman *Zucker* fa/fa fare ve *Bureau of Home Economics* sıçan (6).

2.2. STZ

Diyabeti taklit eden çok sayıda deneysel hayvan modelinin içinde en yaygın kullanılanı alloksan ya da STZ enjeksiyonudur. STZ, 2-deoksi-2-(3-metil-3-nitrozoüreido)-D-glukopiranoz'dur. *Streptomyces griseus*'un metaboliti olan STZ'nin antibiyotik, antitümöral ve karsinojenik etkileri vardır (7-9). STZ yapısında bir glukoz molekülü içerdiği için plazma membranındaki glukoz reseptörlerine bağlanarak pankreas adacıklarındaki β hücrelerini hasarlar. Oluşan nitrozüre tablosu, serbest radikal üretimine bağlı DNA kırılmalarına neden olur (10-12).

2.2.1. STZ ile oluşturulan kimyasal diyabette biyokimyasal değişiklikler

STZ uygulaması sonrası kan glukozunda üç aşamalı bir yanıt oluşmaktadır.

Geçici hiperglisemi fazı: İlk 2 saat içinde oluşur; karaciğerde glikojenin ani yıkımına bağlı olarak kan şekeri yükselir. Bu dönemde plazma insülin düzeyleri düşüktür.

Şiddetli hipoglisemi fazı: Uygulamadan yaklaşık 6 saat sonra başlar. İlk 24 saat içindeki ölçümlerden bu hipoglisemi sorumludur, bu nedenle STZ'nin enjeksiyonundan sonraki ilk 24 saatlik dönemde hayvana %10'luk glukozlu su verilmesi tavsiye edilmektedir. Hipoglisemi, β hücrelerinin ölümü ile birlikte aşırı miktarda insülinin kana salımına bağlıdır ve plazma insülin düzeyleri çok yüksektir.

Kalıcı hiperglisemi fazı: STZ uygulamasından 10-12 saat sonra başlar. Bu fazda plazma insülin düzeyleri düşer ve aylarca düşük düzeylerde seyrederek (8).

2.3. Diyabet ve diyabete eşlik eden ikincil komplikasyonlar

Diyabet, pankreastan insülin salıverilmesindeki yetersizliğe veya dokunun insüline yanıt verebilirliğindeki bozulmaya bağlı gelişen hiperglisemiyle tanımlanan metabolik bir hastalıktır. Diyabetin insüline bağımlı Tip I ve insülininden bağımsız Tip II olarak iki tipi tanımlanmaktadır (1). Tip I diyabette insülin üreten pankreatik β hücrelerinin otoimmün hasarı söz konusu iken, Tip II diyabetin obezite, hipertansiyon ve metabolik sendrom gibi çeşitli faktörler tarafından tetiklendiği ya da ilerletildiği belirtilmektedir (13). İnsülin yokluğunda glukozun hücre içine alımı mümkün olmamakta ve kan glukoz seviyesinin yükseldiği bir tablo olan hiperglisemi ortaya çıkmaktadır (14).

DM’li hastalarda nörolojik (santral ve periferik nöropati), kardiyovasküler (mikro ve makrovasküler rahatsızlıklar, inme, koroner kalp hastalıkları, kardiyomiyopati), oftalmolojik (retinopati), immünolojik (bağışıklık işlev bozukluğu), gastrointestinal, ürolojik ve biyokimyasal olmak üzere kısa ve uzun dönemde çeşitli ikincil komplikasyonlar gelişir. DM’li hastalarda bu ikincil komplikasyonlar, sağlığı tehdit eden ciddi problemler olarak kalmaktadırlar (15).

2.4. Diyabetin MSS’ye etkileri ve diyabetik beyinde moleküler değişiklikler

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda diyabetin her iki tipinin de MSS’de komplikasyonlara sebep olduğu bildirilmiştir. Diyabetle oluşturulan MSS komplikasyonlarının belirtileri arasında beyinde yapısal değişiklikler, atrofi ve algısal performansa etkili elektrofizyolojik değişiklikler sıralanmaktadır. Diyabetle tetiklenen MSS komplikasyonları hipertansiyon gibi altta yatan kardiyovasküler rahatsızlıklar ve serebrovasküler komplikasyonlarla beraber artmaktadır (9,16-18).

Geçmişte diyabetin MSS’deki bu komplikasyonları değerlendirilirken daha çok beyinde oluşturduğu dejeneratif damar hasarı üzerinde durulmuştur (19). Ancak pek çok araştırma artık damar hasarına bağlı olmayan diyabetik ensefalopati kavramı üzerinde yoğunlaşmaktadır (20). Bu araştırmacılar özellikle tip I DM’li hastalarda hiperglisemi ve asidoz gibi rahatsızlıklara ikincil olarak gelişen beyin korteksi, beyincik ve beyin sapında sinir hasarı ile tanımlanan nörolojik hasardan, normal

kişilerin beyni ile karşılaştırıldığında lezyon büyüklüğü ve sayısında artıştan, beynin belirli bölgelerinde gözlenen nörotransmitter işlev bozukluğundan, hipotalamusta fonksiyonel ve morfolojik değişikliklerden, beyin ağırlığında, bazı korteks kısımlarında hacim ve sinir dansitesinde azalmadan ve dendrit ve akson uçlarında dejenerasyondan bahsetmektedirler (21,22). STZ-D (streptozotosin kullanılarak oluşturulan diyabetik) sıçanların kortekslerinde yapılan histolojik incelemelerde hiperglisemik deneklerde kontrolle karşılaştırıldığında hücre dansitesinde ve küçük nöronların sayılarında artma, bu nöronların protein, yağ asidi, kolesterol ve miyelin içeriklerinde ise azalma gözlenmiştir (23). Hipokampusun CA1 bölgesi ve prefrontal korteks algısal faaliyetlerde ve özellikle hafıza ve öğrenme ile ilgili işlevlerde rol almaktadır. Bu hipokampal-prefrontal korteks iletişim ağının işlevi hafıza ve öğrenmeyi kapsamaktadır (24). Yapılan çalışmalarda hipergliseminin özellikle prefrontal korteks piramidal nöronlarında ve hipokampusun CA1 bölgesinde dendrit dansitesinde ve uzunluğunda anlamlı azalmaya yol açtığı gözlenmiş ve bu durumun DM’li hastalardaki algısal hasarla kısmen bağlantısı olduğu düşünülmüştür (25).

Normal şartlar altında glukoz, erişkin beyinde baskın metabolik yakıt molekülüdür ve periferden MSS’ye glukoz taşıyıcıları ile taşınır (26). Beyin glukoz sentezini gerçekleştiremediği ve uzun süre depolayamadığı için, glukozun uygun bir taşıyıcı ile periferden MSS’ye yeterli miktarda taşınması gerekmektedir. İnsülin tarafından düzenlenen bu taşınmanın diyabette hasara uğradığı bildirilmiştir (27). Bunlara ek olarak insülin ve glukoz, algısal işlevlerin düzenleyicileri olarak kabul edildiklerinden (28), bu iki molekülün yetersizliği diyabetik algısal bozukluklar için hipotetik bir yaklaşım olarak işaret edilmektedir. MSS’de insülin sinyallerinin ve glukoz homeostazının bozulması, diyabetin oluşturduğu algısal bozukluğa sebebiyet veren ek faktörlerdendir (29). STZ-D sıçanın KBE (kan beyin engeli)’de GLUT gibi bazı proteinlerin sentezinin değişerek KBE’nin sıkı kavşaklı yapısının moleküler özelliklerinde bozulma meydana geldiği ve bu etkinin uzun süreli diyabette KBE endotelinde geçirgenliği arttırdığı gösterilmiştir (30). GLUT’lar korteks de dahil beynin bir çok bölgesinde glukoz taşıyıcılarıdır ve diyabetik beyinde yapılan çalışmalarda bu taşıyıcıların ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir (21).

Diyabette nöroendokrin fonksiyon bozukluğu da gözlenmektedir. STZ-D sıçanlarda özellikle beyin korteksi, *striatum* ve hipokampuste strese karşı

glukokortikoid seviyelerinde ve IGF gibi bazı büyüme faktörlerinde artış gözlenmektedir (25,31). IGF'ler, MSS'de sinir gelişimi, farklılaşması ve fonksiyonlarının düzenlenmesi faaliyetlerine aracılık ederler (21). Diyabette ve özellikle hiperglisemik stres şartlarında IGF ve IGF-IR artışının glukokortikoidler tarafından düzenlendiği bilinmektedir (32).

DM'li hastalarda hafıza performansında, dikkatte, görme-motor işlevlerinde ve algısal yeteneklerde düşüşe sıklıkla rastlanmaktadır. Bu durum, diyabette "Alzheimer tipi demans" olarak tanımlanmakta ve DM ile AH (Alzheimer hastalığı) arasındaki ilişkiyi vurgulamaktadır (33). Diyabetin klinik verileri arasında gözlemlenen ve beyinde algısal erozyona neden olan vasküler demans, ventriküler hipertrofi, lakunar infarkt ve kanama AH'ye zemin hazırlamaktadır (34). MSS'de oluşan bu hasar, hiperglisemi kontrolünün kalitesine göre hafiften ciddiye doğru değişiklik göstermektedir (35). Glisemi kontrolünden sorumlu insülinin AH'de iki önemli yapı olan amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşumuna neden olan β -amiloid ve tau protein metabolizmasını düzenlediği gösterilmiştir (36). İnsülinin yoksun diyabetik deneklerin beyinlerinde nörodejeneratif hasara neden olan aşırı tau fosforilasyonu artmaktadır (37). Yine başka bir çalışmada, Alzheimer hastalarına uygulanan glukoz-insülin kombine tedavisinin hipokampal glukoz kullanımını artırarak algısal işlevleri iyileştirdiği bildirilmiştir (38,39). Bingham ve diğ. (40) ise DM ve AH arasındaki yakın ilişkiyi, beyin korteksinde insülin direncinin algı ve hafıza gibi beyin fonksiyonlarındaki etkisi üzerinden göstermişlerdir.

DM ve bu hastalığa bağlı komplikasyonlar olan hiperglisemi ve dislipidemi belirli beyin bölgelerinde oksidatif strese ve ROT'ların birikimine neden olabilmekte; bu birikim DM'li kişileri inmeye sağlıklı kişilerden daha yatkın kılabilir. Beynin yüksek enerjiye ihtiyaç duyduğu göz önüne alındığında oksidatif stresle artan ROT'ların nörodejeneratif hastalıklardaki etkisi kayda değerdir (41). Yapılan çalışmalarda bu verileri destekler şekilde, sıçan beyinde deneysel olarak oluşturulan hipergliseminin oksidatif hasara yol açtığı (42), yine deneysel diyabet oluşturulan fare beyinlerinde lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı, katalaz ve süperoksitdismutaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinin ise azaldığı gözlenmiştir (43).

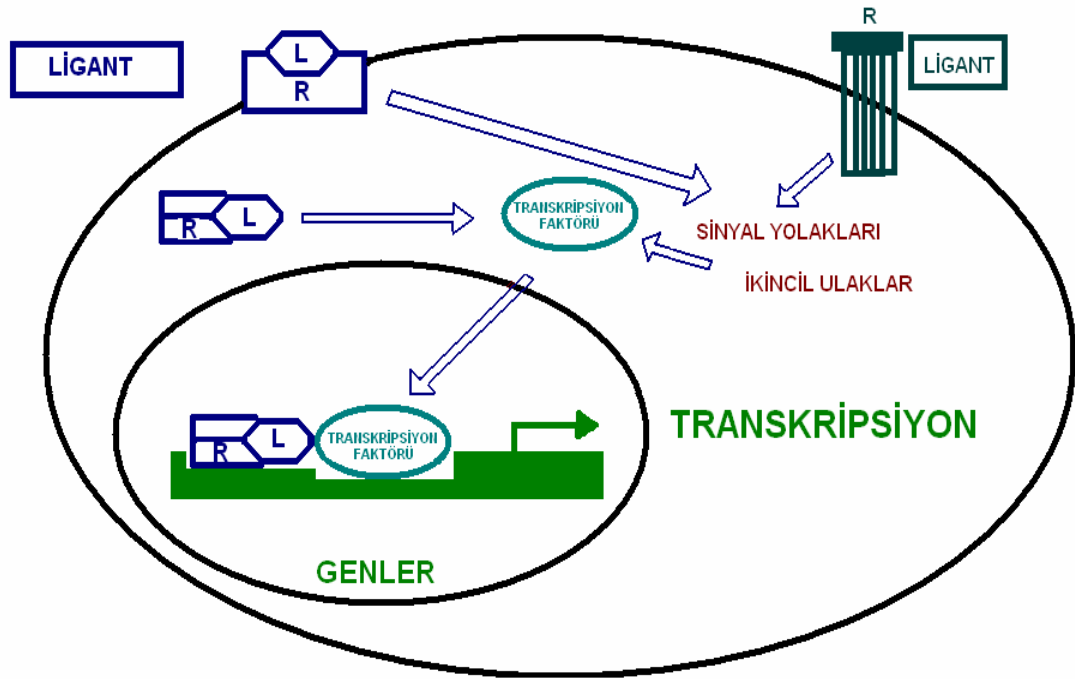
Özetle bu çalışmalar; diyabetin, beyinde sinir hücre atrofisi, β -amiloid protein ve tau fosforilasyonunda artış, KBE geçirgenliği ve GLUT aracılı glukoz taşınmasında bozukluk, stres sonucu glukokortikoid seviyesi ve IGF gibi büyüme faktörü reseptörlerinde artış, ROT oluşumu gibi moleküler, hücresel, morfolojik değişikliklerden; algı ve hafıza fonksiyonlarının azlığı gibi de davranışsal değişikliklerden sorumlu olduğunu göstermektedir.

