



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL DİYABETTE TXNIP İNHİBİTÖRÜNÜN BİLİŞSEL
PERFORMANS ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mutlu Can ASLANPAY

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. CAN DEMİREL

Gaziantep

2025



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL DİYABETTE TXNIP İNHİBİTÖRÜNÜN BİLİŞSEL
PERFORMANS ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mutlu Can ASLANPAY

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Can DEMİREL

Gaziantep

2025

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

DENEYSEL DİYABETTE TXNIP İNHİBİTÖRÜNÜN BİLİŞSEL
PERFORMANS ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mutlu Can ASLANPAY

Tez Savunma Tarihi: 24.07.2025

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Davut Sinan KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tez Danışmanı

Prof. Dr. Can DEMİREL
II. Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Prof. Dr. Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ

Prof. Dr. Muradiye NACAĞ

Prof. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN

Dr. Öğr. Üyesi Murat KORKMAZ

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

24.07.2025

Mutlu Can ASLANPAY



TEŞEKKÜR

Öncelikle, doktora süresi boyunca bilgisi, sabrı, bilgi birikimleri ve yol göstericiliğiyle bana destek olan danışmanlarım Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI ve Prof. Dr. Can DEMİREL'e en derin minnetlerimi ifade ederim.

Tez çalışmamın ilerleyişini değerlendiren, ihtiyacım olduğu her zaman tecrübeleriyle yardım ve desteklerini esirgemeyen tez izleme komitesindeki hocalarım sayın Prof. Dr. Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ ve Prof. Dr. Muradiye NACAĞ'a teşekkürü borç bilirim.

Her zaman varlıklarımı yanımda hissettiğim sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.DT.23.05 numaralı proje ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR VE SEMBOLLER	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 Diyabet Tanımı ve Etiyolojisi.....	6
2.2 Diyabet ve Bilişsel Performans İlişkisi	9
2.3 Diyabet Kaynaklı Bilişsel İşlev Bozukluğunun Moleküler Mekanizmaları ..	10
2.3.1 Endoplazmik Retikulum stresi.....	11
2.3.2 İnflamasyon	15
2.3.3 Tiyoredoksin Etkileşimli Protein (TXNIP).....	18
1.1.4. Nöral Hücre Kaybı ve Bilişsel Gerileme	26
2.4 Diyabet Tedavisinde TXNIP'in Farmakolojik Düzenlenmesi	27
2.4.1 Verapamil	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1 Gereç	30
3.1.1 Çalışmada kullanılan deney hayvanları.....	30
3.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	30
3.1.3 Çalışmada kullanılan Cihazlar	32
3.2 Yöntem.....	34
3.2.1 Hayvan deneyleri	34
3.2.1.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması	34
3.2.1.2 Hayvanların beslenme ve bakımı	34
3.2.1.3 STZ enjeksiyonu ile diyabetin indüklenmesi.....	35
3.2.1.4 Hayvan ağırlıkları tartımı ve kan şekeri ölçümü	35
3.2.1.5 Verapamil uygulaması	35
3.2.1.6 Öğrenme deneyleri	35

3.2.1.7	Hayvan deneylerinin sonlandırılması	37
3.2.2	Moleküler genetik analizler	37
3.2.2.1	Total RNA (mRNA) eldesi	37
3.2.2.2	Total RNA'nın miktar ve kalite tayini.....	38
3.2.2.3	mRNA'dan cDNA eldesi	38
3.2.2.4	Primer seçimi	40
3.2.2.5	qRT-PCR	40
3.2.3	Western blotting	42
3.2.3.1	Doku homojenizasyonu ve protein izolasyonu	42
3.2.3.2	Elde edilen proteinlerin miktar ve kalite tayini.....	42
3.2.3.3	Protein konsantrasyonlarının eşitlenmesi ve protein denatürasyonu .	43
3.2.3.4	SDS-PAGE hazırlanması ve jel elektroforezi.....	43
3.2.3.5	Proteinlerin membrana transferi.....	45
3.2.3.6	Membranın bloklanması	45
3.2.3.7	Primer antikor ile işaretleme	46
3.2.3.8	Sekonder antikor ile işaretleme	46
3.2.3.9	Görüntüleme ve analiz	46
3.2.4	İstatistiksel analiz	47
4.	BULGULAR	48
4.1	Hayvan Deneyleri	48
4.1.1	STZ enjeksiyonu ile diyabetin indüklenmesi.....	48
4.1.2	Hayvanların ağırlık değişimi ve kan glukoz düzeylerinin belirlenmesi .	49
4.1.3	Öğrenme Deneyleri	51
4.1.3.1	İlk öğrenme deneyi.....	51
4.1.3.1.1	İlk probe deneme ısı haritası sonuçları	53
4.1.3.2	Son öğrenme deneyi	56
4.1.3.2.1	Son probe ısı haritası sonuçları	58
4.2	Moleküler Genetik Analizler	62
4.2.1	Gen İfadesi analizi sonuçlar.....	62
4.2.1.1	ER stres ile ilişkili genlerin ifadelerinin analizleri.....	62
4.2.1.2	İnflamasyon ile ilişkili genlerin ifadelerinin analizleri	65
4.2.1.3	TXNIP gen ifadesinin analizi.....	69
4.2.1.4	Apoptoz ile ilişkili genlerin ifadelerinin analizi.....	70

4.2.2	Western Blot	73
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	78
	KAYNAKLAR.....	83
	EKLER	95
	ÖZGEÇMİŞ.....	96



KISALTMALAR VE SEMBOLLER

DM	Diabetes Mellitus
STZ	Streptozotosin
TXNIP	Tiyoredoksin etkileşimli protein
ER	Endoplazmik retikulum
NOD	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein
NLRP3	NOD benzeri pirin alanı içeren protein
T1DM	Tip 1 diabetes mellitus
HLA	İnsan lökosit antijeni
CAR	Coxsackievirus ve adenovirüs reseptörü
T2DM	Tip 2 diabetes mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
AGE	İleri glikozilasyon son ürünü
KBB	Kan beyin bariyeri
UPR	Katlanmamış protein tepkisi
ERAD	ER ile ilişkili protein bozunması
PKR	protein kinaz R
PERK	PKR benzeri ER kinazı
IRE1 α	İnositol gerektiren enzim 1 α
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
EIF2A	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2A
ATF4	Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
PP1	Protein fosfataz 1
GADD34	Büyüme durması ve DNA hasarına neden olan protein
XBP1	X-box bağlayıcı protein 1
RIDD	Düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozunma
miRNA	MikroRNA
RNA	Ribonükleik asit
MAPK	Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
bZIP	Temel lösin fermuar alanı
C/EBP	CCAAT/güçlendirici bağlayıcı protein
CHOP	C/EBP homolog protein

TNF- α	Tümör nekroz faktörü alfa
CARD	kaspaz aktivasyonu ve alım bölgeleri
ASC	Apoptozisle ilişkili CARD içeren leke benzeri protein
PYD	Pirin alanı
LRR	lösin açısından zengin tekrar
IL-1 β	İnterlökin 1 beta
NF- κ B	Nükleer faktör kappa B
GSDMD	Gasdermin D
IL-18	İnterlökin 18
IL-6	İnterlökin 6
MSS	Merkezi sinir sistemi
mtDNA	Mitokondriyal DNA
K ⁺	Potasyum
TRX	Tiyoredoksin
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
ROS	Reaktif oksijen türleri
GLUT	Glikoz taşıyıcı
AKT	Protein Kinaz B
ASK1	Apoptozis sinyalini düzenleyen kinaz 1
NO	Nitrik oksit
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
ChREBP	Karbonhidrat yanıt elemanı bağlayıcı protein
GFAP	Glial fibriller asidik
KKB	Kalsiyum kanal blokeri
FDA	ABD gıda ve ilaç dairesi
EMA	Avrupa ilaç ajansı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 ER'den başlatılan başlıca UPR yolları. (18).....	12
Şekil 2.2 Hiperglisemiye bağlı NLRP3 inflamatuvar aktivasyonu (79)	17
Şekil 2.3 TXNIP'in stres koşulları altına çekirdekten mitokondriye yer değiştirmesi ve apoptozis (102).....	20
Şekil 2.4 TXNIP'in çeşitli hastalıkların gelişimindeki rolü. (106).....	21
Şekil 2.5 TXNIP sinyallemesinin yukarı akış medyatörleri (106).....	22
Şekil 3.1 Deneysel hayvanların sakrifikasyonu ve hipokampus dokusunun izolasyonu	37
Şekil 4.1 Stz enjeksiyonundan 72 saat sonra grupların kan glukoz düzeyi ortalamaları	48
Şekil 4.2 Zamana bağlı vücut ağırlığı değişim grafiği	49
Şekil 4.3 Zamana bağlı kan glukoz düzeyi değişim grafiği.....	50
Şekil 4.4 İlk öğrenme deneyi	51
Şekil 4.5 İlk probe deneme	52
Şekil 4.6 K grubu ısı haritası.....	53
Şekil 4.7 KG grubu ısı haritası.....	53
Şekil 4.8 KV grubu ısı haritası.....	54
Şekil 4.9 D grubu ısı haritası.....	54
Şekil 4.10 DG grubu ısı haritası.....	55
Şekil 4.11 DV grubu ısı haritası.....	55
Şekil 4.12 Son öğrenme deneyi.....	57
Şekil 4.13 Son probe deneme.....	57
Şekil 4.14 K grubu ısı haritası.....	59
Şekil 4.15 KG grubu ısı haritası.....	59
Şekil 4.16 KV grubu ısı haritası.....	60
Şekil 4.17 D grubu ısı haritası.....	60
Şekil 4.18 DG grubu ısı haritası.....	61

Şekil 4.19 DV grubu ısı haritası.....	61
Şekil 4.20 GRP78 log ₂ kat değişim grafiği.....	62
Şekil 4.21 ATF6 log ₂ kat değişim grafiği.....	63
Şekil 4.22 IRE1 α log ₂ kat değişim grafiği.....	64
Şekil 4.23 NF- κ B log ₂ kat değişim grafiği.....	65
Şekil 4.24 NLRP3 log ₂ kat değişim grafiği.....	66
Şekil 4.25 IL-1 β log ₂ kat değişim grafiği.....	67
Şekil 4.26 IL-18 log ₂ kat değişim grafiği.....	68
Şekil 4.27 TXNIP log ₂ kat değişim grafiği.....	69
Şekil 4.28 Bax log ₂ kat değişim grafiği.....	70
Şekil 4.29 Bcl-2 log ₂ kat değişim grafiği.....	71
Şekil 4.30 Kaspaz-3 log ₂ kat değişim grafiği.....	72
Şekil 4.31 Gruplara ait proteinlerin düzeylerinin western blot görüntüleri.....	73
Şekil 4.32 Gruplara ait GRP78'in dansitometrik analizi.....	74
Şekil 4.33 Gruplara ait TXNIP'in dansitometrik analizi.....	75
Şekil 4.34 Gruplara ait Kaspaz-3'ün dansitometrik analizi.....	76
Şekil 4.35 Gruplara ait IL-1 β 'nin dansitometrik analizi.....	77

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1 Öğrenme deneyinde sıçanların suya atış noktaları (65).....	36
Tablo 3.2 cDNA tepkime bileşenleri ve hacimleri.....	39
Tablo 3.3 Ters transkripsiyon tepkime koşulları.....	39
Tablo 3.4 qRT-PCR’da kullanılan primer assayleri.....	40
Tablo 3.5 qRT-PCR reaksiyon hacimleri ve bileşenleri.....	41
Tablo 3.6 Önerilen qRT-PCR döngü protokolü.....	41
Tablo 3.7 Yürütme jeli (%10) formülasyonu.....	44
Tablo 3.8 İstifleme jeli (%4) formülasyonu.....	44
Tablo 4.1 Grupların son öğrenme deneyindeki ortalama platforma kaçış süreleri	56
Tablo 4.2 Grupların son probe denemesinde ortalama platforma kaçış süreleri	58

ÖZET

DENEYSEL DİYABETTE TXNIP İNHİBİTÖRÜNÜN BİLİŞSEL PERFORMANS ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mutlu Can ASLANPAY

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İkinci Tez danışmanı: Prof. Dr. Can DEMİREL

Temmuz 2025, 94 Sayfa

Amaç: Diyabet, metabolik ve inflamatuvar stresin neden olduğu bilişsel gerileme ve nöronal hasarla ilişkilidir. TXNIP, tiyoredoksinle etkileşerek, oksidatif stresi artıran ve NLRP3 inflamasyonunu tetikleyen strese duyarlı bir moleküldür. TXNIP'in aşırı ekspresyonu bilişsel fonksiyon bozuklukları ile bağlantılıdır. Bu çalışmada, deneysel diyabette verapamil tedavisi ile TXNIP inhibisyonu sonucunda hipokampusta ER stresi, inflamasyon ve apoptoz mekanizmalarındaki değişimler ve bunların bilişsel performans üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. **Yöntem:** Araştırmada, Her grupta 10 adet olmak üzere 60 adet Wistar albino sıçan kullanıldı. Rastgele seçilen çalışma grupları; Kontrol, Kontrol+Gavaj, Kontrol+Verapamil, Diyabet, Diyabet+Gavaj ve Diyabet+Verapamil olarak düzenlendi. Diyabet modeli, tek doz 40 mg/kg intraperitoneal streptozotosin uygulaması ile yapıldı ve hayvanlara 12 hafta verapamil (oral gavaj ile 10 mg/kg/gün) verildi. Bilişsel performans, Morris su labirenti kullanılarak 0. ve 12. haftada değerlendirildi. Sıçanlardan elde edilen hipokampus dokularında ER stresi, inflamasyon ve apoptoz ilişkili genler ile TXNIP gen ve protein düzeyinde analiz edildi. Veriler Prism10.5.0 kullanılarak analiz edildi. **Bulgular:** Öğrenme deneyinin sonunda diyabetik sıçanlarda bilişsel performansta kontrol grubuna kıyasla gerileme olduğu saptandı ($p<0,0001$). Diyabetik kontrol grubunda verapamil ile tedavi edilen gruba kıyasla hipokampusta gen ve protein düzeyinde TXNIP ekspresyonunda artış ve buna bağlı olarak yükselmiş ER stresi, inflamasyon ve apoptozu indükleyen parametrelerde artış olduğu saptandı ($p<0,0001$). **Tartışma ve Sonuç:** Verapamil tedavisi diyabetik sıçanlarda hiperglisemi düzeylerini azaltarak bilişsel performansı iyileştirmiştir. Başlangıçta tüm grupların bilişsel performansının benzer olması, sonuçların tedaviye özgü olduğunu göstermektedir. Tedavi gruplarında TXNIP gen ifadesinin baskılanmış olduğu durumda, inflamatuvar yanıt, ER stres ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinde azalmalar saptanmıştır. Protein analiz sonuçları bu bulguları desteklemiştir. Sonuç olarak verapamil TXNIP aracılı hücresel stres yollarını modüle ederek diyabette bilişsel fonksiyon bozukluklarının tedavisinde terapötik bir ajan olma potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar Sözcükler: Diyabet, TXNIP, Verapamil, Bilişsel fonksiyon bozukluğu

ABSTRACT

INVESTIGATION of the EFFECT of TXNIP INHIBITOR on COGNITIVE PERFORMANCE in EXPERIMENTAL DIABETES

Mutlu Can ASLANPAY

PhD Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sibel OGUZKAN BALCI

Second Supervisor: Prof. Dr. Can DEMIREL

July 2025, 94 Pages

Objective: Diabetes is associated with cognitive decline and neuronal damage caused by metabolic and inflammatory stress. TXNIP is a stress-sensitive molecule that interacts with thioredoxin to increase oxidative stress and trigger the NLRP3 inflammasome. Overexpression of TXNIP is associated with cognitive dysfunction. This study aimed to investigate the changes in ER stress, inflammation, and apoptosis mechanisms in the hippocampus following verapamil treatment and TXNIP inhibition in experimental diabetes and their effects on cognitive performance. **Method:** In the study, 60 Wistar albino rats, 10 in each group, were used. Randomly selected study groups were assigned as Control, Control+Gavage, Control+Verapamil, Diabetes, Diabetes+Gavage, and Diabetes+Verapamil. The diabetes model was induced by a single dose of 40 mg/kg intraperitoneal streptozotocin, and the animals received verapamil (10 mg/kg/day by oral gavage) for 12 weeks. Cognitive performance was assessed using the Morris water maze at weeks 0 and 12. ER stress, inflammation, and apoptosis-related genes, as well as TXNIP, were analyzed at the gene and protein levels in hippocampus tissues obtained from rats. Data were analyzed using Prism10.5.0. **Results:** At the end of the learning experiment, cognitive performance was found to be deteriorated in diabetic rats compared to the control group ($p < 0.0001$). In the diabetic control group, there was an increase in TXNIP expression at the gene and protein levels in the hippocampus compared to the verapamil-treated group, and consequently, an increase in parameters that induce ER stress, inflammation, and apoptosis ($p < 0.0001$). **Discussion and Conclusion:** Verapamil treatment improved cognitive performance by reducing hyperglycemia levels in diabetic rats. The similarity of cognitive performance across all groups at baseline suggests that the results were treatment-specific. In the treatment groups, when TXNIP gene expression was suppressed, decreased expression levels of genes related to the inflammatory response, ER stress, and apoptosis were observed. Protein analysis results supported these findings. In conclusion, verapamil has the potential to be a therapeutic agent in the treatment of cognitive dysfunction in diabetes by modulating TXNIP-mediated cellular stress pathways.

Key words: Diabetes, TXNIP, Verapamil, Cognitive dysfunction

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), yalnızca periferik komplikasyonlara (retinopati, nefropati, nöropati) neden olmakla kalmayıp aynı zamanda merkezi sinir sistemini de olumsuz etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, kronik hipergliseminin bilişsel işlevi, özellikle de uzamsal hafızayı bozduğunu göstermektedir. Hipokampus, hafıza oluşumu için kritik öneme sahiptir ve diyabetik modellerde sıklıkla hipokampus dokusunda sinaptik fonksiyonların bozulması ve nöron kaybı görülmektedir. Streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda hipokampus dejenerasyonu ve apoptozis artışına bağlı olarak öğrenme ve bellek işlevlerinde gerileme olduğu ortaya konmuştur (1). Benzer şekilde, Morris su labirenti ile yapılan bilişsel fonksiyon testleri; diyabetli kemirgenlerin kontrollere kıyasla bilişsel performanslarının düştüğünü ve bunun da uzamsal bellek bozukluğu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bilişsel fonksiyonlardaki gerileme, oksidatif stresi, ileri glikasyon son ürünlerini ve nöroinflamasyonu yönlendiren kronik hiperglisemi ile ilişkilidir (1, 2).

Diyabette metabolik stres ile nöroinflamasyon arasındaki temel bağlantı, tiyoredoksinle etkileşimli protein (TXNIP) ile kurulmaktadır. TXNIP, indirgenmiş tiyoredoksini bağlayan ve antioksidan işlevini inhibe eden, böylece reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini teşvik eden glikoz ve stresle indüklenebilir bir proteindir (3). Yüksek glikoz ve endoplazmik retikulum (ER) stresi varlığında TXNIP ekspresyonunda artış meydana gelir bu da inflamatuvar süreçleri yönlendirir. Özellikle TXNIP, NOD benzeri reseptör pirin alanı içeren-3 (NLRP3) inflamazomuna doğrudan bağlanır ve onu aktive ederek pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini ve piroptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. Ayrıca TXNIP aracılı oksidatif stres ve inflamasyon nöronal apoptoz ve sinaptik disfonksiyonun gelişimine katkıda bulunmaktadır. TXNIP, yüksek glikoz koşulları altında hipokampal ER stresi ve apoptoz aracılı metabolik ve bilişsel fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (3, 4).

Birçok çalışma, TXNIP'i diyabetle ilişkili sinir hasarının merkezi bir aracısı olarak vurgulamaktadır. Diyabette artmış TNXIP ekspresyonu doku hasarına bağlı olarak gelişen diyabet komplikasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Diyabetik hayvan modelinde TXNIP veya onunla ilişkili yolaklarının baskılanması ile bilişsel işlev bozukluğunun iyileştirildiği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, TXNIP'i baskılayan antioksidan bileşikler ve NLRP3 inhibitörlerinin hipokampal ER stresini ve nöroinflamasyonu azalttığı ve daha iyi hafıza performansına yol açtığı gösterilmiştir (4, 5) Bu bulgular, diyabet kaynaklı TXNIP ekspresyonundaki artışın, nöral hasarlarda itici bir faktör olduğunu ve diyabete bağlı bilişsel fonksiyon bozukluğunda TXNIP'in tedavi hedefi olabileceğini işaret etmektedir (6).

İyi bilinen bir L tipi kalsiyum kanal blokeri olan Verapamil, TXNIP ekspresyonunun bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Verapamil'in diyabetik dokularda TXNIP seviyelerini azaltarak hücreleri yüksek glikoz toksisitesinden koruduğu gösterilmiştir. Diyabet ve metabolik stres modellerinde verapamil tedavisinin, TXNIP ekspresyonunu azaltarak pankreas β -hücresi işlevini koruduğu ve kan glikozu seviyesini düşürdüğü saptanmıştır (7) Verapamil tedavisinin periferik nöronlarda TXNIP aracılı apoptozu önleyerek diyabetik nöropatiyi de geriletmediği gösterilmiştir (8). Başka bir çalışmada beyin hasarı durumunda verapamil tedavisinin, beyindeki TXNIP ekspresyonunu ve NLRP3 inflamazom aktivasyonunu azalttığı ve bunun sonucunda bilişsel ve motor fonksiyonlarda iyileşme olduğu bulunmuştur (9).

Çalışmamız, diyabet modelinde verapamil ile TXNIP inhibisyonunun bilişsel performans üzerindeki etkisini araştırmak üzere tasarlanmıştır. Yetişkin erkek sıçanlarda tek doz intraperitoneal streptozotosin (40 mg/kg) ile tip-1 diyabet oluşturduk. Diyabetik ve diyabetik olmayan (kontrol) sıçanlar daha sonra 12 hafta boyunca verapamil (gavaj ile 10 mg/kg/gün) veya taşıyıcı ile tedavi edildi. Bunun sonucunda altı deney grubu oluştu: kontrol, kontrol+gavaj, kontrol+verapamil, diyabet, diyabet+gavaj ve diyabet+verapamil. Tedavi periyodunun sonunda bilişsel işlev, sıçanlarda uzamsal öğrenme ve hafızanın standart bir testi olan Morris su labirenti kullanılarak değerlendirildi. Öğrenme deneylerinden sonra TXNIP seviyelerinin ve ER stresi, inflamasyon ve apoptoz belirteçleri hipokampus dokusunda “real time PCR” ve “Western blot” yöntemleri kullanılarak gen ve protein düzeylerinde analiz edildi. Verapamil ile tedavi edilen diyabetik sıçanların tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlara kıyasla daha düşük hipokampal TXNIP ekspresyonu, azalmış nöroinflamasyon, ER stresi ve nöral hücre kayıplarının gelişmiş öğrenme/hafıza ile ilişkili olacağını varsaydık. Özetle, bu çalışma kronik TXNIP inhibisyonunun diyabetle ilişkili bilişsel gerileme üzerindeki etkisini, hipokampal ER stresi, nöroinflamasyon ve nöronal sağkalım üzerine odaklanarak incelemektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Diyabet Tanımı ve Etiyolojisi

Modern dünyada sık görülen hastalıklardan biri, genetik ve çevresel değişiklikler de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden kaynaklanan DM'dir (10). Diyabet, insülin salgılanması ve/veya aksiyonundaki kusurlardan kaynaklanan kronik hiperglisemi ile karakterize bir metabolik hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır (11). Bu kronik metabolik hastalık, modern dünyadaki değişen yaşam tarzı ile önümüzdeki yıllarda artan bir eğilime sahip gibi görünmektedir. Sürekli hiperglisemi, mikrovasküler hastalık (diyabetik retinopati, nefropati ve nöropati gibi) ve aterosklerotik makrovasküler hastalık (kardiyovasküler, serebrovasküler ve diğer periferik vasküler hastalıklar) dahil olmak üzere panvasküler hastalık riskini artırarak çeşitli organ hasarlarına neden olabilir (12).

Diyabetin hem epidemiyolojik hem de etiyolojik açıdan farklılık gösteren tip 1 ve tip 2 diyabet olarak iki yaygın formu bulunmaktadır. Tip 1 diyabette (T1DM), pankreastaki β hücrelerinin otoimmün T hücresi aracılı yıkımı insülin eksikliğine neden olur. Genom çapında çalışmalar HLA genlerinin T1DM'nin genetik riskinin %50'sine kadarını oluşturduğunu doğrulamıştır (özellikle HLA sınıf II lokusları), bu da spesifik otoantijen peptitlerinin seçici sunumunun T1DM'nin patogenezinde rol oynadığını göstermektedir (13, 14). Ayrıca meta-analizler, INS-VNTR (değişken sayıda tandem tekrarı), PTPN22, CTLA4 ve IL2RA içindeki HLA dışı yüksek riskli polimorfizmleri, kendine karşı merkezi ve periferik bağışıklık toleransında azalma ve bağışıklık sisteminin T1DM'nin gelişimine katılımını vurgulayan artmış T hücresi aktivasyonu ve proliferasyonu ile ilişkilendirmiştir (15). Metabolik strese ek olarak, pankreasa 'sızan' viral enfeksiyonlar veya bağırsaktaki inflamatuvar ajanlar proinflamatuvar bir ortam yaratabilir. β hücreler, spesifik reseptörleri ve adezyon moleküllerini eksprese ettikleri için viral enfeksiyona maruz kalırlar. İnsülin içeren granüllerde bulunan β hücrelerine özgü bir coxsackievirus ve adenovirüs reseptörünün (CAR) varlığı, coxsackievirus B4 tarafından enteroviral enfeksiyonu adacık otoimmünitesi ile ilişkilendiren çalışmalarla gösterildiği gibi insülin sekresyonu sırasında β hücreleri viral enfeksiyona karşı savunmasız bırakabilir. Viral enfeksiyonlar T1DM'li hastaların küçük bir azınlığında

risk faktörü oluşturabilir. T1DM'nin gelişiminde coxsackievirus'un yanı sıra rotavirüs ve sitomegalovirüs de rol oynamaktadır (16, 17).



Benzer şekilde, bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler ve artmış Bacteroidetes / Firmicutes oranının neden olduğu gastrointestinal sistemin disbiyozu, serokonversiyon ve T1DM'nin başlangıcı ile ilişkilendirilmektedir (18). Sonuç olarak T1DM'da bu süreç genetik olarak duyarlı bireylerde (örn. HLA risk alelleri) sıklıkla çevresel saldırılar (viral enfeksiyon, diyet, bağırsak disbiyozu) tarafından tetiklenir ve epigenetik faktörler tarafından düzenlenir(19, 20).

Tip 2 diyabette (T2DM) yağ dokusu, kas ve karaciğerdeki insülin direncine ve/veya pankreas β hücrelerinden bozulmuş insülin sekresyonuna bağlı olarak artmış kan glukozu seviyeleri ile karakterize karmaşık heterojen bir metabolik durum grubudur (21). Periferik insülin direnci geliştiğinde β hücreleri hedef dokularda insülin aracılı sinyallemede artan talebi karşılamak için insülin sekresyonunu artırarak yanıt verir (22). Bu düzenleyici mekanizma, insanlarda insülin duyarlılığı ve insülin sekresyonu arasındaki hiperbolik ilişkiyi açıklamaktadır. Ayrıca, INS, PDX1, GLP1R ve PPARGC1A gibi T2DM aday genlerinde artan DNA metilasyonu, söz konusu genlerin ekspresyonunun azalması ve insülin sekresyonunun tükenmesi ile ilişkilendirilmiştir (23). Ayrıca, diyabetli bireylerden alınan pankreas dokusunda epigenetik düzensizliğin önemli bir rolünün olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (24). Bununla birlikte, insülin direncinin süresi ve büyüklüğü, β hücrelerinde artan metabolik gereksinimler, bireylerin genetik ve epigenetik olarak yatkınlığı β hücrelerinin glukoz duyarlılığında keskin bir düşüşe yol açmaktadır. Bu düşüş zamanla, β hücrelerinin glikoz homeostazında bozulmalara neden olarak T2DM'nin gelişmesiyle sonuçlanır (25, 26). Sonuç olarak, bireyler normal glukoz toleransından bozulmuş glukoz toleransına ve daha sonra azalmış β hücreli kütle ile kronik T2DM'ye ilerler. Diyabetin tüm formlarında, devam eden hiperglisemi ve dislipidemi, hastalık sürecini şiddetlendiren hücrel stresin kendi kendini sürdüren döngülerini oluşturmaktadır (27).

Diyabetin küresel olarak popülasyonları etkileyen ciddi kronik bir hastalık olduğu artık bilinmektedir. Uluslararası Diyabet Salgını Araştırması'na göre, 2021 yılında dünya genelinde her 10 kişiden 1'i (toplam 534 milyon) diyabetliken bu rakamın 2045 yılına kadar yaklaşık 780 milyona çıkması beklenmektedir (28).

Özellikle, diyabet sadece kendi başına tehlikeli olmakla kalmaz, aynı zamanda bir dizi komplikasyonla da güçlü bir şekilde ilişkilidir. Çok sayıda çalışma, diyabetle ilişkili komplikasyonların nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, nefropati, retinopati, alt ekstremitte lezyonları ve diyabetin bir sonucu olarak çok çeşitli bilişsel işlev bozuklukların da ortaya çıkarabileceğini göstermiştir (29)

2.2 Diyabet ve Bilişsel Performans İlişkisi

Beyin glikoz seviyeleri, yükselen kan şekeri seviyeleri ile doğrusal bir şekilde yükselir. Yapılan çalışmalar, plazma glukozlarını 4-30 mM aralığında stabilize ettikten sonra serebral ve vasküler kompartmanlardaki glukoz seviyeleri arasında doğrusal bir ilişki olduğunu ve beyin glukoz seviyelerinin plazma seviyelerinin % 20-30'u olduğunu göstermiştir (30). Plazma-beyin glukoz oranının, normoglisemi veya hiperglisemi altındaki Wistar sıçanlarında aynı eğilimi izlediği gösterilmiştir. Normoglisemik sıçan plazma glikoz seviyesi 8 mM iken beyindeki beyin glikozu 2,1 mM, hiperglisemik sıçan plazma glikoz seviyesi 22 mM iken kronik diyabetli gruplarda beyin glikoz seviyesinin 7,5 mM seviyelerine yükseldiği saptanmıştır (31-33). Hiperglisemik hastalar üzerinde yapılan diğer çalışmalar da benzer sonuçlar göstermiştir. Bu bulgular, periferik kandaki hipergliseminin doğrudan diyabette önemli bir özellik olan beyin hiperglisemisine yol açabileceğini güçlü bir şekilde göstermektedir (33).

Hiperglisemi bilişsel gerileme ile bağlantılıdır ve uzun ve kısa vadede bilişsel işlevi etkileyebilmektedir (34). Hipergliseminin, bilişsel fonksiyon bozuklukları, dikkat ve depresyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kan glukozundaki akut değişimler bilişsel performans üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. İnsülin, merkezi sinir sistemini etkiler ve potansiyel olarak bir dizi bilişsel işlevi modüle edebilir. İnsülin reseptörleri beyinde, özellikle hipokampusta fazladır ve insülin, reseptör aracılı aktif bir taşıma süreci yoluyla kan-beyin bariyerini geçer (35). Kan glikozundaki akut değişimler bilişsel performans üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir ve glisemik kontrol iyileştirmesi bilişsel işlevi düzenlemek için avantajlıdır. İnsülin uygulamasının uzamsal hafıza işleyişlerinde iyileşmelere yol açtığını ve STZ ile indüklenmiş diyabetle ilişkili bilişsel performans üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır (36, 37) Kronik hiperglisemi mikrovasküler yapısal değişikliklerine neden olmaz ancak bölgesel serebral kan akışı veya nöronal membran boyunca ozmotik kaymalarla ilişkilendirilmektedir (36).

