

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE
ENSTİTÜSÜ
NÖROBİLİM ANABİLİM DALI**

**STREPTOZOTOSİN (STZ) İLE DİYABET
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN HİPOKAMPÜSÜNDE
OTOFAJİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Şazimet TAŞ**

**Danışman
Prof.Dr. Feyzullah BEYAZ**

Yüksek Lisans Tezi

**Nisan 2023
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE
ENSTİTÜSÜ
NÖROBİLİM ANABİLİM DALI**

**STREPTOZOTOSİN (STZ) İLE DİYABET
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN HİPOKAMPÜSÜNDE
OTOFAJİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

**Hazırlayan
Şazimet TAŞ**

**Danışman
Prof.Dr. Feyzullah BEYAZ**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2022-11616 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Nisan 2023
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Şazimet TAŞ

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Streptozotosin (Stz) ile diyabet oluşturulmuş sıçanların hipokampusünde otofajinin araştırılması ” adlı Yüksek Lisan Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Şazimet TAŞ

Danışman

Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Füsün Ferda ERDOĞAN

Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ danışmanlığında **Şazimet TAŞ** tarafından hazırlanan “**Streptozotosin (Stz) İle Diyabet Oluşturulmuş Sıçanların Hipokampuslerinde Otofajinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü Nörobilim Anabilim Dalında **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

26.04.2023

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr.Feyzullah BEYAZ

Üye : Prof. Dr. Füsun Ferda ERDOĞAN

Üye : Doç. Dr. Mehmet ÖZBEK

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../ ..

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi ve yazılması hususlarında göstermiş olduğu destek ve yardımlarından ötürü tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca TDK-2022-11616 proje kodu ile tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve Birim Personeline,

Tez çalışmamın diyabet oluşturma stz uygulamalarının tüm aşamalarında yardımcı olan Veteriner Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Gonca KAMACI ÖZOCAK'a, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencisi Veteriner hekim Ahmet CABİR'e, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans öğrencisi Veteriner hekim Barış ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca vermiş oldukları derslerle Nörobilim alanında temel bilgi birikiminin oluşturulmasında emeği olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Füsün Ferda ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip, yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için sevgili aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

Şazimet TAŞ

Kayseri, Nisan 2023

STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN HİPOKAMPÜSÜNDE OTOFAJİNİN ARAŞTIRILMASI

Şazimet TAŞ

Erciyes Üniversitesi Nörobilim Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Nisan 2023

Danışman: Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

ÖZET

Otofaji hasarlı hücresel proteinleri ve organelleri ortadan kaldıran evrimsel bir sürecin bir parçasıdır. Post-mitotik olan nöronlar, proteotoksinlerin birikmesine karşı özellikle savunmasızdır ve bu nedenle homeostazı sürdürmek için büyük ölçüde otofajiye bağımlıdır. Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulmuş sıçanların hipokampuslarında otofajinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmada 24 adet Wistar albino suşu erkek sıçan (180-200 gr, 1 aylık) kullanıldı. Sıçanlar rastgele ve eşit olarak; diyabet grubu (45 mg/kg streptozotosin i.p. n: 8), sham grubu (sitrata tamponu ph; 4,5 i.p n: 8) ve kontrol grubu (n: 8) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Hayvanların her gün kuyruk venalarından kan alınarak kan glukoz seviyeleri ölçüldü. Sıçanlar deney bitimine kadar 3'er gün aralıklarla tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi. Deney 40 gün süreyle devam ettirildikten sonra hayvanlara Bouin tespit solüsyonu ile perfüzyon yapılarak beyinleri çıkarıldı. Beyin dokularından 4 µm kesitler alındıktan sonra bu dokulara genel yapının incelenmesi amacıyla Nissl boyama yapıldı. Ardından diğer kesitlere AMPK, mTOR, LC3 ve Beclin-1 için Strept-avidin peroksidaz immunboyanma yöntemi uygulandı. Image J yöntemiyle değerlendirme yapıldı.

Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol grupları hem de diabetik gruptaki hayvanların hipokampuslarının dentat girus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların sitoplazmalarında beclin-1 pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Beclin-1 immunreaktivitesinin diabetik gruptaki nöronlarda kontrol gruplarındakine göre daha belirgin olduğu dikkati çekti ($P<0,05$). Kalitatif incelemelerde herhangi bir fark gözlenmemesine karşın araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile de değerlendirilmesi sonucunda diabetik gruptaki sıçanların hipokampuslarının girus dentatus ve kornu ammonis yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P<0,05$). Hem kontrol gruplarında hem de diabetik gruptaki hayvanların hipokampus bölümlerindeki bazı nöronların nörolemma ve aksolemmaları ile nöropilde AMPK pozitif reaksiyon gözlemlendi. Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile de değerlendirilmesi sonucunda diabetik gruptaki sıçanların hipokampuslarının dentat girus ve kornu ammonis gibi yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlenmedi ($P>0,05$). Kontrol gruplarında ve diabetik gruptaki hayvanların hipokampuslarındaki nöronların sitoplazmalarında yoğun mTOR pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin J-image programı ile de değerlendirilmesi sonucunda diabetik gruptaki sıçanların beyinlerinin hipokampuslarının dentat girus ve kornu ammonis gibi yapılarının incelenmesinde

kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısında anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P<0,05$). Diyabet grubunda mTOR boyanma alan yoğunluğunda azalma vardı.

Çalışmamızda tüm elde ettiğimiz veriler ışığında deneysel STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların hipokampsndeki nöronlarda beclin-1 aracılı bir otofaji gzlendi.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Hipokampüs, Otofaji, Sıan, Streptozotosin.



INVESTIGATION OF AUTOPHAGY IN THE HIPPOCAMPUS OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES RATS

Erciyes University Department of Neuroscience

Şazimet TAŞ, April 2023

Supervisor: Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

ABSTRACT

Autophagy is part of an evolutionary process that removes damaged cellular proteins and organelles. Neurons that are post-mitotic are particularly vulnerable to the accumulation of proteotoxins and are therefore highly dependent on autophagy to maintain homeostasis. The aim of this study was to investigate autophagy in the hippocampus of rats with experimental streptozotocin (STZ) diabetes.

In this study, 24 male Wistar albino strains (180-200 g, 1 month old) were used. Rats randomly and equally; They were divided into 3 groups as diabetes group (45 mg/kg streptozotocin i.p. n: 8), sham group (citrate buffer pH; 4.5 i.p n: 8), and control group (n: 8). Blood glucose levels were measured by drawing blood from the tail veins of the animals every day. The rats were weighed at 3-day intervals until the end of the experiment and their weights were recorded. After the experiment was continued for 40 days, the animals were perfused with Bouin fixation solution and their brains were removed. After 4 µm sections were taken from the brain tissues, Nissl staining was applied to these tissues to examine the general structure. Then, Strept-avidin peroxidase immunostaining method was applied to other sections for AMPK, mTOR, LC3 and Beclin-1. Evaluation was made using the Image J method.

As a result of staining, beclin-1 positive immunoreaction was observed in the cytoplasm of neurons in the dentate gyrus and cornu ammonis parts of the hippocampus of both control groups and animals in the diabetic group. It was noted that Beclin-1 immunoreactivity was more prominent in neurons in the diabetic group than in the control groups ($P<0.05$). Although no difference was observed in the qualitative examinations, as a result of the evaluation of the images obtained with the research microscope with the Image J program, a significant change was determined in the area staining intensity in the examination of the gyrus dentatus and cornu ammonis structures of the rat hippocampus of the rats in the diabetic group compared to the control groups ($P<0.05$). AMPK positive reaction was observed in the neurolemma and axolemma of some neurons and neuropil in hippocampus parts of both control groups and animals in the diabetic group. As a result of the evaluation of the images obtained with the research microscope with the Image J program, there was no significant change in the intensity of field staining compared to the control groups in the examination of the structures such as the dentate gyrus and cornu ammonis of the hippocampus of the rats in the diabetic group ($P>0.05$). Intense mTOR positive immunoreaction was observed in the cytoplasm of neurons in the hippocampus of the control groups and animals in the diabetic group. As a result of the evaluation of the images obtained with the research microscope with the J-image program, a significant change in the intensity of field staining was determined in the examination of the structures such as the dentate gyrus

and cornu ammonis of the brains of the rats in the diabetic group compared to the control groups ($P<0.05$). There was a decrease in mTOR staining area density in the diabetes group.

In the light of all the data we obtained in our study, a beclin-1-mediated autophagy was observed in neurons in the hippocampus of rats with experimental STZ-induced diabetes.

Key words: Autophagy, Hippocampus, Diabetes, Rat, Streptozotocin.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER.....	ixx
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xvi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hipokampal oluşum	4
2.2. Hipokampal oluşumun anatomik yapısı.....	4
2.3. Hipokampusün histolojik Yapısı	5
2.4. Pleksiform veya moleküler katman:	8
2.5. Granüler hücre katmanı:.....	10
2.6. Polimorfik katman veya hilus:.....	11
2.7. Hipokampusün fonksiyonu	12
2.8. Otofajiye Genel Bakış.....	13
2.9. Glukoz eksikliği çeşitli doku ve organlarda otofajiyi AMPK sinyal yolağı aracılığıyla indükler:.....	17
2.10. AMPK aktivitesindeki değişiklikler nörolojik hastalıkların bir yansıması olabilir:.....	20
2.11. Nöronlarda otofajik yolağın herhangi bir basamağında bozulma anormal nöronal homeostaz ile sonuçlanır:	22
2.12. ATG8/ LC3.....	23
2.13. Beclin-1.....	24
2.14. mTOR	25
2.15. Diyabet.....	26