Tüm bu çalışmalar, diyabetin sadece periferik nöropati gibi nörolojik komplikasyonlarla sınırlı kalmadığına, aynı zamanda MSS'de de ciddi patolojilere yol açtığına işaret etmektedir.

2.5. RTK ve MAP/ERK sinyal yolağı

Bir organizmadaki tüm hücreler çevresel uyarıları algılama ve bu uyarılara cevap verme yeteneğine sahiptir. Bu algılama yeteneği sinyal yolları sayesinde gerçekleşmektedir. Hücreler sinyalleri hücre membranındaki reseptörler aracılığıyla tanırlar. Bu reseptörler daha sonra hücre içinde ilgili sinyal yollarını bir takım hücre içi elemanların yardımıyla aktive ederler. Bu sinyal yolları ise apoptozu baskılar ve mitojenez için gerekli genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir (44) (Şekil 2.1).

İnsan ve pek çok hayvan türlerinin genomlarında yapılan çalışmalar, gen ekspresyonu kontrolünün genlerin işlevinde oldukça önemli olduğunu göstermiştir. Gen ekspresyonunun kontrolü için hücre dışından gelen uyarının hücre içi düzenleyici yollar aracılığıyla transkripsiyon faktörlerine aktarılması gerekmektedir. Bu uyarıların hücre içine aktarımı gerek sinyal yollarının gerekse transkripsiyon faktörlerinin seviyelerine göre farklılık gösterebilir. Sonuç olarak, bir genin belirli düzenleyici elementine özel olarak bağlanan transkripsiyon faktörü bu genlerin ekspresyonunu kontrol eder. Belirli bir genin ekspresyonu o gen üzerindeki bir ya da birden fazla düzenleyici elemente ve bu elementlere bağlanan transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerine bağlıdır (45,46).



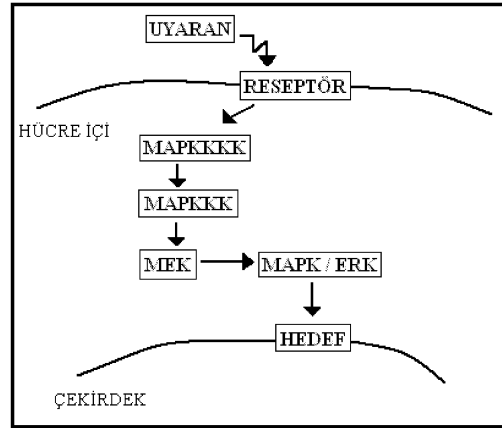
Şekil 2.1. Sinir hücresinde genel sinyal yoluğu.

Hücre dışından gelen ligandın RTK (reseptör tirozin kinaz)'lara bağlanması bu reseptörlerin ve MAPK gibi proteinlerin fosforilasyonuna ve yolağın aktivasyonuna neden olur (47). Proteinlerin tirozin fosforilasyonu ile aktivasyonu bu aktiviteye sahip hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve adhezyonu ile ilişkili sinyal iletimi olaylarında kritik bir öneme sahiptir (48). RTK'lar membranın bir tarafından diğer tarafına uzanır ve hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol ederler. Bu transmembran reseptörlerin özgün bağlanma noktalarına insülin gibi moleküllerin bağlanması membranın sitozolik tarafında bulunan katalitik bölgenin kinaz aktivitesine (MAPK) yol açar (49).

MAPK ailesi, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi pek çok dış etkenle aktive (fosforile) edilirler. Bunlara ERK'ler ya da yaygın ismiyle MAPK'lar adı verilir. Bu kinazların fosforilasyonu çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna, çekirdeğe geçişlerine (translokasyonuna) ve hücre büyümesi ve gelişiminde rol alan genlerin ekspresyonuna neden olur (50).

MAPK'ların ERK dışında diğer alt tipleri JNK (c-jun N-terminal kinaz, aynı zamanda stresle aktive edilen protein kinazlar da denir SAPK/JNK) ve MAPKp38'dir (51). MAPK'lar oksidatif stres sonucu açığa çıkan ROT'lar, çevresel

stres, proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri, ultraviyole ve iyonize radyasyon, yüksek ozmolarite ve ısı şoku gibi çeşitli hücrel stres faktörleri tarafından aktive edilirler ve inflamatuvar cevapların anahtar düzenleyicileridirler (52) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Sinir hücresinde MAPK sinyal yolağı (53).

Büyüme faktörü reseptörlerinin ve sitoplazmik sinyal moleküllerinin özellikle tirozin bölgelerinden fosforilasyonu hücre içi sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açar (44). Epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, trombosit-kaynaklı büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü, beyin kaynaklı nörotrofik faktör ve IGF reseptörlerine ligant bağlanması reseptörün, ardından da MAPK gibi tirozin kinazların aktivasyonuna neden olur (47). ERK, MAPK ailesinin bir üyesidir ve pek çok hücre dışı sinyal molekülü tarafından uyarılır. Pek çok hücre tipinde ERK1 (p44) ve ERK2 (p42) izoformları halinde bulunan ERK'ler (54) tirozin ve treonin bölgelerinden fosforillenmek suretiyle aktive edilirler (p-ERK). ERK aktivasyonu sitozolik ve nükleer pek çok faktörün fosforilasyonuna neden olarak farklı hücrel olayları tetikler (55).

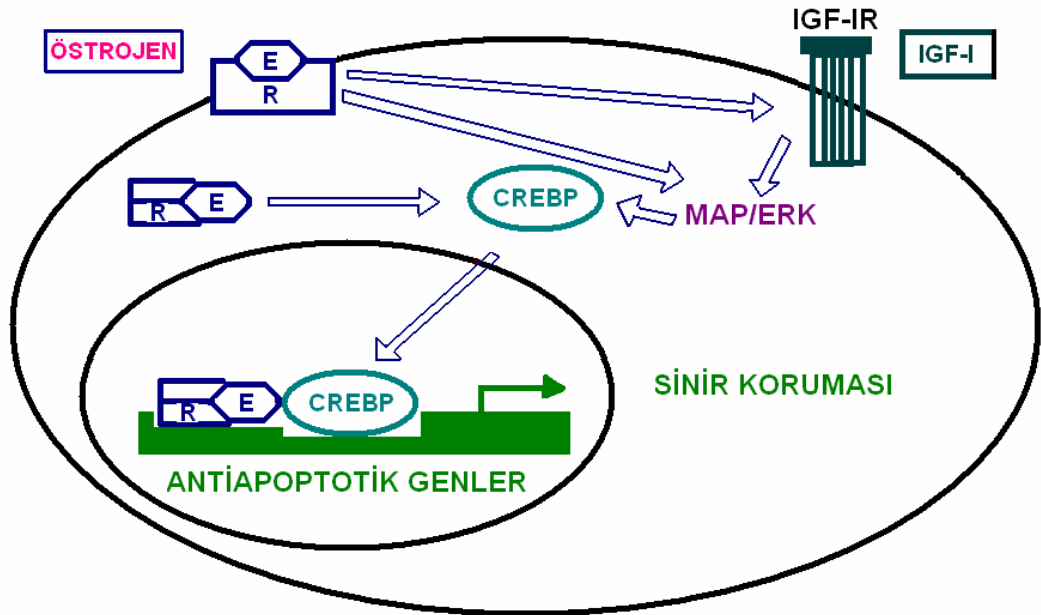
2.6. Beyinde MAP/ERK sinyal yolağının önemi

ERK'ler yetişkin beyinde özellikle sinir hücrelerinde diğer hücrelere nazaran oldukça yüksek miktarda eksprese edilmektedir (56). ERK1'in beyindeki

fosforilasyon faaliyetleri insülin tarafından düzenlenirken (33), ERK2'yi fibroblast büyüme faktörü gibi diğer büyüme faktörleri etkilemektedir (57).

Gerek ERK1 gerekse ERK2 sinir hücrelerinin yaşamının sürdürülmesinde ve yenilenmesinde, nörit büyümesinde ve sinaptik dağılımda ayrıca dendritlerin oluşumuna etki ederek sinirsel plastisitede majör düzenleyici olarak önemli rol oynarlar (58). Buna bağlı olarak beyin gelişimi, öğrenme, hafıza ve algıda kritik öneme sahiptirler (59). Bu sinyal yollarını oluşturan elemanların genlerinin herhangi bir bölgesindeki mutasyon ya da silinmenin otizme ve algısal gelişim bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir. Bu bozukluklara yapısal MSS anomalileri, beyin hacminde özellikle frontal korteks ve beyincikte küçülme eşlik eder (57).

Son yıllarda yapılan çalışmalar nöronal hücre hasarında ve korunmasında da MAPK aktivasyonunun önemini göstermektedir (60). Yapılan çalışmalarda ERK, SAPK/JNK ve MAPKp38'in iskemi/reperfüzyon hasarından hemen sonra beyinde eksprese edildiği (61), MAP/ERK yolağının sinir hücrelerini bu hasara ve apoptotik ölüme karşı koruduğu (62), SAPK/JNK ve MAPKp38 aktivasyonunun ise apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (63). Çeşitli çalışmalar göstermektedir ki sinir hücrelerinde 17 β -östradiol plazma membranında bulunan ER'leri (ERX) etkileyerek MAP/ERK yolağını aktive etmekte (64), bazı durumlarda bu aktivasyon için IGF-IR'lere ihtiyaç duyulmaktadır (65). Bazı araştırmalarda bu yollar dizisine *downstream* aktivasyon yolağı olan ve transkripsiyon faktörü CREBP'in de katıldığı bildirilmektedir (66). ERK CREBP'i aktive etmekte, aktif CREBP hücre çekirdeğine geçerek söz konusu gen üzerindeki CRE'ye bağlanarak gen ekspresyonunu başlatmaktadır (67,68) (Şekil 2.3) (69).

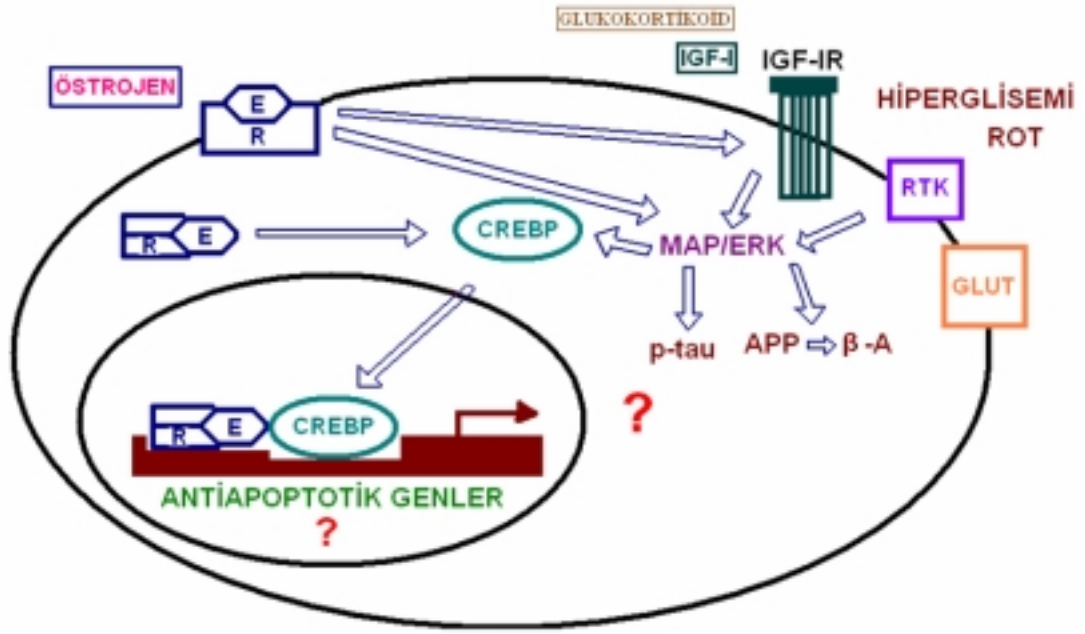


Şekil 2.3. Sinir hücresinde MAP/ERK/CREBP sinyal yolağı aktivasyonu ile antiapoptotik gen transkripsiyonu (69).