Buna karşın kronik hiperglisemi, ileri glikozilasyon son ürünlerinin (AGE'ler) üretimi, yaşlılık plaklarının ve nörofibriler yumakların oluşumu serebral mikrovasküler hastalık yoluyla bilişsel işlevi etkileyebilmektedir. Beyaz madde hacmindeki azalma, azalmış bilişsel işleve ve bilgi işlemedeki azalmaya da bağlanmaktadır (38, 39). Hipergliseminin bilişsel bozukluk üzerindeki olumsuz etkisi, T1DM'nin STZ enjeksiyonu ile indüklendiği bir zebra balığı çalışmasında doğrulanmıştır (40). Kronik hipergliseminin hafif bilişsel bozukluktan demansa kadar çeşitli eksiklikler, diyabetli kişilerde genel popülasyona göre daha sık görülmektedir (38). Yapılan bir çalışmada, yaşlı diyabet hastalarının %30-40'ta bilişsel işlevlerinde bozulma saptanmış ve kronik hipergliseminin şiddetinin bu bozulmanın büyüklüğüyle bir korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Benzer şekilde, epidemiyolojik çalışmalar diyabetin demans riskini (özellikle vasküler demans) yaklaşık iki katına çıkardığını bildirmektedir (38) Dikkat, hafıza, yürütücü işlev, görsel-uzamsal yetenekler ve dil dahil olmak üzere bir veya daha fazla bilişsel alanda düşüş olarak tanımlanan bilişsel bozukluk, hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin yaygın bir komplikasyonu olarak ortaya çıkmıştır. Bu bozukluk, belirli bilişsel alanlardaki ince eksikliklerden vasküler demans veya Alzheimer hastalığı gibi daha şiddetli formlara kadar değişebilir (41). Diyabetle ilişkili bilişsel disfonksiyonun patofizyolojisi, kronik hiperglisemi, insülin disregülasyonu, vasküler patolojiler ve potansiyel olarak diğer mekanizmaların doğrudan etkilerini içeren çok yönlü ve komplekstir (42). Postmortem ve hayvan çalışmaları diyabette hipokampal sinaptik kaybı ve nöronal hasarı ortaya koymaktadır. Buna ek olarak, diyabetli denekler ve kemirgen modellerde, bilişsel kayıpla tutarlı olarak hipokampüste sinaptik proteinlerin azalmış ekspresyonunu göstermektedir (38, 43). İnsan çalışmaları ve deneysel veriler birlikte kronik diyabetin, nöronal hasarı ve kaybı hızlandığını bunun sonucunda bilişi bozduğunu göstermektedir. Bu kronik metabolik hastalık ve buna bağlı ortaya çıkan hastalıkların tedavisinde moleküler yolların rolünü anlamak, ilerleyen zamanlarda yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

2.3 Diyabet Kaynaklı Bilişsel İşlev Bozukluğunun Moleküler Mekanizmaları

Diyabet kaynaklı bilişsel fonksiyon bozukluklarının temelinde yatan çeşitli hücresel stres mekanizmaları bulunmaktadır. Moleküler yollardan biri olan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi yolunda oksidatif strese neden olarak nöronal hasara ve bilişsel eksikliklere neden olabilmektedir.

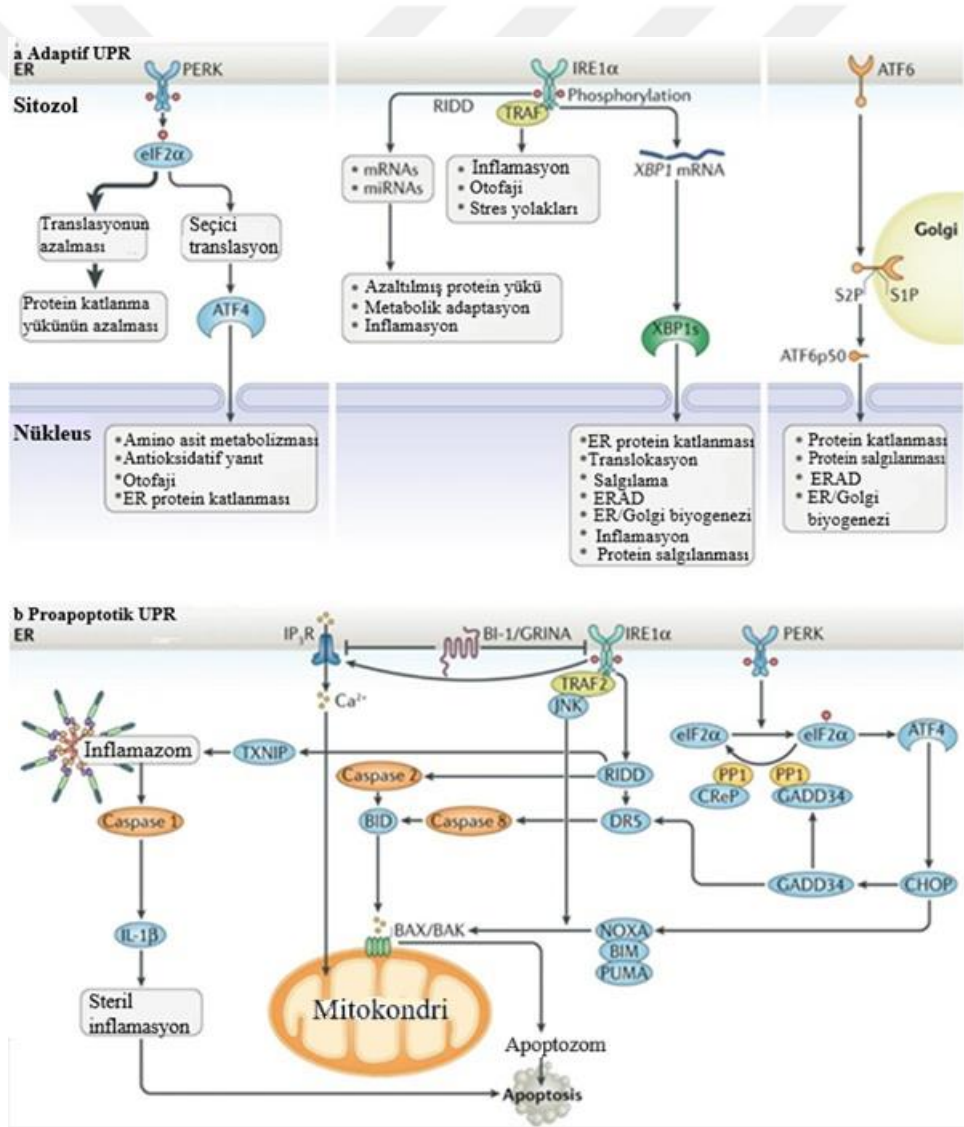
Serebral kan akışını ve kan-beyin bariyeri (KBB) bütünlüğünü bozarak endotel disfonksiyonuna, serebral perfüzyonun azalmasına ve KBB geçirgenliğinin artmasına neden olarak nörotoksik maddelerin beyne girmesine neden olur (44). İnsülin, beyinde kritik bir nöromodülatör olarak işlev görür ve nöronal sağkalımı, sinaptik plastisiteyi ve bilişsel süreçleri düzenler (45-47). Diyabette, insülin direnci ve düzensizlikleri beyin insülin sinyalinin bozarak nöronal işlevi ve bilişi bozar (48). Bu, glikoz alımının azalmasına, oksidatif stresin artmasına ve sinaptik plastisitenin bozulmasına yol açar (49). Kronik hiperglisemi, ER stres, oksidatif stres, inflamasyon ve AGE birikimi yoluyla insülin direncini şiddetlendirmektedir (50, 51). Hem tip 1 hem de 2 diyabette insülin düzensizliği nörotransmitter sistemlerini, nöronal enerji metabolizmasını ve nörojenezi etkilemektedir (52, 53).

DM, diyabetik nefropati, retinopati ve nöropati gibi mortaliteyi artıran ve hastaların yaşam kalitesini düşüren hem mikrovasküler hem de makrovasküler komplikasyonlara neden olur. Diyabete bağlı bilişsel fonksiyonlarda meydana kusurlar; metabolik stres, nörovasküler hasar ve inflamasyon dahil olmak üzere moleküler yolların keşmesinden kaynaklanmaktadır. ER stresi, nöroinflamasyon ve apoptoz olmak üzere üç birbiriyle ilişkili sürecin diyabette nöronal kaybı ve sinaptik işlev bozukluğunu yönlendiren patojenik bir ağ olduğu bilinmektedir. Diyabete bağlı bilişsel fonksiyon bozukluğunda nöronal yaralanma ve ölümün altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak, potansiyel terapötik hedefleri belirlemek ve etkili tedaviler geliştirmek için çok önemlidir (4).

2.3.1 Endoplazmik Retikulum stresi

Endoplazmik Retikulum, protein salgı yolları tüm ökaryotik hücre proteinlerinin üçte birinin sentezinden, translasyon sonrası modifikasyonlarından ve kompleksler halinde birleştirilmesinden ve hücre içindeki kesin hedeflere iletilmesinden veya hücre dışı boşluğa salınmasından sorumludur. Proteinler, sitozolden ER'ye katlanmamış bir durumda salgı yoluna girerler ve burada uygun üç boyutlu konformasyonlarını elde etmek için şaperon destekli katlanmaya uğrarlar. DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonunun aksine, protein katlanması hataya oldukça açık bir süreçtir. Bu nedenle, sağlıklı bir proteomun sürdürülmesi, bazıları verimli protein katlanmasını ve transportunu teşvik etmek için ER düzeyinde çalışan karmaşık kalite kontrol mekanizmalarına bağlıdır (54).

ER homeostazı, hücredeki bir Ca^{2+} rezervuarı, protein katlanması ve montajı için bir fabrika, lipid ve sterol biyosentezi için bir alan, sinyalizasyon ve organeller arası iletişim için bir platform olarak hücredeki çoklu işlevlerini etkileyen fizyolojik talepler ve patolojik maruziyetlerle sürekli karşı karşıya kalır. Protein sekresyonundaki aşırı artış veya bozulmuş ER protein katlanması, ER lümeninde katlanmamış, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olabilir ve bu durum 'ER stresi' olarak adlandırılır. Protein katlanma doğruluğunu sağlamak ve ER fonksiyonlarını sürdürmek için ökaryotik hücrelerin katlanmamış protein tepkisi (UPR), katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin yükünü hafifletmek ve protein homeostazını eski haline getirmek için ilgili genlerin transkripsiyonunu, mRNA translasyonunu ve protein modifikasyonlarını yeniden programlayan tüm sinyal yolları ile ilişkilidir.(55)



Şekil 2.1 ER'den başlatılan başlıca UPR yolları. (18)

UPR, protein üretiminin optimum oranını korumak için adaptif mekanizmaların uygulanmasını düzenler ve hücre dışı yanıtlar, hormonlar, büyüme faktörleri ve hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan küçük ligandlar; değişen besin seviyeleri, enerji durumu ve redoks dengesi gibi hücre içi homeostatik değişiklikler; hücre büyüme ve farklılaşmadaki değişiklikler ve ER protein katlama kapasitesindeki bozulma gibi çeşitli uyarılara hızla tepki verir. UPR'nin aktivasyonu salgılama yolunun hemen her yönünü etkiler, protein sentezi ve ER'ye taşıma hızını, protein katlanmasını, olgunlaşmasını ve kalite kontrolünü, protein trafiğini ve otofaji ve ER ile ilişkili protein bozunma (ERAD) yolları aracılığıyla yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılmasını değiştirir.

Diyabetli beyinlerde UPR sensörlerinin ekspresyonu artmaktadır. Kronik hiperglisemi, ileri glikasyon son ürünleri ve diyabette düzensiz insülin sinyali, nöronlarda ve glialarda protein katlanmasını bozarak üç kanonik UPR sensörünü (PERK, IRE1 α , ATF6) aktive eder.

PERK üzerinden UPR sinyalide, ER stresine karşı ani bir adaptif reaksiyon ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 alt birim- α 'yi (eIF2 α) fosforile eden ve protein sentezinin geçici olarak zayıflamasına yol açan bir kinaz olan PERK tarafından başlatılır (Şekil 2.1a) (56). Bu tersinir kovalent modifikasyon, yeni sentezlenen proteinlerin ER'ye akışını önleyerek proteinin yanlış katlanma yükünü sınırlar. Eşzamanlı olarak, fosforile eIF2 α , 5' çevrilmemiş bölgelerinde bir veya daha fazla upstream açık okuma çerçevesini (uORF) barındıran spesifik bir mRNA setinin translasyonunu başlatır (57). Bunlardan biri, redoks homeostazı, amino asit metabolizması, protein sentezi, apoptoz ve otofajide yer alan genlerin ekspresyonunu aktive eden stresle indüklenebilir bir transkripsiyon faktörü olan ATF4'ü kodlar. ATF4, protein fosfataz 1 (PP1) düzenleyici alt birimi GADD34'ün ekspresyonunu arttırarak protein sentezini eski haline getirmek için eIF2 α 'yı defosforile ederek bir geri besleme döngüsüne katılır (Şekil 2.1b) (58). ER stresi sırasında GADD34, eIF2 α 'ı fosforile etmek için PP1 ile bir kompleks oluşturur. GADD34'e benzer şekilde, bir PP1 kofaktörü olarak görev yapan eIF2 α fosforilasyonunun (CReP) yapısal baskılayıcısının ekspresyonu, fosforile eIF2 α için PP1 özgülüğü sağlar. GADD34 ve CReP, ER stresi çözüldüğü için protein sentezinin kurtarılması için gereklidir (58).

İnositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) üzerinden UPR sinyalinde, ER stresi altında RNaz aktivitesini ortaya çıkarmak için oligomerleşir ve otofosforile olur. IRE1 α , metazoanlarda transkripsiyon faktörü X-box bağlayıcı protein 1'i (XBP1) kodlayan mRNA'dan küçük bir 26 nükleotid intronu çıkarır ve böylece translasyonel açık okuma çerçevesini kaydırır (59). Bu işleme olayı, ER protein translokasyonu, katlanması ve salgılanmasının yanı sıra yanlış katlanmış proteinlerin bozunmasında rol oynayan genlerin ifadesini arttıran aktif bir XBP1 transkripsiyon faktörünün ekspresyonu ile sonuçlanır (Şekil 2.1a). Düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozunma (RIDD) olarak bilinen bir süreçte, IRE1 α ayrıca küçük bir mRNA setini veya öncü mikroRNA'ları (miRNA'lar) parçalayarak bozulmalarına yol açabilir (60). RIDD, mRNA bolluğunu ve dolayısıyla ER'deki protein katlama yükünü azaltmak için bir yol olarak hizmet edebilir. RIDD'nin ER protein katlanma homeostazı üzerindeki kantitatif etkisi henüz belirlenmemiş olsa da seçilen mRNA'ları hücre tipine ve uyarana bağlı bir şekilde parçalayarak çoklu hücrel süreçleri düzenlediği bulunmuştur (61). Hem XBP1 hem de RIDD tarafından düzenlenen mRNA'lar ve öncü miRNA'lar için, bir kök-döngü yapısı içinde ortak bir konsensüs CUGCAG dizi motifi, IRE1 α bölünme bölgesinin önemli bir özelliğidir. Ayrıca, IRE1 α 'nın sinyal tanıma parçacık RNA'sı, ribozomal RNA'lar ve transfer RNA'ları dahil olmak üzere translasyonel ve translokasyonel mekanizmaların bileşenleri ile kompleksler oluşturur (62). Bununla birlikte, IRE1 α küçük RNA komplekslerinin biyolojik öneme sahip olup olmadığı daha fazla araştırılmaya devam etmektedir. Ek olarak, IRE1 α ayrıca makro otofaji ve MAPK yolu dahil olmak üzere diğer stres yanıt yolları ile etkileşim kurabilecek adaptör proteinler ile ilişkilidir (54).

ATF6 üzerinden UPR sinyalinde ER stresinde, tam uzunlukta ATF6, ER'den Golgi aygıtına geçer, burada bölge-1 proteaz (S1P) ve bölge-2 proteaz (S2P) tarafından bölünür ve 'ATF6p50' olarak adlandırılan ve gen ekspresyonunu indüklemek için çekirdeğe yer değiştiren temel bir lösin fermuar (bZIP) transkripsiyon faktörü içeren bir parçayı serbest bırakır (Şekil 2.1a). ATF6 ve XBP1'ler, ER şaperonlarını kodlayan genlerin ve ER proteini translokasyonunu, katlanmasını, olgunlaşmasını ve salgılanmasını, ayrıca yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonunu düzenleyen enzimlerin transkripsiyonunu düzenlemek için paralel olarak hareket eder. Genel olarak, UPR, ER katlama kapasitesini dinamik bir şekilde ayarlayarak ER proteostazını koruyan ve ER stresi altında hücre fonksiyonunu sürdüren sinyal yollarının bir kombinasyonunu temsil etmektedir (54, 63).

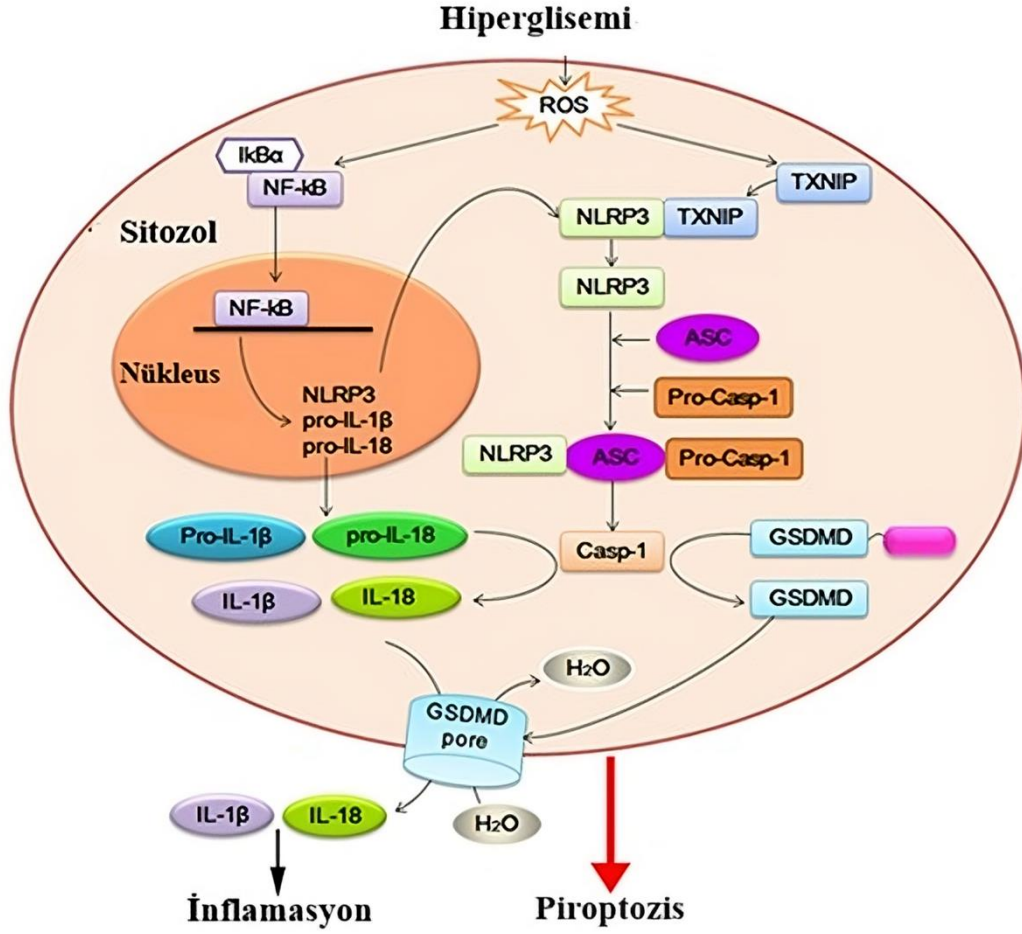
Günümüzde, diyabetik hipokampüslerde ER stresinin belirteçlerini iyi bir şekilde belgelenmiştir. Diyabetli kemirgenler hipokampal nöronlarda BiP/GRP78 ve PERK fosforilasyonunun ekspresyonları artmaktadır. Özellikle, devam eden ER stresi tarafından indüklenen bir transkripsiyon faktörü olan C/EBP Homoloji Proteini (CHOP), diyabetli beyinlerde daha yüksektir. Yapılan bir çalışmada, streptozotosin (STZ) diyabetli sıçanların kontrollerden daha fazla CHOP pozitif hipokampal nörona ve TUNEL pozitif hücrelere sahip olduğunu saptamışlardır. Bu durum CHOP kaynaklı ER stresinin diyabette nöronal apoptozu indüklediğini düşündürmektedir (64). Bu ER stresi aracılı apoptoz, Morris su labirentinde kullanılarak yapılan deneylerde bozulmuş öğrenme ile ilişkilidir ve UPR aktivasyonu ile bilişsel gerileme arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu göstermektedir (43). Benzer şekilde yapılan bir in vitro çalışmada, hiperglisemi ile aktive edilen ER stresinin nöronal hasarı teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Böylece, diyabetik hipokampüste aşırı veya uzun süreli UPR sinyalleme, bilişsel fonksiyon bozukluklarının altında yatan nöron kaybına neden olan pro-apoptotik yolları tetikleyebilmektedir. Ayrıca diyabetik hipokampal ER stresinin, inflamatuvar sinyallemeyle aktive ettiği bilinmektedir (65). Bununla uyumlu olarak başka bir çalışma çözülmemiş ER stresinin diyabetik nöronlarda aşırı otofajiye ve nihayetinde apoptozu yol açtığı bir "ER stres-otofaji" eksenini işaret etmektedir (66). Özetle, beyindeki hiperglisemi ile ilişkili ER stresi, bilişselliği kritik şekilde bozan aşağı akış kaskadlarını (apoptozis, inflamasyon) başlatır (43, 65).

2.3.2 İnflamasyon

Kronik düşük dereceli inflamasyon diyabetin bir özelliğidir ve diyabetik beyindeki nöroinflamasyon artık iyi belgelenmiştir. T2DM'de hem periferik hem de merkezi inflamasyon mediyatörleri yükselir. Sistemik olarak, meta-analizler pro-inflamatuvar belirteçlerin (IL-6, TNF- α , CRP) bilişsel bozukluğu olan diyabetlilerde önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ve bilişsel test puanlarıyla negatif korelasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır (67). Beyinde lokal olarak, diyabetik kemirgen modellerinde mikrogial ve astrosit aktivasyonu tespit edilmiştir. Diyabetik sıçanların hipokampüsünde, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflatuar sitokinler, oksidatif stres belirteçleriyle birlikte belirgin şekilde yükselmektedir (65). Diyabette NLRP3 inflamazom yolu (Şekil 2.2), nöroinflamasyonun önemli bir düğümüdür.

NLRP3 inflamatuvarı, hücrel stres sinyallerine yanıt veren ve bir sensör (NLRP3), bir adaptör protein (ASC) ve bir efektör (kaspaz-1) oluşturan bir sitoplazmik bağışıklık faktörüdür. ASC proteini, bir amino-terminal pirin alanının (PYD) yanı sıra bir kaspaz toplama alanına (CARD) sahiptir. Buna karşılık, NLRP3, merkezi bir NACHT alanı, bir karboksi-terminal lösin açısından zengin tekrar (LRR) alanı ve PYD'den oluşan üçlü bir proteindir (68). NLRP3 ve pro-IL-1 β ekspresyonu NF- κ B yoluyla inflamatuvar uyaranlar tarafından indüklenir.

NLRP3'ün transkripsiyonel indüksiyonunu kontrol eden nükleer faktör- κ B'nin (NF- κ B), NLRP3 inflamatuvarının aktivasyonunda ilk sinyali sağladığı bilinmektedir (69-71). Tioredoksin etkileşimli/inhibe edici protein (TXNIP), deubikitinasyon ve oksitlenmiş mitokondriyal DNA'nın, NLRP3 ile doğrudan bağlanarak ve oligomerizasyonunu modüle ederek ikinci sinyali sağladığı öne sürülmüştür (69, 72). Yüksek glikoz aracılı ROS üretimi, NLRP3 hazırlamayı ve aktivasyonun ikincil adımını açıklayan NF- κ B fosforilasyonunu ve TXNIP ekspresyonunu arttırabilir(73-75). NF- κ B'nin, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunu kolaylaştıran NLRP3'ün pro-kaspaz-18 ve pro-IL-1 β ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (76-78). TXNIP'nin, NLRP3 inflamatuvarının ekspresyonunu hazırlayarak veya NLRP3'ün yapısını doğrudan modüle ederek ROS ve NLRP3 inflamatuvarı arasında bir başka önemli bağlantı olduğu bildirilmiştir (79) NLRP3 inflamatuvarları tipik olarak PAMP (mikrobiyal toksinler, viral RNA ve bakterilerin yüzey bileşenleri gibi) ve DAMP (ATP, ürik asit kristalleri, beta-amiloid peptitler ve alüminyum adjuvanlar dahil) tarafından aktive edilir (80, 81). NLRP3, oligomerize NLRP3 ile kendi kendine oligomerizasyona uğramak için uyaranlar üzerine homotipik NACHT yapısal alanı ile etkileşime girer ve PYD-PYD etkileşimleri yoluyla çekilen bağlı ASC'nin, ASC lekeleri (makromoleküler odak noktaları) halinde toplanmasına neden olur (82-84). Daha sonra, bir araya getirilen ASC, NLRP3 inflamatuvarı olarak adlandırılan NLRP3-ASC-kaspaz-1 protein kompleksini oluşturmak için homotipik CARD-CARD etkileşimleri yoluyla kaspaz-1'i aktifleştirir (85). Aktif NLRP3 inflamatuvarı, kendi kendine bölünmeyi tetikler ve pro-kaspaz-1'i aktive ederek pro-inflamatuvar sitokinler IL-1 β / 18'in salınmasına neden olur. Kaspaz-1 ayrıca gasdermin D'yi (GSDMD) N-terminal GSDMD'ye (N-GSDMD) ayırır, bu da hücre zarında gözeneklerin oluşumuna neden olur ve piroptozu tetikler ve enflamatuvar yanıtı daha da teşvik etmek için enflamatuvar faktörler IL-1 β / 18'i serbest bırakır (86).



Şekil 2.2 Hiperglisemiye bağlı NLRP3 inflammatuar aktivasyonu (79)

Diyabette, mikroglialar pro-inflamatuar (M1 benzeri) bir fenotipe doğru kayar, IL-6, TNF- α ve diğer sitokinleri salgılamaktadır. Bu sitokinler nöronal plastisiteyi bozarak eksitotoksisteye neden olabilmektedir. Klinik olarak, hafif bilişsel bozukluk veya demanslı diyabetli hastalarda daha yüksek serum TNF- α /IL-6 seviyeleri olma eğilimi bulunmaktadır ve hafif hiperglisemi bile merkezi sinir sisteminde (MSS) inflamasyonu artırabilmektedir (65, 67). NLRP3 inflamazom yolu diyabette nöroinflamasyonun önemli bir düğümüdür. Yüksek glikoz ve ER stresi her ikisi de NLRP3'ü aktive etmektedir. Diyabetik fare modelleriyle yapılan çalışmada nöronlardaki NLRP3 inflamazom kompleksi ve kaspaz-1 aktivasyonu belirgindir. Bu durum kronik inflamasyon ve sinaptik hasara yol açmaktadır (65). Özellikle, NLRP3 ve tiyoredoksin etkileşimli proteini (TXNIP) bloke etmek inflamasyonu ve bilişsel eksiklikleri tersine çevirebilmektedir. Diyabetik kemirgenlerde, NLRP3'ü inhibe eden bileşikler ve sitokin ekspresyonunu azaltarak uzamsal hafızayı iyileştirmektedir (5, 87).

Diyabetik beyinde NLRP3 inflamatuvarının aktivasyonunun birçok faktör tarafından tetiklenebileceğini bilinmektedir. Bunlar arasında aşırı glikoz, serbest yağ asitleri ve oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve ER stresi gibi çeşitli hücrel olaylar bulunur. Spesifik olarak, ROS ve mitokondriyal DNA (mtDNA), potasyum (K⁺) salgısı ve TXNIP gibi bu hücrel olayların ürünlerinin tümü, NLRP3 inflamatuvarının aktivasyonuna aracılık etmede çok önemli bir rol oynar. Ek olarak, son çalışmalar, diğer diyabetik komplikasyonlarda lizozomal hasarın neden olduğu histon B'nin de NLRP3 inflamatuvarını aktive etmektedir (29).

Özetle diyabet hem sistemik hem de beyin immün hücrelerinde artan inflamasyon hareketine geçirir. TXNIP/NLRP3 ve diğer yolların tetiklediği inflamasyon, nörotoksik bir ortam yaratır; hipokampüste yükselmiş IL-1 β ve TNF- α , oksidatif stres ve azalmış nörotrofik destek, hafıza kaybına ve bilişsel işlev bozukluklarına katkıda bulunur.

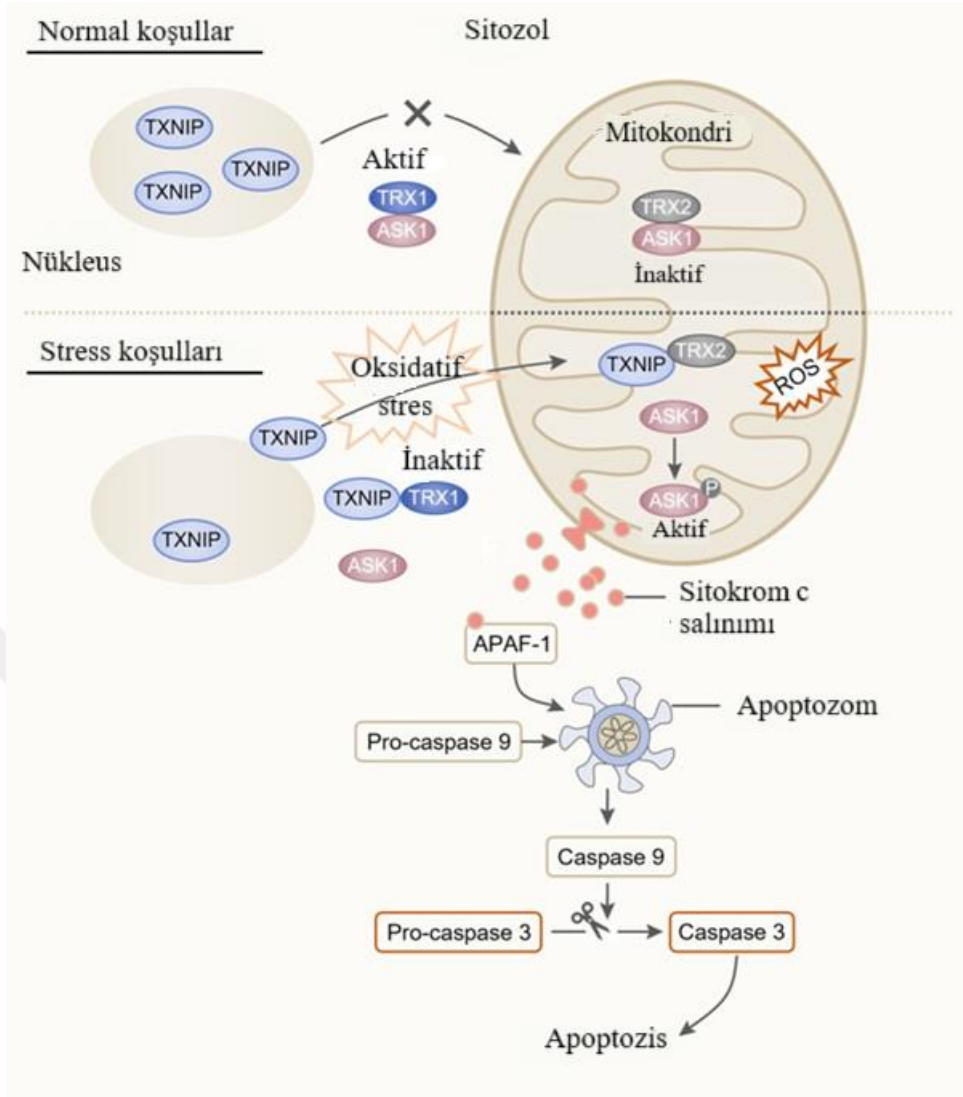
2.3.3 Tiyoredoksin Etkileşimli Protein (TXNIP)

Prokaryotlardan memelilere kadar yüksek oranda korunmuş bir protein olan Tiyoredoksin (TRX), başlangıçta *Escherichia coli*'de DNA sentezi için temel enzim olan ribonükleotid redüktaz için bir hidrojen donörü olarak tanımlandı (88). Daha sonra, hücrel disülfid oksidoredüktaz kompleksinin bir parçası olarak tanınan TRX, TRX-R tarafından NADPH'nin harcanmasıyla yenilendiği ve hücrel redoks homeostazının sürdürülmesinde kritik bir rol üstlendiği biliniyordu. Yani, oksitlenmiş tioredoksin (Trx-S₂), TRX-R aktivitesi tarafından katalizlenen bir reaksiyon yoluyla NADPH tarafından indirgenir. İndirgenmiş Trx-(SH)₂ daha sonra, hedef proteinlerdeki disülfidi doğrudan indirgeyebilir (89, 90). İki farklı gen tarafından kodlanan sitozolik (TRX1) ve mitokondriyal (TRX2) izoformların çok küçük farklılıklar bulunmaktadır. TRX1 ve TRX2, sıçan beyinde yaygın olarak eksprese edilirken, TRX1 özellikle yüksek metabolik aktivite ve oksidatif yük bölgelerinde (örneğin, substantia nigra ve subtalamik çekirdek) ekspresyon seviyeleri yüksektir (91).