2.15.1. Diyabet tipleri	27
2.15.2. Diyabetik nöropati.....	28
2.16. Demans.....	29
2.17. Alzheimer	29
2.18. Medial temporal lob epilepsisi	29
2.19. Deneysel diyabet oluşturma modelleri.....	30
2.20. Streptozotosin (STZ).....	30
2.21. Streptozotosin (STZ) etki mekanizması.....	31
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
3.1. Gereçler	32
3.1.1. Demirbaş malzemeler aletler.....	32
3.1.2. Sarf malzemeler ve kimyasal maddeler	33
3.2. Deneysel prosedür	34
3.2.1. Deney hayvanlarının elde edilmesi	34
3.2.2. Diyabet modelinin oluşturulması	34
3.3. Kan glukoz düzeylerinin ölçümü.....	35
3.4. Doku örneklerinin alınması.....	36
3.4.1. Histolojik ve immünohistokimya için doku örneklerinin alınması.....	37
3.4.2. Hipokampus doku örneklerinin histolojik ve immünohistokimyasal boyama teknikleri için hazırlanması	38
3.4.3. Nissl boyama (Krezil viyole boyama yöntemi)	38
3.4.4. İmmünohistokimyasal analiz (Strep-avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immünoperoksidaz tekniği)	38
3.5. İmmünohistokimyasal boyamanın kalitatif değerlendirmesi	39
3.6. İmmünohistokimyasal boyamanın kantitatif değerlendirmesi	39
3.7. İstatistiksel analiz.....	40
4. BULGULAR	41
4.1. Histolojik bulgular	43
4.2. İmmunohistokimyasal bulgular	48
4.2.1 Beclin 1 immunreaktivitesi	48
4.2.2 LC3 immunreaktivitesi	53
4.2.3 AMPK immunreaktivitesi	61

4.2.2. mTOR immunreaktivitesi.....	68
5. TARTIşMA VE SONUÇ.....	76
6. KAYNAKLAR.....	90
EKLER	
ÖZGEÇMİş	



KISALTMALAR ve SİMGELER

3-MA	: Metiladenin otofaji inhibitörü
AD	: Alzheimer hastalığı
AMBRA1	: Activating molecule in BECN1 regulated autophagy protein
AMP	: 5'-adenosin monofosfat
AMPK	: AMP ile aktive olan protein kinaz
APP	: Amloid öncü protein
Atg	: Otofaji ile ilişkili protein
ATG5	: Otofaji ile ilişkili protein 5
AV	: Otofajik vakuol
Bax	: Bcl-2-asociated X protein
beclin 1	: Otofaji protein
CNS	: Merkezi sinir sistemi
Cys	: Sistein proteazı
DM	: Diyabetes mellitus
ER	: Endoplazmik retikulum
FIP200	: Fokal adezyon kinaz ailesi etkileşimli proteini 200 kD
GFP	: Yeşil floresan proteini
H2O2	: Hidrojen Peroksit
HD	: Huntington hastalığı
HKII	: Heksokinaz II mitokondriden yer alan enzim
IKK β	: I κ B kinaz β
IRE1 α	: İnositol gerektiren enzim 1 α
IRS1	: İnsülin reseptörü substratı 1
JNK1	: İnositol 1,4,5-trisfosfat

LC3	: Mikrotübül ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3
IPFC	: Lateral prefrontal korteks
mPFC	: Medial Prefrontal korteks
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
NO	: Nitrik oksit
oFC	: Orbitofrontal korteks
PBS	: Fosfat Bufer Salın
PD	: Parkinson hastalığı
PE	: Fosfolipid fosfatidiletanolamin
PFC	: Prefrontal korteks
PI3KC3	: Sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz
PI3KC3-C1	: Sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksi I
PtdIns3K	: Sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz
REDD1	: Gelişim ve DNA tepkisinde düzenlenmiş inhibitör
RFP	: Kırmızı floresan proteini
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Sequestozom	: SQSTM1
Ser 317	: Serin 177, AMPK ile fosforilasyon gerçekleştiren protein
Ser 777	: Serin 777, AMPK ile fosforilasyon gerçekleştiren protein
TCA	: Glukoliz ve trikarboksilik asit
TD1	: Tip 1 Diyabetes mellitus
TD2	: Tip 2 Diyabetes mellitus
tfLC3	: Floresan etiketli LC3
TSC1	: mTORC1 inhibitörünün fosforilasyonunu tuberoskleroz 1
TSC2	: mTORC1 inhibitörünün fosforilasyonunu tuberoskleroz 2

ULK	: UNC-51–like kinase
Ulk1	: Unc-51 benzeri kinaz 1
VMP1	: Vakuol membran proteini 1
VPS15, PIK3R4	: Vakuoler protein sınıflandıran protein 15
VPS34	: Vakuoler protein sınıflandırması ile ilişkili protein 34
WPM1	: Vakual membran protein 1



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Kontrol ve Diyabetik sıçanların hipokampuslarında dentat girus ve kornu ammonis bölgelerinde otofaji ile ilgili proteinleri immunohistokimyasal lokalizasyonları ve boyanma yoğunlukları.	75
--	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Hipokampüsün katmanlı organizasyonunun şeması.	9
Şekil 2.2.	Sıçan hipokampüs diyagramı.....	11
Şekil 2.3	mTOR sinyal yolağı	26
Şekil 3.1.	Sıçanların kuyruklarından kan glukoz ölçümü.	34
Şekil 3.2.	Bouin tespit solüsyonu kullanılarak kardiyak perfüzyon uygulandı.	35
Şekil 3.3.	Bouin tespit solüsyonuna maruz kalan beyin görüntüsü.	36
Şekil 4.1.	Kontrol ve STZ ile indüklenen sıçanlar için kan şeker seviyeleri.	42
Şekil 4.2.	Kontrol ve STZ ile indüklenen sıçanların vücut ağırlıkları.....	42
Şekil 4.3.	Hipokampüsün histolojik genel görünümü. DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, Nisll boyaması, Bar; 200 µm.	44
Şekil 4.4.	Hipokampüste Dentat girusun (DG) histolojik genel görünümü. CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, H; Hilus, Nisll boyaması, Bar; 100 µm.	44
Şekil 4.5	Hipokampüste Dentat girusun (DG) yakın histolojik genel görünümü. M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, Nisll boyaması, Bar; 20 µm.....	45
Şekil 4.6.	Hipokampüste Dentat girusun (DG) histolojik genel görünümü. CA; Kornu ammonis, Nisll boyaması, Bar; 100 µm	45
Şekil 4.7.	Hipokampüste CA3b (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar), Nisll boyaması, Bar; 20 µm.....	46
Şekil 4.8.	Hipokampüste CA3a (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar, Nisll boyaması, Bar; 20 µm.	46
Şekil 4.9.	Hipokampüste CA1 (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar), Nisll boyaması, Bar; 20 µm.....	47
Şekil 4.10.	Diyabetli bir sıçanın hipokampüsün'de CA3b (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (kırmızı oklar), Nisll boyaması, Bar; 20 µm.....	47
Şekil 4.11.	Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu	

	ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 μ m.	49
Şekil 4.12.	Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.	49
Şekil 4.13.	Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de CA3a bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.	50
Şekil 4.14.	Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de CA1 bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.	50
Şekil 4.15.	Diyabet grubuna ait bir sıçanın hipokampüsü'nün dentat girusunda beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA3c; Kornu ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 μ m.	51
Şekil 4.16.	Diyabet grubuna ait bir sıçanın hipokampüsü'nün CA3b bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.	51
Şekil 4.17.	Diyabet grubuna ait bir sıçanın hipokampüsü'nün CA3a bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif bir nöron (yeşil ok), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.	52
Şekil 4.18.	Diyabet grubuna ait bir sıçanın hipokampüsü'nün CA1 bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar) CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.	52
Şekil 4.19.	Beclin-1 pozitif kalp kası hücreleri, pozitif kontrol, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.	53
Şekil 4.20.	Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde LC3 immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, EK; Entorinal korteks, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 μ m.	54
Şekil 4.21.	Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde LC3 immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman , G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 μ m.	55

Şekil 4.22.	Kontrol grubu hayvanların hipokampusünün dentat girusunda LC3 immunpozitif hücreler (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.	55
Şekil 4.23.	Kontrol grubu hayvanların hipokampusünde LC3 immunpozitif hücreler (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm... ..	56
Şekil 4.24.	Kontrol grubu hayvanların hipokampusünde CA1 bölgesinde LC3 immunpozitif hücreler (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.	56
Şekil 4.25.	Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde LC3 immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, PSK; Post singular korteks, MK; Motor korteks, SK; Sensorik korteks, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.	57
Şekil 4.26.	Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde LC3 immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman , G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.	57
Şekil 4.27.	Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde CA3b bölgesinde LC3 pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.	58
Şekil 4.28.	Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde CA3a bölgesinde LC3 pozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.	58
Şekil 4.29.	Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde CA1 bölgesinde LC3 pozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.	59
Şekil 4.30.	Böbrek dokusunda LC3 immunreaksiyonu, pozitif kontrol, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.	59
Şekil 4.31.	Kontrol grubu hayvanların hipokampusünde AMPK immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.	61

- Şekil 4.32.** Kontrol grubu hayvanların hipokampusu'nun dentat girusunda AMPK immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm. 61
- Şekil 4.33.** Kontrol grubu hayvanların hipokampusünde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm. 62
- Şekil 4.34.** Kontrol grubu hayvanların hipokampusünde CA2 ve CA3a bölgelerinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm. 62
- Şekil 4.35.** Kontrol grubu hayvanların hipokampusünde CA1 ve CA2 bölgelerinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm. 63
- Şekil 4.36.** Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde AMPK immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm. 63
- Şekil 4.37.** Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün dentat girusunda AMPK immunreaktivitesi (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm. 64
- Şekil 4.38.** Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün CA1 bölgesinde bir AMPK pozitif hücre (kırmızı ok), bir nörodejeneratif nöron (yeşil ok) ve dark nöronlar (mavi oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm. 64
- Şekil 4.39.** Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün CA2 bölgesinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm. 65
- Şekil 4.40.** Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün CA2 bölgesinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 10 µm. 65
- Şekil 4.41.** Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün CA3a bölgesinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 10 µm. 66
- Şekil 4.42.** Kolonda AMPK immunreaktivitesi, pozitif kontrol, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm. 66

- Şekil 4.43.** Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde mTOR immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, EK; Entorinal korteks, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm. 68
- Şekil 4.44.** Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm. 68
- Şekil 4.45.** Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünün girus dentatusunda mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm. 69
- Şekil 4.46.** Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünün DG ve CA3a bölgelerinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm. 69
- Şekil 4.47.** Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünün CA1 bölgesinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm. 70
- Şekil 4.48.** Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde mTOR immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm. 70
- Şekil 4.49.** Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm. 71
- Şekil 4.50.** Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde CA3a bölgesinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm. 71
- Şekil 4.51.** Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde CA1 bölgesinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif bir nöron (yeşil ok), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm. 72
- Şekil 4.52.** Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde CA3b bölgesinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil

oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.	72
Şekil 4.53. Akciğer dokusunda mTOR immunreaktivitesi, pozitif kontrol, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.	73
Şekil 4.54. Kontrol ve diyabetli sıçanların Hipokampüslerinde Beclin1, LC3, AMPK ve mTOR'un immunohistokimyasal ekspresyonları. Image J görüntüleri ile elde edilen boyanma alan yoğunlukları ($P < 0,05$).....	74



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çalışmamız bir araştırma projesi olarak tasarlanmıştır. Kronik yüksek kan glukoz düzeyi ile karakterize olan diyabetes mellitus (DM) kognitif fonksiyon bozuklukları da dahil santral sinir sistemini de etkileyen bir hastalıktır. Bu tez çalışmasında diyabete bağlı olarak şekillendiği bilinen bilişsel bozukluklarda otofajik mekanizmalardaki değişikliklerin rolünün olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmada Streptozotosin (STZ) verilerek diyabet oluşturulan erişkin sıçan modelinde hipergliseminin; hipokampus beyin dokusunda AMPK α 1, mTOR, Beclin 1 gibi otofaji ile ilişkili çeşitli proteinlerin ve otofagozom oluşumunda önemli rol oynayan LC3'ün ekspresyon düzeylerini değiştirip değiştirmediğinin; eğer değiştiriyorsa bu değişimin otofajinin indüklenmesi veya baskılanması yönünde olup olmadığının ve otofajinin indüklenmesinde AMPK sinyal yolağının rol oynayıp oynamadığının araştırılması hedeflenmiştir.