2.7. Diyabetik beyinde MAP/ERK sinyal yolağının önemi

Kronik diyabet MSS hastalıklarında sinir hücrelerinde ikincil ulak değişikliklerine neden olabilmektedir. RTK'lar, diyabetin oluşturduğu stres sinyallerinin sinir hücresinde iletimini gerçekleştirirler (70). Bu kinazların alt grubu olan MAP/ERK yolağı çok çeşitli hücrel stresle aktive olabilir. Diyabet için bu stres hiperglisemidir. Hiperglisemi oksidatif fosforilasyona ve bunun sonucunda ROT'ların sürekli artışına sebep olarak diyabetik komplikasyonları tetiklemektedir (71).

IGF deneysel diyabette oluşan hiperglisemi tablosunda *up-regüle* edilmektedir. Artan IGF, IGF-IR'ler aracılığıyla MAP/ERK yolağını aktive ederek APP (amiloid prekürsör peptit)'den β -amiloid oluşumunu hızlandırmaktadır (5). Diyabetik beyinde IGF-IR'nin ekspresyonundaki artış, tau fosforilasyonunda artışa ve hücre içi β -amiloid proteininin birikimine neden olmakta ve MAP/ERK/CREBP etkileşimi potansiyelize edilmektedir (5) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Diyabetik beyin sinir hücresinde MAP/ERK/CREBP sinyal yolağı aktivasyonu ile gen transkripsiyonu.

2.8. Aromataz

Aromataz, sitokrom p450 aromataz enzim ailesinin bir üyesidir ve androjen prekürsörlerden östrojen biyosentezini katalizler. Aromataz geni klonlanmış, dokuya ve türe özgü gen dizileri gösterilmiştir. İnsanda beyin, overler, plasenta, karaciğer ve yağ dokusunda eksprese edilmektedir (72).

2.8.1. Beyinde aromatazın önemi

Aromataz normal şartlar altında memelilerde özellikle sinir hücrelerinde eksprese edilir (73). Naftolin ve diğ. (74) insan beyinde aromataz ekspresyonu ve aktivitesini ilk gösteren araştırmacılarıdır. Bu ekspresyon insan beyin korteksinde normal şartlar altında hem astrositlerde hem sinir hücrelerinde gerçekleşirken (75) kemirgenlerde sinir hücreleriyle sınırlıdır (76). Yeni doğan kemirgen beyininden elde edilen astrosit kültürlerinde ve hasardan sonra erişkin kemirgen beynindeki astrositlerde aromataz ekspresyonu gösterilmiştir (77).

Aromataz enzimiyle üretilen bölgesel östrojenin korteksle ilgili işlevlerde oldukça önemli olduğu gösterilmiştir (77). Beyne özgü aromataz genini düzenleyen sinyal yolları ve moleküler mekanizmalar tam olarak açıklanamamakla birlikte beyinde aromataz ekspresyonunun ve aktivitesinin östrojen ve cAMP (siklik adozin monofosfat) tarafından düzenlendiği bilinmektedir (78). Sinir hücresi kültürlerinde cAMP artışı aromataz mRNA (mesajcı ribonükleik asit) seviyelerinde de artışa neden olmaktadır (79). Östrojen bu etkiyi aromataz geni üzerindeki ERE (östrojen reseptör elementi), cAMP ise CREAR (cAMP-cevap elementi)'ya bağlanarak gerçekleştirmektedir (80,81). Yapılan çalışmalarda IGF-I gibi büyüme faktörlerinin aromataz ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (81). Aromataz ekspresyonu memeli beyinde beyin hasarı sonrası özellikle korteks, *corpus callosum*, *striatum*, hipokampus, talamus ve hipotalamus gibi hasarlı bölgelerdeki tüm astrositlerde de gözlenmiştir (82,83). Bu da göstermektedir ki, beyinde çoğu bölge hasar sonrası aromataz ekspresyonuna buradan da bölgesel östrojen üretimine yönelmektedir.

Aromatazın beyin hasarı ve AH'de arttığının gösterilmesi, bu enzimin beyinde hasarlı sinir hücrelerinin korunmasındaki ve hücrede savunma mekanizmasındaki önemine işaret etmektedir (84). Sentezi artan östrojen, hasarlı nöronlar için trofik faktör olarak salgılanır böylelikle sinaptik fonksiyonları etkileyerek, bölgesel beyin kan akımını ve nöronal iyileşmeyi çabuklaştırarak, nöronal sağ kalımı arttırarak, nöron ölümünü en aza indirgeyerek muhtemel kompenzasyon mekanizmalarında rol oynayabilir (85).

Östrojenler; östron, östradiol ve östriol olmak üzere 3 tiptir. Özellikle 17 β -östradiol hücre yaşamının devamı, farklılaşması ve morfolojisinde görev alarak hipokampusta dendrit dansitesini düzenler (86). Bu hormon öğrenme ve hafıza oluşumu gibi algısal işlevlerde anahtar rol oynamaktadır (87). Pek çok beyin bölgesinin gelişimi sırasında aromataz ve ER'lerin birlikte eksprese edilmesi bu hormonun sinirsel farklılaşmayı düzenlediğini göstermektedir. Östrojen bu etkisini beyinde ER α 'lar üzerinden olduğu kadar bu reseptörlerden bağımsız hücre içi sinyal yollarını aktive eden ERX'ler üzerinden de gerçekleştirebilir. Bu olay "östrojenin genomik olmayan etkisi" veya "östrojen-büyüme faktörü etkileşimi" olarak da adlandırılmaktadır (88). Garcia-Segura ve diğ. (88) IGF sinyal yolağı ile östrojen

arasındaki etkileşimi tanımlamışlar ve östrojenin IGF-I ve IGF-IR'nin ekspresyonunu sinir hücrelerinde etkilediğini göstermişlerdir. Membran üzerinden tetiklenen bahsedilen büyüme faktörü sinyal yolları ile östrojen reseptörleri arasındaki bu çapraz etkileşim beyindeki hedef nöronların gelişiminde önemlidir. Östrojenin transkripsiyonunu düzenlediği genlerin üzerinde östrojen-reseptör kompleksinin bağlandığı ERE cevap elementi bulunmaktadır. Östrojenin ayrıca beyindeki bazı sinir hücrelerinde cAMP oluşumunu ve CREBP fosforilasyonunu uyardığı bildirilmiştir. Bu uyarı östrojenin genomik olmayan etkileri arasında açıklanmaktadır (88).

2.8.2. Diyabetik beyinde aromatazın önemi

Diyabette dolaşımdaki insülin seviyesinin azalmasının, insülinin uyardığı gonadal aromatazasyonun azalmasına ve dolayısıyla dolaşımda östrojen miktarının düşmesine neden olabileceği ileri sürülmüştür. Bu da diyabetin kadın hastalarda over disfonksiyonu ve klimakteriyum gibi problemlere sebep olabileceğini göstermektedir (2). Erkek bireylerde ise hipogonadizm ve diyabeti ilişkilendiren çalışmaların büyük bir bölümü periferde obezite ve kardiyovasküler etkilerle, MSS'de ise hipokampus üzerindeki algısal işlev bozuklukları ile sınırlı kalmaktadır (3,4). Bu konuda santral etkilere ilişkin yeterli çalışmaya rastlanmaması, bu tez çalışmasının özellikle beyin korteksinde aromataz ekspresyonu ile diyabetin olası etkileşimlerini ve bu etkileşimde rol alan muhtemel sinyal yollarını araştırmaya yönelik olmasına sebep olmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneylerde *Sprague-Dawley* cinsi yetişkin erkek albino sıçanlar kullanıldı (200-250g). Laboratuvar denekleri bakım ve kullanım talimatlarına uygun çalışıldı. Sıçanlara musluk suyu ve standart sıçan pellet yemi verildi ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde tutuldu. Deneyler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 2006/8-6 ve 2009/10 numaralı izni ile Hacettepe Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.1. Deneysel diyabet oluşturulması

Çalışmanın başlangıcında ağırlık ve kan glukoz düzeyleri glukometre (Prestige Smart System) ile ölçülen sıçanlara 0.1 M sitrat tamponu (pH: 4.5) içinde çözündürülen STZ 40 mg/kg tek dozuyla kuyruk veni içine (i.v.) enjeksiyon yoluyla verildi. Kontrol grubundaki sıçanlara aynı yolla eşdeğer hacimde sitrat tamponu enjekte edildi. Deneklere enjeksiyonu takip eden ilk 24 saat %10'luk glukozlu içme suyu verildi. STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra kuyruk veninden kan glukoz seviyeleri ölçüldü. Deneklerden ortalama plazma glukoz seviyesi 250 mg/dl'nin üstünde değerlere sahip olanlar diyabetik olarak sınıflandırıldı. Kan glukoz seviyeleri 4, 8 veya 12 hafta sonraki dekapitasyondan önce tekrar ölçüldü.

3.2. İnsülin tedavisi uygulanması

İnsülin tedavi grupları STZ enjeksiyonundan 7 gün sonra diyabetik deneklere deri altı insülin implantı yerleştirilmesiyle oluşturuldu. İmplantlar deneklerin sağ karın bölgesine bir trokar yardımıyla hafif ketamin-ksilazin (45:5 mg/kg) anestezisi altında yerleştirildi. İnsülin implantlı deneklerden 24-72 saat içinde kan glukoz seviyesi 110 mg/dl'den düşük değere sahip olanlar normoglisemik olarak kabul edildi ve tedavi grubu dahil edildi. Mikrokristalize palmitik asit içindeki insülin implantları 24 saatte 2 ünite insülini yaklaşık 50 gün boyunca salgılarından dolayı implantlar 6 haftanın sonunda yenisiyle değiştirildi. Kontrol gruplarına sadece cerrahi işlem uygulandı. Bu uygulamalar 8 veya 12 hafta boyunca sürdürüldü.

3.3. Doku lizisi ve ekstre elde edilmesi

4, 8 ve 12 haftanın sonunda deneklere eter anestezisinin ardından dekapitasyonla ötenazi uygulandı ve beyin korteksleri çıkarılarak sıvı nitrojende dondurulup deney gününe kadar -80°C’de saklandı. Deney günü her bir deneğin beyin korteksi tartıldı, Dounce cam homojenizatörde buz üzerinde soğuk lizis tamponuyla (3 ml / 1 g doku) lizis edildi. 14000 g’de, 30 dakika süreyle, 4°C’de berrak ekstre elde edilinceye kadar santrifüj edildi. Ekstrelerin total protein konsantrasyonları *Bradford* protein tayini yöntemiyle (89) hesaplandı.

3.4. Ekstrelerden Western Blot yöntemiyle protein eldesi

Her bir örneğin total protein miktarları eşit olacak şekilde yükleme yapıldı. Sıçan over ekstresi pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her bir ekstreye 6x örnek tamponu ilave edilerek 100°C’de 5 dakika kaynatıldı, %10’luk akrilamid-bisakrilamid jellere yükleme yapıldı ve elektroforez uygulandı. Sürüklenme tamponu varlığında 3 saat içinde 100V ve 250mA akımın etkisiyle jel üzerindeki proteinler molekül ağırlıklarına göre sıralandı.

PVDF (polivinilidenfluorid) membran jel boyutlarında kesildi, metanolde 5 dakika bekletildi, soğuk transfer tamponuyla 5 dakika yıkandı. Transfer tepsisinde membran ve jel transfer tamponu varlığında 5 dakika yıkandı. Sünger ve *Wattmann* kağıtları arasına yerleştirilen PVDF membran ve jel 1 saat süreyle 300V ve 250mA akıma maruz bırakıldı. Böylece jeldeki proteinler transfer tamponu yardımıyla PVDF membrana ıslak elektroforez yöntemiyle transfer oldu. Isınmaya karşı transfer tankı buz kalıplarıyla desteklendi. Her kuyucuğa eşit miktarda yükleme yapıldığı transferden sonra membranlara Ponceau S çözeltisi (%0.1 (a/h) Ponceau S’in %5’lik asetik asitteki çözeltisi) ile boyama yapılarak doğrulandı. Bu boya membrandan transfer tamponuyla yıkanarak uzaklaştırıldı.