Genellikle ana TRX izoformu olarak bilinen TRX1, yalnızca mitokondriye özgü olan TRX2'nin aksine sitozol, plazma zarı ve çekirdeğin yanı sıra hücre dışı boşlukta lokalizedir. Redoks düzenleme işlevi nedeniyle, TRX sistemi ve özellikle TRX1'in ampirik olarak muazzam koruyucu etkiler sağladığı gösterilmiştir (92).

TRX aşırı ekspresyonu olan fareler, daha uzun ömür ile oksidatif strese karşı daha dirençlidir, bu durum hücrel sağkalımdaki rolünü açıklamaktadır. Özellikle, TRX'nin aşırı ifadesinin veya damar içi uygulanmasının, iskemik inme hasarına karşı nöroproteksiyon sağladığı ve yaşam süresini uzattığı rapor edilmiştir (93-95). Mitokondriyal izoform olarak TRX2 ayrıca sitokrom-c salınımını doğrudan bloke edebilir ve hücreleri ROS kaynaklı apoptozdan koruyabilir. ROS temizleme sistemindeki birincil rolünün yanı sıra TRX, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanma bölgelerindeki sistin kısımlarını azaltmaktadır (90). Hücre içi indirgeme/oksidasyon dengesinin korunmasında çok önemlidir. Tiyoredoksin ile etkileşime giren protein, Trx1, Trx2'ye doğrudan bağlanarak tioredoksin aktivitesini inhibe ederek oksidatif stresi indükler ve böylece disülfid değişimi yoluyla tioredoksinin indirgeyici aktivitesini inhibe etmektedir.

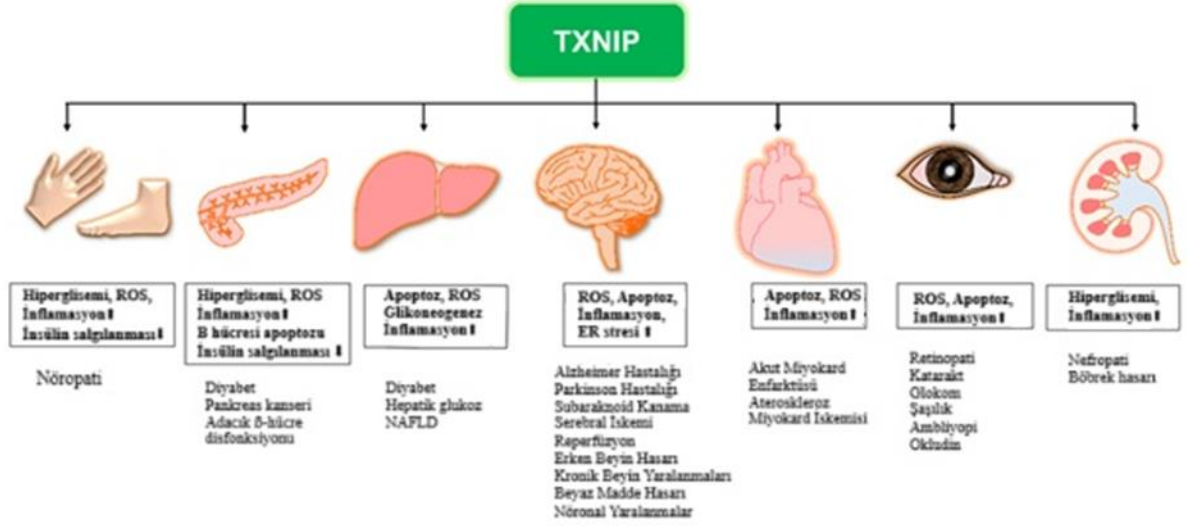
İnsan tioredoksin etkileşimli proteini 391 amino asitten oluşmaktadır. TXNIP, kromozom 1q21.1 bölgesi üzerinden kodlanan, tüm periferik dokularda ve endotelde ekprese edilen 46 kDa'lık bir proteindir (96, 97). Başlangıçta sitoplazmik bir protein olduğu düşünülen TXNIP'in, Saxena ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada normal koşullarda temel olarak çekirdekte lokalize olduğu ve oksidatif stresten sonra mitokondriye yer değiştirdiği keşfedilmiştir (98, 99). TXNIP esas olarak TRX aktivitesini inhibe ederek işlev görür. Sitoplazmada bulunan TRX1 ve çekirdekte bulunan TRX2, pankreas β -hücrelerinde tanımlanmıştır. TXNIP'in aşırı üretilmesi, TRX'in indirgeme aktivitesini düşürür ve Trx'in aktif merkezindeki iki sistein kalıntısına bağlanarak hücreleri oksidatif stres ve apoptoza karşı daha duyarlı hale getirir (100). Stres koşulları altında TXNIP şekil 2.3'te gösterildiği gibi nükleustan mitokondriye geçer ve TRX2'ye bağlanarak ASK1'i serbest bırakır, bunun sonucunda kaspaz-3 aktivasyonu tetiklenmektedir. Sonuçta, TXNIP aşırı ekspresyonu sitokrom-c salınımını indükleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi sonucu protein modifikasyonu ve lipid peroksidasyonuna yol açarak hücrel işlev bozukluğuna neden olur ve birçok insan hastalığında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu tioredoksin sistemi, hücre içi indirgenme/yükseltgenme dengesinin korunmasında kritik önem taşımaktadır. Tiyoredoksin-etkileşimli protein ise Trx1 ve Trx2'ye doğrudan bağlanarak tioredoksin aktivitesini inhibe eder ve böylece onların disülfid değişimi yoluyla gerçekleşen indirgeme aktivitesini engelleyerek oksidatif strese neden olmaktadır (101).



Şekil 2.3 TXNIP'in stres koşulları altına çekirdekten mitokondriye yer değiştirmesi ve apoptozis (102).

TXNIP, iskelet kasları, adipositler, karaciğer, merkezi sinir sistemi, kardiyomiyositler, endotel olmak üzere tüm periferik dokularda eksprese edilir. TXNIP ekspresyonundaki dramatik ve/veya kronik değişiklikler çeşitli hastalıkların gelişimine zemin hazırlamaktadır (şekil 2.4). Tioredoksin sistemi, karbonhidrat metabolizmasında, insülin üretimi ve duyarlılığında, kan basıncı düzenlenmesinde, aterogenezde, inflamasyonda, makrofajların kemotaktik aktivitesinde ve trigliserid-HDL oranının yükselmesinde önemli rol oynamaktadır (103). TXNIP, β hücrelerinin fonksiyonu üzerindeki etki, hepatik glukoz üretimi, adipogenez, enerji harcamasının azalması, periferik dokularda insülin duyarlılığının azaltılması dahil olmak üzere pleiotropik etkiler yoluyla glikoz ve lipid metabolizması ile ilişkilidir (104, 105).

Akut lenfositik lösemi, akciğer karsinomu, meme kanseri, kolorektal kanser, hepatosellüler ve mide kanseri, non-Hodgkin lenfoma, pankreas kanseri, miyelom gibi malign tümörlerde, agresif tümör davranışı ile ilişkili olarak artmış bir tiyoredoksin seviyesi bildirilmiştir. Bu nedenle, Trx sistemi kanser, otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için de hedeflenmektedir (103).

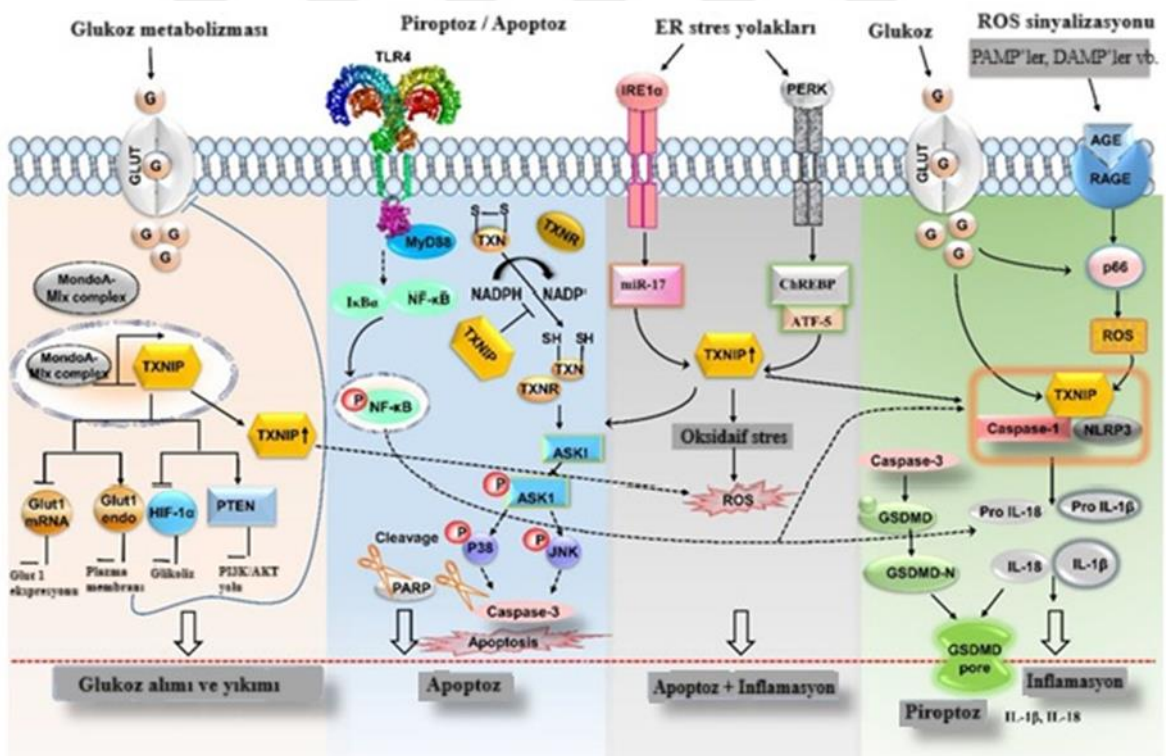


Şekil 2.4 TXNIP'in çeşitli hastalıkların gelişimindeki rolü. (106).

TXNIP, NLRP3 inflamazomu (şekil 2.5) aracılığıyla inflamatuvar sinyalizasyonu aktive ederek hücrel metabolizmada temel bir rol oynamaktadır (106). NLRP3 inflamazom aktivasyonu, oksidatif stres koşullarında çekirdeğe geçiş yapan NF- κ B'nin uyarılmasıyla başlatılır. Pro-IL-1 β ve pro-IL-18 dahil proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra NLRP3'ün transkripsiyonel induksiyonunu kontrol eden NF- κ B'nin, NLRP3 inflamazom aktivasyonunun ilk adımını sağladığı gösterilmiştir. NLRP3 inflamazom aktivasyonunun ikinci adımı, TXNIP ile NLRP3 arasındaki doğrudan etkileşimin redoks ilişkili bir şekilde başlatılmasıdır. Proinflamatuvar yol aktivasyonu ve ROS birikimi, TXNIP'in NLRP3'ün PYD aracılığıyla NLRP3 ve ASC ile etkileşimini indükler, ardından ASC'nin CARD domaini pro-kaspaz 1 ile etkileşime girer (107). Ek olarak, bu stres koşulları, TXNIP'in TRX2'den ayrılmasını teşvik ederek TXNIP'in mitokondride NLRP3 ile doğrudan bağlanmasını mümkün kılmaktadır (72, 108). Bu etkileşimler, NLRP3 inflamazomunun oluşumuna yol açar ve pro-kaspaz 1'in kesilmesini indükleyerek aktif kaspaz 1 üretimini sağlar. Kaspaz 1, pro-IL-18 ve pro-IL-1 β 'yi olgun formlarına (IL-18 ve IL-1 β) katalizler ve sitozole salgılanmalarını sağlayarak inflamatuvar yanıtı kolaylaştırır.

Aktif kaspaz 1, GSDMD'nin N-terminal ve C-terminal domainleri arasındaki bağlayıcı bölgeden keser. N-terminal parçası, plazma zarına taşınır ve 10-20 nm çapında zar porları oluşturmak üzere oligomerleşir (109). Bu zar porları, inflamatuvar sitokinler IL-1 β /IL-18'in salınımını, zar yırtılmasını ve hücre şişmesini destekleyerek sonunda piroptozise (programlı inflamatuvar hücre ölümü) yol açmaktadır (110).

Çeşitli çalışmalar, ER stresi tarafından (şekil 2.5) TXNIP'in indüklenmesinin NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunu teşvik ettiğini bildirmektedir (110). Bunları bölüm 2.3.1'de gösterildiği gibi UPR'nin üç transmembran proteininin (ATF6, IRE1 α ve PERK) uyarılmasıyla başlatılır. ER stresi tarafından bu üç sinyal ileticisinin uyarılması, tipik olarak CHOP ve TXNIP'in aktivitesini düzenler. CHOP/TXNIP sinyal yolunun indüklenmesi, NLRP3 inflamazomunu ve nihayetinde kaspaz 1'i aktive ederek IL-1 β ve IL-18'in olgunlaşmasını ve salınımını tetikler (63). Dolayısıyla, CHOP/TXNIP sinyal yolu; NLRP3 inflamazom aktivasyonunun ve apoptoz/piroptoz yolunun merkezi bir düzenleyicisidir ve oksidatif stres ile inflamasyon gibi çok çeşitli zararlı uyarılar arasında bağlantı kuran kilit bir aracı olarak işlev görebilmektedir (102).



Şekil 2.5 TXNIP sinyalleşmesinin yukarı akış medyatörleri (106).

TXNIP'in ekspresyonu UV radyasyonu, γ radyasyonu, yüksek sıcaklık, hipoksi, H_2O_2 ve hiperglisemi ile indüklenir. Yüksek glikoz seviyeleri tarafından üretilen pankreas β hücrelerinde TXNIP ekspresyonu, β hücrelerinin glukotoksisitenin neden olduğu apoptozu için kritik öneme sahiptir (111). TXNIP, referans seviyeler içindeyken hücrelere zarar vermez ancak seviyesi arttığında istenmeyen birçok metabolik etki vardır. TXNIP ayrıca akut enerji stresine nasıl yanıt verileceğine karar vermede hücreler için önemli bir düzenleyici nokta olarak hizmet eder. Tiyoredoksin sisteminin modülasyonunun metabolik sendrom, insülin direnci ve tip 2 diyabetin yönetiminde olduğu kadar hipertansiyon ve ateroskleroz tedavisinde de yeni bir hedef olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (112). TXNIP, GLUT-1'in (glikoz taşıyıcı-1) ekspresyonunu ve lokalizasyonunu etkileyerek periferik glikoz alımını düzenler (şekil 2.5). TXNIP, GLUT-1'e bağlanarak içselleşmesini indükleyerek doğrudan ve dolaylı olarak GLUT-1 mRNA seviyesini azaltarak glikoz alımını baskılar. TXNIP, enerji stresi altında AMPK tarafından fosforile edilir. TXNIP'in fosforilasyonu, GLUT1'den ayrılmasına yol açar. Böylece, GLUT1'in endositoze edilmesini, GLUT-1 ekspresyonunun önemli ölçüde artmasını ve sonuç olarak glikoz akışında akut bir artışa izin vermesini önler (113, 114). Protein kinaz B (AKT) tarafından aynı TXNIP bölgesi üzerindeki fosforilasyon, glikoz akışında eşdeğer bir artışa neden olur. AKT'nin aktivasyonu, kas ve yağ dokularında enerji depolanması için ve ayrıca kanser gibi hızlı bölünen hücrelerde enerji tüketimi için glikoz alımını artırır. TXNIP, protein kinaz B'nin doğrudan bir substratıdır ve büyüme faktörü tarafından stimülasyondan sonra AKT'ye bağlı akut glikoz akışına aracılık etmekten sorumludur. TXNIP ayrıca GLUT-4'ün bazal endositozu için bir adaptördür ve yokluğu kas ve yağ dokularında hızlı glikoz alımına izin verir, bu da açlık sırasında hipoglisemiye neden olmaktadır. TXNIP, GLUT1 ve GLUT4 yoluyla glikoz akışını modüle etmek için sinyal regülasyonu ve yanıtının önemli bir düğümü olarak kabul edilmektedir (115).

Diyabet ve kronik komplikasyonlarının ortaya çıkması, gelişmesi diyabetik hastalarda oksidatif stres reaksiyonu ve oksijen serbest radikal üretiminin artması ile yakından ilişkilidir. TXNIP, AMPK yolağı yoluyla glomerüler mezanjial hücrelerde oksidatif stres yanıtını kolaylaştırır ve diyabetik nefropatiye yol açmaktadır. Bu nedenle TXNIP, diyabetik nefropati tedavisi için de terapötik bir hedef olarak tanımlanmaktadır (101).

Diyabet ve glukoz intoleransı olan hastalarda TXNIP'in aşırı ekspresyonu bilinmektedir (104). TXNIP inhibisyonunun β hücreli sağkalımı ve işlevi arttırdığı iddia edilmektedir (116). TXNIP eksikliği insülin direncini ve tip 2 diyabeti önlediğini yapılan çalışmalarla desteklemektedir (117). TXNIP eksikliği olan farelerde artmış β hücre kütlesi ile ilişkilendirilmektedir (111).

Uzun süreli hipoksi sırasında, mTORC1 sinyal yolunun inhibisyonunun bir sonucu olarak TXNIP ekspresyonu artmaktadır(118). TXNIP aşırı ekspresyonu, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1a (HIF1A) aktivitesini azaltmaktadır. TXNIP ve nitrik oksit (NO) sinyali arasında çoklu etkileşimler bulunmaktadır. TXNIP'in yalnızca NO üretimini ve biyolojik etkilerini baskıladığı değil, aynı zamanda NO'nun da TXNIP mRNA ifadesini engellediği gösterilmiştir. (119, 120). Bu değişikliklere, aort endoteliumunda reaktif oksijen türlerinin ve vasküler hücre adezyon molekülü-1'in (VCAM-1) artmış ekspresyonu ile eş zamanlı olarak azalmış vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) eşlik etmektedir. Ek olarak, hiperglisemi veya karbonhidrat yanıt elemanı bağlayıcı proteinin (ChREBP) aşırı ekspresyonu ile indüklenen primer insan aort endotel hücrelerinde TXNIP aşırı ekspresyonu, erken apoptozu ve bozulmuş NO biyoaktivitesini teşvik etmektedir. TXNIP ekspresyon seviyeleri ile endotel disfonksiyonu arasındaki korelasyon, TXNIP'in diyabetik hastalarda vasküler komplikasyonlar için bir biyobelirteç olduğunu düşündürmektedir (121).

Çok sayıda yeni çalışma, Alzheimer hastalığı (AD) ve inme [70] dahil olmak üzere nörodejeneratif ve serebrovasküler hastalıklarda TXNIP ekspresyonunun arttığına işaret etmektedir (6, 122). Bildirildiğine göre, TXNIP molekülü, bilişsel gerilemenin ilk ortaya çıktığı dönemde 5xFAD farelerinin hipokampusunda aşırı ifade edilir (122). Bu durum, glial fibriller asidik proteinin (GFAP) hipokampustaki artmış ekspresyonu ile ilişkilidir. D-galaktoz ile indüklenmiş Alzheimer hastalığı sıçan modelinde de TXNIP ekspresyonunun artışı ve TRX ekspresyonunun azalışı gösterilmiştir. Bu çalışmada, bitkisel bir fenilpropanoid glikozit olan salidrozyd ile tedavi, TRX, TXNIP ve NF-kB proteinlerinin ekspresyonlarını düzenleyerek bilişsel işlevleri üzerine pozitif etkilerinin olduğu bildirilmiştir (123). Diyabetten etkilenen beyin dokusunda da TXNIP seviyeleri artmaktadır ve bu durum nöronal hasar belirteçleriyle sıkı bir şekilde ilişkilidir. Diyabetik sıçan modeliyle yapılan bir çalışmada hipokampal TXNIP mRNA ve

proteininde belirgin artışlar ve TXNIP ubikitinasyonunda azalma gösterdiği bildirilmiştir (4).



Diyabetik modellerle yapılan çalışmalarda, TXNIP sinyalleşmesinin azaltılması bilişselliği sürekli olarak iyileştirdiği işaret edilmektedir(5)Bu bağlamda, diyabette ER stres/TXNIP/NLRP3 yolları muhtemelen hipokampüste de benzer şekilde işlemektedir. Diyabetik metabolik streste TXNIP, nöroinflamasyona mekanik bir köprü sağlıyor gibi görünmektedir.

1.1.4. Nöral Hücre Kaybı ve Bilişsel Gerileme

Nöronların apoptotik ölümü, metabolik stresi ve bilişsel kaybı birbirine bağlayan son ortak yoldur. Diyabetik beyinde, mitokondriyal hem de ER stres aracılı apoptotik yollar aktive olur. Hayvan çalışmaları, öğrenme ve hafıza eksiklikleriyle aynı zamana denk gelen diyabetik hipokampuslerde sürekli olarak artan nöronal apoptozis olduğunu göstermektedir. Tip-1 diyabet modeliyle yapılan bir çalışmada sıçanların diyabetin 8. ayında bilişsel eksiklikler geliştirdiğini ve buna DNA parçalanması, TUNEL pozitif hücreler, artmış Bax/Bcl-2 oranı ve hipokampus nöronlarında yükselmiş kaspaz-3 aktivitesinin eşlik ettiğini bildirilmiştir (124). Bu bulgular, kronik diyabette mitokondriyal apoptotik kaskadın devreye girdiğini göstermektedir. Benzer şekilde, Zhang ve arkadaşları (yukarıda), diyabetik hipokampüste CHOP yukarı regülasyonunun nöronal apoptoza yol açtığını yapılan analizlerle doğrulamışlardır (43). Her durumda, apoptoz nöron kaybı (azalmış nöron yoğunluğu) ve uzamsal bellek görevlerinde daha kötü performans ile ilişkilendirilmiştir. Bu ölüm yollarının kesintiye uğraması sonuçları iyileştirir. Diyabetik kemirgenlerde, ER stresini veya inflamatuvar sinyali bloke eden ajanlar nöronal apoptozu azaltarak bilişi korumaktadır (65). Daha geniş olarak, anti-inflamatuvar tedaviler veya antioksidanlar verilen diyabetik hayvanlar daha az TUNEL pozitif nöron ve daha iyi bilişsel puanlar göstermektedir. Klinik olarak, beyin görüntüleme çalışmaları nöronal kaybı desteklemektedir (125). Hipokampus öğrenme ve hafıza için merkezi bir öneme sahiptir. Nöronların ve sinaptik bağlantıların kaybının diyabette görülen bilişsel işlev bozukluklarıyla bağlantılıdır.

ER stresinin, TXNIP aracılı inflamasyonun ve diğer hakaretlerin kümülatif etkileri apoptozda birleşir. Nöronal hücre kayıpları beyin atrofisine ve bilişsel işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Sonuç olarak, diyabette kronik metabolik stres (hiperglisemi, dislipidemi, insülin eksikliği/direnci), nöronal ER stresini tetikler TXNIP'in ekspresyonunu artırır ve doğuştan gelen bağıışıklığı aktifleştirir.

Bu kaskad, birlikte hipokampus gibi hassas beyin bölgelerinde mitokondriyal ve ER ile ilişkili apoptozu tetikleyen ROS ve proinflamatuvar sitokinleri yükseltir. Apoptozun neden olduğu nöral hücre kaybı, diyabetlilerde bilişsel bozulma ve demansın daha yüksek görülme sıklığını açıklamaktadır (38, 65, 124, 125). Bu bağlamda hayvanlar ve hücre modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, ER stresi TXNIP/NLRP3 sinyallemesi veya inflamatuvar sitokinleri hedeflemenin nöronları koruyabileceğini ve bilişselliği iyileştirebileceğini göstermektedir (4, 65).

2.4 Diyabet Tedavisinde TXNIP'in Farmakolojik Düzenlenmesi

T1D ve T2D'li bireylerden insan pankreas langerhans adacıklarında bulunan yüksek TXNIP ekspresyonunun beta hücre sağkalımı ve adacık fonksiyonu üzerindeki zararlı etkileri, adacık TXNIP ekspresyonunu terapötik olarak inhibe etmeye çekici bir hedef haline gelmiştir. Birinci sınıf kalsiyum kanal blokerleri (KKB), kardiyomiyositlerde ve ayrıca pankreatik β hücrelerinde bulunan L tipi kalsiyum kanallarını inhibe etmektedir. KKB'lerin β hücrelerinde TXNIP ekspresyonunu azalttığı ve sağkalımlarını arttırdığı kanıtlanmıştır [32]. Dihidropiridin olmayan L-tipi kalsiyum kanal blokeri ve onaylanmış antihipertansif ilaç olan verapamilin TXNIP ekspresyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (13). Verapamil birinci sınıf L tipi kalsiyum kanal blokeridir ve hücrel kalsiyum akışını azaltır, bu da vazodilatasyona, kan basıncının düşmesine ve kalp kası kasılmasının azalmasına ve atriyoventriküler iletimin yavaşlamasına neden olur [33] İlginç bir şekilde, STZ ve obezite kaynaklı diyabetik fareler kullanılarak T1DM ve T2DM fare modellerinde verapamil ile tedavi TXNIP delesyonunun anti-diyabetik etkilerine yakın bir sonuç vermiştir (13). Ayrıca, verapamil diyabetin başlamasından sonra verapamil, STZ'nin neden olduğu beta hücre yıkımı nedeniyle fareleri diyabetten kurtarmayı başardı (13).

2.4.1 Verapamil

Verapamil, otuz yılı aşkın bir süredir antihipertansif bir bileşik olarak kullanılan ve ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanan L tipi bir kalsiyum kanal blokeridir. Verapamil, kardiyomiyositlerde TXNIP ekspresyonunu azaltmaktadır (126). Farelerde verapamil uygulaması, şiddetli diyabette bile kardiyak

TXNIP ekspresyonu azaltarak aktif kaspaz-3'ü ekspresyonun azalmasına neden olmaktadır ve bu sebeple TXNIP seviyelerinin azalması, apoptozun azalması ile ilişkilendirilmektedir (127). Ayrıca, kardiyomiyosit spesifik TXNIP geninin nakavt edilmesi, kalpte kaspaz-3 seviyesini azaltarak, hücre sağkalımını önemli ölçüde arttırmaktadır ve hipertansiyona bağlı kardiyak hipertrofisini azaltmaktadır (112, 126)

Verapamil'in pankreatik β -hücreleri üzerindeki moleküler etki mekanizması, Shalev'in çalışmasında açıklanmıştır. Bu çalışmaya göre; KKB'lerinin fare modelinde ve insanlarda TXNIP ekspresyonunu azalttığı ve β -hücre apoptozunu önlediği gösterilmiştir. Verapamil ve diğer KKB'ler, TXNIP ekspresyonunu inhibe ederek işlevsel β -hücre kütlelerini korur, streptozotosin kaynaklı diyabeti önler ve obeziteye bağlı diyabette glukoz homeostazisini iyileştirir. Bu koruyucu etki, verapamil tedavisi gören hayvanların pankreasından izole edilen langerhans adacıklarında TXNIP düzeylerinde %80'lik bir azalma ile ilişkilendirilmiştir (128). Diyabetik fare modellerinde, verapamilin oral yoldan verilmesi, fonksiyonel beta hücre kütlelerini arttırmaktadır ve buna bağlı olarak diyabeti önleme ve hatta tersine çevirebilme potansiyeline sahiptir (129).

Verapamil'in, hücre içi kalsiyum seviyesini düşürerek, kalsinörin sinyalizasyonunu inhibe ederek, ChREBP'İ azaltarak çekirdeğe girişini ve TXNIP promotöründeki E-box tekrarına zamana bağlı olarak bağlanmasını engelleyerek etki gösterdiği ve bu yolla TXNIP transkripsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (112). Glikoza yanıt olarak ChREBP, defosforile olur, sitozolden çekirdeğe geçer ve E-box tekrarına bağlanır (130). Verapamil, ChREBP mRNA ekspresyonunu ve toplam ChREBP protein seviyelerini değiştirmeden bırakırken, nükleer ChREBP belirgin şekilde azaltmaktadır (112).

Diğer kalsiyum kanal blokerlerinin β hücreli TXNIP ekspresyonu üzerindeki etkisi incelendiğinde verapamilin TXNIP inhibisyonu yeteneğinin en yakın grup olan diltiazemden %50 daha fazla olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Buna ek olarak diyabetik açlık kan şekeri üzerine etkileri üzerine pozitif etkileri de bilinmektedir. Yapılan bir başka çalışmada, normal kan glukoz seviyelerine sahip olan kişilerde verapamil kullananlar ve kullanmayanlar arasında serum glukoz düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadığı belirtilmektedir. Bu karşın verapamil kullanıcıları ve kullanmayanlar arasında serum glukozundaki farklılık, insülin tedavisi alanlar için anlamlı olarak farklılık göstermektedir (128). Ayrıca, yüksek yağlı diyetle beslenen prediyabetik farelerde kullanılan verapamilin TXNIP'in artmış ekspresyonunu inhibe ederek nöropatiyi üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Bu bulgu, TXNIP'in dislipidemili prediyabetik hastalarda da nöropati tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir (8)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında yer alan tüm hayvan deneyleri Gaziantep Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi (GAÜNDAM) laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmanın moleküler genetik analizleri ise Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm işlemler, Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) Protokol No: 289, Karar No: 2022/58 etik kurul kararıyla uygun bulunmuştur (Ek 1).

3.1 Gereç

3.1.1 Çalışmada kullanılan deney hayvanları

Bu çalışmanın hayvan deneyleri kısmında 60 adet yetişkin, çalışma başlangıcında 180-220 gr ağırlığında olan, erkek Wistar albino sıçan GAÜNDAM'dan temin edilmiştir.