Otofaji , 'kendini yeme' anlamına gelen Yunanca kökenli bir terimdir. İlk olarak 1963 yılında Christian de Duve tarafından sıçan karaciğer epitel hücrelerinde keşfedilmiştir. 2016 Nobel Tıp Ödülü'nün otofajiyi düzenleyen mekanizmaların varlığını ortaya çıkaran Japon bilim adamı Yoshinori Ohsumi'ye verilmesiyle güncel bir konudur. Otofaji hasarlı, sorunlu hücrel proteinleri ve organelleri yok eden bir süreçtir (Liman N., 2017).

Otofajinin ana türü olan makrotofaji, sitoplazmanın bir kısmının multimembran bir bölmede (otofagozom) yutulmasından oluşur ve daha sonra büyük bir ikincil lizozom (otolizozom) üretmek için bir lizozomla birleşir. Otofaji, hücrelerin uzun vadeli sağlığı için gereklidir ve hücrel homeostazı koruyarak ve besinleri sağlayarak, otofajide bir artış, besin ve büyüme faktörü yoksunluğu veya toksik moleküllerin

birikimi gibi bazı stres koşullarında hücrenin hayatta kalmasına katkıda bulunabilir (patojenler, yanlış katlanmış proteinler, hasarlı organeller vb.) (Galluzi I., 2017).

Beyin, lizozom bozukluğunda savunmasızdır, bu da nöronların, protein homeostazını devam ettirmek için diğer hücrelerden daha fazla otofajiye güvenebileceğini gösterir. Nöronlardaki büyük dendritik ve aksonal sitoplazma gibi olağandışı yapılar, zamanla bozulmuş organelleri ve diğer atıkları ortadan kaldırmada zorluklara neden olur. Otofajinin iki temel bileşeni, aksonlarda üretilen otofajik vakuollerin, esas olarak hücre gövdesinin yakınında bulunan lizozomlara uzun mesafeler kat etmesi gereken farklı yerlerde bulunur (Guo F. Ve ark., 2018).

Diabetes mellitus, kalıcı hiperglisemi ile tanımlanan metabolik bir hastalıktır. Diyabet, tip 1 veya tip 2 olarak sınıflandırılır. Anormal derecede yüksek kan şekeri seviyeleri, insülin üretiminin eksikliğinden (tip 1 diabetes mellitus) veya insülinin hücresel etkilerine karşı direncin bir sonucu olarak ve ayrıca insülin üretiminin azalmasından (tip 2 diabetes mellitus) kaynaklanabilir (Abdulrahman O, 2012).

Beyin, insülinin direkt hedef organı olmasa da, son zamanlarda bu polipeptid hormonunun insan nörofizyolojisinde insülin reseptör sinyalinin düzensizliğinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. biliş, hafıza, metabolizma ve beyne glukoz alımı insülin tarafından düzenlenmektedir (Kubis-Kubiak AM. ve ark., 2019). Beyindeki insülinin bilinen görevlerine ek olarak, santral sinir sisteminde, nöronların olgunlaşması, nöronal sağkalım, nörogenez, sinaptogenez, sinaptik plastisite, nörorejenerasyon, öğrenme ve hafıza gibi beyin işlevlerinde hayati öneme sahiptir (Ferrario CR, 2018). Beynin farklı hücrelerinde özellikle hafıza ve öğrenme süreçlerine dâhil olan beyin bölgelerinde yüksek oranda bulunmaktadır. İnsüline bağımlı glukoz metabolizması, esas olarak hipokampusta GLUT4 aracılığıyla gerçekleşmektedir (Barone E. ve ark., 2021).

Diyabetin beyin üzerindeki uzun vadeli etkileri yapısal, nörofizyolojik ve nöropsikolojik düzeyde kendini gösterir ve hipoglisemik epizodlar, serebrovasküler değişiklikler, diyabetin rolü gibi diyabetteki serebral disfonksiyonun patogenezinde birden fazla patojenik faktör rol oynar gibi görünmektedir. Beyin, yüksek oksijen tüketim oranı, bol lipid içeriği ve diğer dokulara kıyasla antioksidan enzimlerin görece azlığı nedeniyle özellikle oksidatif hasara karşı savunmasızdır (Jakson GR. ,

1994). Nöronal hücreler özellikle oksidatif saldırılara duyarlıdır ve bu nedenle reaktif oksijen türleri (ROS) diyabet gibi birçok nörodejeneratif süreçte rol oynar. Normal fizyolojik koşullar altında ROS üretimi ile antioksidan mekanizmalar arasında bir denge olmasına rağmen, diğerlerinin yanı sıra antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalması nedeniyle yaşlanan dokularda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Bala K. ve ark., 2006). Otofajinin diyabet veya metabolizmadaki rolü henüz net değildir ve bu nedenle diyabetik komplikasyonların patogeneğinde otofajinin etkisi yoğun bir araştırma altındadır (Gonzalez CD., 2011).



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Hipokampal oluşum

Beyinde iki tür serebral korteks vardır: allokorteks (heterojenik korteks) ve neokorteks. Allokorteks, korteksin sadece % 10 unu kaplayan çok daha küçük alanıdır; neokorteks ise kalan % 90'ı kaplar. Neokorteks altı kortikal katmandan (sinir hücreleri katmanı) oluşurken, allokorteks yalnızca üç veya dört kortikal katmana sahip olmasıyla karakterizedir. (Strominger ve ark., 2012). Allokorteksin üç alt tipi vardır: paleokorteks, arkikorteks ve periallokorteks (Filimonoff, 1947).

Paleokorteks, üç kortikal laminadan oluşan ince, ilkel bir kortikal doku türüdür. Neokorteksin iki granüler tabakası II ve IV, paleokortekte bulunmaz. Paleokorteksin ana alanları bulbus olfactoryus, koku alma tüberkülü ve piriform kortekstir. Arkikorteks, dört adet laminadan oluşan bir kortikal doku türüdür. Arkikorteksin ana alanları hipokampus ve dentat girus'tur (<http://braininfo.rprc.washington.edu/centraldirectory.aspx?type=a&ID=2336>, erişim tarihi: 20 Aralık 2020).

Periallokorteks, neokorteks ile paleo- veya arki-korteks arasındaki geçiş formudur. Bu nedenle periallokorteks alanları peripaleokorteks (anterior insular korteks) veya periarkikorteks (entorinal korteks, prekubiküler korteks, retrosplenial, suprakallozal ve subgenual alanlar) olabilir (D'Udine ve Gozzo, 1983).

2.2. Hipokampal oluşumun anatomik yapısı

Hipokampus at anlamına gelen Yunanca "Hippos" ve deniz canavarı anlamına gelen "kampos" sözcüklerinden türetilmiştir. Şekil olarak denizatına benzetilmiştir. Bu özellik, ayrıntılar farklılık gösterse de, kirpiden insana kadar tüm memeli türleri için geçerlidir. Örneğin, farede iki hipokampus, saplarından birleştirilmiş bir çift muza benzer. Hipokampal yapılar, arkikorteksin medial temporal lob içine doğru yaptığı

kıvrımlar olup temporal lobların medial kısımlarının her birinde birer tane olmak üzere beyin uzunlamasına eksenini boyunca uzanır ve lateral ventriküllerin medial duvarlarını oluşturur. Primat beyinlerinde, hipokampusün temporal lobun tabanına yakın kısmı, üst kısımdakinden daha geniştir (Dekeyzer ve ark., 2017). Sıçan hipokampusü, serebral korteksin ventroposterior ve ventrolateral duvarında geniş bir yer kaplamaktadır (Bayer, 1985).

2.3. Hipokampusün histolojik yapısı

Hipokampal oluşum, beyin medial temporal lobunda yerleşen bileşik bir yapı olup filogenetik olarak beyin en eski kısımlarından biridir ve limbik sistemin bir parçasını oluşturur. Hipokampal oluşum teriminin hangi beyin bölgelerini kapsadığına dair bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bazı yazarlar hipokampal oluşumun dentat girus, kornu ammonis ve subikulum'dan oluştuğunu belirtirken (Martin, 2003), diğerleri ayrıca presubikulum, parasubikulum ve entorinal korteksi de içerdiğini ileri sürmektedirler Burada hipokampal oluşumun arkikorteksin medial temporal lob içine doğru yaptığı kıvrımlar olduğu bilgisi doğrultusunda birinci görüş dikkate alınarak hipokampal oluşum kornu ammonis (CA), dentat girus (DG) ve subikulum olarak bölümlenmiştir (Amaral ve Lavenex, 2007).

Anatomik olarak lateral ventrikülün alt boynuzunun tabanında yerleşen hipokampüste dentat girus ve kornu ammonisin her ikisi yatay yerleşmiş U veya V harfi şeklinde koyu bir bant halinde dizilen iki hücre kümesi şeklinde izlenir. Kornu ammonisin U veya V harfinin açık uçlarından biri dentat girus içine uzanır. Bu kısım CA3c veya hilus olarak adlandırılır. Dentat girus dentat fasia (fascia dentate) ve hilusu içerirken, CA anatomik ve fonksiyonel olarak CA1, CA2 ve CA3 olarak adlandırılan sıkıca paketlenmiş piramidal nöronlara sahip farklı alt bölgelere ayrılır. CA3 bölgesi, hafıza süreçlerindeki özel rolü, nörodejeneratif hastalıklara karşı duyarlılığı nedeniyle son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Cherubin ve Miles, 2015). CA3, CA3a, CA3b ve CA3c olarak bilinen bölgelere ayrılır. CA3c, DG'a en yakın olan hilusa giren kısımdır. CA3a, DG'den en uzakta olan bölümdür ve CA3b ikisi arasında yer alır (Ishizuka ve ark., 1990; Wible, 2013).