3.5. Proteinlerin görünür hale getirilmesi

PVDF membranlar blok çözeltisinde 2 saat bloklandıktan sonra 15 dakika boyunca 3 defa TBS-T (tris tampon çözeltisi ve tween-20) ile yıkandı. Membranlar 1° antikor çözeltisinde seyreltilen 1° antikora 1 saat maruz bırakıldı ve süre sonunda 15 dakika boyunca 3 defa TBS-T ile yıkandı. Son olarak membranlar 2° antikor çözeltisinde seyreltilen 2° HRP-GAM veya HRP-GAR antikora 1 saat süreyle maruz bırakıldı ve süre sonunda 15 dakika boyunca 3 defa TBS-T ile yıkandı. Tüm bloklama veya antikor çözeltilerinde yağsız granüle süt tozu ve BSA (sığır serum albumini) kullanıldı. Bloklama ve antikor maruziyetleri orbital çalkalayıcı üzerinde ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Membran, güçlendirilmiş kimyasal ışımaya reaktifleri (enhanced chemiluminiscent) ile 5 dakika bekletildikten sonra streç filmle sarıldı ve fotoğraf filmi ile immünoaktif bantlar görünür hale gelinceye kadar karanlık bir ortamda bekletildi. Filmler, tab edici çözeltilere maruz bırakıldı ve suyla yıkanarak kurumaya bırakıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. İlgili proteinler için kullanılan antikorlar, blok ve antikor çözeltileri.

	Blok çözeltisi	1° antikor çözeltisi	2° antikor çözeltisi
	TBS-T	TBS-T	TBS-T
Aromataz	%5 süt tozu	%5 BSA Aromataz (1:5000)	%5 süt tozu + %1 BSA HRP-GAM (1:5000)
	TBS-T	TBS-T	TBS-T
p-ERK	%5 süt tozu	%5 süt tozu p-ERK (1:2000)	%5 süt tozu HRP-GAM (1:2000)
	TBS-T	TBS-T	TBS-T
ERK	%5 süt tozu	%5 süt tozu + %1 BSA ERK (1:2000)	%5 süt tozu + %1 BSA HRP-GAR (1:2000)
	TBS-T	TBS-T	TBS-T
β-Aktin	%5 süt tozu	%5 süt tozu β-Aktin (1:5000)	%5 süt tozu HRP-GAM (1:5000)

3.6. Sıyırma yöntemi (*Stripping*)

Antikorlara ve güçlendirilmiş kimyasal ışıma reaktiflerine maruz bırakılmış membran kurumadan TBS-T ile yıkandı ve 4°C’de saklandı. Membranlar sıyırma tamponu ile 60°C’lik çalkalayıcı su banyosunda 90 dakika orta devirde çalkalanmaya bırakıldı. 90 dakika sonunda membran TBS-T ile yıkandıktan sonra bloklamadan itibaren anlatılan işlemlere tabi tutuldu.

3.7. Kullanılan kimyasallar

Aromataz antikor (Acris), HRP-GAM antikor (Santa Cruz), HRP-GAR antikor (Santa Cruz), β -aktin antikor (Santa Cruz), ERK1 antikor (Santa Cruz), p-ERK antikor (Santa Cruz), güçlendirilmiş kimyasal ışıma reaktifi (enhanced chemiluminiscent) (Pierce), fotoğraf filmi (Amersham), BSA (Sigma), coomasie brilliant blue-R (Applichem), proteaz inhibitör kokteyl tablet (Roche), etilendiamintetraasetik asit (Sigma), magnezyum klorür (Sigma), tris hidroklorür (Sigma), tris baz (Sigma), STZ (Sigma), sodyumdodesilsülfat (Sigma), β -merkaptotanol (Sigma), tetrametilendiamin (Sigma), sodyumklorür (Sigma), gliserol (Sigma), fenilmetansülfonilfluorid (Sigma), tab edici çözeltiler (developer-fixer) (Kodak), glisin (Applichem), örnek tamponu (Laemmli’s SDS-sample buffer (Boston Bioproducts), amonyum persülfat (Biorad), insülin implantı (Linshin), tween-20 (Merck), yağsız granüle süt tozu (Marvel), akrilamid-bisakrilamid (Biorad), Ponceau S (MP Biomedicals), ditiyotritol (Santa Cruz), polivinilidenfluorid (PVDF) membran (Santa Cruz).

3.8. Kullanılan cihazlar

Güç kaynağı (Consort), soğutmalı santrifüj cihazı (Kubota), enzim ilintili immün test cihazı (Biotek), orbital çalkalayıcı (Nüve), çalkalayıcı su banyosu (Nüve).

3.9. Kullanılan çözeltiler

Lizis Tamponu

Tris hidroklorür (pH: 7.5)	50 mM
Etilendiamintetraasetik asit	1 mM
Magnezyum klorür	5 mM
Ditiyotritol	5 mM
Fenilmetansülfonilfluorid	1 mM
Proteaz inhibitör kokteyl tablet	400 ul/10 ml

Bradford protein tayini reaktifi (1L)

Coomasie brilliant blue-R	100 mg
Etanol (%96)	50 ml
Fosforik asit (%85)	100 ml
Distile su	1 L'e tamamlanır

Ayırıcı jel (%10)

Distile su	4.1 ml
Tris hidroklorür (1.5 M, pH:8.8)	2.5 ml
Sodyumdodesilsülfat (%20)	0.05 ml
Akrilamid-bisakrilamid (%30 / %0.8 w/v)	3.3 ml
Amonyum persülfat (%10)	0.05 ml
Tetrametilendiamin	0.005 ml

Yükleme jeli (%4)

Distile su	3.075 ml
Tris hidroklorür (0.5 M, pH:6.8)	1.25 ml
Sodyumdodesilsülfat (%20)	0.025 ml
Akrilamid-bisakrilamid (%30 / %0.8 w/v)	0.67 ml
Amonyum persülfat (%10)	0.025 ml
Tetrametilendiamin	0.005 ml

Örnek Tamponu

Tris hidroklorür	0.5 M
Gliserol	%10
Sodyumdodesilsülfat	%2
β -merkaptoetanol	%5
Bromofenol mavisi	%0.05 (a/h)
Distile su	%50

Sürükleme Tamponu

Tris baz (pH: 8.3)	248 mM
Glisin	1.92 M
Sodyumdodesilsülfat	34.6 mM
Distile su	1 L

Deney günü 100ml sürükleme tamponu 900ml distile suyla seyreltilir.

Transfer Tamponu

Tris baz	48 mM
Glisin	386 mM
Sodyumdodesilsülfat	3.5 mM
Distile su	1 L

Deney günü 200ml transfer tamponu 200ml metanol ve 600 ml distile suyla seyreltilir.

TBS-T

Tris hidroklorür (pH: 7.6)	0.01 M
Sodyum klorür	0.05 M
Tween-20	%0.01
Distile su	1 L

Sıyırma tamponu

Tris hidroklorür (pH: 6.8)	20 mM
Sodyumdodesilsülfat	%1
β -merkapttoetanol	%1

3.10. İstatiksel analiz ve bulguların sunumu

Film üzerindeki bantlar Scion Image 4.0.3.2. (Scion Corp.) programıyla kantite edildi ve veriler kontrole göre göreceli yoğunluk olarak gösterildi. Bütün veriler ortalama $\pm$ standart hata (S.H.) olarak sunuldu. Prism 3.03 (Graph Pad Prism Software Inc.) programında istatiksel analiz için One-way ANOVA ve post-hoc test olarak Tukey testi kullanıldı. $P < 0.05$ ise ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğu kabul edildi. “n” kullanılan denek sayısını göstermektedir.

4. BULGULAR

4.1. Diyabetin ve insülin tedavisinin kan glukoz seviyesi ve vücut ağırlığına etkisi

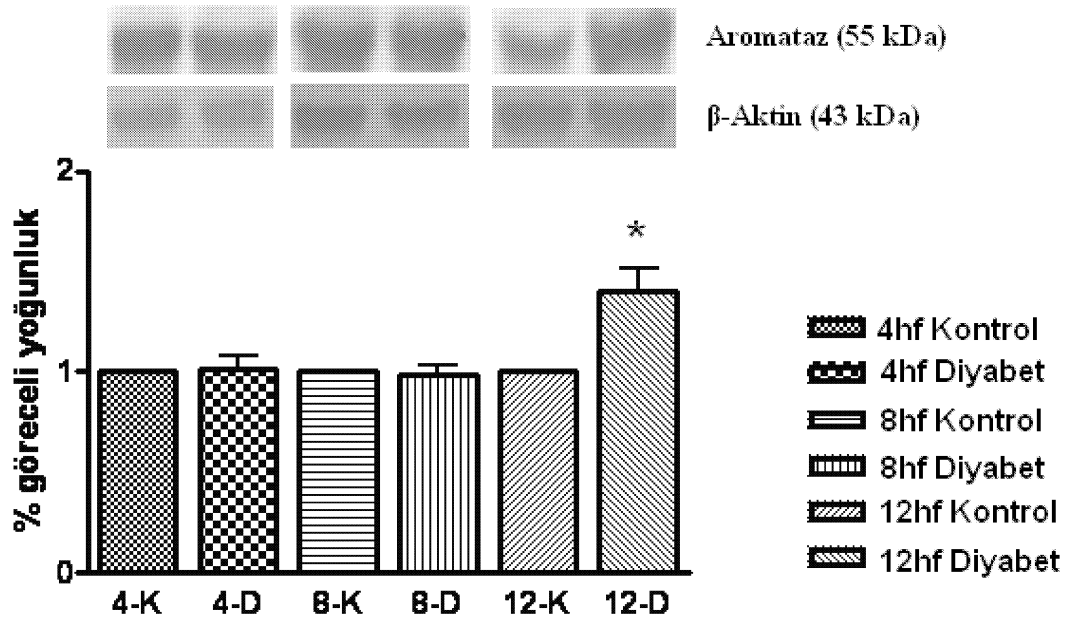
Bu tez çalışmasında STZ-D sıçanlarda glisemide anlamlı artış ve vücut ağırlıklarında anlamlı azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler STZ enjeksiyonuyla deneysel diyabet oluşturulduğunu ispatlar niteliktedir. STZ-D gupleri, insülin tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında ise insülinin vücut ağırlığındaki azalmayı ve glisemideki artışı önlediği söylenebilir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Deneklerin kan glukozu ve vücut ağırlık ölçümleri. Değerler ortalama $\pm$ S.H. olarak verilmiştir (^a: 4 hafta kontrolden farklıdır; ^b: 8 hafta kontrol ve 8 hafta insülin tedavisinden farklıdır; ^c: 12 hafta kontrol ve 12 hafta insülin tedavisinden farklıdır).

Gruplar	Kan glukozu (mg/dl)	Vücut Ağırlığı (g)		n
	Son	İlk	Son	
4 hafta kontrol	107,2 $\pm$ 1,9	214,0 $\pm$ 5,1	320 $\pm$ 19,2	5
4 hafta diyabet	332,8 $\pm$ 9,0 ^a	228,0 $\pm$ 6,0	194 $\pm$ 4,0 ^a	5
8 hafta kontrol	90,7 $\pm$ 3,8	220,0 $\pm$ 5,8	280 $\pm$ 25,2	3
8 hafta diyabet	363,0 $\pm$ 21,6 ^b	233,3 $\pm$ 8,8	213 $\pm$ 24,0 ^b	3
8 hafta insülin kontrol	98,0 $\pm$ 3,0	206,7 $\pm$ 3,3	320 $\pm$ 15,3	3
8 hafta insülin tedavisi	156,3 $\pm$ 6,2	223,3 $\pm$ 4,4	393 $\pm$ 6,7	3
12 hafta kontrol	93,7 $\pm$ 1,9	225,0 $\pm$ 6,2	370 $\pm$ 8,2	6
12 hafta diyabet	352,7 $\pm$ 18,7 ^c	231,2 $\pm$ 4,4	263 $\pm$ 9,0 ^c	8
12 hafta insülin kontrol	97,3 $\pm$ 0,7	233,3 $\pm$ 3,3	336 $\pm$ 14,5	3
12 hafta insülin tedavisi	96,0 $\pm$ 1,5	230,0 $\pm$ 5,8	390 $\pm$ 5,8	3

4.2. Diyabetin aromataz enzimi üzerine etkileri

4 ve 8 haftalık STZ-D sıçanların beyin korteksi total ekstrelerindeki aromataz seviyelerinde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmezken, 12 haftalık uzun dönem diyabetik deneklerde anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 4.1, $n=8$, $P<0.05$).