3.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Hayvanların beslenme ve bakımlarında;

- Standart sıçan yemi (Akın Yem, Türkiye)

Hayvanların tedavi protokolünde

- Verapamil, Hydrochloride (Sigma-Aldrich, ABD)

Hayvanların genel anestezisinde;

- Ksilazin (Bioveta, Çekya)
- Ketamin (Richter Pharma AG, Avusturya)

Dokuların saklanması;

- RNA stabilizasyon solüsyonu (Thermo Scientific, ABD)

RNA izolasyonunda;

- Ribo^{Ex}™ Total RNA izolasyon solüsyonu (GeneAll Biotechnology Seoul, South Korea)
- Kloform (Sigma-Aldrich, ABD)

- Etanol (Sigma-Aldrich, ABD)

cDNA eldesinde;

- cDNA kit (Solis Biodyne, Estonya)

Real-Time PCR aşamasında;

- HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus qPCR kiti (Solis Biodyne, Estonya)

Protein izolasyonu ve miktar tayininde;

- 10x RIPA buffer (Elbisecince, ABD)
- BCA Protein Colorimetric Assay Kit (Elabscience, ABD)

Western Blot;

- Glisin (Merck, ABD)
- Tris base (Sigma-Aldrich, ABD)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck, ABD)
- NaCl (Sigma-Aldrich, ABD)
- HCL (Merck, ABD)
- Tween20 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Yağsız süt tozu (Cell Signaling Technology, ABD)
- Color-coded Prestained protein marker (Cell Signaling Technology, ABD)
- 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, ABD)
- PVDF membran (Thermo Scientific, ABD)
- Metanol (Sigma-Aldrich, ABD)
- 2-beta merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, ABD)
- TEMED (Thermo Scientific, ABD)
- Amonyum persülfat (Sigma-Aldrich, ABD)
- Akrilamid (Sigma-Aldrich, ABD)
- Bis-akrilamid (Sigma-Aldrich, ABD)
- SignalFire™ ECL kemilüminesans kiti (Cell Signaling Technology, ABD)
- Primer ve sekonder antikorlar (Affinity biosciences, İngiltere)

3.1.3 Çalışmada kullanılan Cihazlar

Hayvanların ağırlık ve kan glikoz ölçümlerinde;

- Hassas Terazı (Hanna, İtalya)
- Kan şekeri ölçüm cihazı (IME-DC, Almanya)

Öğrenme deneylerinde;

- Termal kamera (Axis Communications, İsveç)

Dokuların saklanması;

- -80 °C dondurucu (Hettich, Almanya)

RNA ve protein izolasyonlarında;

- Tissue Lyser LT homojenizatör (Qiagen, Almanya)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)

RNA ve proteinlerin miktar tayininde;

- Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)
- Multiskan GO spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)

cDNA eldesinde;

- Thermal Cycler (Veriti™ Dx 96 - Well ABD)

Real-Time PCR aşamasında;

- qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya)

Western Blot aşamasında;

- Thermal Cycler cihazı (SensoQuest, Almanya)
- Mini PROTEAN® Tetra Cell elektroforez tankı (Bio-Rad, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

Proteinlerin membrana transferinde;

- Mini PROTEAN® Tetra Cell elektroforez tankı (Bio-Rad, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

Membranın bloklanmasında;

- Orbital çalkalayıcı (ISOLAB, Almanya)
- Antikorlar ile işaretlemelerde;
- Orbital çalkalayıcı (Stuart, İngiltere)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Görüntüleme aşamasında;

- Kemilüminesans görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Fransa)

3.2 Yöntem

3.2.1 Hayvan deneyleri

3.2.1.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması

Çalışma grupları TXNIP parametresi arasında büyük bir etki büyüklüğü ($f=0,6$) oluşacağı beklentisinin istatistiksel olarak anlamlı bulunması için her grupta gerekli minimum sayı 8 olarak belirlenmiştir ($\alpha=0,05;1-\beta=0,80$)(131). Çalışma boyunca oluşabilecek kayıplar gözönüne alındığında her bir gruptaki denek sayısının %25 oranında artılmasına karar verilmiş olup son olarak her bir grupta 10 denek olmasına karar verilmiştir. Güç analizi Gpower 3.9.1 yazılımında yapılmıştır.

1. **Kontrol grubu (K)**; deney süresince bu gruptaki sıçanlara hiçbir kimyasal ve ilaç uygulaması yapılmadı.
2. **Kontrol+Gavaj grubu (KG)**; deney süresince bu gruptaki sıçanlara anti diyabetik ilaçların verilmesinde çözücü olarak kullanılan distile su verildi.
3. **Kontrol+verapamil grubu (KV)**; bu gruptaki sıçanlara deney süresince günlük, her gün aynı saatte distilesuda çözülmüş 10 mg/kg dozunda verapamil gavaj yoluyla verildi (131).
4. **Diyabet grubu (DV)**; bu grup sıçanlara 40 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak STZ uygulanarak diyabet modeli oluşturuldu (132). Diyabet modeli oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca hiçbir kimyasal ve ilaç uygulaması yapılmadı.
5. **Diyabet+Gavaj grubu (DG)**; bu grup sıçanlara 40 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak STZ uygulanarak diyabet modeli oluşturuldu (132). Gavaj grubu, bu grup sıçanlara anti diyabetik ilaçların verilmesinde çözücü olarak kullanılan distile su verildi.
6. **Diyabet+verapamil grubu (DV)**; bu grup sıçanlara deney süresince günlük, her gün aynı saatte distile suda çözülmüş 10 mg/kg dozunda verapamil gavaj yoluyla verildi (131).

3.2.1.2 Hayvanların beslenme ve bakımı

Tüm hayvan grupları çalışmanın başlangıcından sonuna kadar standart sıçan yemi ile beslendi.

Deney gruplarındaki tüm hayvanların haftalık ağırlık takipleri yapıldı. Tüm hayvanların haftalık olarak kuyruk venlerinden alınan bir damla kan ile şeker ölçüm cihazı ve stripleri kullanılarak kan glikoz düzeyleri ölçüldü. 22 ± 3 °C, % 45 ± 10 nem ve 12 saatlik aydınlık karanlık döngü kontrollü bir odada tutularak sınırsız içme suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Çalışmada kullanılacak hayvanlar Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden (GAÜNDAM) temin edildi ve bütün beslenme ve bakım işlemleri bu merkezde gerçekleştirildi

3.2.1.3 STZ enjeksiyonu ile diyabetin indüklenmesi

Deneye başlamadan önce her bir sıçan tartılacak ve kan glikoz seviyesi bir glukometre yardımıyla kuyruk veniden ölçülerek kaydedildi. Deneysel diyabetik sıçan modeli için STZ kullanıldı (132). Enjeksiyondan önce STZ ph 4.5 daki 0,1 M sitrat tamponunda çözülmüş olarak 40mg/kg dozunda, sıçanlara bir 0,1 ml'lik enjektör yardımıyla intraperitoneal olarak enjekte edildi (133). 72 saat sonra ve çalışma süresinin sonunda hayvanların kuyruk kanından kan glikoz seviyeleri ölçüldü ve 200 ml/dl üzeri kan glukoz düzeyine sahip olan hayvanlar diyabet olarak kabul edildi.

3.2.1.4 Hayvan ağırlıkları tartımı ve kan şekeri ölçümü

Sıçanların ağırlıkları STZ ile diyabet indüklendikten sonra ilk gün ve sonrasında 12 hafta boyunca günlük tartıldı, kan şekerleri haftalık ölçüldü ve kaydedildi.

3.2.1.5 Verapamil uygulaması

Yetkili firmadan etken madde toz halinde temin edilen ilaç, uygun miktarda distile suda karıştırıcı yardımıyla çözdürülüp uygulanacak deney grubuna 10 mg/kg dozunda gavaj yoluyla verildi (134, 135).

3.2.1.6 Öğrenme deneyleri

Bütün gruplardaki hayvanlara, 0. Hafta ve tüm hayvan deneylerinin tamamlandığı 12. haftanın sonunda Morris su tankı kullanılarak (gizli platform) yer öğrenme protokolü ile uzamsal bellek testi uygulandı. Öğrenme denemelerine başlamadan önce stresi en aza indirmek adına her hayvana 3 gün boyunca günde bir kere 1 dakika yüzme alıştırmaları yapıldı. İlk 5 gün öğrenme denemeleri, 6. gün ise belleği test eden probe denemeler gerçekleştirildi.

Öğrenme denemeleri günde 4 farklı noktadan uygulandı. Morris su tankı, öğrenme denemelerinin uygulandığı günlerde 25 ± 3 °C su ile dolduruldu. Morris tankı rastgele dört kadrana bölündükten sonra platform, kadranlardan herhangi birine bunlardan birinin merkezine su seviyesinin 1-2 cm altında kalacak biçimde yerleştirildi. Tankın içerisindeki suya, içerisindeki platformun yerinin tespit edilememesi amacıyla toksik olmayan gıda boyası karıştırıldı. Tankın çevresine, hayvanların platformun yerini öğrenmesine yardımcı olacak farklı renk ve şekillerde ipuçları asıldı. Beş gün sürecek öğrenme günleri boyunca platformun sürekli aynı kadrana ve aynı mesafede kalması sağlandı. Öğrenme denemelerinde hayvanın bırakılacağı noktalar Kuzey (K), Doğu (D), Güneydoğu (GD), Kuzeybatı (KB) olmak üzere belirlendi.

Tablo 3.1 Öğrenme deneyinde sıçanların suya atış noktaları (65)

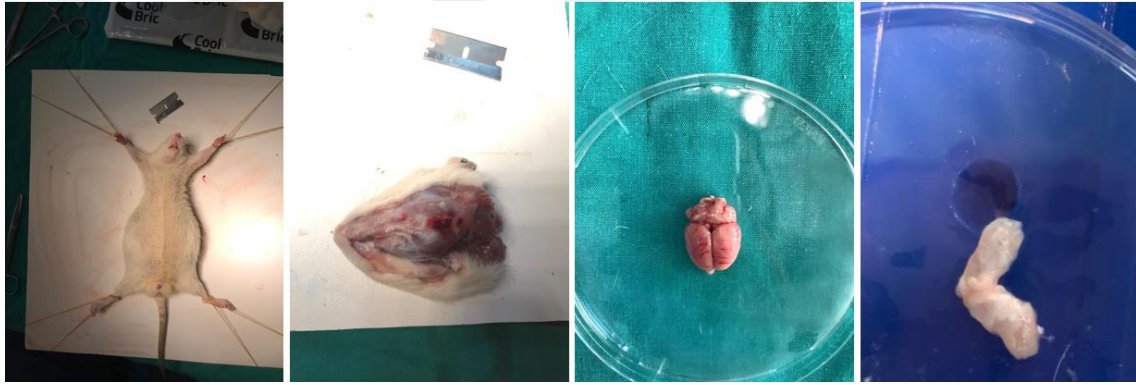
Gün	Birinci atış noktası	İkinci atış noktası	Üçüncü atış noktası	Dördüncü atış noktası
1. Gün	KUZEY	DOĞU	GÜNEYDOĞU	KUZEYBATI
2. Gün	GÜNEYDOĞU	KUZEY	KUZEYBATI	DOĞU
3. Gün	KUZEYBATI	GÜNEYDOĞU	DOĞU	KUZEY
4. Gün	DOĞU	KUZEYBATI	KUZEY	GÜNEYDOĞU
5. Gün	KUZEY	GÜNEYDOĞU	DOĞU	KUZEYBATI
6. Gün (Probe)	KUZEYDOĞU			

Hayvanlar sırasıyla seçilen suya bırakılma noktasından suya bırakılarak gizli platformu bulması için 120 saniye sürede platformun üzerine çıkmaları beklendi. İlk gün atışlarında 120 saniye içerisinde platformu bulamayan hayvan, bu sürenin sonunda platformun yerini öğrenebilmesi için platformun üzerine konarak 30 saniye süreyle bekletildi. Her öğrenme denemesi gününde, ilk deneme için hayvanın ilk suya bırakılış noktası tablo 3.1’de gösterildiği gibi bir önceki günden farklı olacak biçimde seçildi. Devam eden denemelerde, platformu bulan ve üzerine çıkan hayvanın başarılı olduğu kabul edildi ve 5. günün sonunda öğrenme denemeleri sonlandırıldı. Öğrenme denemelerinin tamamlanmasının ardından, altıncı gün belleği test etmek amacıyla probe denemesine geçildi.

Probe denemelerine geçilmeden önce platform su tankından çıkartıldı. Hayvanlar daha önce hiç bırakılmadığı bir noktadan suya bırakıldı ve her hayvana 60 saniye süre verildi ve sürenin tamamlanmasının ardından hayvanlar su içerisinde alınıp kurularak kafeslerine konuldu (65). Öğrenme denemelerinin tamamı Morris su tankının üzerinde konumlandırılmış olan, tavana asılı termal bir kamera ve Etho Vision XT sürüm 11.5 video takip sistemiyle kaydedilip öğrenme-bellek verileri analizler için depolandı.

3.2.1.7 Hayvan deneylerinin sonlandırılması

Hayvan deneyleri 12. haftanın sonunda son probe denemelerini takiben anestezi altında (Ksilazin+ Ketamin; 5-10 mg/kg + 50-60 mg/kg, intraperitoneal) şekil 3.1’de gösterildiği gibi sakrifikasyonları gerçekleştirildi ve hipokampus dokuları izole edildi.



Şekil 3.1 Deney hayvanları sakrifikasyonu ve hipokampus dokusunun izolasyonu

Elde edilen hipokampus doku örnekleri daha sonra yapılacak moleküler analizler amacıyla Tıbbi Biyoloji AD.’nda bulunan -80°C dondurucularda saklandı.

3.2.2 Moleküler genetik analizler

3.2.2.1 Total RNA (mRNA) eldesi

Taze dokudan total RNA izole etmek için Ribo^{Ex}™ Total RNA izolasyon solüsyonu (GeneAll Biotechnology Seoul, South Korea) kullanıldı. İlgili solüsyonun çalışma protokolü şu şekilde gerçekleştirildi:

1. Taze dokular yeterli miktarda lam üzerinde kesilerek uygun tüplere alındı.
2. Elde edilen parçaların üzerine 1 ml RiboEx™ ve metal boncuk eklenip, doku parçalayıcı kullanılarak 15 - 30 dk boyunca parçalandı.

3. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra +4 °C'de 12000 g'de 10 dakika santrifüjlendi.
4. Santrifüj sonrası sıvı faz yeni tüpe alındı.
5. Üzerine 0,2 ml kloroform eklenerek 15 saniye vortekslendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrası +4°C'de 12000 g'de 10 dakika santrifüjlendi ve üstteki sıvı faz toplama tüpüne alındı.
7. Toplama tüpündeki RNA'yı çöktürmek için 0,5 ml izopropil alkol eklendi ve 3-5 dk nazıkçe karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra +4 °C'de 12000 g'de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
9. Santrifüj sonrası sıvı faz uzaklaştırıldı.
10. Toplama tüpündeki artık ürünleri uzaklaştırmak için 1 ml %75'lik etanol eklendi ve +4 °C'de 7500 g'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.
11. Sıvı faz uzaklaştırılarak 5-10 dakika oda sıcaklığında tüpteki peletin kurumması beklendi.
12. RNA'ların çözünmesi için toplama tüpüne 30–50 µl ribonükleaz içermeyen su eklenip 56 °C'de 10-15 dakika inkübe edildi.

3.2.2.2 Total RNA'nın miktar ve kalite tayini

İzolasyon işlemi tamamlanmış total RNA numunelerinin konsantrasyonlarını ve kalitesini belirleyebilmek amacıyla NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Total RNA'dan cDNA elde etmek için reaksiyondaki tüm örnekleri aynı konsantrasyon ve hacimlere ayarlayabilmek adına RNA konsantrasyonları 200 ng/µl olarak ayarlandı.

3.2.2.3 mRNA'dan cDNA eldesi

Gen amplifikasyon çalışması için cDNA sentezinde Solis Biodyne cDNA kit (Tartu, Estonya, Catalog number 06 - 35 - 00050) kullanıldı. İlgili kitin çalışma protokolü şu şekilde gerçekleştirildi:

1. Reaktifleri oda sıcaklığında çözdürüldü ve her bir reaktif hafifçe vorteksleyerek ardından kısa süre santrifüjlendi.
2. Kit prosedürüne göre RNA ve diğer tepkime bileşenleri Tablo 3.1. de gösterildiği gibi eklenerek hacminin geri kalan kısmı ise nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlandı.

Tablo 3.2 cDNA tepkime bileşenleri ve hacimleri.

Bileşen	Hacim
Oligo (dt) primerleri/Random	1 µl
dNTP Karışımı	0,5 µl
10x DTT'li RT reaksiyon tamponu	2 µl
Ters Transkriptaz	1 µl
Ribonükleaz İnhibitörü	0,5 µl
Kalıp RNA	0,5 µl
Ribonükleaz içermeyen su	14,5 µl
Toplam	20 µl

3. Tablo 3.2'deki karışım, cDNA sentezi için Veriti™ Dx 96 - Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) cihazı ile ters transkripsiyon tablo 3.3'de belirtilen tepkime koşullarında gerçekleştirildi.

Tablo 3.3 Ters transkripsiyon tepkime koşulları

Sıcaklık	Zaman
25°C	10 dakika
50°C	5 dakika
85 °C	5 dakika

4. Hazır olan cDNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.2.2.4 Primer seçimi

İlgili gen bölgesi primerlerinin seçimi yapılırken literatür taraması yapıldı. Seçilen genler tablo 3.4 de gösterildiği gibidir;

Tablo 3.4 qRT-PCR’da kullanılan primer assayleri

Primer	Forward	Reverse
Beta aktin	GCAGAAGGAGATTACTGCCCT	GCTGATCCACATCTGCTGGAA
GRP78	TCGACTTGGGGACCACCTAT	GCCCTGATCGTTGGCTATGA
IRE-1 α	TCATCTGGCCTCTTCTCTCGGA	TTGAGTGAGTGGTTGGAGGC
ATF6	GGACCAGGTGGTGTGAGAG	GACAGCTCTGCGCTTIGGG
NF-κ.B	GAGATTGTGCCAAGAGIGAC	CTTGTCTTCCATGGTGGATG
NLRP3	GTGGAGATCCTAGGTTTCTCTG	CAGGATCTCATTCTCTTGGATC
IL-1β	TGCTGTCTGACCCATGTGAG	GTCGTTGCTTGICTCTCCTTG
IL-18	CGCAGTAATACGGAGCATAAATGAC	GGTAGACATCCTTCCATCCTTACC
Bax	CGGCGAATTGGAGATGAACTGG	CTAGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC
Bcl-2	TGTGGATGACTGACTACCTGAACC	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
Kaspaz-3	GTGGAAGTACGATGATATGGC	CGCAAAGTACTGGATGAACC
TXNIP	GCTCAATCATGGTGTGTTCAAG	CTTCACACACTTCCACTGTCAC

3.2.2.5 qRT-PCR

Total mRNA’den sentezlenen cDNA’lar kullanılarak:

- ER stres ilişkili gen bölgelerinin; GRP78, IRE-1 α ve ATF 6
- TXNIP geninin
- İnflamasyonla ilişkili gen bölgelerinin; NLRP3, NF- κ .B, IL-1 β , IL-18
- Apoptoz ile ilişkili gen bölgelerinin; Bax, Bcl-2, Kaspaz-3

Gen ifade düzeylerini belirlemek amacıyla Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qRT-PCR) metodu kullanıldı.

1. qRT-PCR için gerekli tepkime bileşenleri Solis Biodyne HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus qPCR mastermix kiti kullanılarak elde edildi.
2. Tepkime bileşenlerinin her bir örnek için hacimleri buz bloğu üzerinde tablo 3.5'te belirtilen hacimlere göre hazırlandı.
3. Master mix karışımı 0,1 µl'lik real time tüplerinin her birine 8 µl olacak şekilde eklendi.
4. Son olarak da hazırlanan mixin üzerine cDNA örneklerinden 2 µl eklenerek 20 µl'ye tamamlandı.

Tablo 3.5 qRT-PCR reaksiyon hacimleri ve bileşenleri

Bileşenler	Hacim
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix	4 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	13 µl
Template DNA	2 µl
Total	20 µl

5. PCR Tüpleri, qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazına yüklendi ve tablo 3.6'teki tepkime koşullarına göre ayarlandı reaksiyon başlatıldı.

Tablo 3.6 Önerilen qRT-PCR döngü protokolü

Döngü	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Initial aktivasyon	95°C	12 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 s	40
Annealing	60-65°C	20 s	
Extension	72°C	20 s	

Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen Ct değerleri kullanılarak, gen ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak hesaplanmış ve daha sonra istatistiksel analizleri yapılmıştır.

3.2.3 Western blotting

3.2.3.1 Doku homojenizasyonu ve protein izolasyonu

1. Bütün deney gruplarındaki hayvanlardan çıkarılan ve ayrı ayrı mikrosantrifüj tüplerine alınarak -80°C 'de saklanan hipokampus dokularından, uygun miktarlarda (30-40 mg) lam üzerinde kesilerek temiz tüplere alındı.
2. Her tüpe birer adet 5 mm çelik boncuk (Qiagen, Hilden, Almanya. Cat. No. 69989) eklendi.
3. Protein lizatları için her örnek başına, RIPA (Elabscience, Texas, ABD. Cat. No. 8553) Lizis Tamponu 1 mL RIPA Lizisine 10 μL PMSF ve 10 μL Na_3VO_4 olacak şekilde eklendi.
4. Tüpler Qiagen Tissue Lyser LT (Qiagen, Hilden, Almanya. Cat. No. 69980) cihazına yerleştirildi, ardından 50 osc ve 5 dakika boyunca homojenizasyonu gerçekleştirildi.
5. Homojenizasyondan sonra 30 dakika boyunca buz üzerinde çalkalandı ve lizize edildi.
6. DNA zincirinin kırıldığından ve numunenin viskozitesinin azaldığından emin olmak için lizat yaklaşık buz üstünde 50 kez pipetajlandı.
7. Homojenize doku çözeltileri yeni tüplere alınarak, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika boyunca 12,000 x g'de santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası üst fazlar, temiz 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak elde edilmiş protein lizatları daha sonra kalite ve miktar tayini yapılmak üzere Tıbbi Biyoloji AD.'nda bulunan -80°C dondurucularda saklandı.

3.2.3.2 Elde edilen proteinlerin miktar ve kalite tayini

İzole edilen proteinlerin kalite ve konsantrasyonları, total proteinin kolorimetrik tespiti ve miktar tayini için bisinkoninik asite (BCA) dayalı bir yöntemi içeren BCA Protein Colorimetric Assay Kit (Elabscience, Texas, ABD. Cat. No. E-BC-K318-M) kullanılarak gerçekleştirildi.

1. Stok reaksiyon çözeltisi hazırlanırken kit içerisindeki solüsyon A ve B 50:1 oranında olacak şekilde karıştırıldı.
2. Hazırlanan solüsyon 96 kuyucuklu plate'lerin her kuyucuğa 200 µl reaksiyon solüsyonu eklendi.
3. Kalibrasyon grafiği oluşturmak amacıyla standart hazırlanırken seri dilüsyon yapılarak farklı konsantrasyonlarda BSA sulu çözeltisi 20 µl her kuyucuğa eklendi.
4. Her örnek daha önce belirlenmiş olan sırasına göre kuyucuklara 20 µl eklenip plate 30 saniye boyunca nazikçe sallanarak karıştırıldı.
5. Sonrasında 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon süresi sonunda Multiskan Go (Thermo Fisher ABD Cat. No. 51119200) cihazı kullanılarak 562 nm dalga boyunda absorban değerleri ölçüldü.

3.2.3.3 Protein konsantrasyonlarının eşitlenmesi ve protein denatürasyonu

1. Absorbans değerleri ölçülmüş proteinlerin konsantrasyonlarını belirlemek üzere seri dilüsyon yapılmış standartları kullanarak oluşturulmuş kalibrasyon grafiğinde yararlanarak protein konsantrasyonları belirlendi.
2. Her örneğin proteinin konsantrasyonu 20µg/10µl olacak şekilde ayarlandı
3. Yükleme tamponu olarak 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 1610737) kullanıldı.
4. Proteinlerdeki disülfür bağlarını (S-S) kırarak proteinin üç boyutlu yapısını bozmak amacıyla 2x Laemmli Sample Buffer'a 1:20 oranında 2-beta mercaptoethanol eklendi.
5. Yükleme tamponu ve protein 1:1 oranında karıştırılarak toplam hacim 20 µl'ye ayarlandı.
6. Denatürasyon, 95 °C' de 5 dk Labcycler thermal cyler cihazı (SensoQuest, Göttingen, Almanya) kullanılarak tamamlandı.

3.2.3.4 SDS-PAGE hazırlanması ve jel elektroforezi

Proteinlerin yüklenmesi ve yürütülmesi için, çalışmada protein ifade düzeylerinin saptanması hedeflenen proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için manuel olarak hazırlanmış % 10'luk SDS-PAGE jel kullanılmıştır.

1. Öncelikle tablo 3.7’da gösterildiği gibi jel karışımı hazırlandı ve camlarının arasına mikropipet kullanarak döküldü. Üzerine %99’luk etanol eklenip 30 dakika jel polimerizasyonu için beklendi.

Tablo 3.7 Yürütme jeli (%10) formülasyonu

Bileşenler	Hacim
H ₂ O	8.13 ml
30% AA	6.7 ml
4xResolving buffer (1,5 M Tris+%04 SDS)	5 ml
10% APS	150 µl
TEMED	20 µl
Toplam	20 ml

2. Yürütme Jelinin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra etanol uzaklaştırıldı ve 3.8’de belirtildiği gibi istifleme jeli, yürütme jelinin üzerine dikkatli bir şekilde döküldükten sonra 30 dakika polimerazyonu beklendi.
3. SDS-Page jel elektroforezi için kullanılan Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 1658004) tankına jeller elektrodlu jel çerçevesi içerisine yerleştirildi.

Tablo 3.8 İstifleme jeli (%4) formülasyonu

Bileşenler	Hacim
H ₂ O	3,7 ml
30% AA	0,8 ml
4x Stacking buffer	1,5 ml
10% APS	100 µl
TEMED	12 µl
Toplam	6 ml

4. Jel tankı, 10X Tris-Glycine SDS Running Buffer stok çözeltisinden distile su ile seyreltilerek elde edilen 1X konsantrasyonda çözelti dolduruldu.
5. Taraklar çıkarıldıktan sonra ilk ve son kuyucuğa 20 µl Protein ladder (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 74124) yüklendi.
6. Diğer kuyucuklara ise 20 µl denatüre edilmiş proteinler yüklenerek tankın kapağı kapatıldı. İstifleme jelini geçip protein ladderlar açılıncaya kadar (yaklaşık 30 dakika) 50V'da daha sonra 120V'da 90 dakika yürütüldü.

3.2.3.5 Proteinlerin membrana transferi

1. PVDF membranın (Thermo Scientific, Waltham, ABD. Cat. No. LC2005) yaklaşık 1 dk metanolde çalkanıp yüzey aktivasyonu yapıldı.
2. Yüzey aktivasyonu tamamlanan membran, ardından 1X Transfer Buffer ile yıkandı.
3. Sandviç oluşturulacak olan tüm süngerler ve filtre kağıtları 1X Transfer Buffer ile ıslatılarak muamele edildi.
4. Membran ve jel aralarında hava kabarcığı kalmayacak şekilde birbirlerinin üstüne koyulduktan sonra her iki tarafa sırasıyla filtre kâğıdı ve süngerler koyulup transfer kaseti kapatılarak sandviç modeli oluşturuldu.
5. Hazırlanan kaset, Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 1658004) tankına yerleştirilerek, üzeri 1X Transfer Buffer ile dolduruldu.
6. 23 V ve 4°C'de gece boyunca ıslak transfer yöntemi ile proteinlerin membrana transferi gerçekleştirildi.

3.2.3.6 Membranın bloklanması

Membran bloklaması için %5'lik yağsız süt tozu içeren bloklama buffer kullanıldı. Bloklama tamponu için 1 litre 1X Tris Buffered Saline (TBS) sulu çözeltisine, 1 ml TWEEN® 20 (Merck, Hessen, ABD. Cat. No. P1379) eklenerek 1X TBST solüsyonu hazırlandı. Elde edilen 1X TBST stok solüsyonundan, 100 ml'ye 5 gram yağsız süt tozu (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 9999) eklenerek bloklama tamponu hazır hale getirildi.

Transfer işleminin tamamlanmasının ardından membran, içeren bloklama tamponu içerisinde oda sıcaklığında 1 buçuk saat boyunca orbital çalkalayıcı (ISOLAB, Bavyera, Almanya) üzerinde bloklandı.

3.2.3.7 Primer antikor ile işaretleme

Bloklama işleminden sonra analizleri gerçekleştirilecek olan TXNIP (DF706), GRP78 (AF5366), IL - 1 β (DF6251), Kaspaz-3 (AF6311) protein ifadesinin analizi için tavşan birincil antikorunu 1:1000 oranında (Affinity biosciences, Wembley, İngiltere) kontrol için tavşan birincil antikor beta Aktin (Texas, ABD. Cat. No. E-AB-40338) bloklama tamponu içerisinde ayrı ayrı 1:3000 oranında hazırlandı. Membranlar, hazırlanan primer antikor çözeltilerine alınarak gece boyunca 4°C’de orbital çalkalayıcı (ISOLAB, Bavyera, Almanya) üzerinde çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar, antikor çözeltilerinden uzaklaştırılıp, bloklama tamponu ile 3 defa, 5’er dakika süreyle yıkandı.

3.2.3.8 Sekonder antikor ile işaretleme

Primer antikorlarla işaretleme ve yıkama işlemlerinin tamamlanmasının ardından, sekonderantikor Anti-tavşan IgG, HRP-linked (CUSABIO, CSB - PA564648, Wuhan, China Cat. No. 7074) bloklama tamponu içerisinde 1:2000 oranında hazırlandı. Membranlar, hazırlanan sekonder antikor çözeltileriyle oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar, antikor çözeltilerinden uzaklaştırılıp blocking solüsyonuyla 3 defa, 10’ar dakika süreyle yıkandı.

3.2.3.9 Görüntüleme ve analiz

Protein bantları, SignalFire™ ECL Reagent (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 6883) kemilüminesans kiti kullanılarak görüntülendi. Kit içerisindeki SignalFire™ ECL Reagent A ve SignalFire™ ECL Reagent B solüyonları 1:1 oranında karıştırılıp 3 dakikalık inkübasyonun sonunda membran üzerine dağıtıldı. Membran, oda sıcaklığında ve karanlıkta 3 dakika inkübe edildi. Ardından, Fusion FX kemilüminesans görüntüleme cihazı ile (Vilber Lourmat, Collégien, Fransa) görüntüler kaydedildi.

Kaydedilen protein bant görüntülerinin, ImageJ sürüm 1.54f programı ile dansitometrik ölçümleri gerçekleştirilerek, beta aktin protein seviyeleri ile normalizasyonu sağlandı.

3.2.4 İstatistiksel analiz

Yapılan tüm deneysel verilerin istatistiksel analizlerinde Graphpad Prism 8.0.2 (San Diego, CA, USA) programı kullanıldı. one-way ANOVA ve post-hoc testlerden Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapıldı. D

Hayvan deneylerinde ağırlık ve kan glukoz düzey verilerin analizleri yapılırken gruplar arasındaki farklar Two-way ANOVA ve post-hoc testlerden Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapıldı. Öğrenme deneylerinin analizleri ise farklar One-way ANOVA ve post-hoc testlerden Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma (ort \pm std) şeklinde özetlendi. İstatistiksel analizlerde $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Gen ifade analizlerinde beta aktin geni house keeping olarak kullanılmıştır. Analiz yapılırken $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri One-way ANOVA ve post-hoc testlerden Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapıldı.