Ventriküler yüzeyden itibaren dentat girusa kadar CA şu katmanlardan oluşur:

1. Dış pleksiform katman

2. Stratum oriens
3. Stratum pyramidale
4. Stratum radiatum
5. Stratum lakunozum
6. Stratum molekölare

(<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/hippocampus-structure-and-functions>, Erişim tarihi: 21 Aralık 2020).

Hipokampüsün ventriköler yüzeyini örten fornıksden çıkan sinir telleri alveus adı verilen ince beyaz bir bant şeklinde görölür. Hipokampüs, uyarıcı girdisinin çoğunu entorinal korteksten alır. Entorinal korteksten hipokampüse uzanan iki sinir yolağından biri alvear yolaktır. Alvear yolak ilk olarak Cajal tarafından tanımlanmış olup, entorinal korteksin medial bölgesindeki nöronlardan çıkan afferent sinir tellerinden oluşur. Alvear yolağı oluşturan sinir telleri alveus yoluyla CA1 bölgesine ulaşırlar ve buradaki piramidal hücrelerin baziler dendritlerinde sinaps yaparlar (Schukla ve ark., 2001). Diğer sinir yolağı perforant yolaktır. Hipokampal oluşum boyunca trisinaptik devrenin birinci sinir teli yolu olan perforant yolak entorinal korteksten dentat girus, tüm CA alanları (CA1 dahil) ve subikulum dahil olmak üzere hipokampal oluşumun tüm alanlarına bağlantı sağlar. Perforant yolağın sinir telleri, kökenlerini esas olarak lateral entorinal korteksin II ve III. katmanlarında bulunan nöronlardan alır, ancak tellerin daha küçük bir kısmı V. katmandan kaynaklanır. Entorinal korteksi terk ettikten sonra, sinir telleri alttaki alba (substantia alba) katmanını ve daha sonra subikulumun piramidal hücre katmanını geçerler ve dentat girusa girmek için hipokampal fissürü geçerler veya subikulumun molekül katmanına ve hipokampusun CA alanlarına dağılırlar. Entorinal korteksin II. katmanındaki yıldız hücrelerinin sinir telleri dentat girus ve CA3 bölgesini, III. katmanındaki piramidal hücrelerden gelen sinir telleri ise CA1 ve subikulumu hedef alır (Van Groen ve Miettinen, 2003).

1. Dış pleksiform katman: Kornu ammonisin dış pleksiform katmanı, lateral ventrikölün inferior (alt) boynuzunun yakınında bulunur ve piramidal hücrelerin aksonları ile alvear yolağın sinir tellerini içerir.

2. Stratum oriens: İnhibitör sepet hücrelerin ve yatay trilaminer hücrelerin hücre gövdeleri bu katmanda bulunur. Trilaminer hücrelerin aksonları oriens, piramidal ve radiatum katmanlarını innerve ettiğinden bu adla anılırlar. Piramidal nöronların bazal dendritleri de burada bulunur.

3. Stratum pyramidale: Hipokampüsün başlıca uyarıcı nöronları olan piramidal nöronların hücre gövdelerini içerir. Bu tabaka aynı zamanda akso-aksonik hücreler, iki tabakalı hücreler ve radyal trilaminer hücreler gibi birçok inter nöronun hücre gövdelerini içerir. CA3 bölgesinde, stratum lusidum adı verilen hücresel olmayan dar bir bölge, piramidal hücre katmanının hemen üzerinde yer alır. Bu tabaka dentat girusun granüler hücrelerinin aksonları olan Mossy tellerini içerir. Stratum lusidum'un uzak ucunda, Mossy tellerinin ventral olarak büküldüğü tabakada hafif bir kalınlaşma vardır. Bu CA3 ve CA2 sınırını belirtir. Kornu ammonis ve subiculumun dominant nöronları piramidal hücrelerdir. Nöronların büyüklükleri ve yoğunlukları hipokampüs boyunca değişiklik gösterir. Piramidal hücrelerin dendritik uzantıları eksitator sinaptik iletimin esas yerleridir. Bu hücrelerin dendritlerinde çok sayıda dikensi yapılar görülür (Turner ve ark., 1998). Son yıllarda yapılan çalışmalarda dendritik çıkıntılarının oldukça dinamik yapılar olduğu gösterilmiştir. Bu çıkıntılarda öğrenme ve hafıza gibi fizyolojik durumlarda değişimler gözlenmiştir. Ayrıca CA1 bölgesindeki dendritik çıkıntılarının yaşlanmış sıçanlarda ve Alzheimer'lı hastalarda azaldığı rapor edilmiştir (Ruan ve ark., 2006; Wible, 2013).

4. Stratum radiatum: Stratum oriens'e benzer olarak septal ve komissural teller içerir. Ayrıca, CA3'ten CA1'e doğru uzanan Schaffer kollateral sinir tellerini de içerir. Bu tabakada sepet hücreleri, iki tabakalı hücreler ve radyal trilaminer hücreler gibi birçok inter nöronun hücre gövdeleri bulunabilir.

5. Stratum lakunozum: Schaffer kollateral sinir tellerini ve aynı zamanda entorhinal korteksin yüzeysel katmanlarından gelen perforant yolağın sinir tellerini de içeren ince bir tabakadır.

6. Stratum molekülare: Hipokampustaki en yüzeysel tabakadır. Burada perforant yolağın sinir telleri piramidal hücrelerin distal, apikal dendritleri üzerinde sinapslar oluşturur. Küçük boyutu nedeniyle, genellikle stratum molekülare ile birlikte stratum

lakunozum-molekölare adı verilen tek bir katman olarak tanımlanır (Andersen, 2007).

Kornu ammonisin CA2 ve CA3 bölgeleri, birbiri üzerinde yakın şekilde paketlenmiş birkaç katman oluşturan büyük piramidal hücrelerin varlığı ile karakterize edilir. Her iki alan da CA1 ve subikuluma benzer katmanlı bir görünüme sahiptir. Sıçanda şu özellikler CA3'ü CA2'den açıkça ayırır: CA2'nin piramidal hücre katmanı, bitişik CA3'tekinden biraz daha kalın olma eğilimindedir ve CA3 nöronları ile benzer boyuttaki büyük hücrelerin, küçük nöronlar ve CA1 nöronlarına benzer boyuttaki nöronların bir karışımıdır. CA3, CA2'de neredeyse tamamen bulunmayan güçlü kalbindin pozitif Mossy telleri ile karakterizedir. CA2, CA3'ten çok daha yüksek yoğunlukta pozitif nöronlar içerir (Amaral ve ark., 2007).

Dentat girus üç katmandan oluşur:

1. Pleksiform veya moleköl katman
2. Granüler hücre katman
3. Polimorfik katman (Hilus)

Granüler hücre ve moleköl katmanlar dentat fasiya (fascia dentate) olarak da adlandırılır.

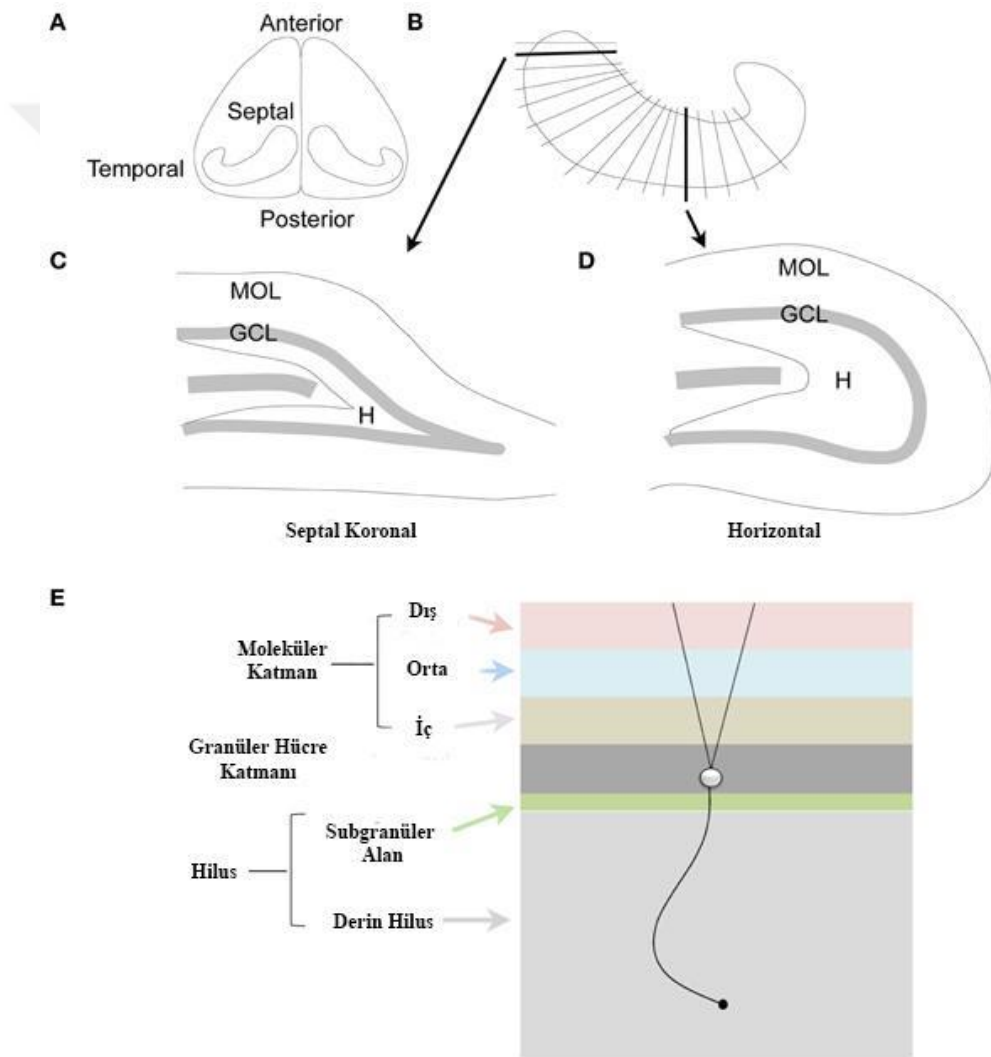
2.4. Pleksiform veya moleköl katman:

Kornu ammonisin moleköl katmanının yanındaki konumu nedeniyle bu şekilde adlandırılan dentat girusun moleköl katmanı granüler hücrelerin, polimorfik katman hücreleri ve piramidal sepet (basket) hücrelerinin dentritlerini ve terminal entorhinal korteks ile diğer birkaç bölgenin (presubikulum, parasubikulum) nöronlarının aksonlarını içerir. Perforant yolağın sinir telleri bu tabakadan geçerek, granül hücrelerin distal apikal dendritlerinde uyarıcı sinapslar oluşturur. Moleköl katman, yaklaşık olarak aynı genişlikte üç bölgeye bölünmüştür: dış moleköl katman; orta moleköl katman ve iç moleköl katman.