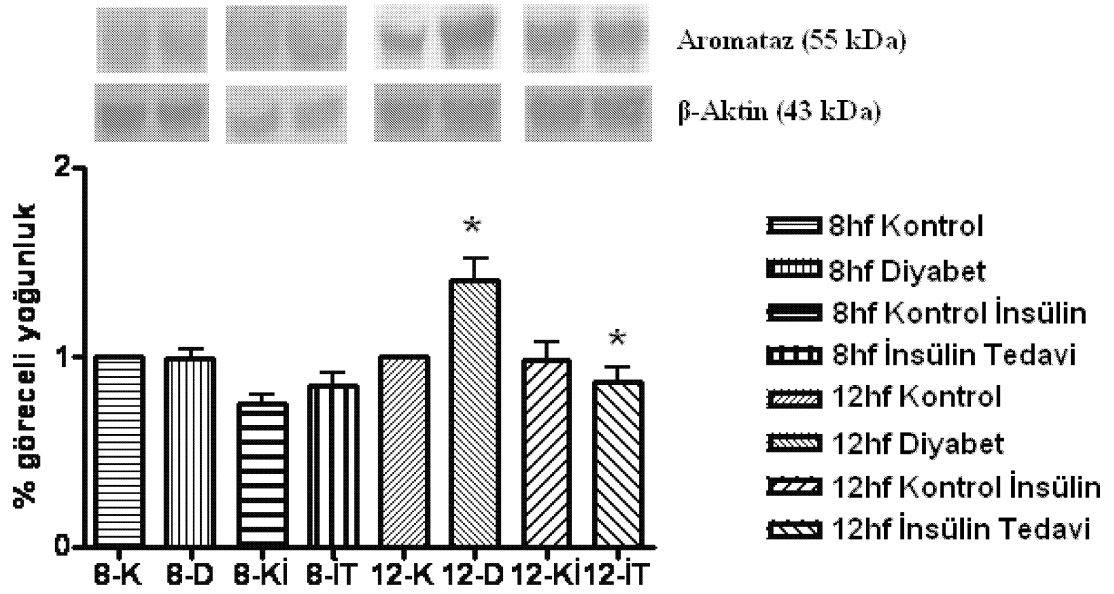


Şekil 4.1. Diyabetik beyinde aromataz ekspresyonunun zamana göre değişimi.

(*: 12 hafta kontrole göre farklıdır)

4.3. İnsülin tedavisinin aromataz enzimi üzerine etkileri

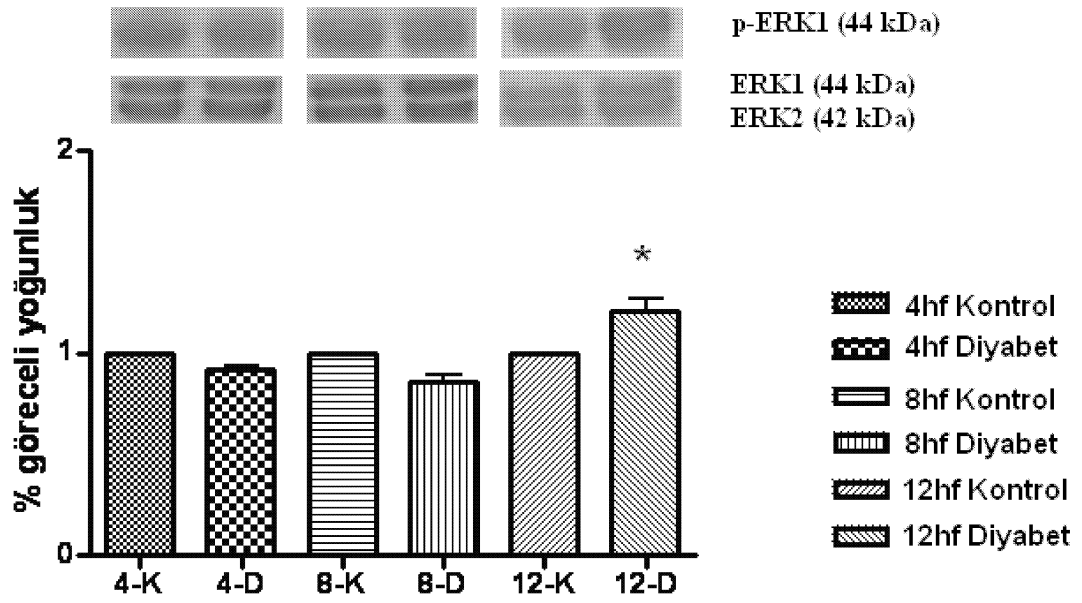
İnsülin tedavili deneklerin beyin korteksi total ekstralarında aromataz seviyelerinde kontrole göre 8 haftada anlamlı değişiklik gözlenmezken, insülin tedavisinin 12 hafta diyabette gözlenen artışı önlediği belirlenmiştir (Şekil 4.2, $n=3$, $P<0.05$).



Şekil 4.2. Diyabetik beyinde insülin tedavisi sonrası aromataz ekspresyonundaki değişiklikler. (*: 12 hafta kontrole göre farklıdır)

4.4. Diyabetin p-ERK enzimi üzerine etkileri

Bu çalışmada 4 ve 8 haftalık STZ-D deneklerin beyin korteksi total ekstrelerindeki p-ERK seviyelerinde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmezken, 12 haftalık uzun dönem diyabetik deneklerde anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 4.3, $n=8$, $P<0.05$).

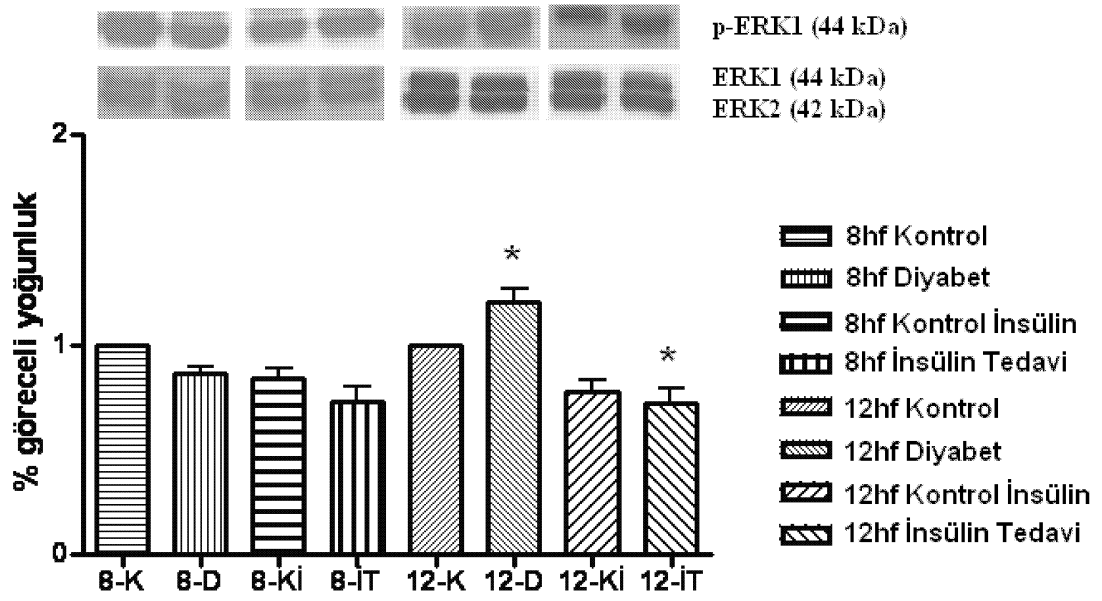


Şekil 4.3. Diyabetik beyinde p-ERK ekspresyonunun zamana göre değişimi.

(*: 12 hafta kontrole göre farklıdır)

4.5. İnsülin tedavisinin p-ERK enzimi üzerine etkileri

İnsülin tedavili deneklerin beyin korteksi total ekstratlerinde p-ERK seviyelerinde kontrole göre 8 haftada anlamlı değişiklik gözlenmezken, insülin tedavisinin 12 hafta diyabette gözlenen p- ERK seviyelerindeki artışı önlediği belirlenmiştir (Şekil 4.4, $n=3$, $P<0.05$).



Şekil 4.4. Diyabetik beyinde insülin tedavisi sonrası p-ERK ekspresyonundaki değişiklikler. (*: 12 hafta kontrole göre farklıdır)

5. TARTIŞMA

Diyabetin MSS’de yaptığı morfolojik değişiklikler çok iyi bilinmemekle birlikte bu metabolik hastalığın demans için bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Devam eden hipergliseminin beyinde ani hipoglisemik ataklar kadar tehlikeli sonuçları olabileceği bildirilmiştir (23).

Diyabetle oluşan MSS komplikasyonlarının belirtileri arasında beyinde atrofi, yapısal ve algısal bozulmalar yer almaktadır. Geçmişte diyabetin MSS’deki komplikasyonları değerlendirilirken daha çok beyinde oluşturduğu dejeneratif damar hasarı üzerinde durulmuş (19), ancak pek çok araştırma artık damar hasarına bağlı olmayan diyabetik beyin hasarı kavramı üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır (20).

Bu araştırmacılar özellikle tip I DM’li hastalarda hiperglisemi ve asidoza ek olarak gelişen beyin korteksi, beyincik ve beyin sapında sinir hasarı ile tanımlanan nörolojik hasardan, lezyon büyüklüğü ve sayısında artıştan, nörotransmitter işlev bozukluğundan, morfolojik değişikliklerden, beyin ağırlığında, hacim ve sinir dansitesinde azalmadan, dendrit ve akson uçlarında dejenerasyondan bahsetmektedirler (21,22).

Beyinde ana yakıt molekülü olan glukozun uygun bir taşıyıcı ile dolaşımdan MSS’ye yeterli miktarda taşınması gerekmektedir. İnsülin tarafından düzenlenen bu taşınmanın diyabette hasara uğradığı ve bu hasarın algısal bozukluğa sebebiyet verdiği bildirilmektedir (27,29). STZ-D sıçan KBE’de GLUT gibi bazı proteinlerin sentezinin değiştiği, KBE’nin sıkı kavşaklı yapısının moleküler özelliklerinde bozulma meydana geldiği ve uzun süreli diyabette KBE endotelinde geçirgenliğin arttığı gösterilmiştir (30). Bu veriler ayrıca diyabetin zayıflattığı KBE bölgelerinin ortabeyni, bazal ganglia’yı, korteksi ve hipokampusu daha fazla etkilediğini ve insülin tedavisinin KBE’de görülen bu hasarı azalttığını da göstermektedir (90). GLUT’lar korteks de dahil beyin bir çok spesifik bölgesinde glukozun hücre içine taşınmasından sorumludur (21).

Diyabette nöroendokrin fonksiyon bozukluğu da gözlenmektedir. STZ-D sıçanlarda özellikle beyin korteksi, *striatum* ve hipokampuste strese karşı glukokortikoid seviyelerinde ve IGF gibi bazı büyüme faktörlerinde artış gözlenmiştir (19,42). IGF, MSS’de sinir gelişimi, farklılaşması ve işlevlerinin

düzenlenmesi gibi çeşitli faaliyetlere aracılık eder. Strese maruz kalan diyabetik sıçanlarda, özellikle hipokampusta CA1 ve CA3 piramidal nöronlarda, *dentat girusta* IGF-IR mRNA ekspresyonlarında anlamlı artış gözlenmiştir (21). DM’de ve özellikle hiperglisemik stres şartlarında IGF ve IGF-IR artışında diyabetle artan glukokortikoid sentezinin de önemi vardır (91).

Glisemi kontrolünden sorumlu insülinin AH’de iki önemli yapı olan amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşumuna neden olan β -amiloid ve tau protein metabolizmasını düzenlediğinin gösterilmesi (36), insülinde yoksun diyabetik deneklerin beyinde ve nöronal insülin reseptör *knock-out* farelerin beyinlerinde AH’de nörodejeneratif hasara neden olan aşırı tau fosforilasyonunun artması (37), DM’li hastalarda hafıza performansında, dikkatte, görme-motor işlevlerinde ve algısal yeteneklerde düşüşe sıklıkla rastlanması (92) DM ile AH arasındaki ilişkiyi vurgulamaktadır. İnsülin ayrıca beyinde ERK1 aracılığı ile aksonal büyüme ve nöronal farklılaşmadan sorumludur (33). Beyinde farklı bölgelerde tau proteinlerinin fosforilasyonu insülin kadar ERK1 ve ERK2 tarafından da etkilenmektedir (93).

Diyabete bağlı hiperglisemi belirli beyin bölgelerinde oksidatif stres sonucu ROT oluşumuna neden olmakta ve oluşan ROT’lar nörodejeneratif hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Sıçan beyinde deneysel olarak oluşturulan hipergliseminin oksidatif hasara yol açtığı (42), deneysel diyabet oluşturulan fare beyinlerinde lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinin ise azaldığı gözlenmiştir (43).