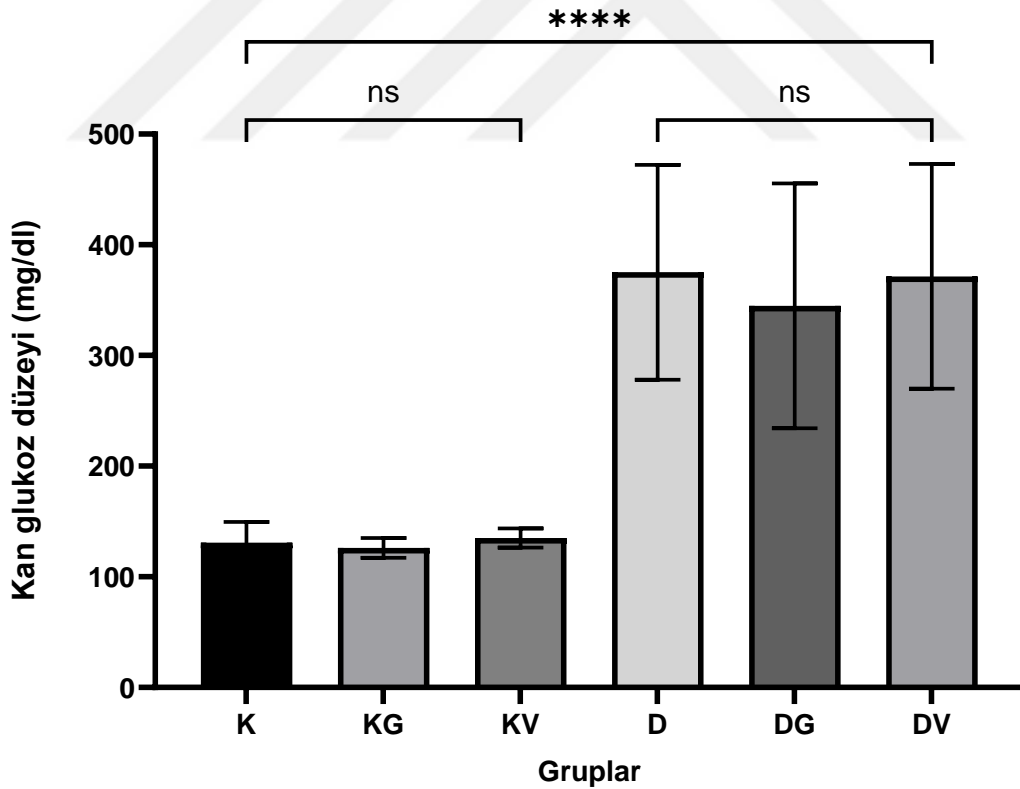
Protein ifade analizlerinin değerlendirilmesinde ise ImageJ sürüm 1.54f programı ile bant yoğunlukları analiz edilerek One-way ANOVA ve post-hoc testlerden Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 Hayvan Deneyleri

4.1.1 STZ enjeksiyonu ile diyabetin indüklenmesi

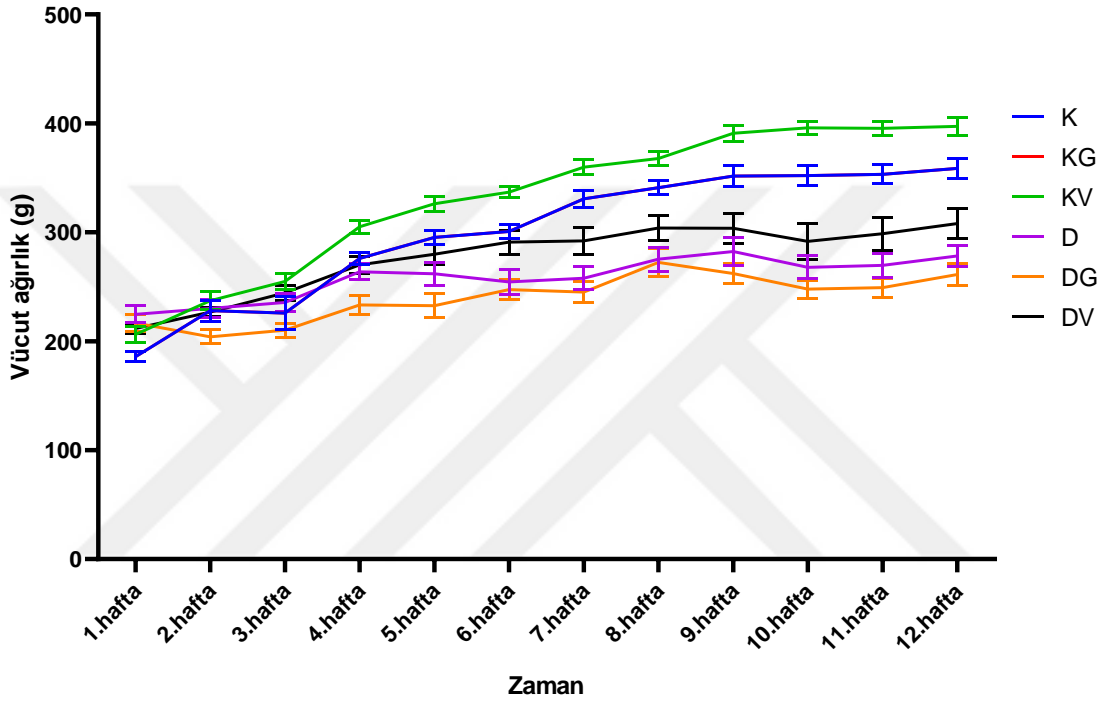
Çalışmada rastgele gruplar oluşturulduktan sonra diyabet olacak gruplara stz ile diyabet indüklendi. Enjeksiyonu takiben 72 saat sonunda kan glukoz değerleri ölçüldüğünde grupların kan glukoz düzeyleri şekil 4.1'deki gibidir. Buna göre kan glukoz seviyeleri kontrol gruplarına göre diyabetin indüklendiği gruplarda anlamlı bir şekilde (**** $p<0,0001$) artmıştır. Ancak, kontrol ve diyabetik grupların kendi içerisinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 4.1 Stz enjeksiyonundan 72 saat sonra grupların kan glukoz düzeyi ortalamaları

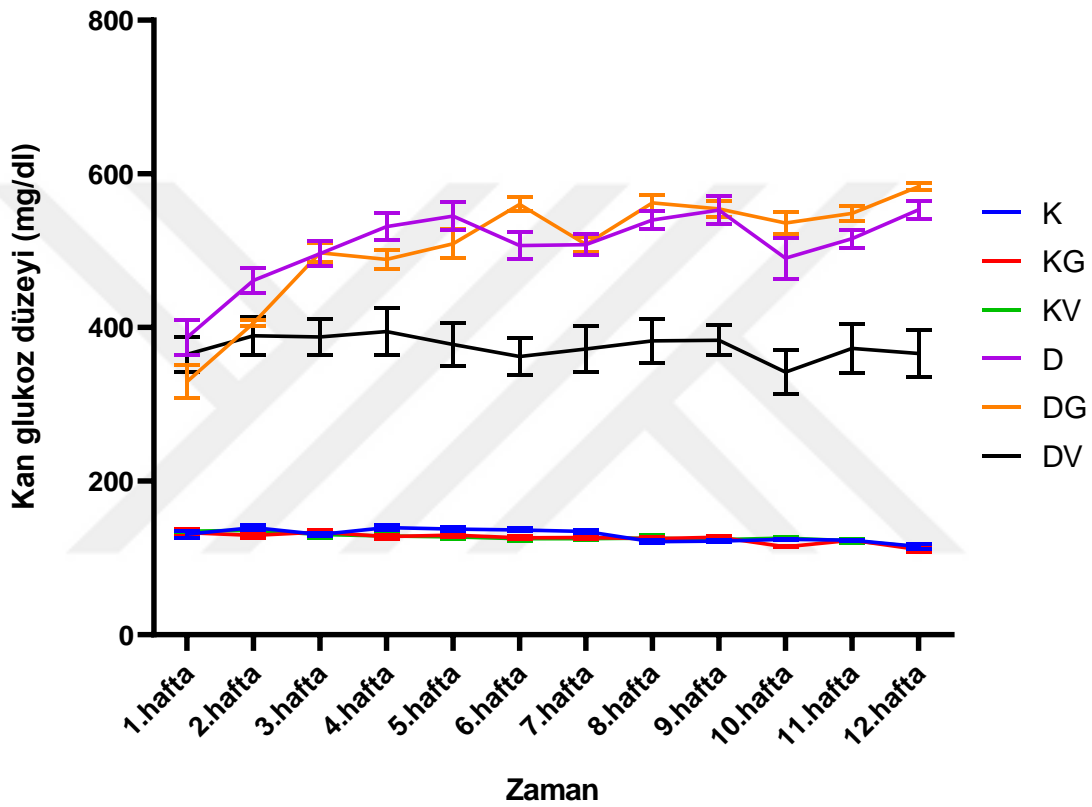
4.1.2 Hayvanların ağırlık değişimi ve kan glukoz düzeylerinin belirlenmesi

Hayvanların başlangıçta grup ağırlık ortalamaları arası anlamlı bir fark bulunmazken şekil 4.2’de gösterildiği gibi 12. hafta sonunda kontrol gruplarının ağırlıkları, diyabetik gruplara göre anlamlı bir şekilde (****p<0,0001) artmıştır. Kontrol grupları ağırlıklarının kendi içerisinde anlamlı bir fark olmamasına rağmen DV grubun ağırlık ortalaması, D ve DG gruplarına göre anlamlı bir artış (****p<0,0001) göstermektedir.



Şekil 4.2 Zamana bağlı vücut ağırlığı değişim grafiği

Şekil 4.3'te gösterildiği gibi 12. hafta sonunda diyabetik gruplarının kan glukoz düzeyleri, kontrol gruplarına göre anlamlı bir şekilde (****p<0,0001) artmıştır. Kontrol gruplarının arasında kan glukoz düzeylerinde anlamlı bir fark olmamasına rağmen DV grubunun kan glukoz düzeyi, D ve DG gruplarına göre anlamlı bir azalış (****p<0,0001) göstermektedir.

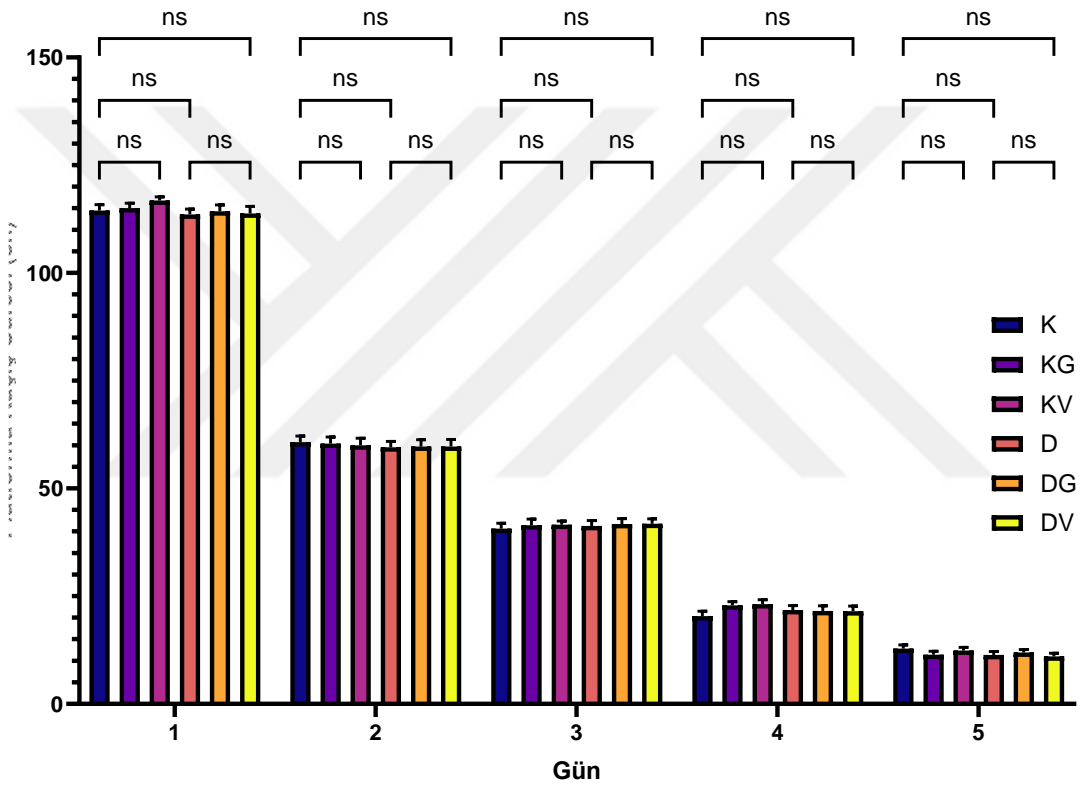


Şekil 4.3 Zamana bağlı kan glukoz düzeyi değişim grafiği

4.1.3 Öğrenme Deneyleri

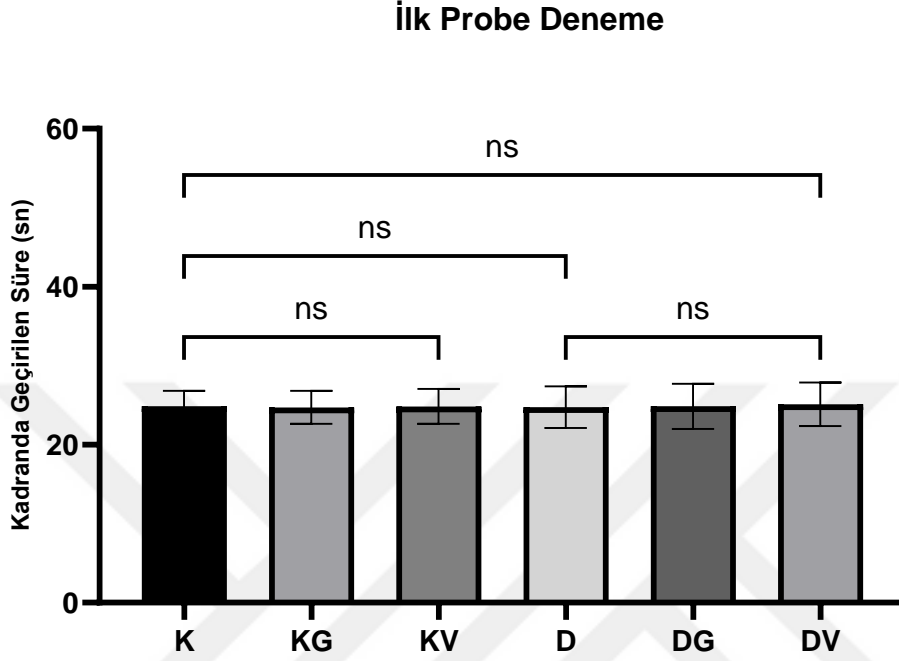
4.1.3.1 İlk öğrenme deneyi

Tüm deney gruplarındaki hayvanların öğrenme ve bellek performansları Morris su tankı ile test edildi. Bellek performanslarının değerlendirilmesi amacıyla şekil 4.4'te gösterildiği gibi 0. haftada yapılan öğrenme deneyleri sonucunda platforma kaçış sürelerinde 5 gün boyunca gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.



Şekil 4.4 İlk öğrenme deneyi

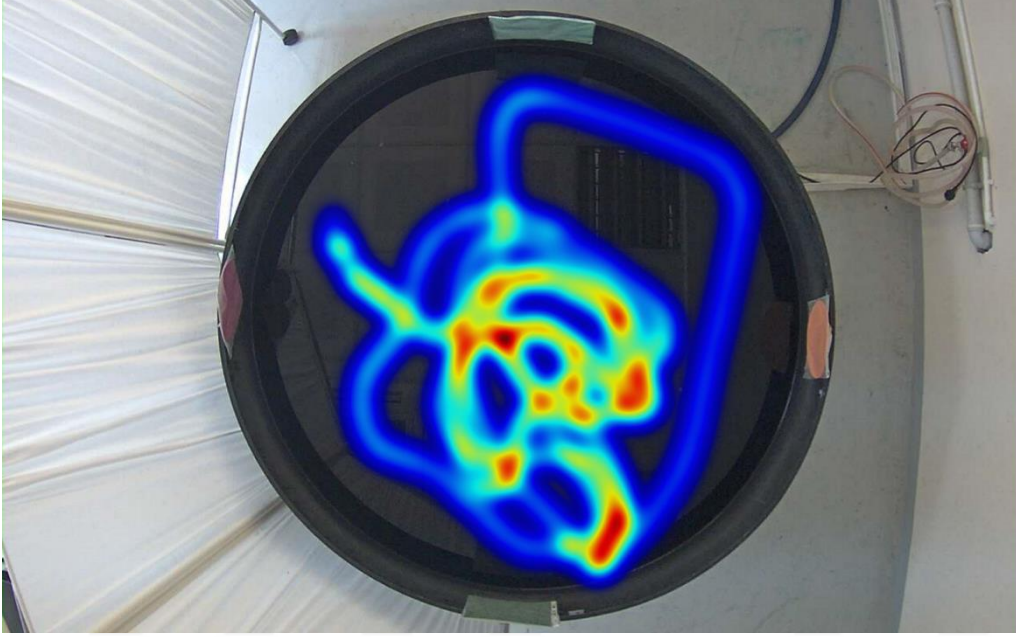
Öğrenme deneylerini takiben yapılan probe denemede, platformun bulunduğu kadranda geçirilen süreler arasında şekil 4.5'te gösterildiği gibi istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



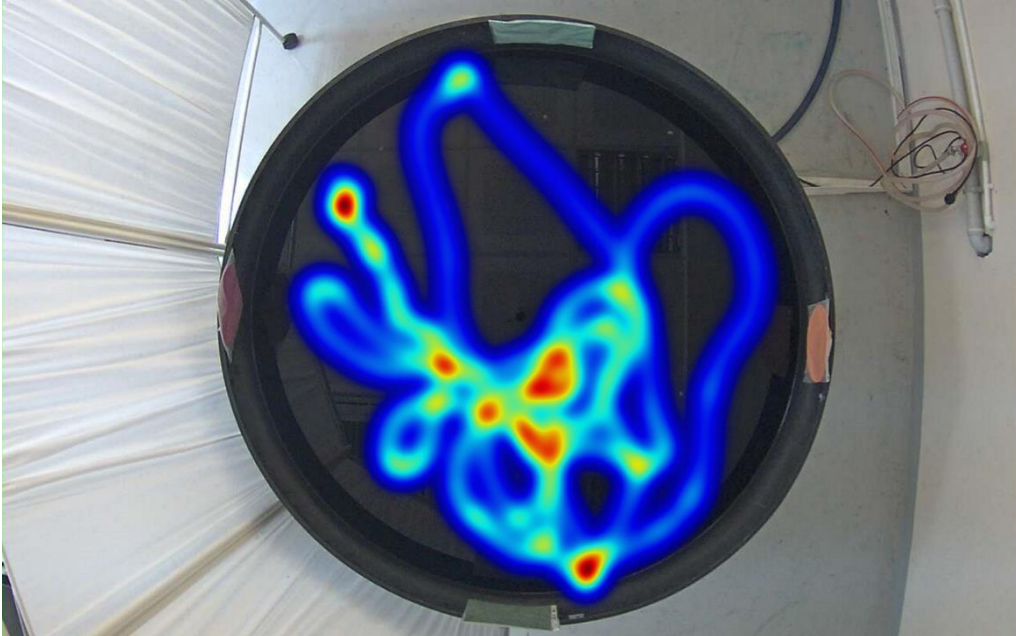
Şekil 4.5 İlk probe deneme

4.1.3.1.1 İlk probe deneme ısı haritası sonuçları

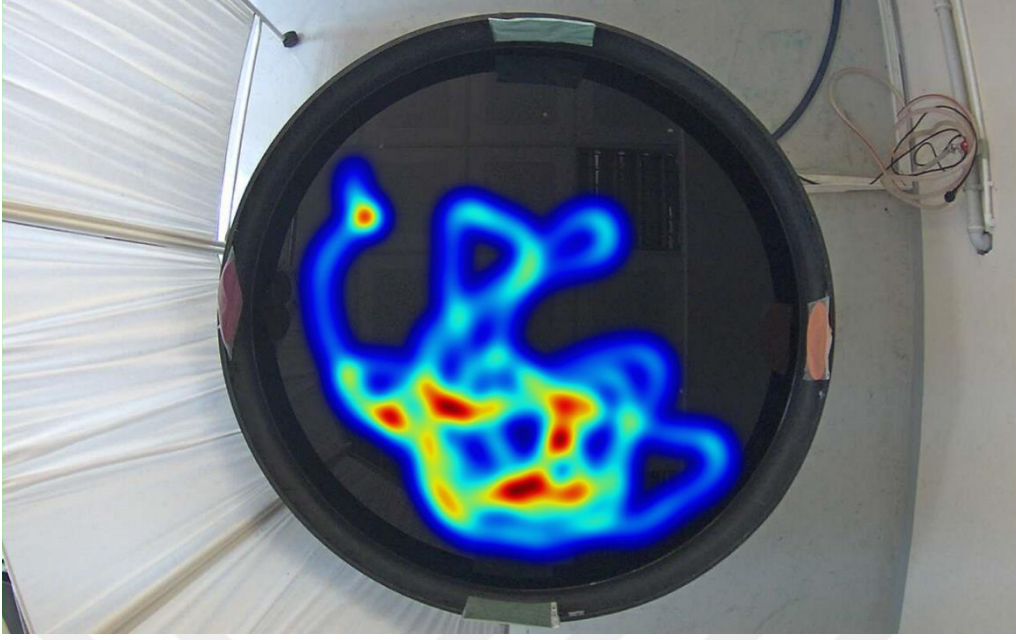
Probe denemelerinde, sıçanların platform ararken izledikleri yollar termal kamera ve EthoVision programı kullanılarak ısı haritaları şekil 4.6-11'de gösterildiği gibi oluşturulmuştur. Isı harita sonuçlarına, hedef kadranda yaydıkları ısı göre tüm gruplarda benzerlik göstermektedir.



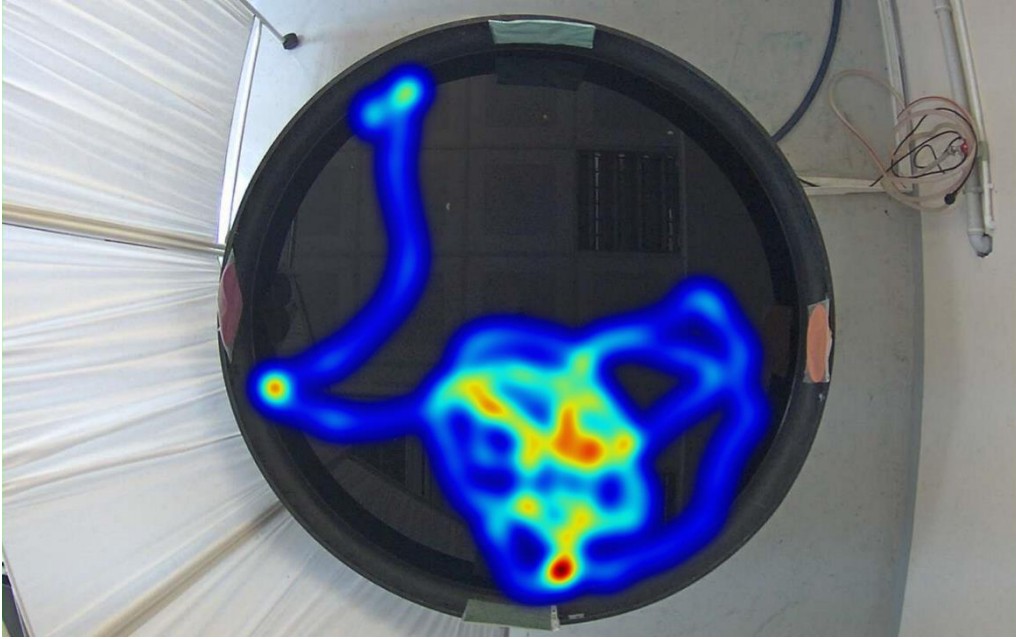
Şekil 4.6 K grubu ısı haritası



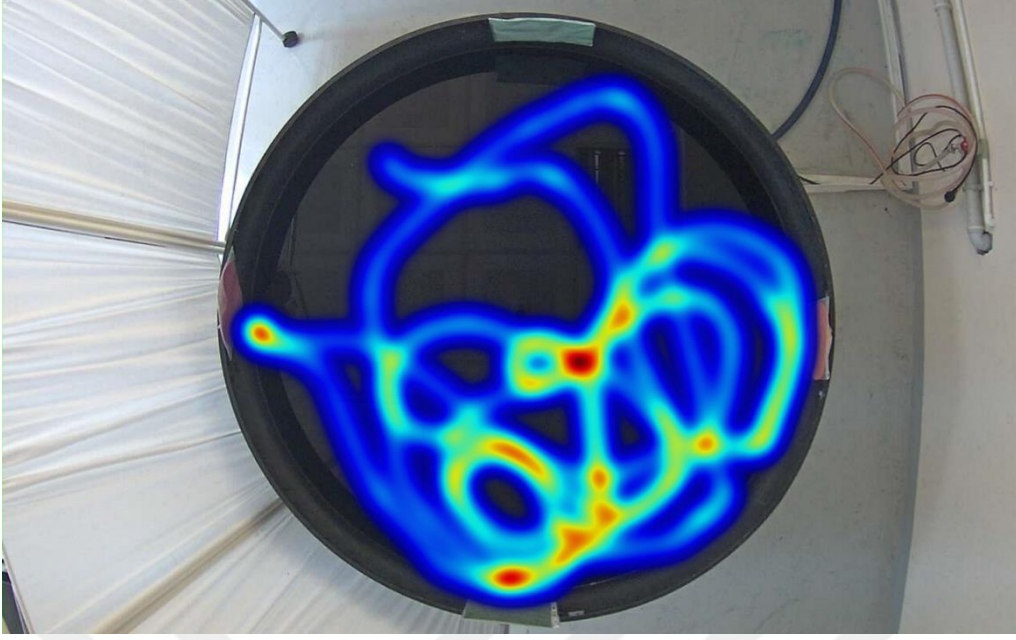
Şekil 4.7 KG grubu ısı haritası



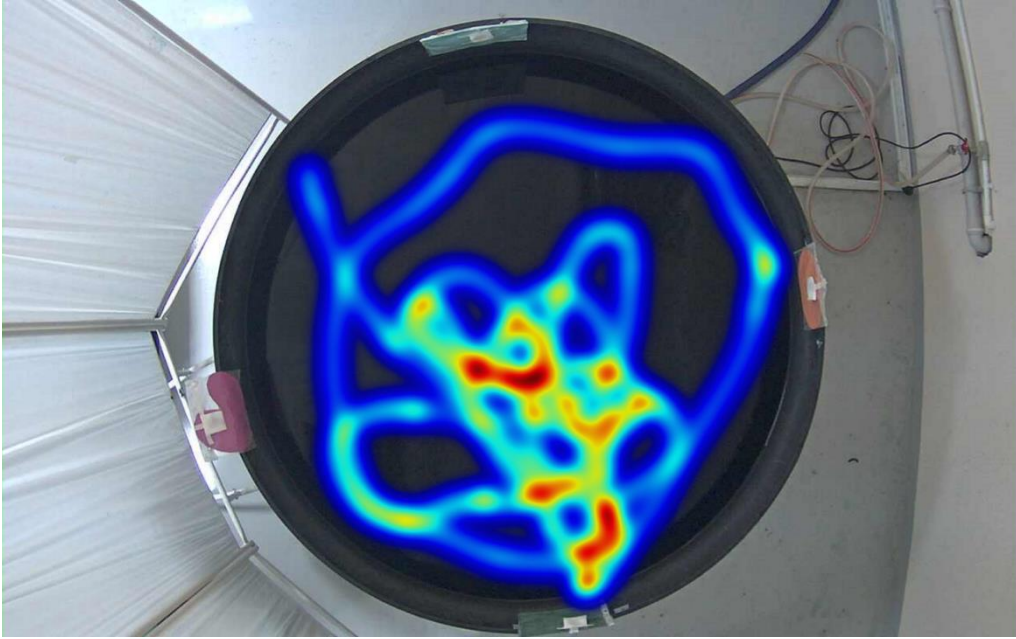
Şekil 4.8 KV grubu ısı haritası



Şekil 4.9 D grubu ısı haritası



Şekil 4.10 DG grubu ısı haritası



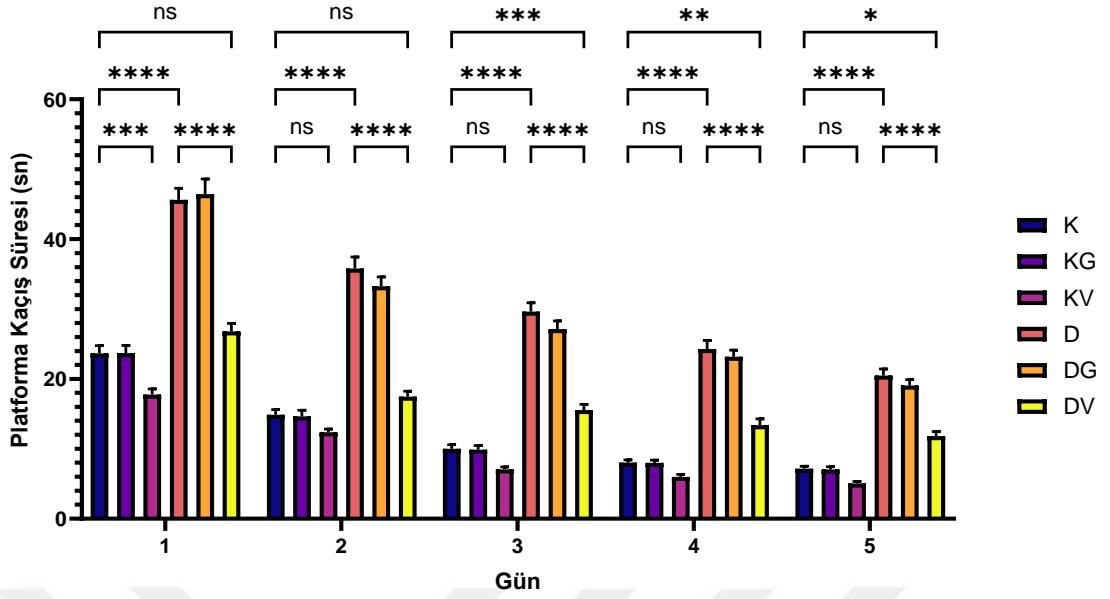
Şekil 4.11 DV grubu ısı haritası

4.1.3.2 Son öğrenme deneyi

Tablo 4.1 Grupların son öğrenme deneyindeki ortalama platforma kaçış süreleri

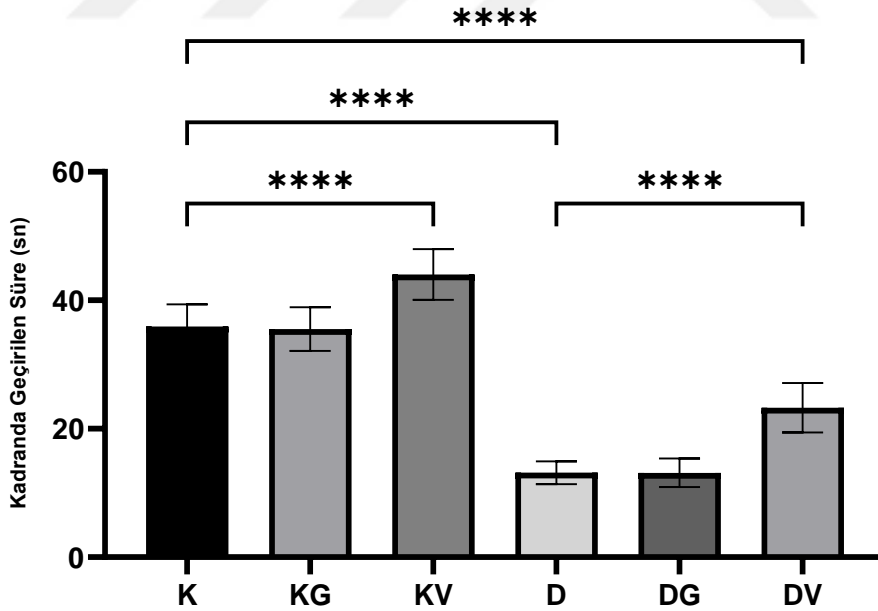
Grup karşılaştırması	Gruplar arası fark (1.gün)	Gruplar arası fark (5.gün)
K↔KG	ns (p>0,9999)	ns (p>0,9999)
K↔KV	*** (p=0,0003)	ns (p=0,6619)
K↔D	**** (p<0,0001)	**** (p<0,0001)
K↔DG	**** (p<0,0001)	**** (p<0,0001)
K↔DV	ns (p=0,2133)	* (p=0,0101)
KG↔KV	*** (p=0,0003)	ns (p=0,6932)
KG↔D	**** (p<0,0001)	**** (p<0,0001)
KG↔DG	**** (p<0,0001)	**** (p<0,0001)
KG↔DV	ns (p=0,2278)	** (p=0,0086)
KV↔D	**** (p<0,0001)	**** (p<0,0001)
KV↔DG	**** (p<0,0001)	**** (p<0,0001)
KV↔DV	**** (p<0,0001)	**** (p<0,0001)
D↔DG	ns (p=0,9918)	ns (p=0,9136)
D↔DV	**** (p<0,0001)	**** (p<0,0001)
DG↔DV	**** (p<0,0001)	**** (p<0,0001)

Bellek performanslarının değerlendirilmesi amacıyla 12. haftanın sonunda yapılan öğrenme deneylerinde grupların birinci ve beşinci gündeki ortalama platforma kaçış süreleri istatistiksel olarak, şekil 4.12’de gösterildiği gibi değerlendirildi ve tablo 4.1’de belirtildiği gibi özetlendi.