Moleköl katman içinde başlıca iki sinir hücresi tipi vardır:

- a. MOPP hücresi (perforant yolla ilişkili moleköl katman hücresi): Bu hücreler moleköl katmanın derinliklerinde bulunan ve moleköl katmanın dış üçte ikisinde sonlanan üçgen gövdeli multipolar sinir hücreleridir.

b. "Avize" benzeri hücreler: Granüler hücre katmanının yüzeyel kısmına bitişik bulunan bu hücreler akso-aksonik hücreler olarak da adlandırılır. Çok sayıda kollaterallere sahiptirler ve granüler hücrelerin akson başlangıç segmentlerinde sonlanırlar. Bu hücrelerin her biri yaklaşık 1000 adet granüler hücreyi innerve eder. Bu hücreler GABA salar ve granüler hücreler üzerinde inhibe edici etkiye sahiptirler. Moleküler katmanın iç üçte birlik bölümü, yalnızca polimorfik katmandan uzantılarını alır (Amaral ve ark., 2007).



Şekil 2.1. Hipokampusün katmanlı organizasyonunun şeması.

Kemirgen dentat girusu (DG). (A) Kemirgen hipokampusünün dorsal görünümü. (B) Hipokampusün katmanlı organizasyonunun şeması. Koronal düzlemde ve yatay düzlemde oklarla gösterildiği gibi iki bölüm gösterilmiştir. (C) Septal hipokampüsten

bir koronal kesit gösterilmektedir. MOL, moleküler katman; GCL, granül hücre katmanı; H, hilus. (D) Temporal hipokampüsten yatay bir kesit gösterilmektedir. (E) DG'nin laminar organizasyonu, dendritlerin yönünü ve Mossy teli olarak adlandırılan granül hücre aksonu tek bir granül hücrede gösterilmiştir. Moleküler katman, yaklaşık olarak aynı genişliğe sahip üç bölgeye ayrılmıştır: dış moleküler katman (açık kırmızı); orta moleküler katman (açık mavi); ve iç moleküler katman (açık kahverengi). Granül hücre katmanı (koyu gri), birkaç yoğun şekilde paketlenmiş granül hücre katmanına sahiptir. Granül hücre katmanının altında, hilar nöronları ve granül hücrelerin öncüllerini içeren küçük bir subgranüler bölge (açık yeşil) bulunur. Hilus, subgranüler bölgeyi ve CA3c alanıyla biten daha geniş bir alanı içerir. CA3c yakınındaki bölge bazen derin hilus (açık gri) olarak adlandırılır. (Scharfman ve Myers, 2013) (Şekil 2.1).

2.5. Granüler hücre katmanı:

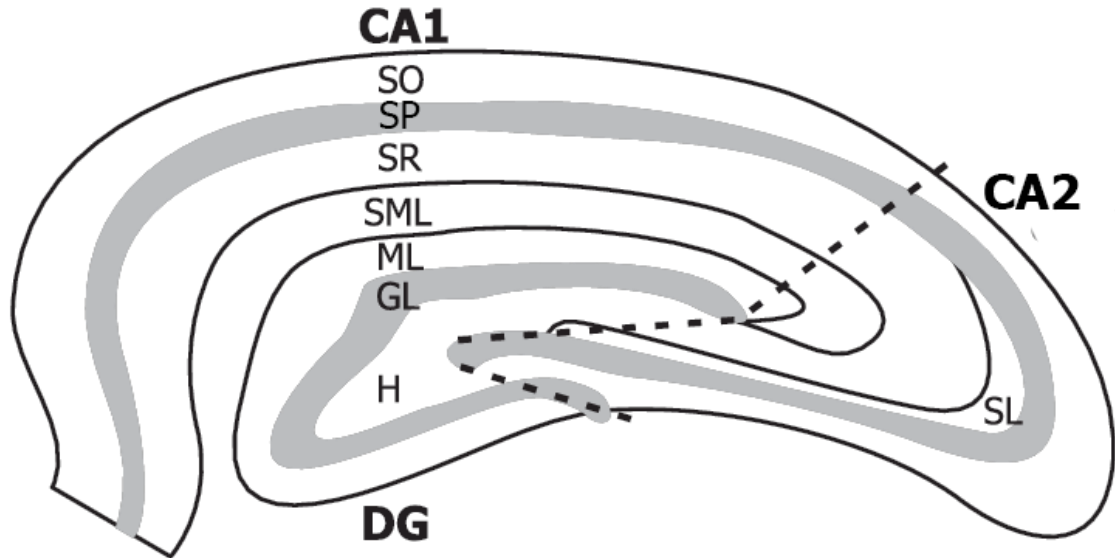
Bu katman dentat girusun ana katmanıdır ve esas olarak birbirine yakın bir şekilde paketlenmiş granüler nöronlardan oluşur. Bu nöronlar yaklaşık 10 µm genişliğinde ve 18 µm yüksekliğinde eliptik bir hücre gövdesine ve bir koni şekilli dikenli apikal dendrit ağacına sahiptir. Dendrit dalları tüm moleküler katman boyunca dağılır ve dendritik ağacın en uzak uçları hipokampal fissürde veya ventriküler yüzeyde sonlanır. Bu granüler hücrelerin aksonlarına Mossy telleri de denir (Hestings ve ark., 2001). Mossy iplikleri CA3'deki piramidal hücreler ile sinaps yaparlar. Hipokampusta dentat girus nöronlarının kaybı, uzamsal hafıza yetersizliklerine neden olur. Bu nedenle dentat granül hücrelerin uzamsal anıların ve epizodik anıların oluşumunda işlev gördüğü düşünülmektedir. Olgunlaşmamış ve olgun dentat granül hücreleri hafıza işlevinde farklı rollere sahiptir (Ribak ve Seress, 1983).

Granüler hücre katmanı ile polimorfik hücre katmanı arasındaki sınırdaki morfolojileri, aksonal uzantıları ve peptit içerikleri farklı olan birçok inter nöron bulunur. Bu inter nöronlar basket hücreleri olarak adlandırılırlar. Sıçanın dentat girusunda beş farklı tip basket hücresi bulunmuştur. Bu hücrelerin hücre gövdeleri piramidal, horizontal, mekik biçiminde veya multipolar şekilde olabilir. Dendritleri spinsizdir veya çok az sayıda spin (dikensi çıkıntı) içerir ve dentat girusun tüm katmanlarında bulunur.

Aksonları, granüler hücre katmanında ve moleküler tabakalarda geniş bir pleksus oluşturur (Ribak ve Seress, 1983).

2.6. Polimorfik katman veya hilus:

Polimorfik katman veya hilus, granül hücre katmanının içinde yer alır. Hilus önceleri başka terimlerle tanımlanmıştır: alan H5, CA3c veya polimorfik bölge gibi. Hilus, subgranüler bölgeyi ve CA3c alanıyla biten daha geniş bir alanı içerir. CA3c yakınındaki bölge bazen derin hilus olarak adlandırılır. Dentat girus hilus etrafında suprapiramidal ve infrapiramidal bölge olmak üzere iki kısma ayrılır (Schmidt ve ark., 2012). Granül hücre katmanının altında, hilar nöronları (Mossy hücreleri) ve granül hücrelerin öncüllerini içeren küçük bölge subgranüler bölge olarak adlandırılır. Hilusta en bol bulunan hücreler Mossy hücreleridir. Görünümleri yosun kaplı bir hücreye benzediği için "yosunlu (Mossy) hücreler," olarak adlandırılmıştır. Hilar Mossy hücreleri fare, kobay, gerbil, hamster ve primatlarda tanımlanmıştır (Scharfman ve Myers, 2013). Polimorfik tabakada Mossy hücrelerinin yanı sıra füziform (mekik şekilli) hücreler de vardır. Bu hücrelerin çeşitli alt tipleri vardır, ancak hepsi moleküler katmanın dış üçte ikisine uzanır ve GABA/somatostatin salarlar (Amaral ve ark., 2007).



Şekil 2.2. Sıçan hipokampus diyagramı.

Kesikli çizgi CA1'i CA2'den ayırır; SO: Stratum oriens, SP: Stratum piramidale, SR: Stratum radiatum, SML: Stratum molekulare, ML: Dentat girusun moleküler katmanı, GL: Granüler hücre katmanı, H: Dentat girus katmanı, SL: stratum lucidum (Jiang ve Swann, 1997).

Subiküler korteks, hipokampus ile entorinal korteks arasındaki geçiş alanını temsil eder. Hipokampus ve subiküler korteks arasındaki temel ayırt edici özellik, subiküler kortekste piramidal hücre katmanının hipokampusta olduğundan önemli ölçüde daha kalın olmasıdır (Kumar ve ark., 2010) (Şekil 2.2).

2.7. Hipokampusün fonksiyonu

Hipokampus tipik olarak trisinaptik devre bağlamında tanımlanır. Bu, perforant yolaktan dentat girusa, dentattan CA3'e ve CA3'den CA1 alanına bilgi aktaran bir yol olarak ifade edilir. Limbik sistemin bir parçası olan hipokampus kısa ve uzun süreli bellekte bilgilerin birleştirilmesinde ve navigasyonu mümkün kılan uzamsal bellekte önemli roller oynar (Watson ve ark., 2013).