Yapılan çalışmalarda diyabetik beyinde GLUT’taki değişikliklerin, IGF-IR ekspresyonundaki, tau fosforilasyonu ve ROT seviyesindeki artışın ve hücre içi β -amiloid protein birikiminin MAP/ERK/CREBP etkileşimini potansiyalize ettiği bildirilmektedir (5) (bkz. Şekil 2.4).

Bu tez çalışmasında 4 ve 8 haftalık STZ-D sıçan beyin kortekslerindeki p-ERK seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmezken, 12 haftalık uzun dönem diyabetik deneklerin beyin kortekslerinde artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar diyabetin yukarıda sayılan mekanizmaları aktive ederek MAP/ERK *down-stream* yolağı üzerinden p-ERK’i arttırabileceği yorumunun getirilmesine neden olmuştur. 12 haftalık insülin tedavisi yapılan STZ-D sıçanların kortekslerinde p-ERK

seviyelerindeki düşüş, diyabette MAP/ERK yolağının hiperglisemi ile aktive olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Bu tez çalışması deneysel diyabetin sıçan beyin korteksinde aromataz ekspresyonu üzerine etkilerini araştırmak üzerine de kurgulanmıştır. Beyin diyabetin komplikasyonlarına duyarlı bir yapıdır ve algısal bozuklukların diyabetik hastalarda normal kişilere göre daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (94-96). Diyabette görülen nörofizyolojik ve algısal bozukluklarda altta yatan mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber aromataz enziminin diyabette gelişen algısal hasardan beyni koruyan moleküllerden biri olabileceği düşünülmektedir.

Aromataz östrojen sentez edilmesinden sorumludur ve bu sentezde hız kısıtlayıcı basamaktır (72). Aromataz enzimi ile androjen prekürsörlerden bölgesel olarak sentezlenen östrojen, normal şartlar altında beyinde nöroendokrin işlevlerin düzenlenmesinden sorumludur. Ancak MSS'yi tehdit eden durumlarda sinir hücreleri, oluşan hasar ile başa çıkabilmek amacıyla östrojeni koruma mekanizmalarının bir parçası olarak kullanırlar (97). Aromatazın genetik ve farmakolojik inhibisyonu dejeneratif hasara karşı sinir hassasiyetini arttırmaktadır. Azcoitia ve diğ.'nin (77) yaptığı çalışmada aromataz *knock-out* erkek farelere ve onların *wild type* kontrollerine düşük doz nörotoksik bileşik domoik asit enjekte edildiğinde, normal farelerin hipokampus ve *dentat girus*larının *hilus*larında sinir hasarı gözlenmemiş ancak aromataz eksikliğinde (aromataz *knock-out* farelerde) *hilus*taki nöronların nörotoksik dejenerasyona hassasiyetlerinin arttığı gözlenmiştir. Bölgesel aromataz aktivitesinin sinir korumasındaki önemini test etmek amacıyla bir grup sıçanın sağ lateral ventriküllerine aromataz inhibitörü fadrazol enjekte edilmiş nörotoksik bileşik olarak ise kainik asit kullanılmıştır. Aromataz geni sağlam olan ancak fadrazol ve kainik asit enjekte edilmiş sıçanların *hilus*taki nöronlarının sayılarında sadece kainik asit ya da sadece fadrazol enjekte edilmişlere göre anlamlı düşüş gözlenmiştir (77).

DM'nin aromataz enzimi üzerine olan etkilerinin araştırılması birkaç çalışmayla sınırlı kalmıştır. Bahsedilen çalışmalarda aromataz aktivitesi ve ekspresyon seviyeleri direkt olarak ölçülmemiş, aromataz seviyesindeki değişiklikler değişen östrojen ve/veya testosteron (androjen) seviyeleri üzerinden değerlendirilmiştir (98-100). Yapılan çalışmalarda periferik dokulardaki aromataz

aktivitesine insülinin etkisi gösterilmekle beraber, aromatazın ekspresyon düzeylerine değinilmemiştir. Bu çalışmalarda insülinin diyabetik hamile kadınlarda sitotrofoblastik aromataz aktivitesine selektif inhibisyon yapması (101), öte yandan insan granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesini artırması bu proteinin farklı hücre tiplerinde farklı etki göstermesi olarak yorumlanmıştır. Stamataki ve diğ. (98) yaptıkları çalışmada insüline bağımlı olmayan diyabetik kadın hastaların kan örneklerinde androstenedion, testosteron ve östradiol seviyelerine bakarak bu hastaların overlerinde androjenden östrojen üretim kapasitesindeki düşüşün, azalan over kaynaklı aromataz aktivitesine bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

MSS’de aromatazla ilgili yapılan pek çok çalışmada östrojenin sinir büyümesi ve korunmasındaki önemi gösterilmiştir (102-105). Östrojenler *in vitro* şartlarda nöronların hayatta kalış süresini uzatmışlar (105) ve *in vivo* olarak koruyucu etki yapmışlardır (102). Rune ve diğ. (106), östradiolün sinaps oluşumunu düzenlediğini ve hipokampus kaynaklı östradiolün hipokampal sinapslarda ve sinaptik plastisitede hayati öneme sahip olduğunu doğrulamışlardır. Östradiol ve testosteron MSS’de sinir hasarına model oluşturan çeşitli deneysel hayvan modellerinde nöron kaybını önlemektedir (102). Östrojenin travmatik ya da kronik nörolojik ve mental hastalıklarda sinir hücrelerini koruduğu düşünülmektedir (82). Östrojen yerine koyma tedavisinin, Alzheimer’li kadın hastalarda hafızayı güçlendirdiği ve sinir koruyucu etkinliği epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (107). Bununla beraber beyin omurilik sıvısında azalan östradiol ile β -amiloid seviyeleri artışı arasında bağlantı bulunmaktadır (108). Östradiol *amigdala*, beyin korteksi ve hipokampus gibi farklı beyin bölgelerinden elde edilen primer sinir hücre kültürlerinde canlılığı, yaşama süresini ve farklılaşmayı da arttırmıştır. Östrojen *in vitro* ortamlarda çeşitli stres faktörleri ile oluşturulan anoksi, eksitotoksisite ve oksidatif hasara karşı da hücreleri korumuştur (109). Östrojenin *in vivo* sinir koruyucu etkisi de deneysel önbeyin iskemisine maruz bırakılmış sıçan, fare ve *gerbillerde* gösterilmiştir (110). Östrojen sentezinde rol alan aromataz enziminin beyin hasarı sonrasında sentezinin artması sinir koruyucu etkiye katkısına işaret etmektedir. Hasarlı beyin dokusunda ER ekspresyonunun da artmış olması östradiolün bu etkisini destekler niteliktedir (111). Sinir koruyucu etkinlik steroid/tiroid hormon ailesine ait transkripsiyon faktörlerinden olan ER α ’ya bağlı olabilir ve ER α antagonistleri ile önlenabilmektedir

(110). Bu duruma göre östrojen, östrojene cevap veren apoptozdan, aksonal yenilenmeden ve genel trofik destekten sorumlu genlerin ekspresyonunu etkilemektedir. Ancak östrojenin sinir koruyucu etkisinin altında yatan bazı mekanizmalar klasik olarak tanımlanan ER α 'lardan bağımsız olabilir. Östrojenin ER α 'lardan bağımsız etkisi, plazma membranındaki ve sitoplazmadaki ERX'lerden kaynaklandığı kadar molekülün C3 pozisyonundaki A halkası nedeniyle antioksidan özelliğinden de ileri gelebilmektedir (112).

ERX'ler ise membran ve sitoplazmada bulunmakta, IGF-IR gibi reseptörler aracılığıyla fosforilasyon yolağına etki etmektedirler. Gerçekten de ERX'ler ve IGF-IR, PI3K (fosfoinositol 3-kinaz) ve MAPK sinyal yolları ile etkileşmekte ve sinir korumasında rol oynamaktadırlar. Yapılan araştırmalar östrojenin *in vitro* sinir koruyucu etkinliğinin MAPK'nın farmakolojik blokajı ile önlendiğini göstermişlerdir. Bu bulgular östrojenin ER'ler ve IGF-IR ile senkronize etkileşmesi sonucunda sinir koruyucu etkisini meydana getirdiğini göstermektedir (113). MSS'de ER α ve ERX ile IGF-IR aynı hücrede beraber eksprese olmaktadır. Östradiol yokluğunda da IGF-I ve diğer büyüme faktörleri ER'leri aktive edebilmektedir (114). Östrojen varlığında ise IGF-IR ve diğer tirozin kinazlarla bağlantılı PI3K ve MAPK'lar gibi sinyal iletim yolları aktive olabilmektedirler. Örneğin beyin korteksi dokularında östradiol ERK1 ve ERK2'nin hızlı ve sürekli aktivasyonuna neden olmaktadır (115). Bu çalışmalar östrojenin sinir koruyucu etkisinin bir kısmının IGF-IR sinyal yolağının aktivasyonu ile gerçekleştiğini düşündürmektedir (113).

Bu tez çalışması STZ-D sıçan beyin korteksinde doğrudan aromataz enzim proteininin ölçüldüğü ve MAP/ERK/CREBP yolağı ile olası etkileşiminin sorgulandığı ilk çalışmadır.

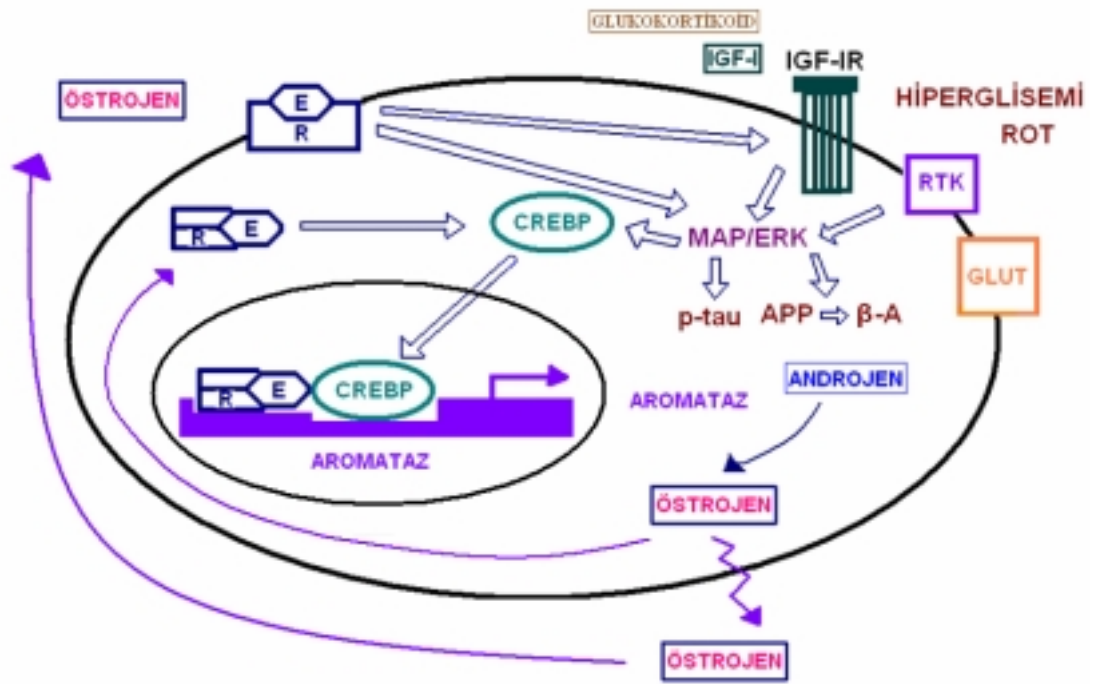
Gerçekleştirilen bu çalışmada 12 haftalık STZ-D sıçanların beyin kortekslerinde aromataz ekspresyonu ve p-ERK aktivitesinde artış gözlemlendi. Bu proteinlerin seviyeleri 4 ve 8 haftalık dönemde ise değişiklik göstermedi (bkz. Şekil 4.1 ve 4.3). 12 haftalık uzun dönem diyabetik deneklerin aromataz ve p-ERK seviyelerindeki artışın birbiriyle bağıntı göstermesi, ER'lerin IGF-IR gibi büyüme faktörü reseptörleri ile hücre içi etkileşme mekanizmasına yeni bir yaklaşım getirilmesine neden olmuştur. Bu çalışmada, Şekil 2.4'de belirtilen antiapoptotik

genlere, sinir koruyucu etki mekanizmasını da göz önünde bulundurarak aromataz geninin de eklenebileceği düşünülmektedir. Nitekim, aromataz *knock out* farelerin ön beyin kortekslerinde östrojen eksikliğine bağlı olarak apoptoz ve hücre kaybı gözlenmiş ve östrojenin bu etkisini sinir hücrelerinde antiapoptotik genlerin *up-regülasyonuna*, proapoptotik genlerin ise *down-regülasyonuna* neden olarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (5). Aromataz ekspresyonu sonucu sentezi artan östrojen ERX ya da ER α 'ya bağlanarak çekirdeğe geçebilir ve aromataz geni üzerinde kendine ait bağlanma bölgesine bağlanabilir. Bu iki etkinin sonucunda aromataz gen ekspresyonu 12 haftalık uzun dönem STZ-D deneklerde aromataz ve p-ERK seviyelerinin artışı şeklinde kendini gösterebilir. Bu artışın diyabetik beyin hücrelerinde MAP/ERK/CREBP yolağını aktive etmesi ve aktif CREBP'in çekirdeğe geçerek aromataz geni üzerinde bulunan CREARo bölgesine bağlanarak aromataz ekspresyonunu arttırması olasıdır. Sözü edilen bu yolak sıçan over granüloza hücrelerinde kanıtlanmıştır. MAP/ERK yolağıyla fosforile olan CREBP'in gen ekspresyonunda artışa neden olduğunun (67) ve aynı yolak üzerinden fosforile edilen ICER'in (CREBP düzenleyicisinin uyarılabilir baskılayıcı izoformu) aromataz gen ekspresyonunu baskıladığının gösterilmesi bu tezde kurulan hipotezi destekler niteliktedir (116).