Şekil 4.12 Son öğrenme deneyi.

Öğrenme deneylerini takiben yapılan probe denemede, platformun bulunduğu kadranda geçirilen süreler arasındaki fark şekil 4.13te gösterildiği gibi son derece anlamlıdır ($p<0,0001$).



Şekil 4.13 Son probe deneme

Bellek performanslarının değerlendirilmesi için yapılan probe denemede grupların 12. haftanın sonunda ortalama kadranda geçirdikleri süreler istatistiksel olarak değerlendirildi ve tablo 4.2’de verildiği gibi özetlendi.

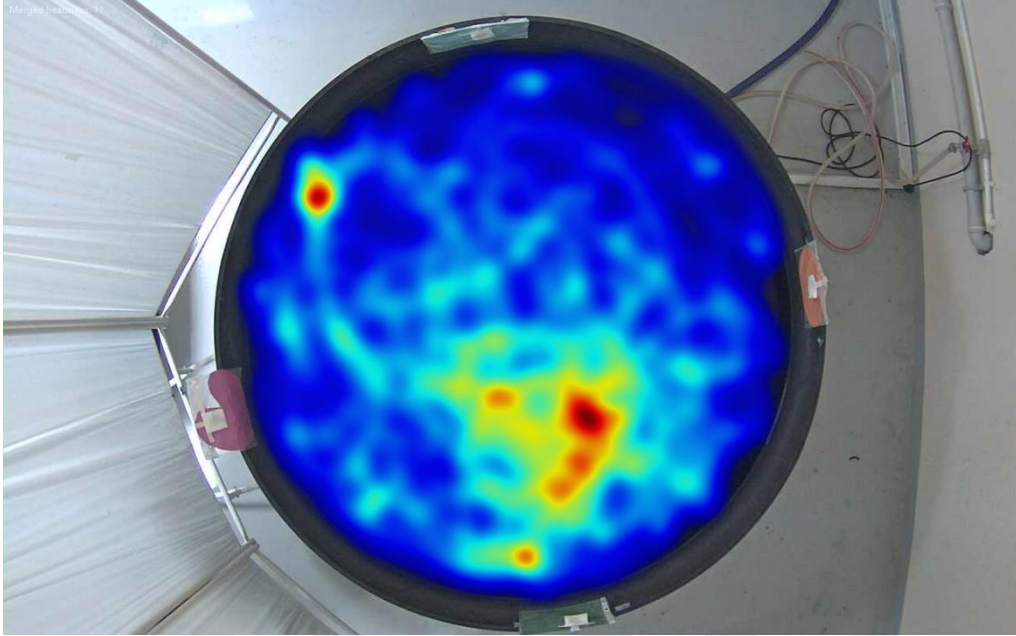
Tablo 4.2 Grupların son probe denemesinde ortalama platforma kaçış süreleri

Grup karşılaştırması	Gruplar arası fark
K↔KG	ns (p=0,9998)
K↔KV	**** (p<0,0001)
K↔D	**** (p<0,0001)
K↔DG	**** (p<0,0001)
K↔DV	**** (p<0,0001)
KG↔KV	**** (p<0,0001)
KG↔D	**** (p<0,0001)
KG↔DG	**** (p<0,0001)
KG↔DV	**** (p<0,0001)
KV↔D	**** (p<0,0001)
KV↔DG	**** (p<0,0001)
KV↔DV	**** (p<0,0001)
D↔DG	ns (p>0,9999)
D↔DV	**** (p<0,0001)
DG↔DV	**** (p<0,0001)

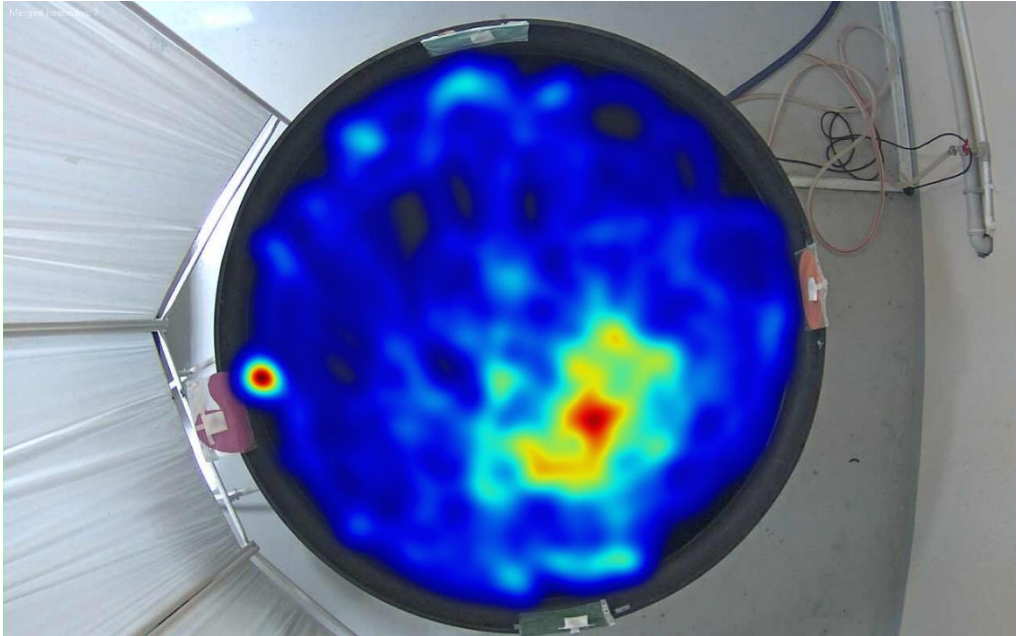
4.1.3.2.1 Son probe ısı haritası sonuçları

Probe denemelerinde, sıçanların platform ararken izledikleri yollar termal kamera ve EthoVision programı kullanılarak ısı haritaları şekil 4.14-19’da gösterildiği gibi oluşturulmuştur.

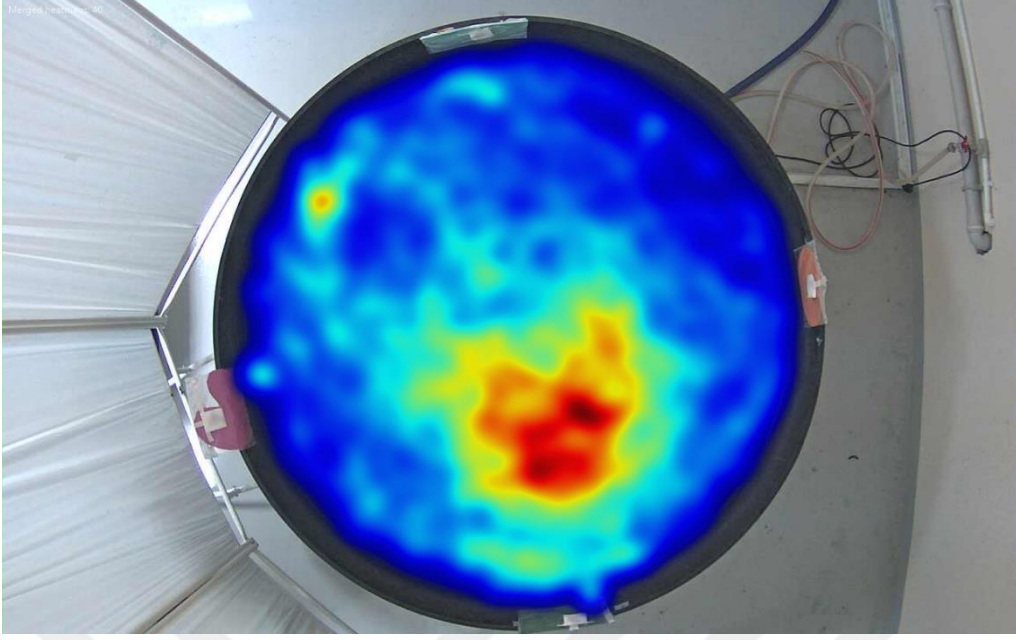
Bu ısı haritaları grup içerisindeki tüm hayvanların şekil ısı haritalarının birleştirilmesinden elde edilmiştir. Isı harita sonuçlarına göre tedavi gruplarının (şekil 4.16,4.19) hedef kadranda yaydıkları ısı, kontrol gruplarına (şekil 4.14,4.15,4.17,4.18) kıyasla fazladır.



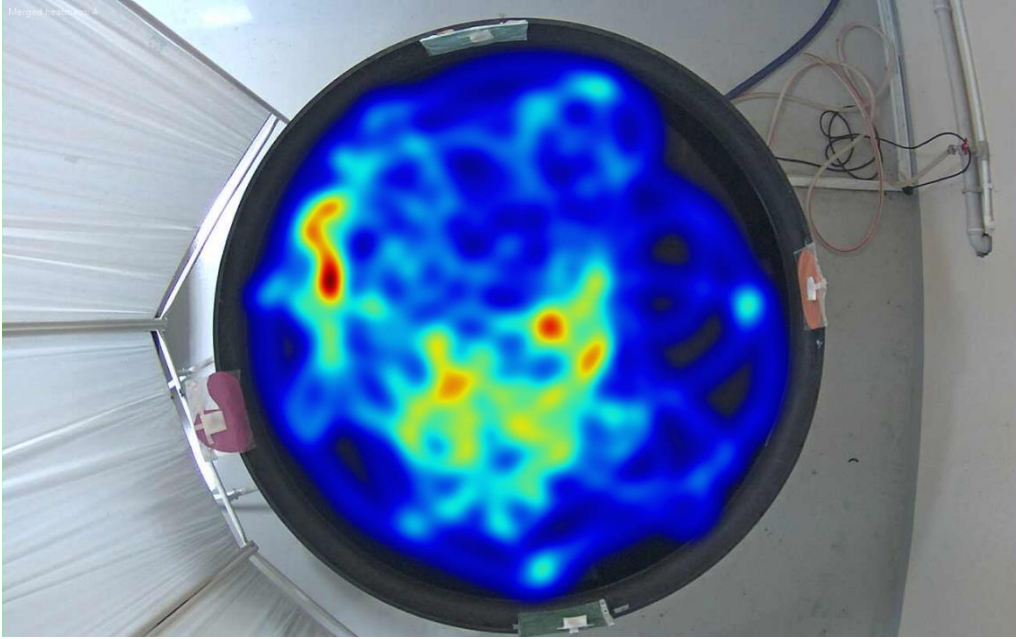
Şekil 4.14 K grubu ısı haritası



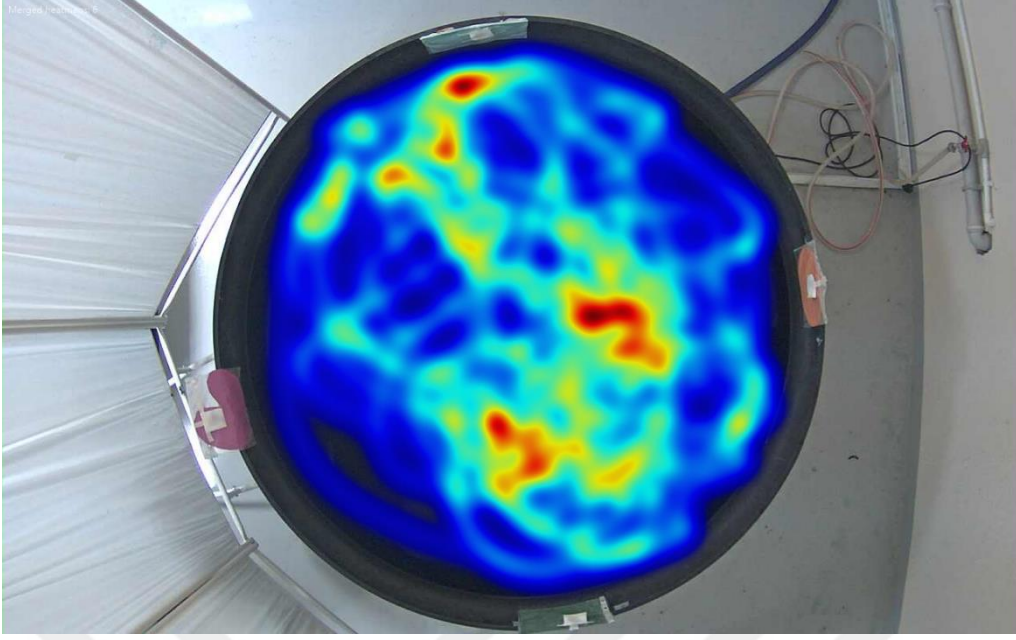
Şekil 4.15 KG grubu ısı haritası



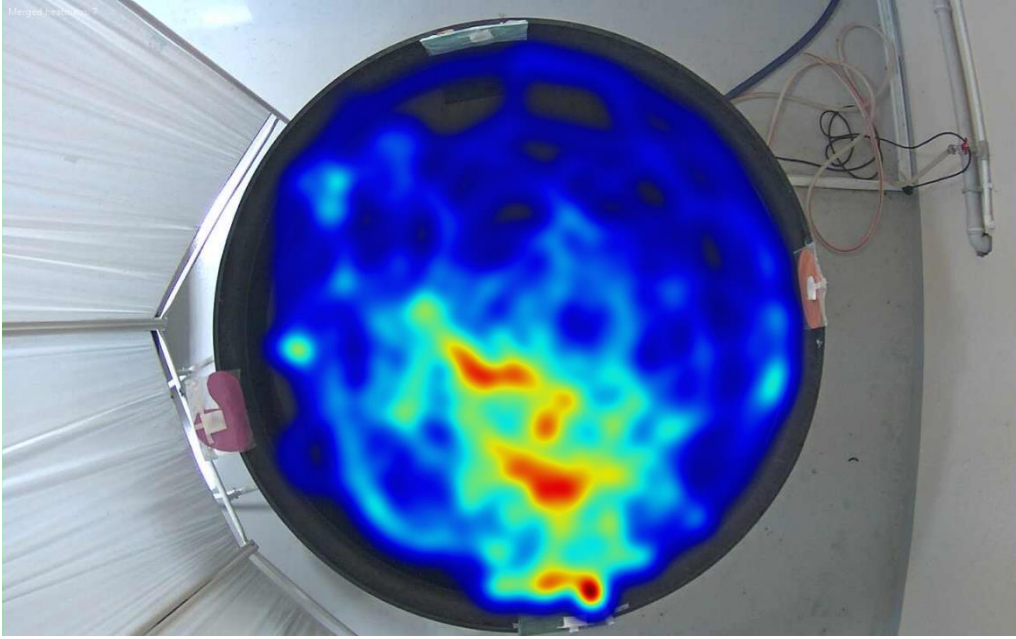
Şekil 4.16 KV grubu ısı haritası



Şekil 4.17 D grubu ısı haritası



Şekil 4.18 DG grubu ısı haritası



Şekil 4.19 DV grubu ısı haritası

4.2 Moleküler Genetik Analizler

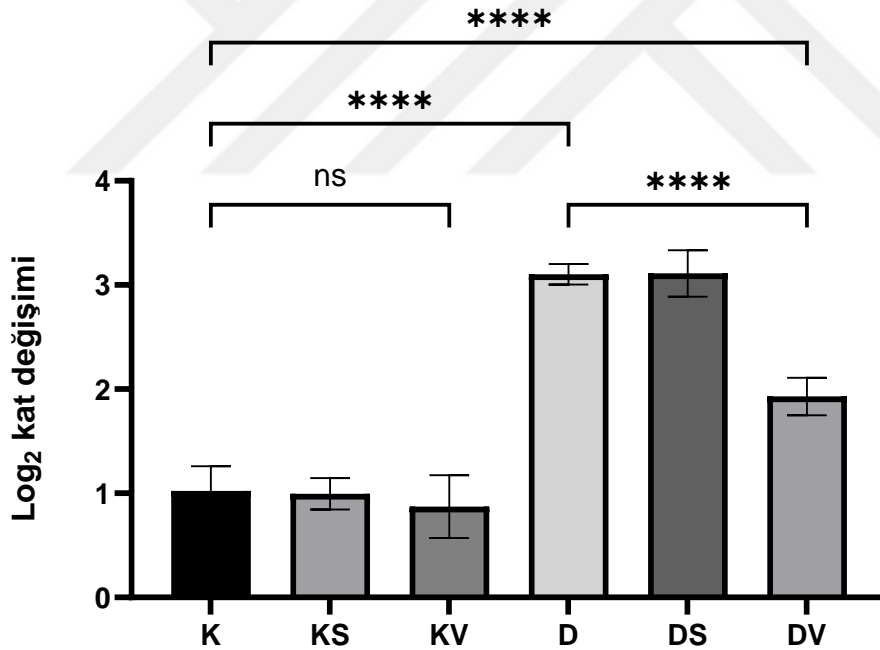
4.2.1 Gen İfadesi analizi sonuçlar

Gen ifade düzeylerinin analizini yapmak için qRT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen verilerin analizi için (ct değerleri) $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı. Sonuçlar kontrol ve housekeeping gene (beta aktin) göre normalize edildi.

4.2.1.1 ER stres ile ilişkili genlerin ifadelerinin analizleri

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre GRP78 geninin ifadesi şekil 4.20’de gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

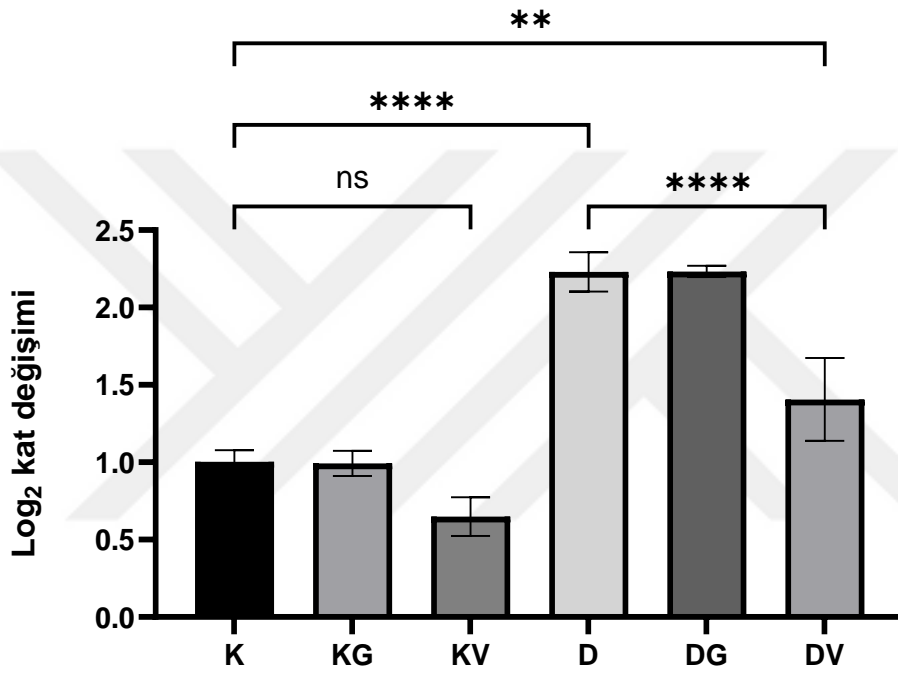
Kontrol gruplarının kendi aralarında anlamlı bir fark olmamasına rağmen DV grubunda GRP78 geninin ifadesi D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.



Şekil 4.20 GRP78 log₂ kat değişim grafiği

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre ATF6 geninin ifadesi şekil 4.21’de gösterildiği gibi i son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

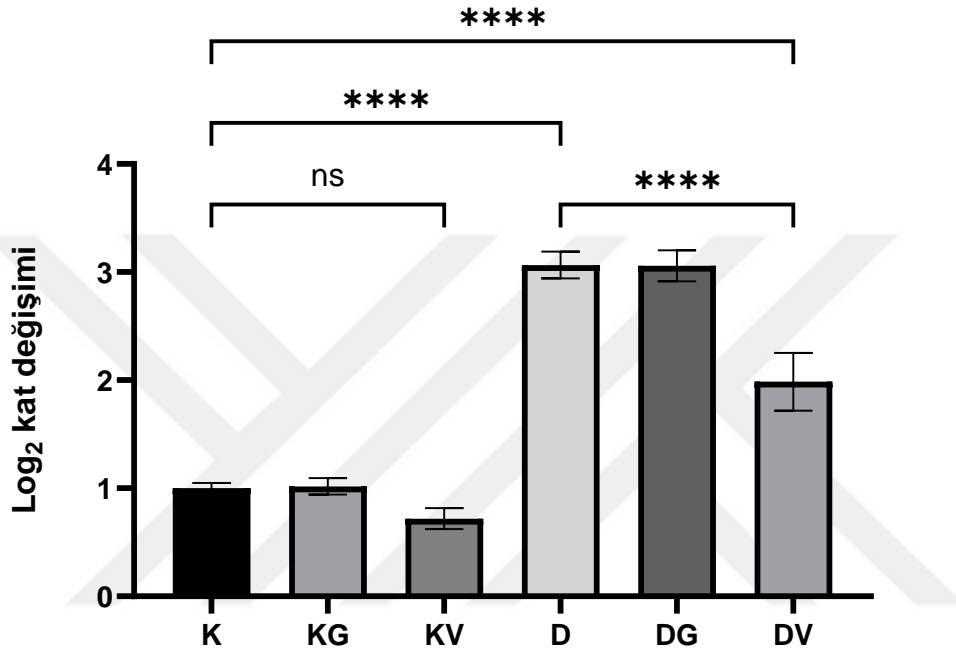
Kontrol gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen DV grubunda ATF6 geninin ifadesi D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.



Şekil 4.21 ATF6 log₂ kat değişim grafiği

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre IRE1 α geninin ifadesi şekil 4.22’de gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

Kontrol gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen DV grubunda IRE1 α geninin ifadesi D ve DG grubuna son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.

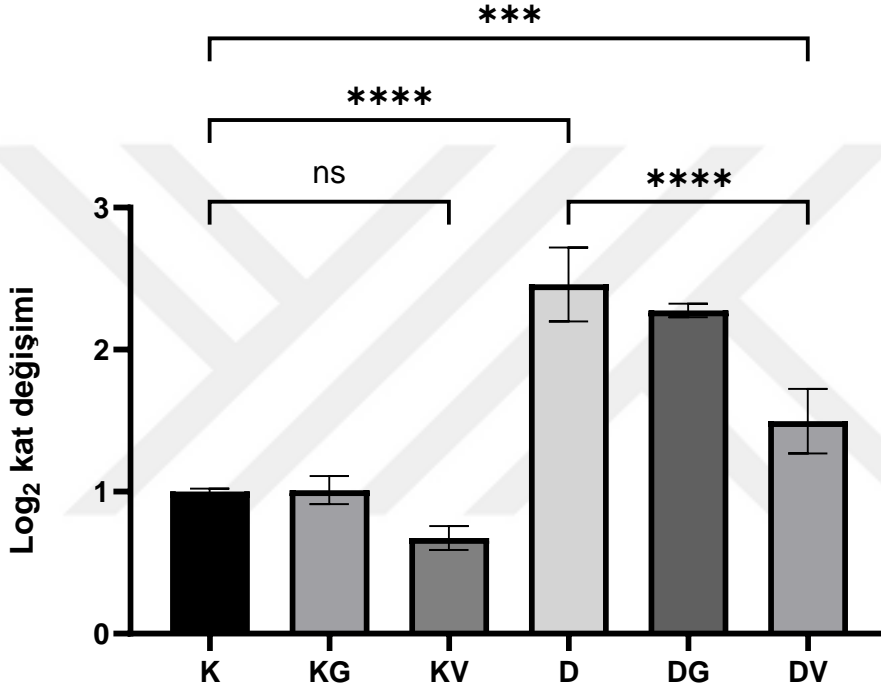


Şekil 4.22 IRE1 α log₂ kat değişim grafiği

4.2.1.2 İnflamasyon ile ilişkili genlerin ifadelerinin analizleri

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre NF- κ B geninin ifadesi şekil 4.23'te gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0,0001$) artmıştır.

Kontrol gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen DV grubunda NF- κ B geninin ifadesi D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0,0001$) azalmıştır.

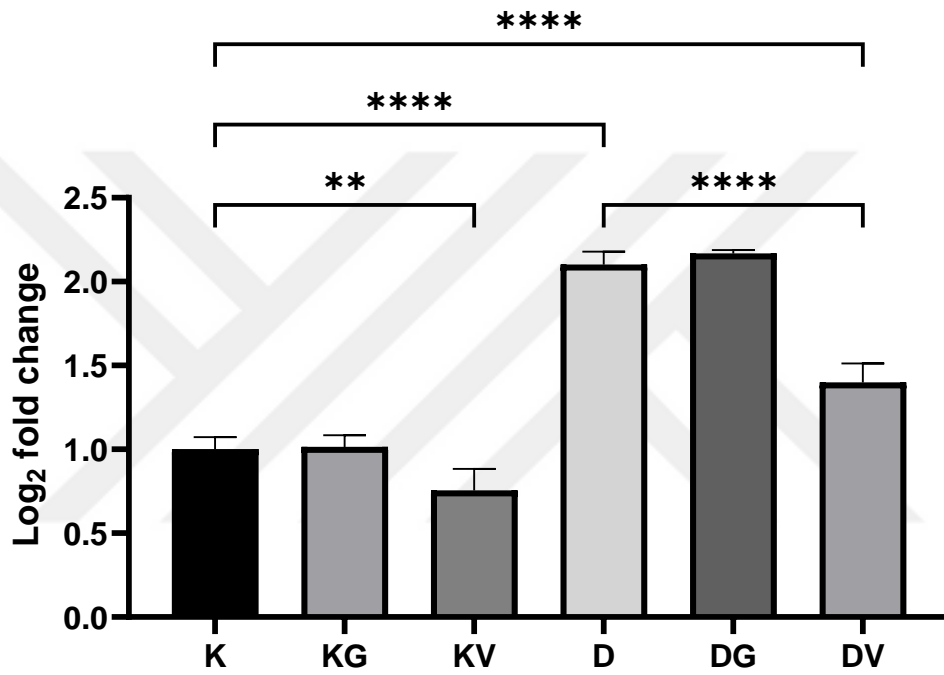


Şekil 4.23 NF- κ B log₂ kat değişim grafiği

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre NLRP3 geninin ifadesi şekil 4.24'te gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0,0001$) artmıştır.

KV grubunda NLRP3 geninin ifadesi K ve KG grubuna göre anlamlı bir şekilde ($p < 0,01$) azalmıştır.

DV grubunda NLRP3 geninin ifadesi ise D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0,0001$) azalmıştır.

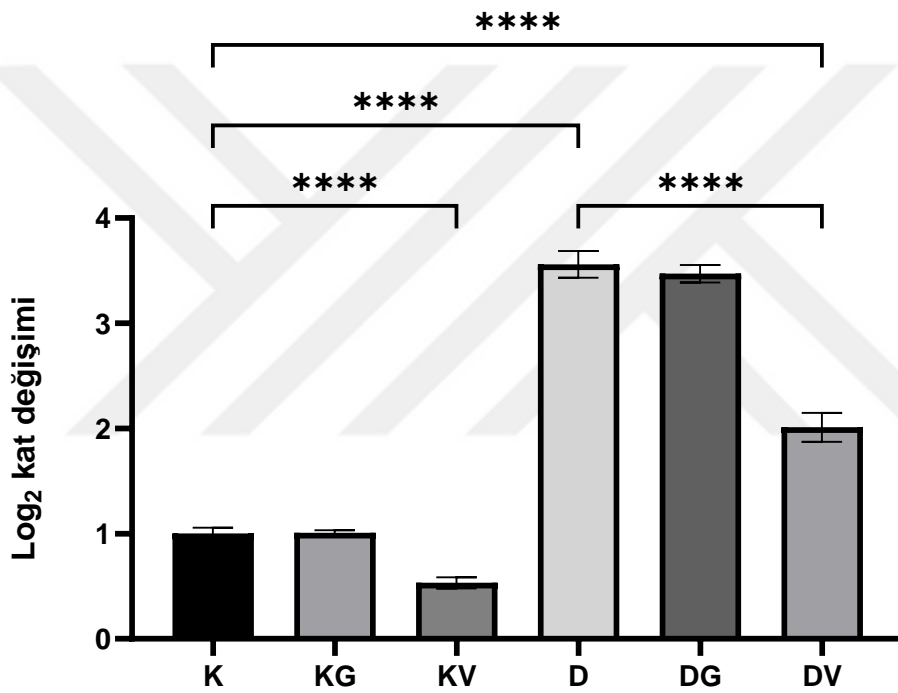


Şekil 4.24 NLRP3 log₂ kat değişim grafiği

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre IL-1 β geninin ifadesi şekil 4.25'te gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

KV grubunda IL-1 β geninin ifadesi K ve KG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.

DV grubunda NLRP3 geninin ifadesi ise D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.

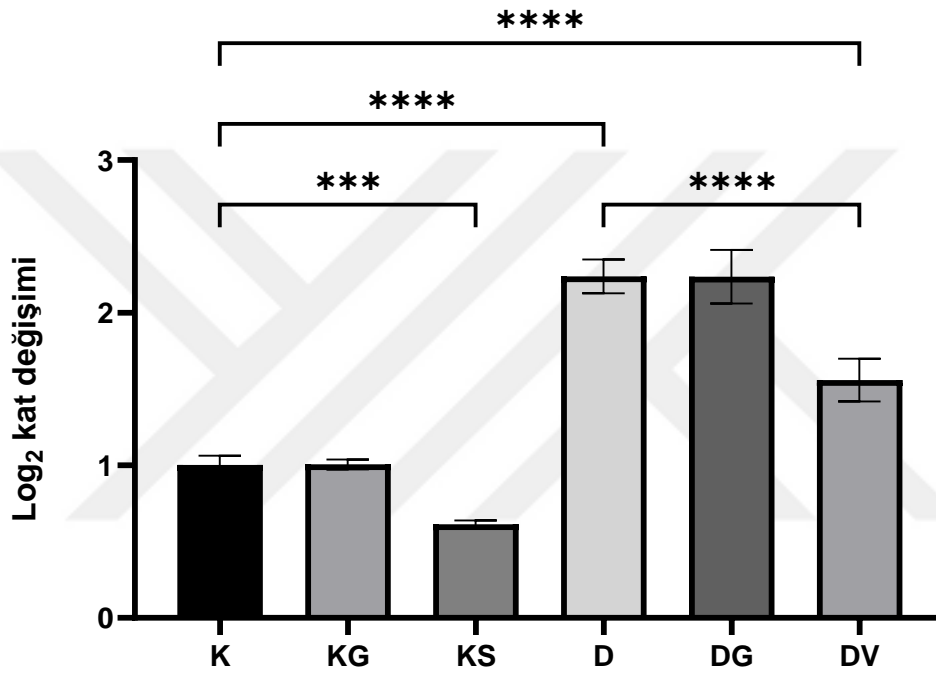


Şekil 4.25 IL-1 β log₂ kat değişim grafiği

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre IL-18 geninin ifadesi şekil 4.26'da gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

KV grubunda IL-18 geninin ifadesi K ve KG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) azalmıştır.

DV grubunda IL-18 geninin ifadesi ise D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.