Bildirimsel hafızada hipokampusün görevi birden fazla girdiyi birbirine bağlayarak sahneleri ve olayları meydana getiren elementlerle ilişkili depoların oluşturulmasını sağlamaktır (Cohen ve ark., 1999). Bu fonksiyon kortikal bölgeler boyunca uzun süreli hafızanın depolanmasını sağlar. Hipokampus korteks bölgeleri boyunca, medial temporal lobda bulunan yüksek derecede birbiriyle bağlantılı bir grup beyin alanları aracılığı ile iletişindedir. Dolayısıyla hipokampusün anormal aktivasyonu özellikle hipokampus ile ileri derecede bağlantı gösteren algısal kortikal alanları etkiler (Wible, 2013). Entorhinal korteks hipokampusün en büyük girdisini oluşturur ve aynı zamanda CA1'in subikulum aracılığı ile çıktısını alır (Witter ve Amaral, 1991). Entorhinal korteks hipokampüse iki yol ile girdi sağlar; birisi dentat girusa ve CA3'e uzanır, diğeri CA1 ve subikuluma uzanır. Sonrasında subikulum geri entorhinal kortekse büyük bir girdi gönderir (Wible, 2013). Entorhinal korteksin perirhinal ve parahipokampal korteksler ile kendi ana çift yönlü bağlantısı vardır. Bu nedenle hipokampus kortikal alanlar boyunca entorhinal, perirhinal ve parahipokampal korteksler aracılığıyla iletişim kurar (Lavenex ve Amaral, 2000; Lavenex ve ark., 2002; Suzuki ve ark., 1994). Hipokampüste aynı zamanda uzunlamasına sinir teli yolakları da bulundurulur (Sloviter ve Lomo, 2012). Bu oluşum

hipokampal oluşumun farklı parçaları arasındaki uyarıma izin verir. Hipokampüsün fizyolojisi kendine özgüdür ve öğrenme ile hafıza için önemli olan yüksek plastisite gösterir. Hipokampüs bazı memeli türlerinde beyindeki yeni nöron oluşturabilme yeteneğini koruyabilen birkaç bölgeden birisidir (Eriksson ve ark., 1998; Kempermann ve Gage, 2000). Hipokampüste nöroenez görülür; bu yüzden yaşam boyu değişiklikler gösterir (Epp ve ark., 2013). Hipokampüsün özellikle CA1 katmanı beyindeki en fazla N-Metil-D-aspartat (NMDA) konsantrasyonuna sahiptir (Cotman ve Monaghan, 1986). NMDA reseptörleri hafıza ve öğrenmeyi sağladığı düşünülen uzun-dönemli potansiyasyonun (LTP) temelini oluşturan glutamat reseptörüdür (Bliss, 1973).

2.8. Otofajiye genel bakış

Diğer hücre ölümüne kıyasla otofajinin en belirgin özelliği, biyomoleküller, organeller ve mikropların da dâhil olduğu hücredeki neredeyse her şeyi parçalayabilme yeteneğidir (Mizushima ve Komatsu, 2011). Otofagozomun oluşumunun düzenlenmesi ile ilgili olarak en az 30 adet Atg proteini, 3PI3K, m-TOR, AMPK (AMP-aktif protein kinaz), Beclin-1 gibi otofaji aktivasyonunda görev alan proteinler bulunmaktadır (Aparicio ve ark., 2016).

Otofaji, hücre içi materyallerin lizozom veya vakuol içinde bozunduğu tüm süreçleri içerir. En az üç ana otofaji türü vardır: makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaj (Meijer ve ark., 2004).

1- Makrootofaji; basit otofaji olarakta adlandırılan bu otofaji mekanizmasında, sitoplazmanın bir kısmını ya da bir organelin tamamının endoplazmik retikulumdan oluşan ve 2 ya da daha çok tabakalı intraselüler bir zar tarafından sarılarak otofagozomun oluşturulduğu nonspesifik bir süreçtir.

2- Mikrootofaji; normal fizyolojik koşullar altında küçük sitoplazmik çözünebilen proteinlerin membran invajinasyonu ile lizozom içine taşınarak yıkıma uğratıldığı süreçtir.

3- Şaperon aracılı otofaji; HSP 73 adı verilen 73 kDa ısı-şok şaperon proteini gibi spesifik sitosolik şaperonların yardımına ihtiyaç duyan otofajidir. Besin yokluğu, açlık durumunda aktive olur, bu süreçte hem yıkılan proteinler üzerinde hedefleme

sinyallerinin olması hem de lizozom membranının üzerinde de spesifik bir reseptörün bulunması gerekmektedir (Ross ve ark., 2014).

Otofaji, seçici ya da seçici olmayan olarak kategorize edilebilir. Seçici ve seçici olmayan otofaji uyarıcı sinyalleri, taşıdıkları madde türü, kargonun alıkonma mekanizması bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedir (Yin ve ark., 2016). Seçici olmayan otofaji, besin yoksunluğu ya da metabolik bozulmalar tarafından indüklenir. Sitoplazmanın herhangi bir kısmının bu degradasyon yolağı üzerinden geri dönüşümü sağlandığı düşünülmektedir. Seçici otofaji ise hasarlı ve/veya fazla olan yapıların hücreler için toksik olmadan önce yok edilmesini kolaylaştırır (Johansen ve Lamark, 2011). Ayrıca, seçici otofaji tipik olarak hedef üzerinde bir ligand ve seçici otofaji reseptörlerinin en az bir iskele proteini ile birlikte bulunması gibi degradasyon ipuçlarının varlığı ile karakterizedir (Kaur ve Debnath, 2015; Yin ve ark., 2016). Otofaji ile organellerin seçici olarak parçalanması, organizmalarda hücrel homeostazının sürekliliği için hayati önem taşır. Hasar gören organellerin temizlenmesini ve biyoenerji için organel bileşenlerin tekrar kullanılmasını sağlayan mitofaj, peksosfaj, lizofaj, retikuloşaj (ER-faj), nükleofaj, klorofaj mekanizmaları tanımlanmıştır. Bu organelle özgü otofaji mekanizmalarının etkinliği sonucunda mitokondri, peroksizom, lizozom, ER, kloroplast ve çekirdek ortandan kaldırılabilir. Organel temizlenmesindeki kusurlar hücrelerin sağlığına zarar vermekte dolayısıyla, kansere, nörodejenerasyona ve inflamasyona yol açabilmektedir (Anding ve Baehrecke, 2017).

Otofajinin özellikle besin yoksunluğu, radyasyon, metabolik stres, ER stresi ve kemoterapötik maddeler ile uyarıldığı vurgulanmaktadır (Yoshida, 2017). Ancak, uygun büyüme koşullarında bile bazal otofaji ile sitoplazmik içeriklerin sürekli deviri normal hücre fizyolojisi için oldukça önemlidir. Yeni çalışmalar, otofajinin hücrenin gelişimi sırasında da vazgeçilmez olduğunu göstermektedir. Örneğin, otofaji mayada spor oluşumuna katılırken, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) somatik hücrelerinde P granüllerinin oluşumu ve parçalanması için gereklidir. Ayrıca, yine *C. elegans*'da oosit döllenmesinden sonra otofajinin maternal mitokondrinin ortadan kaldırılmasında rol aldığı rapor edilmiştir (Al Rawi ve ark., 2011; Sato ve Sato, 2011). *Drosophila melanogaster*'de ise otofaji mutantları larva letalitesini ve metamorfozdaki başarısızlığı göstermektedir (Di Bartolomeo ve ark., 2010).

Memelilerde otofaji, döllenmeden sonra ubiquitin-proteazom sistemi ile birlikte sperm mitokondrisini ortadan kaldırır ve böylece heteroplazmiye katkıda bulunur (Song ve ark., 2016). İki hücreli geç evreden sonra otofaji, zigotik genom aktivasyonu için gerekli olabilecek maternal mRNA ve proteinleri hedef alarak, yüksek aktivite gösterir (Stitzel ve Seydoux, 2007). Otofaji, ayrıca pre-implantasyon embriyo gelişimi, hücre farklılaşması ve organogenez için hayati önem taşımaktadır (Di Bartolomeo ve ark., 2010). Eritropoez de otofaji için bir örnektir. Eritroblastlardan üretilen olgun eritrositlerde hücre fonksiyonu için gerekli olmayan mitokondri, ribozom ve diğer organellerin eliminasyonu otofajiyile sağlanır (Mortensen ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalar bazı tümörlerin otofajiye bağımlı olduğunu göstermiştir (Russell ve ark., 2014). Kanserin belirlenmesinden sonraki aşamalarda, otofaji süreci metabolik stres (hipoksi, kemoterapi ve radyoterapi gibi terapötik stresler) altında tümörlerin hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (Özpolat, 2015). Tümör hücreleri otofajinin geri dönüştürme özelliğini besin kaynağı olarak da kullanmaktadır (White, 2012). Otofaji yollarını hedefleyen otofajik inhibitörler kanser tedavisinde yakın geçmişte kullanılmaya başlanmıştır (Chude ve ark., 2017; Shi ve ark., 2017; White, 2012). Otofajinin farklı evrelerini inhibe eden birden fazla bileşik olmasına rağmen, klinik olarak onaylanmış tek otofaji inhibitörü bir anti-sıtma etmeni klorokin (CQ)'in türevi olan hidrosiklorokin (HCQ)'dir. HCQ, lizozomal asidifikasyonu inhibe etmesinden dolayı otofagozomların yıkımını önleyebilmekte ve böylece otofajiyi baskılayabilmektedir (Pellegrini ve ark., 2014). CQ türevlerinin ayrıca anti-kanser lizotrofik ilaçları lizozomdan serbest bırakarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Fu ve ark., 2014; Sui ve ark., 2013). Lizotrofik ilaçlar lizozomlar içerisinde kolayca tutulur, ancak CQ türevleri ile kombine edildiğinde, bu ilaçların lizozom tarafından tutulumu azalır ve böylece sitoplazmadaki ilaç konsantrasyonu artar (Chude ve ark., 2017; Fu ve ark., 2014; Sui ve ark., 2013). Nitekim, HCQ'un diğer ajanlarla birlikte kullanıldığında, anti-neoplastik etkileri arttırdığı belirtilmiştir (Donohue ve ark., 2013; Goldberg ve ark., 2012).