Bu tez çalışmasında insülin tedavisi 12 haftalık diyabetik tedavi gruplarında p-ERK aktivasyonundaki ve aromataz ekspresyonundaki artışı önlemiştir (bkz. Şekil 4.2 ve 4.4). Diyabet için stres faktörü olan hipergliseminin p-ERK aktivitesi ve aromataz ekspresyonunu arttırdığı, insülin tedavisi sonrasında ise bu proteinlerin kontrol seviyelerine geri döndüğü gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak aromataz sentezi sonrası artışı öngörülen östradiolün, STZ-D sıçan beyin korteksinde MSS komplikasyonlarına karşı koruyucu ve dengeleyici rol oynayabileceği ileri sürülebilir. Ancak bu mekanizmalar 12 haftalık uzun periyotta ortaya çıkmaktadır. Bu da hasarın derecesi arttıkça savunma mekanizmasını oluşturan aromataz ekspresyonunda hasarı karşılamak için artış olduğunu düşündürmektedir. 4-8 haftalık kısa süreli diyabette ise hasarı kompanze edici adaptif mekanizmalar henüz ortaya çıkmamaktadır.

ERK1 aktivitesinin ve aromataz ekspresyonunun geç evrede ortaya çıkmasının nedenleri şunlar olabilir: Diyabette özellikle uzun dönemde IGF-IR

ekspresyonunda artış olmakta, bu artış reseptör aracılı MAP/ERK aktivitesini arttırmakta, aktif ERK (p-ERK) sitoplazmada CREBP aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktifleşen CREBP çekirdeğe geçerek aromataz geninde kendine ait CREaro bölgesine bağlanarak aromataz geninin transkripsiyonuna neden olmaktadır. Eksprese olan aromataz enzimi nedeniyle sentezi artan östrojen ERX'e bağlanarak çekirdeğe geçmektedir. Ayrıca çekirdekteki ER α 'ya da bağlanan östrojen, aromataz geninde kendine ait ERE'ye bağlanarak bu genin daha fazla transkripsiyonuna neden olmaktadır. (Şekil 5.1)



Şekil 5.1. Diyabetik beyin sinir hücresinde aromataz ve MAP/ERK/CREBP sinyal yollarının olası etkileşimi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması diyabetik sıçan beyin korteksinde aromataz ve p-ERK ekspresyon artışının ve bu artışın insülin tedavisi ile önlendiğinin gösterildiği ilk çalışmadır ve bu çalışmada şekil 2.4’de görülen beyin sinir hücresindeki klasik yolak mekanizmasına ek hipotetik yaklaşımlar getirilmiştir. Bu yaklaşım diyabette MAP/ERK/CREBP yolağı ile aktive olan antiapoptotik genlere aromataz geninin de dahil edilebileceği yönündedir. Aromatazın artışı androjenden östrojen sentezini de arttırmakta, artan östrojen ise bu yolağı potansiyelize etmektedir. Aromataz ile MAP/ERK/CREBP yolağının etkileşimi hasara karşı sinir hücrelerinin gösterdiği savunma mekanizması olarak yorumlanmıştır. Bu kompanzatuvar mekanizma akut dönem değil kronik dönem diyabette kendini göstermektedir.

İleride gerçekleştirilecek çalışmalarda bu olası etkileşim aynı ekstrelerde CREBP ve IGF-IR aktivasyonu gösterilerek aydınlatılabilir. Ayrıca MAP/ERK aracılığı ile aktifleşen CREBP’nin aromataz geni üzerine bağlanması ve bu bağlanmanın fonksiyonel olup olmadığının araştırılması da bu çalışmalara dahil edilebilir. Gelecekte, özellikle uzun dönemde DM ile AH arasındaki ilişki de göz önünde bulundurulduğunda diyabetik komplikasyonlardan biri olan sinir hücre hasarının önlenmesinde aromataz enziminin önemli bir hedef molekül olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1.Ozturk, Y., Altan, V.M.,Yildizoglu-Ari, N. (1996) Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev*, 48 (1), 69-112.
- 2.Mu, Y.M., Yanase, T., Nishi, Y., Waseda, N., Oda, T., Tanaka, A. ve diğ erleri. (2000) Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 271 (3), 710-713.
- 3.Kalyani, R.R.,Dobs, A.S. (2007) Androgen deficiency, diabetes, and the metabolic syndrome in men. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 14 (3), 226-234.
- 4.Wrighten, S.A., Piroli, G.G., Grillo, C.A.,Reagan, L.P. (2009) A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. *Biochim Biophys Acta*, 1792 (5), 444-453.
- 5.Zhao, Z., Ho, L., Wang, J., Qin, W., Festa, E.D., Mobbs, C. ve diğ erleri. (2005) Connective tissue growth factor (CTGF) expression in the brain is a downstream effector of insulin resistance- associated promotion of Alzheimer's disease beta-amyloid neuropathology. *FASEB J*, 19 (14), 2081-2082.
- 6.Irer, S.V., Alper, G. (2004) Experimental models of diabetes mellitus. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 127-136.
- 7.Mathis, D., Vence, L.,Benoist, C. (2001) beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414 (6865), 792-798.
- 8.Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., Tanaka, Y.,Takahashi, H. (2003) Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, 52 (3), 581-587.
- 9.Jimenez-Bonilla, J.F., Quirce, R., Hernandez, A., Vallina, N.K., Guede, C., Banzo, I. ve diğ erleri. (2001) Assessment of cerebral perfusion and cerebrovascular reserve in insulin-dependent diabetic patients without central neurological symptoms by means of 99mTc-HMPAO SPET with acetazolamide. *Eur J Nucl Med*, 28 (11), 1647-1655.
- 10.Hinokio, Y., Suzuki, S., Hirai, M., Chiba, M., Hirai, A.,Toyota, T. (1999) Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: its association with diabetic complications. *Diabetologia*, 42 (8), 995-998.
- 11.Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D. ve diğ erleri. (1996) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, 347 (8999), 444-445.
- 12.Rakieten, N., Rakieten, M.L.,Nadkarni, M.V. (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*, 29, 91-98.
- 13.Group, T.D.C.a.C.T.R. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. . *N Engl J Med*, 329 (14), 977-986.
- 14.Rosen, P., Nawroth, P.P., King, G., Moller, W., Tritschler, H.J.,Packer, L. (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev*, 17 (3), 189-212.

15. Greene, D.A., Lattimer, S.A., Sima, A.A. (1988) Pathogenesis and prevention of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Rev*, 4 (3), 201-221.
16. Brown, C.M., Marthol, H., Zikeli, U., Ziegler, D., Hilz, M.J. (2008) A simple deep breathing test reveals altered cerebral autoregulation in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 51 (5), 756-761.
17. Kannel, W.B. (1975) Diabetes and cardiovascular-disease-Framingham study. *American Journal of Cardiology*, 35 (1), 147-147.
18. Tuttolomondo, A., Pinto, A., Salemi, G., Di Raimondo, D., Di Sciacca, R., Fernandez, P. ve diğerleri. (2008) Diabetic and non-diabetic subjects with ischemic stroke: differences, subtype distribution and outcome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18 (2), 152-157.
19. DeJong, R.N. (1977) CNS manifestations of diabetes mellitus. *Postgrad Med*, 61 (1), 101-107.
20. Reske-Nielsen, E., Lundbaek, K. (1963) Diabetic Encephalopathy. Diffuse and Focal Lesions of the Brain in Long-Term Diabetes. *Acta Neurol Scand Suppl*, 39 (4), SUPPL4:273-290.
21. Reagan, L.P., Magarinos, A.M., McEwen, B.S. (1999) Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci*, 893, 126-137.
22. Djursing, H., Carstensen, L., Hagen, C., Andersen, A.N. (1984) Possible altered dopaminergic modulation of pituitary function in normal-menstruating women with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *Acta Endocrinol (Copenh)*, 107 (4), 450-455.
23. Malone, J.I., Hanna, S.K., Saporta, S. (2006) Hyperglycemic brain injury in the rat. *Brain Res*, 1076 (1), 9-15.
24. Wood, J.N. (2003) Social cognition and the prefrontal cortex. *Behav Cogn Neurosci Rev*, 2 (2), 97-114.
25. Magarinos, A.M., McEwen, B.S. (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, 69 (1), 89-98.
26. McEwen, B.S., Reagan, L.P. (2004) Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol*, 490 (1-3), 13-24.
27. Boyle, P.J., Nagy, R.J., O'Connor, A.M., Kempers, S.F., Yeo, R.A., Qualls, C. (1994) Adaptation in brain glucose uptake following recurrent hypoglycemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (20), 9352-9356.
28. Hall, J.L., Gonder-Frederick, L.A., Chewning, W.W., Silveira, J., Gold, P.E. (1989) Glucose enhancement of performance on memory tests in young and aged humans. *Neuropsychologia*, 27 (9), 1129-1138.
29. Reagan, L.P., Grillo, C.A., Piroli, G.G. (2008) The As and Ds of stress: metabolic, morphological and behavioral consequences. *Eur J Pharmacol*, 585 (1), 64-75.
30. Evangelia Tolia, I.P.F., Paul A.T. Kelly, Ian R. Whittle. (2005) The blood-brain barrier in diabetes mellitus: A critical review of clinical and experimental findings. *International Congress Series*, 1277, 244-256.
31. Baydas, G., Tuzcu, M., Yasar, A., Baydas, B. (2004) Early changes in glial reactivity and lipid peroxidation in diabetic rat retina: effects of melatonin. *Acta Diabetol*, 41 (3), 123-128.

32. Bernton, E., Hoover, D., Galloway, R., Popp, K. (1995) Adaptation to chronic stress in military trainees. Adrenal androgens, testosterone, glucocorticoids, IGF-1, and immune function. *Ann N Y Acad Sci*, 774, 217-231.
33. Schechter, R., Beju, D., Miller, K.E. (2005) The effect of insulin deficiency on tau and neurofilament in the insulin knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 334 (4), 979-986.
34. Huber, J.D. (2008) Diabetes, cognitive function, and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des*, 14 (16), 1594-1600.
35. Gasparini, L., Netzer, W.J., Greengard, P., Xu, H. (2002) Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci*, 23 (6), 288-293.
36. Gasparini, L., Gouras, G.K., Wang, R., Gross, R.S., Beal, M.F., Greengard, P. ve diğeri. (2001) Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci*, 21 (8), 2561-2570.
37. Hong, M., Lee, V.M. (1997) Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem*, 272 (31), 19547-19553.
38. Craft, S., Dagogo-Jack, S.E., Wiethop, B.V., Murphy, C., Nevins, R.T., Fleischman, S. ve diğeri. (1993) Effects of hyperglycemia on memory and hormone levels in dementia of the Alzheimer type: a longitudinal study. *Behav Neurosci*, 107 (6), 926-940.
39. Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., Dagogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y. ve diğeri. (1996) Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 17 (1), 123-130.
40. Bingham, E.M., Hopkins, D., Smith, D., Pernet, A., Hallett, W., Reed, L. ve diğeri. (2002) The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes*, 51 (12), 3384-3390.
41. Lukovits, T.G., Mazzone, T.M., Gorelick, T.M. (1999) Diabetes mellitus and cerebrovascular disease. *Neuroepidemiology*, 18 (1), 1-14.
42. Aragno, M., Brignardello, E., Tamagno, E., Gatto, V., Danni, O., Boccuzzi, G. (1997) Dehydroepiandrosterone administration prevents the oxidative damage induced by acute hyperglycemia in rats. *J Endocrinol*, 155 (2), 233-240.
43. Kumar, J.S., Menon, V.P. (1993) Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism*, 42 (11), 1435-1439.
44. Bradshaw, R.A., Blundell, T.L., Lapatto, R., McDonald, N.Q., Murray-Rust, J. (1993) Nerve growth factor revisited. *Trends Biochem Sci*, 18 (2), 48-52.
45. Herskowitz, I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*, 80 (2), 187-197.
46. Grinkevich, L.N., Lisachev, P.D., Baranova, K.A., Kharchenko, O.A. (2007) Comparative analysis of the activation of MAP/ERK kinases in the CNS of animals with different learning abilities. *Neurosci Behav Physiol*, 37 (7), 715-720.
47. Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., Thierfelder, W.E., Kreider, B. ve diğeri. (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci*, 19 (5), 222-227.