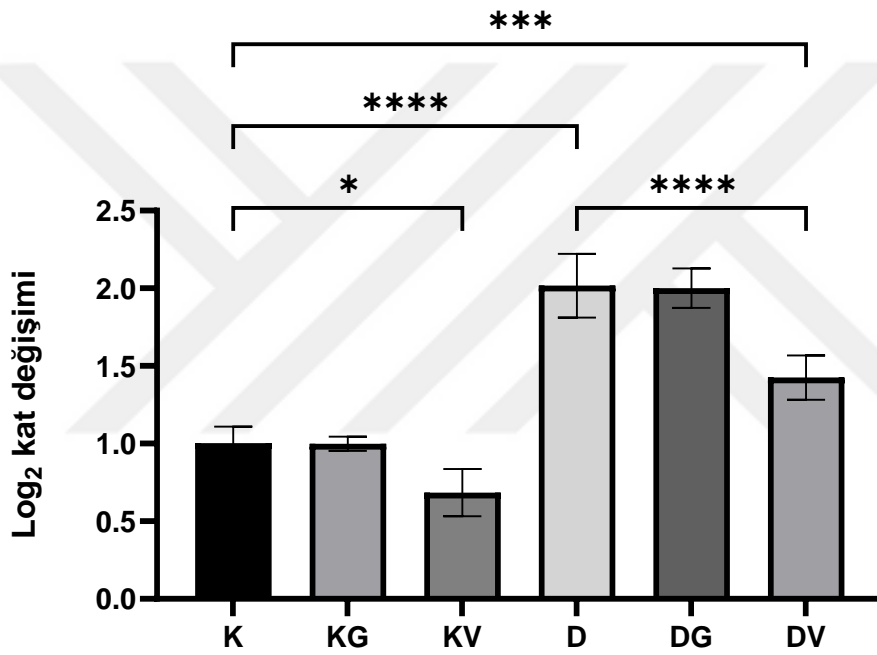
Şekil 4.26 IL-18 log₂ kat değişim grafiği

4.2.1.3 TXNIP gen ifadesinin analizi

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre TXNIP geninin ifadesi şekil 4.27’de gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0,0001$) artmıştır.

KV grubunda TXNIP geninin ifadesi K ve KG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0, 1$) azalmıştır.

DV grubunda TXNIP geninin ifadesi ise D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0,0001$) azalmıştır.



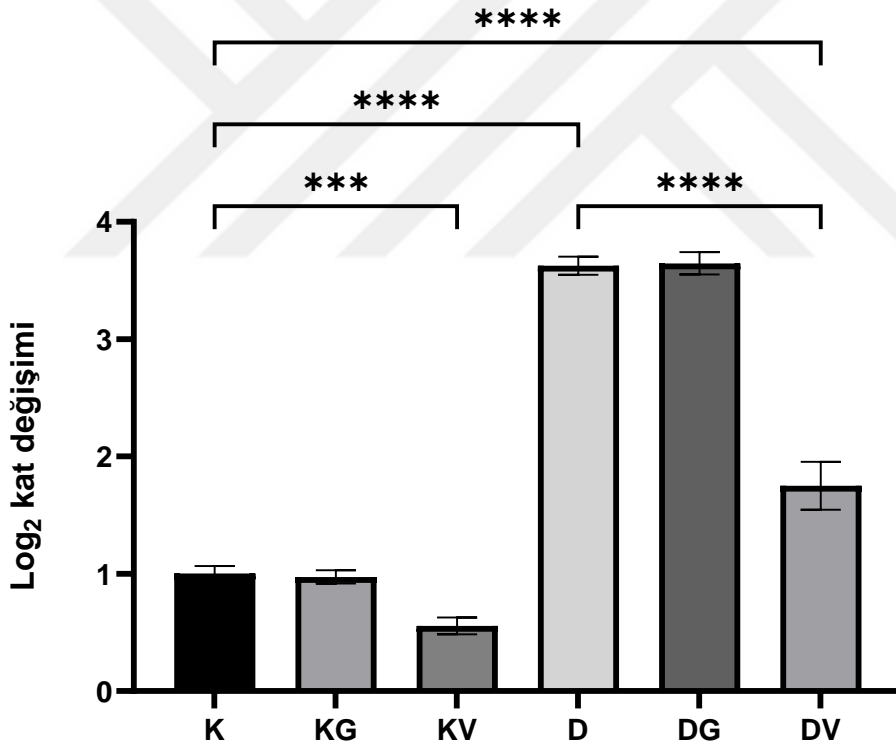
Şekil 4.27 TXNIP log₂ kat değişim grafiği

4.2.1.4 Apoptoz ile ilişkili genlerin ifadelerinin analizi

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre Bax geninin ifadesi şekil 4.28’de gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

KV grubunda Bax geninin ifadesi K ve KG grubuna son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) azalmıştır.

DV grubunda Bax geninin ifadesi ise D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.

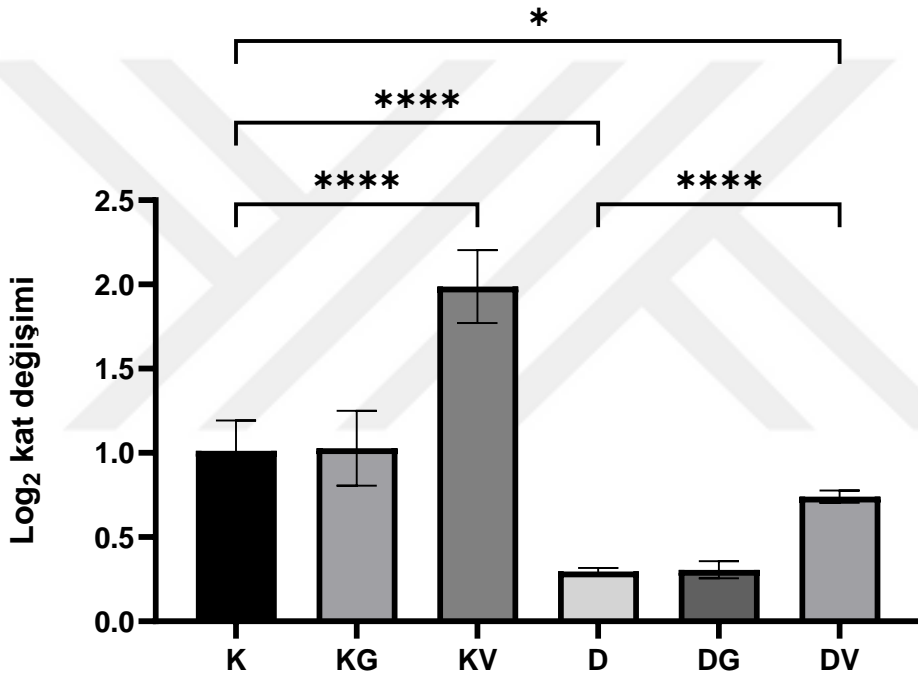


Şekil 4.28 Bax log₂ kat değişim grafiği

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre Bcl-2 geninin ifadesi şekil 4.29'da gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.

KV grubunda Bcl-2geninin ifadesi K ve KG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) artmıştır.

DV grubunda Bcl-2geninin ifadesi ise D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

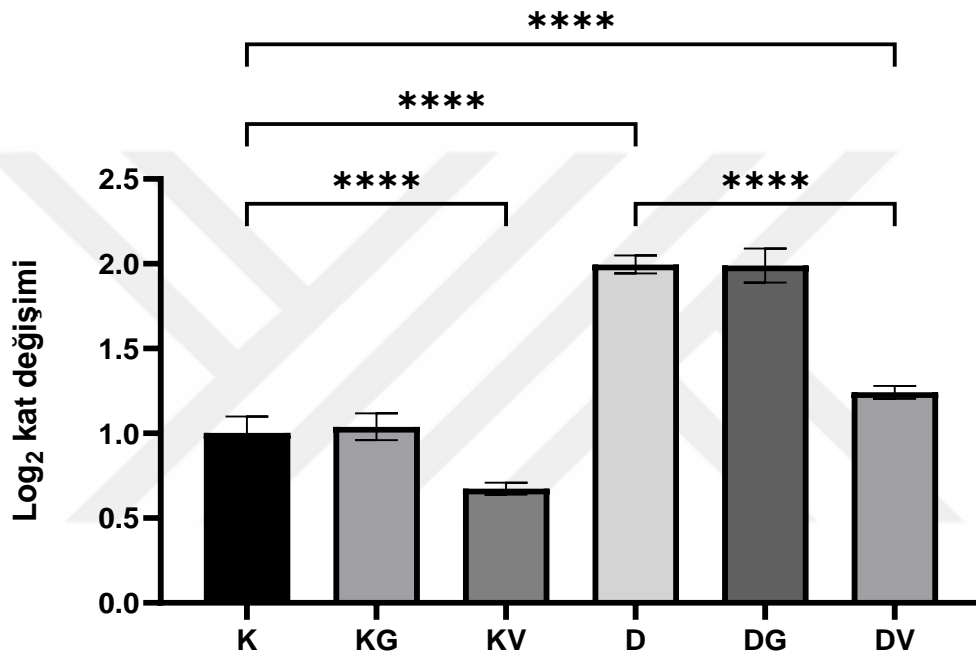


Şekil 4.29 Bcl-2 log₂ kat değişim grafiği

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre Kaspaz-3 geninin ifadesi şekil 4.30'da gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0,0001$) artmıştır.

KV grubunda Kaspaz-3 geninin ifadesi K ve KG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0,0001$) azalmıştır.

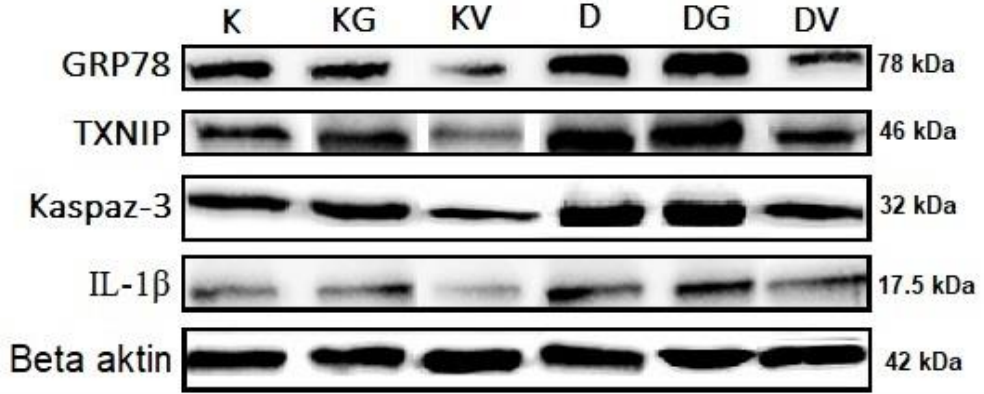
DV grubunda Kaspaz-3 geninin ifadesi ise D ve DG son derece anlamlı bir şekilde ($p < 0,0001$) azalmıştır.



Şekil 4.30 Kaspaz-3 log₂ kat değişim grafiği

4.2.2 Western Blot

Western blot yöntemiyle beta aktin, TXNIP, GRP78, IL-1 β ve Kaspaz-3 proteinlerinin bantları şekil 4.31’de görüldüğü elde edilmiştir ve dansitometrik analizleri Image J yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

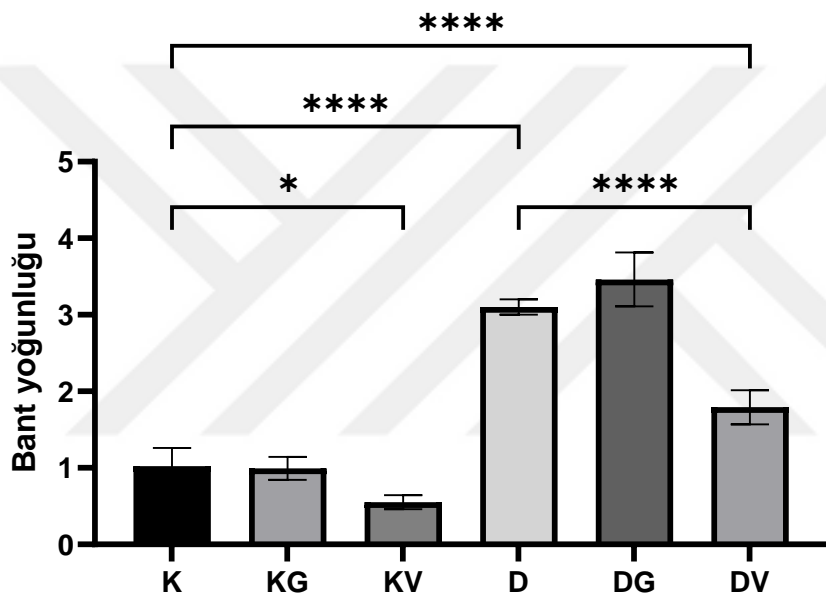


Şekil 4.31 Gruplara ait proteinlerin düzeylerinin western blot görüntüleri

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre GRP78'in protein seviyeleri şekil 4.32'de gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

KV grubunda GRP78'in protein seviyeleri K ve KG grubuna göre anlamlı bir şekilde ($p<0,1$) azalmıştır.

DV grubunda GRP78'in protein seviyeleri ise D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.

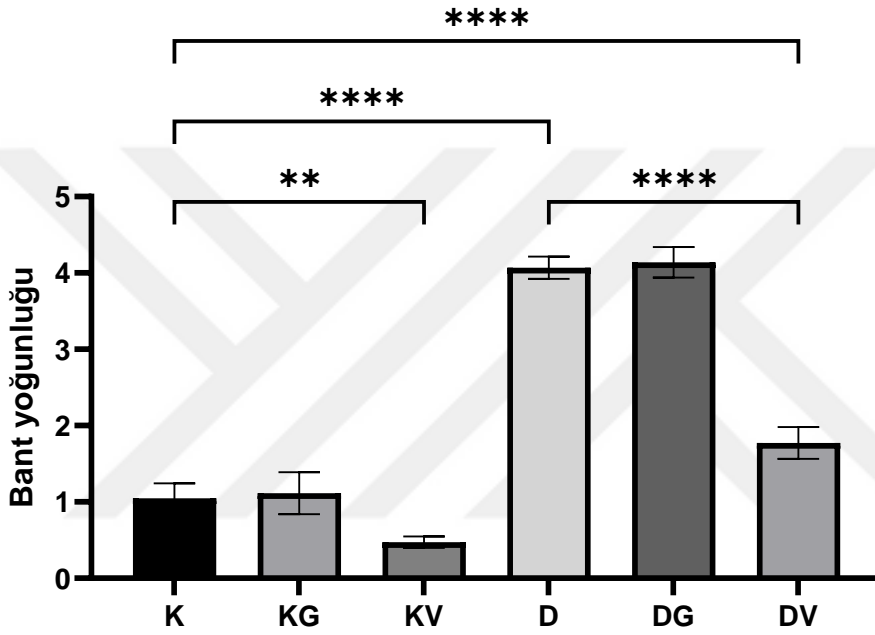


Şekil 4.32 Gruplara ait GRP78'in dansitometrik analizi.

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre TXNIP'in protein seviyeleri şekil 4.33'te gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

KV grubunda TXNIP'in protein seviyeleri K ve KG grubuna göre anlamlı bir şekilde ($p<0,01$) azalmıştır.

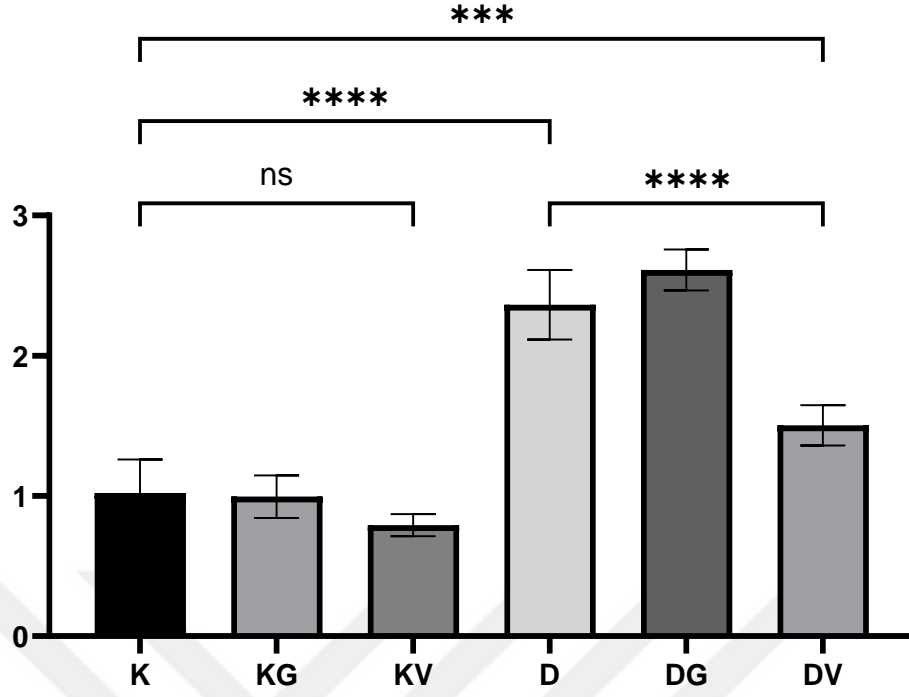
DV grubunda TXNIP'in protein seviyeleri ise D ve DG grubuna son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır.



Şekil 4.33 Gruplara ait TXNIP'in dansitometrik analizi.

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre Kaspaz-3'ün protein seviyeleri şekil 4.34'te gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

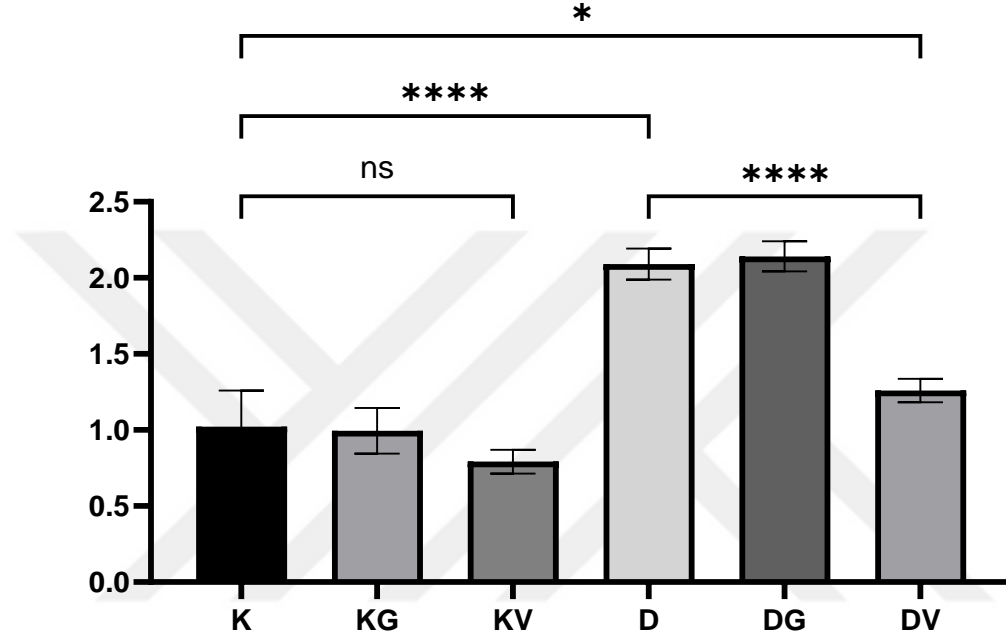
Kontrol gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen DV grubunda Kaspaz-3'ün protein seviyeleri D ve DG grubuna göre son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır



Şekil 4.34 Gruplara ait Kaspaz-3'ün dansitometrik analizi.

Diyabetik gruplarda, kontrol gruplarına göre IL-1 β 'nin protein seviyeleri şekil 4.35'te gösterildiği gibi son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) artmıştır.

Kontrol gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen DV grubunda IL-1 β 'nin protein seviyeleri D ve DG grubuna son derece anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azalmıştır



Şekil 4.35 Gruplara ait IL-1 β 'nin dansitometrik analizi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, tiyoredoksin etkileşimli proteinin farmakolojik inhibisyonunun deneysel diyabette bilişsel fonksiyon bozukluğun temel patolojik özelliklerini iyileştirdiğini göstermektedir. Verapamil aracılı TXNIP baskılanması, diyabetik beyin dokusunda ER stresi (GRP78, IRE1 α , ATF6), inflamasyon (NF- κ B, NLRP3, IL-1 β , IL-18) ve apoptozis (Bax, Kaspaz-3) belirteçlerini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu moleküler değişikliklere, 12. haftada Morris su labirentinde gelişmiş performans eşlik etmiş olup, tedavi edilmemiş diyabetik kontrollere kıyasla uzamsal hafıza üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Bu analizlerden her biri, TXNIP'in bilinen biyolojisi ve diyabetle ilişkili nöronal hasardaki rolüyle tutarlılık göstermektedir. Aşağıda, bu bulguların her parametre için çıkarımları ilgili literatürlerle entegre ederek tartışıldı.

TXNIP hücrel redoks ve stres yollarının ana düzenleyicisidir. Hiperglisemi koşulları altında, TXNIP ekspresyonu güçlü bir şekilde indüklenmektedir. Artmış TXNIP ekspresyonunun, ER stresini ve apoptozu şiddetlendirdiği gösterilmiştir (3, 102) TXNIP seviyelerinin artışı tiyoredoksin inhibisyonuna yol açarak katlanmamış protein tepkisi sinyallemesini teşvik etmektedir. TXNIP'in aşırı ekspresyonu, IRE1 α yolunu aktifleştirerek ER stresi altında TXNIP mRNA'sını stabilize eder ve stres sinyallemesinin ileri beslemeli pozitif bir döngüsünü oluşturmaktadır. Bunun aksine, TXNIP seviyelerinin azalması, ER stresi kaynaklı hücre ölümünü önlemektedir (3, 4). Diyabetik beyinlerde nöronal ER stres, bilişsel eksikliklerin önemli bir aracıdır. Zhang ve ark. yaptığı çalışmada STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda, hipokampal ER stresi sergilediğini ve bu sıçanların morris su labirenti testinde diyabet olmayan gruplara göre platforma kaçış sürelerinde önemli gecikmeler (daha zayıf hafıza) olduğunu saptamışlardır (43). Çalışmamızda, TXNIP'in farmakolojik olarak inhibisyonuyla hipokampal kanonik UPR belirteçleri (GRP78, IRE1 α ve ATF6) ekspresyonlarının önemli ölçüde azaldığını saptadık. Bu sonuçlar, TXNIP inhibisyonunun ER stresini hafiflettiğini göstermektedir. ER stresinin hafiflemesiyle stres kaynaklı apoptoz döngüsünün zayıfladığı pro-apoptotik faktörlerde azalma ve anti-apoptotik faktörlerin de artmış olduğunu yaptığımız analizler sonucunda belirledik. Bu nedenle, TXNIP inhibisyonunun diyabetik nöronların ER stres yükünü hafiflettiği, literatürde diğer modellerde bildirilen TXNIP baskılamasının koruyucu etkisiyle tutarlılık göstermektedir (3, 102).

Giderek artan sayıda çalışma, TXNIP'i doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonu ile ilişkilendirmektedir. TXNIP, NLRP3 inflamazomunun tam aktivasyonu için kilit bir roledir. Oksidatif stres veya hiperglisemi altında, TXNIP doğrudan NLRP3'e bağlanarak kaspaz-1 ve IL-1 β olgunlaşmasını tetikleyebilmektedir (136, 137). Diyabetik modellerde, bu TXNIP–NLRP3 eksenini kronik inflamasyonu yönlendirmektedir. Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yüksek glikozda tarafından indüklenen TXNIP'in, NLRP3 inflamazomunu aktifleştirerek IL-1 β salınımının arttığını göstermişlerdir (72). Nöronlarda da benzer mekanizmalar görülmektedir. Li ve arkadaşları, glutamat nörotoksitesinin TXNIP inflamazom aktivasyonuna bağlı olduğunu yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Çalışmaya göre, Fare hipokampal kültürlerinin veya SH-SY5Y hücrelerinin toksik dozlarda glutamata maruziyeti ROS, ER stres ve TXNIP ekspresyonlarını artırarak NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile sonuçlanmıştır ve buna bağlı olarak hücre toksitesine yol açtığını belirlemişlerdir (138). Ayrıca, diyabet ile ilişkili demansta, nöroinflamasyon bilişsel fonksiyonlardaki gerilemeyle ilişkilendirilmektedir (139). Çalışmamız literatürle tutarlı olarak, verapamil ile tedavi edilen diyabetik gruplarda NF- κ B, NLRP3, IL-1 β ve IL-18'in gen ifadelerinin hipokampus dokusunda ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını ve ayrıca IL-1 β 'nin protein düzeyinde de azalmış olduğunu saptadık. NF- κ B, inflamatuvar sitokinler için bir ana transkripsiyon faktörüdür ve ayrıca NLRP3 transkripsiyonunu sürdürebilir, bu nedenle aşağı regülasyonu inflamasyonun daha geniş bir şekilde bastırıldığını gösterir. NLRP3 ve IL-1 β /IL-18 seviyelerindeki eş zamanlı azalış, inflamazomun TXNIP inhibisyonu tarafından deaktif edildiğini düşündürmektedir. Bu moleküler gelişmeler yayınlanmış raporlarla uyumluluk göstermektedir. Bu bağlamda yapılan başka bir çalışmada diyabetik ve yüksek glikozlu koşullarda, TXNIP yukarı regülasyonu NLRP3 yoluyla IL-1 β ve IL-18 üretimini artırarak vasküler ve sinirsel inflamasyonu indüklediği gösterilmiştir (139). Özetle bulgularımız, TXNIP'in verapamil ile inhibisyonu sonucunda, diyabetik bilişsel fonksiyon bozukluğunun altında yatan sebeplerden biri olan artmış glikoz kaynaklı nöroinflamatuvar süreçleri kesintiye uğrattığını göstermektedir (130, 140)

TXNIP, özellikle mitokondriyal yol aracılığıyla apoptozda önemli bir rol oynamaktadır. Stres altında, TXNIP nükleustan mitokondriye geçer ve TRX2'ye bağlanarak ASK1'i serbest bırakır, bunun sonucunda kaspaz-3 aktivasyonu tetiklenmektedir. Sonuçta, TXNIP aşırı ekspresyonu sitokrom-c salınımını indükleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır (102). Bu yol diyabet kaynaklı organ hasarında rol oynamaktadır. Çalışma sonuçlarımız, verapamil tedavisinin hipokampusta Bax ve Kaspaz-3 gen ifadesi düzeylerini önemli ölçüde düşürürken Bcl-2 gen ifadesi düzeyini artırdığını göstermektedir. Ayrıca protein düzeyinde yaptığımız analizler sonucunda kaspaz-3 düzeylerinin de tedavi gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığını saptandı. Bu veriler, TXNIP inhibisyonunun bilinen anti-apoptotik etkisiyle uyusmaktadır. Takagi ve arkadaşlarının transgenik fare modeliyle yaptıkları çalışmada, tiyoredoksinin aşırı ekspresyonunun iskemik nöronal apoptozu büyük ölçüde azalttığı ve tersine, TXNIP artışının pro-apoptotik olduğu gösterilmiştir (93). Dolayısıyla çalışma sonuçlarımız, TXNIP'i inhibe ederek nöronal sağkalımın korunduğunu göstermektedir. Bax ve aktif kaspaz-3'teki azalma bunun kanıtı olarak sunulabilir. Özetle, bulgularımız TXNIP'in diyabet modelinde hipokampusta güçlü bir şekilde apoptozu indüklediğini ve inhibisyonunun apoptotik ölüm süreçlerini engellediğini işaret etmektedir.

Bilişsel fonksiyon bozukluğu, diyabetin bilinen bir komplikasyonudur. Kronik hiperglisemi, ER stres, inflamatuvar ve metabolik hasar yoluyla öğrenme ve bellek performansında düşüşe yol açmaktadır (65, 139). Diyabetik sıçan modellerinde uzamsal öğrenme hipokampal patoloji ile ilişkili olarak, STZ enjeksiyonundan 6-11 hafta kadar erken bir zamanda bozulmaktadır. Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 6 haftalık hipergliseminin su labirenti performansını önemli ölçüde kötüleştirdiğini ve hipokampal CHOP ve apoptozu artırdığını bildirmişlerdir (43). Biessels ve arkadaşları benzer şekilde, yüksek derecede diyabetli sıçanların (STZ'den 11 hafta sonra) bozulmuş uzamsal öğrenme ve uzun süreli potansiyasyona (LTP) sahip olduğunu, orta derecede hiperglisemik sıçanların ise olmadığını göstermişlerdir (37). Bu çalışmalar, zayıf glikoz kontrolünün ve bunun sonucunda oluşan hücresel stresin bellek performansında gerilemeye neden olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda, diyabet indüksiyonunu takiben (0. hafta) morris su labirenti performansları gruplar arası farklılık göstermedi ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanamadı. Deneylerin devamında 12 haftaya kadar tedavi edilmeyen diyabetik kontrol gruplarında bilişsel performansta gerileme yani platforma kaçış sürelerinin uzamış olduğunu gösterdi.

Buna karşın verapamil ile tedavi edilen sıçanların öğrenme performanslarında istatistiksel olarak anlamlı iyileşmeler saptandı. Kontrol altına alınmayan diyabet modellerinde, bilişsel fonksiyonlarda bozulmalara neden olurken (141), diyabetin gelişiminin moleküler yollarını hedefleyen tedaviler (gastrodin inhibitörü gibi) bilişsel fonksiyonları korumaktadır (87) (43, 65). Bu da çalışma sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir. Rom ve ark. yaptıkları çalışmada, hiperglisemi kaynaklı nöroinflamasyonun kan-beyin bariyerinin geçirgenliğinin artmasına neden olarak nörotoksik maddelerin beyne girmesine neden olduğunu ve diyabetik farelerin bilişsel fonksiyonlarında gerileme olduğunu bildirmişlerdir (44). Dolayısıyla, çalışmamızda elde edilen öğrenme verileri TXNIP inhibisyonunun, ER stresini, inflamasyonu ve apoptozu azaltarak hipokampal işlevi, uzamsal bellek ve sinaptik plastisite için koruyucu olduğunu göstermektedir.

İyi bilinen bir L tipi kalsiyum kanal blokeri olan Verapamil, TXNIP inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Borowiec ve arkadaşları, verapamilin pankreas β hücrelerinde TXNIP ekspresyonunu benzersiz bir şekilde engellediğini ve hücre sağ kalımını desteklediğini göstermiştir (112). Benzer şekilde Xu ve arkadaşları, verapamilin diyabetli farelerde yalnızca çoklu düşük doz STZ kaynaklı diyabeti önlemekle kalmayıp, aynı zamanda beta hücre apoptozunu azaltarak beta hücre kütlelerini artırdığını ve buna bağlı olarak insülin seviyelerini yükselttiği belirlenmiştir (128). Çalışmamız, STZ ile indüklenmiş deneysel diyabette verapamil aracılı TXNIP inhibisyonunu nöroproteksiyona bağlayan ilk çalışmadır. Bu sonuçlar ER stres, inflamasyon ve apoptoz belirteçlerindeki geniş azalma, verapamilin (veya benzer TXNIP blokerlerinin) nöral plastisiteyi korumak için diyabette ek tedavi olarak yeniden kullanılabileceğini düşündürmektedir. Verapamil FDA onaylıdır ve onlarca yıldır antihipertansif olarak güvenli bir şekilde kullanılmaktadır ve tip-1 diyabette yapılan klinik deneyler verapamilin eklenmesinin muhtemelen TXNIP baskılanması yoluyla endojen insülin salgılanmasını koruduğunu göstermektedir (129). Çalışma sonucunda ortaya çıkan verilerimiz, verapamilin etkilerini merkezi sinir sistemine kadar genişleterek diyabetik bilişsel gerilemeyi yavaşlatmak için kombine terapi olasılığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın pozitif sonuçlarına rağmen bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. İlk olarak, sıçanlarda deneysel bir tedavi olarak verapamilin tüm diyabetli hastalarda uygulanabilirliği sınırlıdır.