Otofaji Mekanizması Otofagozomlar, 1950'lerin başlarında elektron mikroskopisi ile gözlemlense de, otofajinin moleküler mekanizması son yirmi yıl içerisinde detaylı olarak incelenebilmiştir. Moleküler mekanizma ilk olarak tomurcuklanan maya, S.

cerevisiae'deki çalışmalarla tanımlanmış ve bugüne kadar 40'dan fazla otofajiye bağlı (ATG) genin bu süreçte yer aldığı ortaya konmuştur (Liu, 2017). Memeli hücreleriyle yapılan daha sonraki çalışmalar, otofajinin evrimsel olarak muhafaza edildiği fikrini destekleyen temel otofaji mekanizmasında görevli proteinlerin homologlarını ortaya çıkarmıştır (Bento ve ark., 2016). Aynı zamanda, maya homologlarından yoksun memelilerde ve *C. elegans* gibi diğer model sistemlerde tanımlanan ATG proteinlerinin sayısının artmasıyla, kompleks ökaryotlarda otofajinin daha karmaşık bir mekanizmaya ve birden fazla işleve sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, otofaji proteinlerinin çoğunluğunun kompleksler olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Bento ve ark., 2016). Aşamaları Otofaji, 1- çekirdeklenme (izolasyon membranının oluşumu), 2- uzama (izolasyon membranının uzaması), 3- olgunlaşma (otofagozomun tamamlanması ve taşınması), 4- birleşme (otofagozom ile lizozomun kaynaşması ve birleşimi) ve 5- parçalanma (kargoların otolizozom içinde yıkımı) aşamalarından oluşmaktadır (Shuheii ve ark., 2017). Memeli hücrelerinde besin yokluğu gibi bir uyarandan sonra, otofagozom yapımının başlaması, omegazom denilen yapının oluşumu ile ER zarında meydana gelir. Fagofor (izolasyon membranının) büyümesi, hücredeki neredeyse tüm hücre içi bölümlerden girişi gerektirir. Bu görüş, fagoforun birçok organel ile temas ettiğini gösteren morfolojik verilerle desteklenmektedir (Axe ve ark., 2008; Biazik ve ark., 2015). Çekirdeklenme aşamasında; otofajiyi düzenleyen ve FIP200, ATG13, ATG101 ile tetramerik bir kompleks oluşturan ULK1 kompleksi, Sınıf III-PI3K kompleks I (VPS34, VPS15, ATG14, Beclin1)'i aktive ederek vezikül çekirdeğini uyarır. Fagoforun daha sonra uzatılması ve kapanması ise iki ubikitin benzeri konjugasyon sistemi (ATG5-ATG12 ve LC3) ile gerçekleşir. Fagoforun ve otofagozomların mikroskopik olarak belirlenmesinde yaygın bir belirteç olarak kullanılan LC3 (hepsi LC3 olarak anılan LC3A/B/C, GATE-16 ve GABARAP 1/2/3) ATG8 ortoloğudur (Kabeya ve ark. 2000; Nakamura ve Yoshimori, 2017). ATG komplekslerinin PAS'da (fagofor oluşum bölgesi) toplanmasıyla, PAS ER'nin proksimal bölgesine lokalize olur ve burada omegazom adını alır. Farklı kaynakların zarları fagoforun oluşumuna katılır (Reggiori ve ark., 2017). Disk benzeri yapıda genişleyen fagoforun kendi çevresinde kapanarak otofagozom haline gelmesinde COPII kaplı veziküller rol almaktadır (Shuheii ve ark., 2017). Son çalışmalar COPII

kaplı veziküllerin otofajide anahtar role sahip olduğunu ve besin açısından zengin koşullar altında COPII veziküller ER-golgi trafiğine aracılık ettiğini göstermiştir. Besin yoksunluğunda ise bu veziküller otofagozom oluşumuna katkıda bulunur. COPII kaplı Sec24'ün (vezikül içinde oluşmaya başlayan 3 kargo adaptöründen biridir) fosforilasyonu, otofagozomların miktarını düzenlemek için Sec24- mATG9 etkileşimini kolaylaştırır (Wang ve ark., 2017).

Fagoforun kapanmasından sonra, ATG proteinlerinin uzaklaştırılması ile otofagozomlar olgunlaşır (Reggiori ve ark., 2017). Otofagozomlar daha sonra geç endozomlarla birleşerek amfizomu veya doğrudan lizozomlarla kaynaşarak otolizozomları oluştururlar (Shuhei ve ark., 2017). Lizozomlar ve otofagozomlar arasında etkili bir birleşmenin olabilmesi için bu iki organelin perinükleer bölgeye eş zamanlı olarak taşınması gerekir. Açlık durumu hücre içi pH'taki değişiklikler ile lizozomların perinükleer kümelenmesine neden olurken, otofagozomlar da mikrotübüler etkileşim yoluyla hücrenin periferik bölgesine taşınır (Reggiori ve Ungermann, 2017). Otofagozomlar lizozom ile kaynaştıktan sonra, otolizozomlarda içerikler sindirilir (Shuhei ve ark., 2017).

Birleşme sonrasında, iç vezikülün parçalanması, memeli hücrelerinde proteinaz A ve B (sırasıyla PEP4 ve PRB1 tarafından kodlanan) ve L'yi içeren bir dizi lizozomal asit hidrolaza bağlıdır (Tanida ve ark., 2005). Parçalanma sonucu elde edilen özellikle aminoasit gibi küçük moleküller, protein sentezi ve açlık koşullarında hücrel fonksiyonları korumak için sitozole geri taşınır (Yang ve ark. 2006). Otolizozomlar kalıcı yapılar değildir ve otofaji sona erdikten sonra parçalanırlar. Otofajinin sonlandırma aşaması, otofajik lizozom değişikliği (ALR) olarak adlandırılan bir işlemdir (Yu ve ark., 2010).

2.9. Glukoz eksikliği çeşitli doku ve organlarda otofajiyi AMPK sinyal yolağı aracılığıyla indükler:

Memelilerde glükoz eksikliğinin çeşitli doku ve organlarda otofajiyi indüklediği (Kobayashi ve ark., 2012; Maruyama ve ark., 2008; Singh ve ark., 2011; Williams ve ark., 2009), otofaji ile karbonhidrat metabolizması arasında bir etkileşimin olduğu ve otofaji ile hücrel enerji dengesi arasında dinamik bir geri bildirimin bulunduğu

son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Singh ve ark., 2011). Sinir sistemi dışındaki dokularda glukoz eksikliği hücrede ATP konsantrasyonunun azalmasına ve AMP düzeyinin artmasına yani AMP/ATP oranında bir artışa neden olur. AMP düzeyindeki artış bir hücresel enerji sensörü olan adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK)'ın upstream kinazlar tarafından fosforile olarak aktifleşmesini sağlar (Hardie ve Hawley, 2001; Hardie, 2011; Stein ve ark., 2000). Aktifleşen AMPK, mTOR bağımlı protein translasyonu gibi enerji yoğun süreçleri kapatarak hücresel ATP üretimini arttırarak ve ATP tüketimini azaltarak enerji tasarrufu sağlayan bir program koordine eder (Towler ve Hardie, 2007) ve otofajiyi indükler (Gwinn ve ark., 2008).

Tüm ökaryotlarda bulunan AMPK bir katalitik (α) alt birim ve iki düzenleyici (β ve γ) alt birimden oluşan heterotrimerik bir serin/treonin protein kinaz kompleksidir (Kahn ve ark., 2005) ve besin maddeleri ile hücre içi enerji düzeylerindeki değişimlere tepki olarak glukoz ve lipid metabolizmasını yöneten merkezi bir metabolik anahtar olup hücre büyümesi ve otofajiyi kontrol eder (Mihalova ve Shaw, 2012). AMPK alt birim izoformları periferik dokularda yaygın şekilde ifade edilirken, beyin ağırlıklı olarak $\alpha 2$, $\beta 1$ ve $\gamma 1$ ve daha düşük oranda $\alpha 1$ ve $\beta 2$ içeren daha sınırlı bir model gösterir (Turnley ve ark., 1999). AMPK'nın aktifleşmesi için katalitik α -altbiriminin aktivasyon halkasında korunmuş bir treonin kalıntısının (T172) upstream kinazlar tarafından fosforilasyonu ilk koşuldur. Hücresel enerji seviyeleri tükendiğinde ve AMP/ATP oranı yükseldiğinde, AMPK, AMP'nin AMPK γ alt-ünitesine allosterik olarak bağlanmasıyla aktive edilir ve bu kompleksde bir konformasyonel değişiklik oluşturarak AMPK α -altbiriminin upstream kinazlar için bir substrat olma yeteneğini artırır. Şimdiye kadar birçok AMPK fosforile edici kinaz tanımlanmıştır. Her yerde eksprese edilmiş ve yapısal olarak aktif kinaz liver kinaz B1(LKB1)'e ek olarak, Ca^{2+} ile aktive Ca^{2+} /kalmodulin-bağımlı kinaz kinaz β (CaMKK β) ve transforme edici büyüme faktörü β -aktive kinaz-1 (TAK1) AMPK'nın aktivatörleri olarak bilinirler (Momcilovic ve ark., 2006).

Son yıllardaki araştırmalar, AMPK'nin ATF1'in bir memeli homologu olan ULK1'i doğrudan ve dolaylı olarak aktive ederek otofajiyi aktive ettiğini göstermiştir (Kim ve ark., 2011). İlk olarak AMPK, otofajiyi indüklemek için doğrudan ULK1'i fosforile ve aktive eder. İkincisi, AMPK ULK1'i fosforilleyerek ve ULK1-AMPK

etkileşimini bozan mTORC1'i inhibe ederek ULK1'i dolaylı bir şekilde aktive eder. ULK1 ve mTORC1'in bu koordineli düzenlemesi, zarar görmüş mitokondriayı ortadan kaldırır ve besin açlığı sırasında mitokondriyal bütünlüğü korur (Kim ve ark., 2011). Aktifleşen AMPK; ULK1 ve TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2 veya tuberin)'yi direkt olarak fosforile eder (Kim ve ark., 2011; Moruno ve ark., 2012). Fosforile olan ULK1; Atg13 ve FIP200 ile otofajinin indüksiyonuna neden olan bir kompleks oluşturur. Fosforile ve aktive olan TSC2 ise mTORC1'i inhibe eder (Inoki ve ark., 2003) AMPK, ayrıca mTORC1'in RAPTOR alt birimini doğrudan fosforile ederek mTORC1 aktivasyonunu inhibe eder ve otofajiyi indükler (Gwinn ve ark., 2008). Glikoz eksikliği sırasında AMPK ayrıca p53 ve p27'yi fosforile ederek de otofajiyi regüle eder. Normal koşullar altında sitosolik p53 otofajiyi inhibe eder. Ancak glikoz eksikliği sırasında AMPK tarafından fosforile edilir edilmez çekirdeğe taşınır ve SESTRIN2, DAPK1 ve AMPK genlerinin ekspresyonlarını indükler. SESTRIN2; AMPK ve TSC2'yi aktive ederken, DAPK1 Beclin 1'i fosforile ederek otofajinin indüksiyonuna neden olur. Son olarak p27 RHOA'yı inhibe ederek otofajiyi indükler. RHOA, Beclin1'i parçalamakla görevli olan calpainleri aktive eder. Böylece RHOA'nın inhibisyonu sonucu calpainler aktive olmadığından ve Beclin 1 parçalanmadığından otofaji şekillenir (Moruno ve ark., 2012).