- 48.Ullrich, A.,Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61 (2), 203-212.
- 49.Blackshear, P.J., Haupt, D.M., App, H.,Rapp, U.R. (1990) Insulin activates the Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem*, 265 (21), 12131-12134.
- 50.Pelech, S.L.,Sanghera, J.S. (1992) MAP kinases: charting the regulatory pathways. *Science*, 257 (5075), 1355-1356.
- 51.Zhang, P., Wang, Y.Z., Kagan, E.,Bonner, J.C. (2000) Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J Biol Chem*, 275 (29), 22479-22486.
- 52.Roulston, A., Reinhard, C., Amiri, P.,Williams, L.T. (1998) Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*, 273 (17), 10232-10239.
- 53.Bogoyevitch, M.A., Boehm, I., Oakley, A., Ketterman, A.J.,Barr, R.K. (2004) Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*, 1697 (1-2), 89-101.
- 54.Blumer, K.J.,Johnson, G.L. (1994) Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem Sci*, 19 (6), 236-240.
- 55.Schechter, R., Yanovitch, T., Abboud, M., Johnson, G., 3rd,Gaskins, J. (1998) Effects of brain endogenous insulin on neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures. *Brain Res*, 808 (2), 270-278.
- 56.Davis, S.,Laroche, S. (2006) Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav*, 5 Suppl 2, 61-72.
- 57.Samuels, I.S., Saitta, S.C.,Landreth, G.E. (2009) MAP'ing CNS development and cognition: an ERKsome process. *Neuron*, 61 (2), 160-167.
- 58.Goldin, M.,Segal, M. (2003) Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 17 (12), 2529-2539.
- 59.Atkins, C.M., Selcher, J.C., Petraitis, J.J., Trzaskos, J.M.,Sweatt, J.D. (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci*, 1 (7), 602-609.
- 60.Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J.,Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270 (5240), 1326-1331.
- 61.Herdegen, T., Claret, F.X., Kallunki, T., Martin-Villalba, A., Winter, C., Hunter, T. ve diğ erleri. (1998) Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci*, 18 (14), 5124-5135.
- 62.Kaplan, D.R.,Miller, F.D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10 (3), 381-391.
- 63.Tsuji, M., Inanami, O.,Kuwabara, M. (2000) Neuroprotective effect of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrone in gerbil hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway and heat shock proteins. *Neurosci Lett*, 282 (1-2), 41-44.
- 64.Stevis, P.E., Deecher, D.C., Suhadolnik, L., Mallis, L.M.,Frail, D.E. (1999) Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology*, 140 (11), 5455-5458.

- 65.Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R.,Grohe, C. (2000) Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem*, 275 (24), 18447-18453.
- 66.Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, K.M., Harris, K.M.,Greenberg, M.E. (1997) CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19 (5), 1031-1047.
- 67.Kornhauser, J.M.,Greenberg, M.E. (1997) A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron*, 18 (6), 839-842.
- 68.Orban, P.C., Chapman, P.F.,Brambilla, R. (1999) Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation? *Trends Neurosci*, 22 (1), 38-44.
- 69.Azcoitia, I., Doncarlos, L.L.,Garcia-Segura, L.M. (2002) Estrogen and brain vulnerability. *Neurotox Res*, 4 (3), 235-245.
- 70.Middlemas, A., Delcroix, J.D., Sayers, N.M., Tomlinson, D.R.,Fernyhough, P. (2003) Enhanced activation of axonally transported stress-activated protein kinases in peripheral nerve in diabetic neuropathy is prevented by neurotrophin-3. *Brain*, 126 (Pt 7), 1671-1682.
- 71.Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y. ve diğ erleri. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404 (6779), 787-790.
- 72.Simpson, E.R., Zhao, Y., Agarwal, V.R., Michael, M.D., Bulun, S.E., Hinshelwood, M.M. ve diğ erleri. (1997) Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res*, 52, 185-213; discussion 213-184.
- 73.Balthazart, J.,Ball, G.F. (1998) New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci*, 21 (6), 243-249.
- 74.Naftolin, F., Ryan, K.J.,Petro, Z. (1971) Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human fetuses. *J Endocrinol*, 51 (4), 795-796.
- 75.Stoffel-Wagner, B. (2003) Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci*, 1007, 64-78.
- 76.Balthazart, J., Foidart, A., Surlemont, C.,Harada, N. (1991) Distribution of aromatase-immunoreactive cells in the mouse forebrain. *Cell Tissue Res*, 263 (1), 71-79.
- 77.Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S., Honda, S., Harada, N.,Garcia-Segura, L.M. (2001) Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol*, 47 (4), 318-329.
- 78.Yilmaz, M.B., Wolfe, A., Cheng, Y.H., Glidewell-Kenney, C., Jameson, J.L.,Bulun, S.E. (2009) Aromatase Promoter I.f is Regulated by Estrogen Receptor Alpha (ESR1) in Mouse Hypothalamic Neuronal Cell Lines. *Biol Reprod*.
- 79.Lavaque, E., Mayen, A., Azcoitia, I., Tena-Sempere, M.,Garcia-Segura, L.M. (2006) Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450scc, and aromatase in the olivocerebellar system. *J Neurobiol*, 66 (3), 308-318.
- 80.Chen, S., Zhou, D., Okubo, T., Kao, Y.C.,Yang, C. (1999) Breast tumor aromatase: functional role and transcriptional regulation. *Endocr Relat Cancer*, 6 (2), 149-156.

- 81.Chen, S., Ye, J., Kijima, I., Kinoshita, Y.,Zhou, D. (2005) Positive and negative transcriptional regulation of aromatase expression in human breast cancer tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 95 (1-5), 17-23.
- 82.Garcia-Segura, L.M., Wozniak, A., Azcoitia, I., Rodriguez, J.R., Hutchison, R.E.,Hutchison, J.B. (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*, 89 (2), 567-578.
- 83.Peterson, R.S., Saldanha, C.J.,Schlinger, B.A. (2001) Rapid upregulation of aromatase mRNA and protein following neural injury in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Neuroendocrinol*, 13 (4), 317-323.
- 84.Negri-Cesi, P., Poletti, A.,Celotti, F. (1996) Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5alpha-reductase and aromatase in brain differentiation and functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 58 (5-6), 455-466.
- 85.Hutchison, J.B., Wozniak, A., Beyer, C.,Hutchison, R.E. (1996) Regulation of sex-specific formation of oestrogen in brain development: endogenous inhibitors of aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 56 (1-6 Spec No), 201-207.
- 86.Minano, A., Xifro, X., Perez, V., Barneda-Zahonero, B., Saura, C.A.,Rodriguez-Alvarez, J. (2008) Estradiol facilitates neurite maintenance by a Src/Ras/ERK signalling pathway. *Mol Cell Neurosci*, 39 (2), 143-151.
- 87.Tremere, L.A., Jeong, J.K.,Pinaud, R. (2009) Estradiol shapes auditory processing in the adult brain by regulating inhibitory transmission and plasticity-associated gene expression. *J Neurosci*, 29 (18), 5949-5963.
- 88.Beyer, C. (1999) Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol (Berl)*, 199 (5), 379-390.
- 89.Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- 90.Huber, J.D., VanGilder, R.L.,Houser, K.A. (2006) Streptozotocin-induced diabetes progressively increases blood-brain barrier permeability in specific brain regions in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291 (6), H2660-2668.
- 91.Ohyama, T., Sato, M., Niimi, M., Hizuka, N.,Takahara, J. (1997) Effects of short- and long-term dexamethasone treatment on growth and growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH)-GH-insulin-like growth factor-I axis in conscious rats. *Endocr J*, 44 (6), 827-835.
- 92.Gispen, W.H.,Biessels, G.J. (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci*, 23 (11), 542-549.
- 93.Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D. ve diğ erleri. (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (9), 3100-3105.
- 94.Brands, A.M., Biessels, G.J., de Haan, E.H., Kappelle, L.J.,Kessels, R.P. (2005) The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 28 (3), 726-735.
- 95.Ryan, C.M., Williams, T.M., Orchard, T.J.,Finegold, D.N. (1992) Psychomotor slowing is associated with distal symmetrical polyneuropathy in adults with diabetes mellitus. *Diabetes*, 41 (1), 107-113.

96. Ryan, C.M., Geckle, M.O., Orchard, T.J. (2003) Cognitive efficiency declines over time in adults with Type 1 diabetes: effects of micro- and macrovascular complications. *Diabetologia*, 46 (7), 940-948.
97. Roselli, C.F. (2007) Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 106 (1-5), 143-150.
98. Stamatakis, K.E., Spina, J., Rangou, D.B., Chlouverakis, C.S., Piaditis, G.P. (1996) Ovarian function in women with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 45 (5), 615-621.
99. McRobie, D.J., Korzekwa, K.R., Glover, D.D., Tracy, T.S. (1997) The effects of diabetes on placental aromatase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 63 (1-3), 147-153.
100. Garzo, V.G., Dorrington, J.H. (1984) Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin. *Am J Obstet Gynecol*, 148 (5), 657-662.
101. Nestler, J.E. (1993) Regulation of the aromatase activity of human placental cytotrophoblasts by insulin, insulin-like growth factor-I, and -II. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 44 (4-6), 449-457.
102. Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*, 63 (1), 29-60.
103. Wise, P.M. (2002) Estrogens and neuroprotection. *Trends Endocrinol Metab*, 13 (6), 229-230.
104. Bisagno, V., Bowman, R., Luine, V. (2003) Functional aspects of estrogen neuroprotection. *Endocrine*, 21 (1), 33-41.
105. Green, P.S., Bishop, J., Simpkins, J.W. (1997) 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci*, 17 (2), 511-515.
106. Rune, G.M., Frotscher, M. (2005) Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience*, 136 (3), 833-842.
107. Paganini-Hill, A., Henderson, V.W. (1996) Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med*, 156 (19), 2213-2217.
108. Schonknecht, P., Pantel, J., Klinga, K., Jensen, M., Hartmann, T., Salbach, B. ve diğlerleri. (2001) Reduced cerebrospinal fluid estradiol levels are associated with increased beta-amyloid levels in female patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 307 (2), 122-124.
109. Chowen, J.A., Torres-Aleman, I., Garcia-Segura, L.M. (1992) Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology*, 56 (6), 895-901.
110. Chen, J., Adachi, N., Liu, K., Arai, T. (1998) The effects of 17beta-estradiol on ischemia-induced neuronal damage in the gerbil hippocampus. *Neuroscience*, 87 (4), 817-822.
111. Dubal, D.B., Shughrue, P.J., Wilson, M.E., Merchenthaler, I., Wise, P.M. (1999) Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*, 19 (15), 6385-6393.
112. Behl, C., Holsboer, F. (1999) The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. *Trends Pharmacol Sci*, 20 (11), 441-444.
113. Garcia-Segura, L.M., Cardona-Gomez, G.P., Chowen, J.A., Azcoitia, I. (2000) Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *J Neurocytol*, 29 (5-6), 425-437.

114. Ma, Z.Q., Santagati, S., Patrone, C., Pollio, G., Vegeto, E., Maggi, A. (1994) Insulin-like growth factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3. *Mol Endocrinol*, 8 (7), 910-918.
115. Singh, M., Setalo, G., Jr., Guan, X., Warren, M., Toran-Allerand, C.D. (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci*, 19 (4), 1179-1188.
116. Morales, V., Gonzalez-Robayna, I., Santana, M.P., Hernandez, I., Fanjul, L.F. (2006) Tumor necrosis factor- α activates transcription of inducible repressor form of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-responsive element binding modulator and represses P450 aromatase and inhibin α -subunit expression in rat ovarian granulosa cells by a p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Endocrinology*, 147 (12), 5932-5939.