Yüksek doz kalsiyum kanal blokajı hipotansiyona neden olabilir veya kalp yetmezliğini şiddetlendirebilir bu nedenle pediatrik diyabet hastaları veya kalp disfonksiyonu olanlar için uygun olmayabilir (130). TXNIP geninin silindiği fareler diyabetten korunur ancak hepatosellüler karsinom için artan bir eğilim göstermektedir (142) Ancak, TXNIP'i farmakolojik olarak düzenlemek daha güvenli görünmektedir. Bu sebeple, düşük dozlu müdahaleler ve aralıklı kullanımı onkojenik riski azaltabilir (130) İkinci bir sınırlama, sonuçlarımızın öncelikle moleküler ve davranışsal olmasıdır; yapısal ve işlevsel faydalarını doğrulamak için daha uzun vadeli çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasının sonucunda;

- TXNIP'in diyabette hipokampus hasarının temel modülatörü olduğu ve TXNIP inhibisyonunun nöronları koruyucu bir rol üstlendiğine dair kanıtlar sunulmaktadır.
- Verapamil ile TXNIP molekülünün baskılanmasının ER stresini azalttığı (GRP78, IRE1 α , ATF6), inflamasyonu azalttığı (NF- κ B, NLRP3, IL-1 β , IL-18) ve apoptozu sınırladığı (Bax, Kaspaz-3) ve böylece diyabetik sıçanlarda bilişsel işlevi koruduğu saptandı.
- Başlangıçta tüm grupların bilişsel performansının benzer olması, elde edilen sonuçların tedaviye özgü olduğunu güçlendirmektedir

Bulgularımız bir araya getirildiğinde, TXNIP molekülünü tedavi hedefi aday olarak konumlandırmakla birlikte verapamil ve ilgili ajanlar diyabette bilişsel fonksiyonu korumak için gelecekteki kombinasyon terapilerinin olası bir parçası olduğunu göstermektedir. Ancak, olası yan etkiler göz önüne alındığında dikkatli klinik değerlendirmeye ihtiyaç vardır. Gelecekteki çalışmalar, optimum dozajı araştırmalı, uzun vadeli güvenliği doğrulamalı ve bilişsel fonksiyon bozukluğu diğer modellerinde TXNIP inhibisyonunu araştırmalıdır. Sonuç olarak çalışmamızdan elde edilen bu veriler, verapamilin TXNIP aracılı hücrel stres yollarını modüle ederek diyabetik nöropatide terapötik bir rol üstlenme potansiyeli taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Geng J, Wang L, Zhang L, Qin C, Song Y, Ma Y, Chen Y, Chen S, Wang Y, Zhang Z, Yang GY. Blood-Brain Barrier Disruption Induced Cognitive Impairment Is Associated With Increase of Inflammatory Cytokine. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:129.
2. Georgy GS, Nassar NN, Mansour HA, Abdallah DM. Cerebrolysin Ameliorates Cognitive Deficits in Type III Diabetic Rats. *PLoS One.* 2013;8(6):e64847.
3. Tsubaki H, Tooyama I, Walker DG. Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) with Focus on Brain and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24).
4. Zhang Q, Huang HJ, Zhang JL, Tian Y, Hu Y. E3 ubiquitination ligase XIAP lightens diabetes-induced cognitive impairment by inactivating TXNIP-ERS-mediated neuronal injury. *Kaohsiung J Med Sci.* 2025;41(1):e12913.
5. Hu Y, Zhang Q, Wang JC, Wang J, Liu Y, Zhu LY, Xu JX. Resveratrol improves diabetes-induced cognitive dysfunction in part through the miR-146a-5p/TXNIP axis. *Kaohsiung J Med Sci.* 2023;39(4):404-415.
6. Ishrat T, Mohamed IN, Pillai B, Soliman S, Fouda AY, Ergul A, El-Remessy AB, Fagan SC. Thioredoxin-interacting protein: a novel target for neuroprotection in experimental thromboembolic stroke in mice. *Mol Neurobiol.* 2015;51(2):766-778.
7. Chen YS, Weng SJ, Chang SH, Li RY, Shane GT, Hsu JP, Yeh SW, Chang AC, Lee MJ. Evaluating the antidiabetic effects of R-verapamil in type 1 and type 2 diabetes mellitus mouse models. *PLoS One.* 2021;16(8):e0255405.
8. Xu L, Lin X, Guan M, Zeng Y, Liu Y. Verapamil Attenuated Prediabetic Neuropathy in High-Fat Diet-Fed Mice through Inhibiting TXNIP-Mediated Apoptosis and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:1896041.
9. Ismael S, Patrick D, Salman M, Parveen A, Stanfill AG, Ishrat T. Verapamil inhibits TXNIP-NLRP3 inflammasome activation and preserves functional recovery after intracerebral hemorrhage in mice. *Neurochem Int.* 2022;161:105423.
10. Singh R, Chandel S, Dey D, Ghosh A, Roy S, Ravichandiran V, Ghosh D. Epigenetic modification and therapeutic targets of diabetes mellitus. *Bioscience Reports.* 2020;40(9).
11. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013;36 Suppl 1(Suppl 1):S67-74.
12. Lu X, Xie Q, Pan X, Zhang R, Zhang X, Peng G, Zhang Y, Shen S, Tong N. Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):262.

13. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS, The Type 1 Diabetes Genetics C. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature Genetics*. 2009;41(6):703-707.
14. van Lummel M, van Veelen PA, de Ru AH, Janssen GMC, Pool J, Laban S, Joosten AM, Nikolic T, Drijfhout JW, Mearin ML, Aanstoot HJ, Peakman M, Roep BO. Dendritic Cells Guide Islet Autoimmunity through a Restricted and Uniquely Processed Peptidome Presented by High-Risk HLA-DR. *The Journal of Immunology*. 2016;196(8):3253-3263.
15. Roep BO, Thomaidou S, van Tienhoven R, Zaldumbide A. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the β -cell (do not blame the immune system?). *Nature Reviews Endocrinology*. 2021;17(3):150-161.
16. Vehik K, Lynch KF, Wong MC, Tian X, Ross MC, Gibbs RA, Ajami NJ, Petrosino JF, Rewers M, Toppari J, Ziegler AG, She J-X, Lernmark A, Akolkar B, Hagopian WA, Schatz DA, Krischer JP, Hyöty H, Lloyd RE, the TSG. Prospective virome analyses in young children at increased genetic risk for type 1 diabetes. *Nature Medicine*. 2019;25(12):1865-1872.
17. Ifie E, Russell MA, Dhayal S, Leete P, Sebastiani G, Nigi L, Dotta F, Marjomäki V, Eizirik DL, Morgan NG, Richardson SJ. Unexpected subcellular distribution of a specific isoform of the Coxsackie and adenovirus receptor, CAR-SIV, in human pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2018;61(11):2344-2355.
18. Han H, Li Y, Fang J, Liu G, Yin J, Li T, Yin Y. Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. 2018;19(4):995.
19. Zajec A, Trebušak Podkrajšek K, Tesovnik T, Šket R, Čugalj Kern B, Jenko Bizjan B, Šmigoc Schweiger D, Battelino T, Kovač J. Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Established Facts and New Insights. *Genes (Basel)*. 2022;13(4).
20. Isaacs SR, Foskett DB, Maxwell AJ, Ward EJ, Faulkner CL, Luo JYX, Rawlinson WD, Craig ME, Kim KW. Viruses and Type 1 Diabetes: From Enteroviruses to the Virome. *Microorganisms*. 2021;9(7).
21. Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:767-793.
22. Santos JL, Yévenes I, Cataldo LR, Morales M, Galgani J, Arancibia C, Vega J, Olmos P, Flores M, Valderas JP, Pollak F. Development and assessment of the disposition index based on the oral glucose tolerance test in subjects with different glycaemic status. *J Physiol Biochem*. 2016;72(2):121-131.
23. Odimegwu CL, Uwaezuoke SN, Chikani UN, Mbanefo NR, Adiele KD, Nwolisa CE, Eneh CI, Ndiokwelu CO, Okpala SC, Ogbuka FN, Odo KE, Ohuche IO, Obiora-Izuka CE. Targeting the Epigenetic Marks in Type 2

Diabetes Mellitus: Will Epigenetic Therapy Be a Valuable Adjunct to Pharmacotherapy? *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2024;17:3557-3576.

24. Bermudez V, Salazar J, Martínez MS, Chávez-Castillo M, Olivar LC, Calvo MJ, Palmar J, Bautista J, Ramos E, Cabrera M, Pachano F, Rojas J. Prevalence and Associated Factors of Insulin Resistance in Adults from Maracaibo City, Venezuela. *Adv Prev Med.* 2016;2016:9405105.
25. Gilbert ER, Liu D. Epigenetics: the missing link to understanding β -cell dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Epigenetics.* 2012;7(8):841-852.
26. Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:37.
27. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2015;6(3):456-480.
28. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119.
29. Zeng X, Yuan Y, Li Y, Hu Z, Hu S. Deciphering the NLRP3 inflammasome in diabetic encephalopathy: Molecular insights and emerging therapeutic targets. *Experimental Neurology.* 2025;391:115304.
30. Gruetter R, Ugurbil K, Seaquist ER. Steady-state cerebral glucose concentrations and transport in the human brain. *J Neurochem.* 1998;70(1):397-408.
31. Jacob RJ, Fan X, Evans ML, Dziura J, Sherwin RS. Brain glucose levels are elevated in chronically hyperglycemic diabetic rats: no evidence for protective adaptation by the blood brain barrier. *Metabolism.* 2002;51(12):1522-1524.
32. Silver IA, Erecińska M. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci.* 1994;14(8):5068-5076.
33. Zhang S, Zhang Y, Wen Z, Yang Y, Bu T, Bu X, Ni Q. Cognitive dysfunction in diabetes: abnormal glucose metabolic regulation in the brain. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1192602.
34. Lamport DJ, Lawton CL, Mansfield MW, Dye L. Impairments in glucose tolerance can have a negative impact on cognitive function: a systematic research review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009;33(3):394-413.
35. Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001;25(4):311-323.

36. Ryan CM, Freed MI, Rood JA, Cobitz AR, Waterhouse BR, Strachan MW. Improving metabolic control leads to better working memory in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(2):345-351.
37. Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1996;45(9):1259-1266.
38. Ab-Hamid N, Omar N, Ismail CAN, Long I. Diabetes and cognitive decline: Challenges and future direction. *World J Diabetes*. 2023;14(6):795-807.
39. Wilson V. Cognitive impairment in patients with diabetes. *Nurs Stand*. 2012;27(15-17):44-49.
40. Capiotti KM, De Moraes DA, Menezes FP, Kist LW, Bogo MR, Da Silva RS. Hyperglycemia induces memory impairment linked to increased acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2014;274:319-325.
41. Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*. 2013;80(4):844-866.
42. Yu X, He H, Wen J, Xu X, Ruan Z, Hu R, Wang F, Ju H. Diabetes-related cognitive impairment: Mechanisms, symptoms, and treatments. 2025;20(1).
43. Zhang X, Xu L, He D, Ling S. Endoplasmic reticulum stress-mediated hippocampal neuron apoptosis involved in diabetic cognitive impairment. *Biomed Res Int*. 2013;2013:924327.
44. Rom S, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, Seliga A, Winfield M, Heldt NA, Kolpakov MA, Bashkirova YV, Sabri AK, Persidsky Y. Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. *Mol Neurobiol*. 2019;56(3):1883-1896.
45. Milstein JL, Ferris HA. The brain as an insulin-sensitive metabolic organ. *Mol Metab*. 2021;52:101234.
46. Rhea EM, Leclerc M, Yassine HN, Capuano AW, Tong H, Petyuk VA, Macauley SL, Fioramonti X, Carmichael O, Calon F, Arvanitakis Z. State of the Science on Brain Insulin Resistance and Cognitive Decline Due to Alzheimer's Disease. *Aging Dis*. 2024;15(4):1688-1725.
47. Ansari MA, Al-Jarallah A, Babiker FA. Impaired Insulin Signaling Alters Mediators of Hippocampal Synaptic Dynamics/Plasticity: A Possible Mechanism of Hyperglycemia-Induced Cognitive Impairment. *Cells*. 2023;12(13).
48. Chen W, Cai W, Hoover B, Kahn CR. Insulin action in the brain: cell types, circuits, and diseases. *Trends Neurosci*. 2022;45(5):384-400.

49. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
50. González P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11).
51. Caturano A, D'Angelo M, Mormone A, Russo V, Mollica MP, Salvatore T, Galiero R, Rinaldi L, Vetrano E, Marfella R, Monda M, Giordano A, Sasso FC. Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Impacts from Pathogenesis to Lifestyle Modifications. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;45(8):6651-6666.
52. Sebastian MJ, Khan SK, Pappachan JM, Jeeyavudeen MS. Diabetes and cognitive function: An evidence-based current perspective. *World J Diabetes.* 2023;14(2):92-109.
53. Dakic T, Jevdjovic T, Lakic I, Ruzicic A, Jasnic N, Djurasevic S, Djordjevic J, Vujovic P. The Expression of Insulin in the Central Nervous System: What Have We Learned So Far? *Int J Mol Sci.* 2023;24(7).
54. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(8):421-438.
55. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science.* 2008;319(5865):916-919.
56. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-529.
57. Merighi A, Lossi L. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and Neuronal Cell Death. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23).
58. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol.* 2013;15(5):481-490.
59. Wang JM, Qiu Y, Yang ZQ, Li L, Zhang K. Inositol-Requiring Enzyme 1 Facilitates Diabetic Wound Healing Through Modulating MicroRNAs. *Diabetes.* 2017;66(1):177-192.
60. Upton JP, Wang L, Han D, Wang ES, Huskey NE, Lim L, Truitt M, McManus MT, Ruggero D, Goga A, Papa FR, Oakes SA. IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science.* 2012;338(6108):818-822.
61. Hassler JR, Scheuner DL, Wang S, Han J, Kodali VK, Li P, Nguyen J, George JS, Davis C, Wu SP, Bai Y, Sartor M, Cavalcoli J, Malhi H, Baudouin G, Zhang Y, Yates JR, III, Itkin-Ansari P, Volkmann N, Kaufman RJ. The IRE1 α /XBP1s Pathway Is Essential for the Glucose Response and Protection of β Cells. *PLoS Biol.* 2015;13(10):e1002277.

62. Acosta-Alvear D, Karagöz GE, Fröhlich F, Li H, Walther TC, Walter P. The unfolded protein response and endoplasmic reticulum protein targeting machineries converge on the stress sensor IRE1. *Elife*. 2018;7.
63. Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*. 2018;69(2):169-181.
64. Xu L, Han F, Mandal A, Rao GN, Zhang X. Diazoxide attenuates hypothermic preservation-induced renal injury via down-regulation of CHOP and caspase-12. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(12):3859-3867.
65. Ye T, Meng X, Zhai Y, Xie W, Wang R, Sun G, Sun X. Gastrodin Ameliorates Cognitive Dysfunction in Diabetes Rat Model via the Suppression of Endoplasmic Reticulum Stress and NLRP3 Inflammasome Activation. *Front Pharmacol*. 2018;9:1346.
66. Kong FJ, Wu JH, Sun SY, Zhou JQ. The endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway is involved in cholesterol-induced pancreatic β -cell injury. *Sci Rep*. 2017;7:44746.
67. Du Y, Zhang Q, Zhang X, Song Y, Zheng J, An Y, Lu Y. Correlation between inflammatory biomarkers, cognitive function and glycemic and lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Clin Biochem*. 2023;121-122:110683.
68. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(8):588-606.
69. Luo B, Li B, Wang W, Liu X, Xia Y, Zhang C, Zhang M, Zhang Y, An F. NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. *PLoS One*. 2014;9(8):e104771.
70. Corsini E, Galbiati V, Nikitovic D, Tsatsakis AM. Role of oxidative stress in chemical allergens induced skin cells activation. *Food Chem Toxicol*. 2013;61:74-81.
71. Liao PC, Chao LK, Chou JC, Dong WC, Lin CN, Lin CY, Chen A, Ka SM, Ho CL, Hua KF. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression and caspase-1-mediated interleukin-1 β secretion. *Inflamm Res*. 2013;62(1):89-96.
72. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 2010;11(2):136-140.
73. Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol*. 2009;19(9):455-464.
74. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*. 2012;13(4):325-332.

75. Kumar S, Prasad S, Sitasawad SL. Multiple antioxidants improve cardiac complications and inhibit cardiac cell death in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One*. 2013;8(7):e67009.
76. Donath MY, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Halban PA, Ehses JA. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(5):261-267.
77. Qiao Y, Wang P, Qi J, Zhang L, Gao C. TLR-induced NF- κ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS Lett*. 2012;586(7):1022-1026.
78. Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Van de Leur E, Lehnen E, Liedtke C, Weiskirchen R. NLRP3 inflammasome expression is driven by NF- κ B in cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;458(3):700-706.
79. Luo B, Huang F, Liu Y, Liang Y, Wei Z, Ke H, Zeng Z, Huang W, He Y. NLRP3 Inflammasome as a Molecular Marker in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol*. 2017;8:519.
80. Xue Y, Enosi Tuipulotu D, Tan WH, Kay C, Man SM. Emerging Activators and Regulators of Inflammasomes and Pyroptosis. *Trends Immunol*. 2019;40(11):1035-1052.
81. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(12):1012-1021.
82. Cai X, Chen J, Xu H, Liu S, Jiang QX, Halfmann R, Chen ZJ. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell*. 2014;156(6):1207-1222.
83. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, Schröder GF, Fitzgerald KA, Wu H, Egelman EH. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*. 2014;156(6):1193-1206.
84. Schmidt FI, Lu A, Chen JW, Ruan J, Tang C, Wu H, Ploegh HL. A single domain antibody fragment that recognizes the adaptor ASC defines the role of ASC domains in inflammasome assembly. *J Exp Med*. 2016;213(5):771-790.
85. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417-426.
86. Zheng X, Wan J, Tan G. The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in diabetic retinopathy. *Front Immunol*. 2023;14:1151185.
87. Song X, Fan S, Gao Y, Ma A, Zhang X, Zhou Z, Zheng Y, Du L, Zhu X. Swietenolide inhibits the TXNIP/NLRP3 pathways via Nrf2 activation to ameliorate cognitive dysfunction in diabetic mice. *Neuropharmacology*. 2025;267:110312.

88. Nordlund P, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:681-706.
89. Luthman M, Holmgren A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry.* 1982;21(26):6628-6633.
90. Nasoohi S, Ismael S, Ishrat T. Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) in Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases: Regulation and Implication. *Mol Neurobiol.* 2018;55(10):7900-7920.
91. Rybnikova E, Damdimopoulos AE, Gustafsson JA, Spyrou G, Pelto-Huikko M. Expression of novel antioxidant thioredoxin-2 in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 2000;12(5):1669-1678.
92. Yoshihara E, Masaki S, Matsuo Y, Chen Z, Tian H, Yodoi J. Thioredoxin/Txnip: redoxisome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases. *Front Immunol.* 2014;4:514.
93. Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, Hashimoto N, Yodoi J. Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(7):4131-4136.
94. Hattori I, Takagi Y, Nakamura H, Nozaki K, Bai J, Kondo N, Sugino T, Nishimura M, Hashimoto N, Yodoi J. Intravenous administration of thioredoxin decreases brain damage following transient focal cerebral ischemia in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6(1):81-87.
95. Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, Kondo N, Hirabayashi Y, Ishizaki-Koizumi S, Hirakawa T, Inoue T, Yodoi J. Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4(4):693-696.
96. Chen KS, DeLuca HF. Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1219(1):26-32.
97. Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, De Matos F, Durand E, Leprêtre F, Lecoœur C, Gallina P, Zekiri L, Dina C, Froguel P. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1470-1480.
98. Saxena G, Chen J, Shalev A. Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem.* 2010;285(6):3997-4005.
99. Kim GS, Jung JE, Narasimhan P, Sakata H, Chan PH. Induction of thioredoxin-interacting protein is mediated by oxidative stress, calcium, and glucose after brain injury in mice. *Neurobiol Dis.* 2012;46(2):440-449.
100. Junn E, Han SH, Im JY, Yang Y, Cho EW, Um HD, Kim DK, Lee KW, Han PL, Rhee SG, Choi I. Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative


- stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol.* 2000;164(12):6287-6295.
101. Xu W, Wang L, Li J, Cai Y, Xue Y. TXNIP mediated the oxidative stress response in glomerular mesangial cells partially through AMPK pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018;107:785-792.
 102. Choi EH, Park SJ. TXNIP: A key protein in the cellular stress response pathway and a potential therapeutic target. *Exp Mol Med.* 2023;55(7):1348-1356.
 103. Tinkov AA, Bjorklund G, Skalny AV, Holmgren A, Skalnaya MG, Chirumbolo S, Aaseth J. The role of the thioredoxin/thioredoxin reductase system in the metabolic syndrome: towards a possible prognostic marker? *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(9):1567-1586.
 104. Parikh H, Carlsson E, Chutkow WA, Johansson LE, Storgaard H, Poulsen P, Saxena R, Ladd C, Schulze PC, Mazzini MJ, Jensen CB, Krook A, Björnholm M, Tornqvist H, Zierath JR, Ridderstråle M, Altshuler D, Lee RT, Vaag A, Groop LC, Mootha VK. TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med.* 2007;4(5):e158.
 105. Alhawiti NM, Al Mahri S, Aziz MA, Malik SS, Mohammad S. TXNIP in Metabolic Regulation: Physiological Role and Therapeutic Outlook. *Curr Drug Targets.* 2017;18(9):1095-1103.
 106. Qayyum N, Haseeb M, Kim MS, Choi S. Role of Thioredoxin-Interacting Protein in Diseases and Its Therapeutic Outlook. 2021;22(5):2754.
 107. Panse M, Kluth O, Lorza-Gil E, Kaiser G, Mühlbauer E, Schürmann A, Häring HU, Ullrich S, Gerst F. Palmitate and insulin counteract glucose-induced thioredoxin interacting protein (TXNIP) expression in insulin secreting cells via distinct mechanisms. *PLoS One.* 2018;13(5):e0198016.
 108. Park SJ, Kim Y, Li C, Suh J, Sivapackiam J, Goncalves TM, Jarad G, Zhao G, Urano F, Sharma V, Chen YM. Blocking CHOP-dependent TXNIP shuttling to mitochondria attenuates albuminuria and mitigates kidney injury in nephrotic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(35):e2116505119.
 109. Wang YY, Liu XL, Zhao R. Induction of Pyroptosis and Its Implications in Cancer Management. *Front Oncol.* 2019;9:971.
 110. He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang ZH, Zhong CQ, Han J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res.* 2015;25(12):1285-1298.
 111. Chen J, Saxena G, Mungrue IN, Lusic AJ, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes.* 2008;57(4):938-944.
 112. Borowiec AM, Właszczuk A, Olakowska E, Lewin-Kowalik J. TXNIP inhibition in the treatment of diabetes. Verapamil as a novel therapeutic modality in diabetic patients. *Med Pharm Rep.* 2022;95(3):243-250.

113. Wu N, Zheng B, Shaywitz A, Dagon Y, Tower C, Bellinger G, Shen CH, Wen J, Asara J, McGraw TE, Kahn BB, Cantley LC. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell*. 2013;49(6):1167-1175.
114. Lee YS, Jun HS. Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. *Metabolism*. 2014;63(1):9-19.
115. Waldhart AN, Dykstra H, Peck AS, Boguslawski EA, Madaj ZB, Wen J, Veldkamp K, Hollowell M, Zheng B, Cantley LC, McGraw TE, Wu N. Phosphorylation of TXNIP by AKT Mediates Acute Influx of Glucose in Response to Insulin. *Cell Rep*. 2017;19(10):2005-2013.
116. Oka S, Yoshihara E, Bizen-Abe A, Liu W, Watanabe M, Yodoi J, Masutani H. Thioredoxin binding protein-2/thioredoxin-interacting protein is a critical regulator of insulin secretion and peroxisome proliferator-activated receptor function. *Endocrinology*. 2009;150(3):1225-1234.
117. Xu G, Chen J, Jing G, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204. *Nat Med*. 2013;19(9):1141-1146.
118. Wong RW, Hagen T. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) dependent regulation of thioredoxin interacting protein (TXNIP) transcription in hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;433(1):40-46.
119. Chong CR, Chan WP, Nguyen TH, Liu S, Procter NE, Ngo DT, Sverdllov AL, Chirkov YY, Horowitz JD. Thioredoxin-interacting protein: pathophysiology and emerging pharmacotherapeutics in cardiovascular disease and diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2014;28(4):347-360.
120. Schulze PC, Liu H, Choe E, Yoshioka J, Shalev A, Bloch KD, Lee RT. Nitric oxide-dependent suppression of thioredoxin-interacting protein expression enhances thioredoxin activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2666-2672.
121. Li X, Kover KL, Heruth DP, Watkins DJ, Guo Y, Moore WV, He LG, Zang M, Clements MA, Yan Y. Thioredoxin-interacting protein promotes high-glucose-induced macrovascular endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;493(1):291-297.
122. Gouget T, Djelloul M, Boucraut J, Weinhard L, Baranger K, Rivera S, Khrestchatisky M, Perrone L. O4-02-02: TXNIP, the major player in insulin resistance, is early over-expressed in the brain of the 5XFAD Alzheimer's mice model and is induced by A β in vitro: Emerging role of TXNIP and inflammation in Alzheimer's Disease progression. 2011;7(4S_Part_20):S684-S684.
123. Gao J, He H, Jiang W, Chang X, Zhu L, Luo F, Zhou R, Ma C, Yan T. Salidroside ameliorates cognitive impairment in a d-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2015;293:27-33.
124. Li Z-G, Zhang W, Grunberger G, Sima AAF. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Research*. 2002;946(2):221-231.


125. Zhang T, Shaw M, Cherbuin N. Association between Type 2 Diabetes Mellitus and Brain Atrophy: A Meta-Analysis. *Diabetes Metab J.* 2022;46(5):781-802.
126. Chen J, Cha-Molstad H, Szabo A, Shalev A. Diabetes induces and calcium channel blockers prevent cardiac expression of proapoptotic thioredoxin-interacting protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(5):E1133-1139.
127. Yoshioka J, Imahashi K, Gabel SA, Chutkow WA, Burds AA, Gannon J, Schulze PC, MacGillivray C, London RE, Murphy E, Lee RT. Targeted deletion of thioredoxin-interacting protein regulates cardiac dysfunction in response to pressure overload. *Circ Res.* 2007;101(12):1328-1338.
128. Xu G, Chen J, Jing G, Shalev A. Preventing β -cell loss and diabetes with calcium channel blockers. *Diabetes.* 2012;61(4):848-856.
129. Wych J, Brunner M, Stenson R, Chmura PJ, Danne T, Mander AP, Mathieu C, Dayan C, Pieber TR. Investigating the effect of verapamil on preservation of beta-cell function in adults with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus (Ver-A-T1D): protocol for a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multicentre trial. *BMJ Open.* 2024;14(11):e091597.
130. Thielen L, Shalev A. Diabetes pathogenic mechanisms and potential new therapies based upon a novel target called TXNIP. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2018;25(2):75-80.
131. Eissa LD, Ghobashy WA, El-Azab MF. Inhibition of thioredoxin-interacting protein and inflammasome assembly using verapamil mitigates diabetic retinopathy and pancreatic injury. *European Journal of Pharmacology.* 2021;901:174061.
132. Ghasemi A, Jeddi S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: a practical guide. *Excli j.* 2023;22:274-294.
133. Shehata AM, Quintanilla-Fend L, Bettio S, Singh CB, Ammon HP. Prevention of multiple low-dose streptozotocin (MLD-STZ) diabetes in mice by an extract from gum resin of *Boswellia serrata* (BE). *Phytomedicine.* 2011;18(12):1037-1044.
134. Michalak A, Pekala K, Budzynska B, Kruk-Slomka M, Biala G. The role of verapamil and SL-327 in morphine- and ethanol-induced state-dependent and cross state-dependent memory. *European Journal of Pharmacology.* 2018;834:318-326.
135. Wang K, Jingming Z, and Lang J. The effects of verapamil on the pharmacokinetics of curculigoside in rats. *Pharmaceutical Biology.* 2016;54(12):3001-3008.
136. Lerner AG, Upton JP, Praveen PV, Ghosh R, Nakagawa Y, Igbaria A, Shen S, Nguyen V, Backes BJ, Heiman M, Heintz N, Greengard P, Hui S, Tang Q, Trusina A, Oakes SA, Papa FR. IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab.* 2012;16(2):250-264.

137. Osowski CM, Hara T, O'Sullivan-Murphy B, Kanekura K, Lu S, Hara M, Ishigaki S, Zhu LJ, Hayashi E, Hui ST, Greiner D, Kaufman RJ, Bortell R, Urano F. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab.* 2012;16(2):265-273.
138. Li Y, Li J, Li S, Li Y, Wang X, Liu B, Fu Q, Ma S. Curcumin attenuates glutamate neurotoxicity in the hippocampus by suppression of ER stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in a manner dependent on AMPK. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;286(1):53-63.
139. Grabowska AD, Wątroba M, Witkowska J, Mikulska A, Sepúlveda N, Szukiewicz D. Interplay between Systemic Glycemia and Neuroprotective Activity of Resveratrol in Modulating Astrocyte SIRT1 Response to Neuroinflammation. *Int J Mol Sci.* 2023;24(14).
140. Ismael S, Nasoohi S, Yoo A, Mirzahosseini G, Ahmed HA, Ishrat T. Verapamil as an Adjunct Therapy to Reduce tPA Toxicity in Hyperglycemic Stroke: Implication of TXNIP/NLRP3 Inflammasome. *Mol Neurobiol.* 2021;58(8):3792-3804.
141. Zhang J, Liu L, Zhang Y, Yuan Y, Miao Z, Lu K, Zhang X, Ni R, Zhang H, Zhao Y, Wang X. ChemR23 signaling ameliorates cognitive impairments in diabetic mice via dampening oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation. *Redox Biol.* 2022;58:102554.
142. Sheth SS, Bodnar JS, Ghazalpour A, Thippavong CK, Tsutsumi S, Tward AD, Demant P, Kodama T, Aburatani H, Luscis AJ. Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice. *Oncogene.* 2006;25(25):3528-3536.

EKLER



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI



TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	TOPLANTI YERİ
10.11.2022	9	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Başlığı (Türkçe ve İngilizce)	Deneysel diyabette TXNIP inhibitörünün bilişsel performans üzerindeki etkisinin araştırılması Investigation of the effect of TXNIP inhibitor on cognitive performance in experimental diabetes
	Başvuru Tarihi	02.11.2022
	Protokol no	290
	Kullanılacak deney hayvanı (tür/ırk/dinsiyet/say)	Sıçan / Wistar Albino / Erkek / 50

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2022 / 59 <input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Red Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI' nın yürütücüsü olduğu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, başvurunun Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesince "uygun" olduğuna toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.
------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Yürütücü	Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Araştırmacılar	Prof. Dr. Can DEMİREL, Doktora Öğrencisi Mutlu Can ASLANPAY, Doktora Öğrencisi İbrahim YILMAZ

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	İlişki	Katılım	İmza
Prof. Dr. Piraye KERVANÇIOĞLU (Başkan)	GAÜN Tıp Fakültesi Anatomi AD.	H	E	
Doç. Dr. Davut Şinan KAPLAN (Başkan Yardımcısı)	GAÜN Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Tekin KARSUGİL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.	E	H	
Prof. Dr. Emine Elçin EMRE (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	H	E	
Prof. Dr. Can DEMİREL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	H	
Doç. Dr. Haluk ŞEN (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Öroloji AD.	H	E	
Doç. Dr. Merve GÖYMEN (Üye)	GAÜN Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti AD.	H	E	
Dr. Öğr. Üyesi A. Sarper BOZKURT (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.	H	E	
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Gülbin KAVAK (Üye)	GAÜN Tıp F. Radyasyon Onkolojisi AD.	H	E	
Veteriner Hekim Filiz BİÇİCİ (Üye)	GAÜN Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (GAÜNDAM)	H	E	
Veteriner Hekim Celal ÖZSÖYLER (Üye)	Gaziantep Büyükşehir Belediyesi Hayvanat Bahçesi	H	E	
Avukat Orhan BEYAZ (Üye)	Serbest, Dernek Üyesi	H	E	

E: Evet, H: Hayır

ÖZGEÇMİŞ

2012 yılında Uşak Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2016 yılında buradan mezun oldu. 2016 yılı güz döneminde Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesine bağlı Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2019 yılında tamamladı. 2020 yılı Bahar döneminde Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik programında doktora eğitimine başladı ve 2025 yılında doktora eğitimini tamamladı.