Otofaji indüklenir indüklenmez endoplazmik retikulum (ER), golgi kompleksi, mitokondri veya plazma membranından kaynaklanan fagofor oluşmaya başlar (Hailey ve ark., 2010; Ravikumar ve ark., 2010). Bu süreci düzenleyen başlıca iki unsur var. Bunlardan birincisi, fagofor oluşumu bölgesinde Atg17 ve Atg13'ün alınması için gerekli olan fosfatidilinositol-3-fosfat üretebilen Vps34'tür (Blommaert ve ark., 1997). Bir sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz olan Vps34, aynı zamanda, otofagozom oluşumunda yer alan diğer bileşikler olan Beclin 1, P150, UV radyasyon direnci, ATG14 veya otofaji / Beclin-1 düzenleyici 1 ile ilişkilidir (Kihara ve ark., 2001). İkinci bileşen ise ise ofagozomların biyogenezinde yer alan ULK1 olup, FIP200 ve ATG13 ile ilişkilidir. Bunların oluşturduğu kompleksin ULK1'in düzgün lokalizasyonuna yol açtığı ve kinaz aktivitesini uyardığı bilinmektedir (Ganley ve ark., 2009). Şekillenen fagor uzamaya başlar. Fagoforların uzaması iki ubiquitin benzeri konjugasyon sistemine bağlıdır:

1. ATG12-ATG5-ATG16L sistemi: ATG12, ATG7 (E1 benzeri enzim) ve ATG10

(E2 benzeri enzim) yoluyla ATG5'e konjuge edilir ve daha sonra konjuge ATG12-ATG5 kompleksi ATG16L ile ilişkilendirilir. ATG12-ATG5-ATG16L kompleksi, uzayan otofagozomların dış zarına lokalize olur, ancak otofagozom oluşumu tamamlanmadan önce membrandan ayrılır. Yeni bir çalışma, belirli stres koşullarında makrotofaginin ATG5 / ATG7'den bağımsız olarak ortaya çıkabileceğini ve bunun da otofagosom oluşturmak için alternatif bir yol olduğunu öne sürmektedir.

2. Fosfatidiletanolamin (PE)-hafif zincir 3 (LC3) sistemi: Mikrotübüle bağlı protein 1 LC3 (veya sadece LC3) PE'ye konjuge edilir. LC3'ün membrana bağlanmayı geliştirdiği bilinmektedir (Nakatogawa ve ark., 2007). LC3'ün sitosolik formu olan LC3-I, pro-LC'nin ATG4B tarafından bölünmesiyle üretilir ve takiben ATG7 ve ATG3 ile işlenerek PE'ye konjuge edilir (LC3-II). LC3-II özellikle otofagozom zarlarıyla ilişkilidir ve bu nedenle düzeyi otofagozomların sayısı ile koreledir (Tanida ve ark., 2002).

Glukoz ve enerji metabolizmasının homeostazı için gerekli olan bir diğer yolak LKB1-AMPK yolağıdır. LKB1, AMPKα'nın Thr-172'sini fosforile eden ve böylece kinaz etkinliğini aktive eden primer kinaz olup tüm fetal ve erişkin dokularda eksprese edilir. En yüksek ekspresyonu karaciğer, pankreas ve kas dokusudur. LKB1-AMPK yolu, apoptoz ve otofaji de dahil olmak üzere yaşam ve ölüm süreçlerinin düzenlenmesinde doku spesifik kritik bir rol oynar (Just ve ark., 2011). LKB1'in, hücre içi AMP'nin yükselmesine yanıt olarak hücreleri apoptozdan korumak için gerekli olduğu gösterilmiştir (Shaw ve ark., 2004).

2.10. AMPK aktivitesindeki değişiklikler nörolojik hastalıkların bir yansıması olabilir:

AMPK, tüm organizmanın metabolik düzenleyicisi olarak düşünülür ve obezite, şeker hastalığı (diyabet), kaşeksi ile diğer metabolik bozuklukların araştırılmasında değerlendirilen önemli faktörlerden biridir. Son on yılda elde edilen veriler AMPK'nın merkezi sinir sistemi fizyopatolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir. AMPK, nöronal çoğalma ve farklılaşma, sinaptik bağlantı ve nöroproteksiyon gibi çeşitli nöronal özelliklerle ilişkilendirilir. Böylece, AMPK'daki değişiklikler farklı nörolojik ve nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Son birkaç yılda, birkaç araştırma grubu, nöronlarda enerji üretimi ve

tüketiminin düzenlenmesinde AMPK'nın hayati bir rolü olduğunu vurgulamaktadır. Sinaptik aktivasyonu sodyum pompasının aktivitesi, nörotransmitter reseptör translokasyonu/geri dönüşümü, sinaptik taşıma, hücre iskeleti yenilenmesi ve metabolik süreçler gibi yüksek enerji tüketimi ile karakterize birkaç moleküler ve hücreyel olay takip eder (Rosso ve ark., 2017). Glukoz metabolizmasına ek olarak, bazı çalışmalar AMPK'nın nöronlarda mitokondriyal fonksiyonun ve biyogenez ile mitokondriyal metabolizmanın anahtar düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (Dasgupta ve Milbrandt, 2007; Onyango ve ark., 2009). Nöronlardaki metabolizmanın doğrudan düzenlenmesinin yanı sıra, AMPK'nın nörogelişimsel süreçlerde yer aldığı, AMPK işlevselliğindeki kusurlar anormal çoğalmayı ve nöronal kök hücresi öncüllerinin (NPC'ler) artmış apoptozisine neden olduğu belirtilmektedir (Dasgupta ve Milbrandt, 2009). Artan kanıtlar ayrıca, AMPK'nın enerji eksikliği koşulları altında hücre polarizasyonunun kontrolünde önemli bir rol oynadığını, örneğin, AMPK'nın hem aksogenezisi etkileyerek nöronal polaritenin oluşumunu modüle ettiğini (Amato ve ark., 2011) hem de nöronal gelişim sırasında dendrit büyümesi ve dallanmasını düzenlediğini (Ramamurthy ve ark., 2014) ve ayrıca moleküler düzeyde, nöronal mimari üzerindeki etkilerin hem mTOR hem de Akt sinyal yollarının AMPK'ya bağlı baskılanması ile indüklendiği ortaya koymaktadır. Tüm bunların yanı sıra yetişkin beyinde, AMPK'nın yaşlanma sürecinde yer alan hücreyel olayları yönettiği, Alzheimer hastalığı (AD), Huntington hastalığı (HD) ve Parkinson hastalığı (PD) gibi çeşitli beyin hastalıklarının AMPK sinyalizasyonunun işlev bozukluğuyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ma ve ark., 2014; Won ve ark., 2010). Tüm bu veriler AMPK aktivitesindeki değişiklikler ile felç, AD, HD, PD ve beyin tümörleri gibi nörolojik hastalıklar arasındaki ilişkiyi vurgularken, diğer taraftan beyindeki AMPK'nın patolojik rolü hakkında büyük bir bilgiye ulaşılmış olsa da, literatür verileri yeterli değildir. Nitekim AMPK, nörodejeneratif hastalıklarda tek bir davranış göstermez; hem zararlı hem de koruyucu roller üstlenebilir. AMPK aktivasyonu, HD'lı striatal nöronlarda mutant Huntingtin geni (mHtt)'nin neden olduğu toksisiteye aracılık ederken, PD'de nöronal hücre ölümünü önler ve bir hayatta kalma faktörü gibi davranır. Bazı raporlar, AMPK aktivasyonunun amiloidogenezideki bir azalma ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğuna işaret etmesine karşın, AMPK'nın rolü, AD patogenezinde belirsizdir; diğer

çalışmalar, AMPK inhibisyonunun, ATP'nin neden olduğu LTP'deki bozulmaları düzelttiğini göstermektedir. Bu çelişik sonuçların varlığı, AMPK aktivitesini ve MSS hastalıklarının gelişimini birbirine bağlayan moleküler mekanizmaları daha iyi incelemek için ileri araştırmaların gerekli olduğuna işaret etmektedir. Hipotiroidizmde hipokampal AMPK aktivitesinin değişip değişmediği ve tiroid hormon yetersizliği ile AMPK aktivitesi arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığı bilinmemektedir (Ma ve ark., 2014; Won ve ark., 2010).

2.11. Nöronlarda otofajik yolağın herhangi bir basamağında bozulma anormal nöronal homeostaz ile sonuçlanır:

Otofajinin nöronları da beslenme açlığından koruduğu dolayısıyla nöroprotektif bir rol oynadığı bilinmektedir (Kaushik ve ark., 2011). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar, i) otofajinin nöronlarda da normal koşullar altında yapısal olarak meydana geldiğini, ii) yapısal otofajinin nöronal sağkalımdan sorumlu olduğunu (Poels ve ark., 2012), iii) yapısal otofajinin bozulmasının nörodejenerasyona yol açtığını ve iv) ayrıca bozulmuş otofajinin birçok nörogelişimsel ve nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde rol oynadığını göstermiştir (Hara ve ark., 2006; Komatsu ve ark., 2006; Vijayan ve Verstreken, 2017). Nöronlarda otofajik yolağın herhangi bir adımında bozulma genellikle, aksonal bozukluklarla kendini gösteren ve nöronal dejenerasyonda doruğa çıkan anormal nöronal homeostaz ile sonuçlanır (Nixon ve Yang, 2012). Bununla birlikte, beyindeki farklı nöron tiplerinin otofajik yolağına bağımlılık dereceleri farklıdır ve otofajik sürecin bozulmalarına farklı şekilde savunmasızdırlar (Nikolopoulou ve ark., 2015). Buna ek olarak, birkaç raporda, otofajinin presinaptik ve postsinaptik terminallerde sinaptik fonksiyonu düzenleyebildiği, anormal otofajik vezikül şekillenmesinin, presinaptik terminalleri bozduğu ve aksonal distrofiye neden olduğu bildirilmektedir (Sanchez-Varo ve ark., 2012; Shen ve ark., 2015). Otofajinin ayrıca sinaptik plastisitede yer aldığı rapor edilmiştir (Shehata ve ark., 2012). Otofajinin normal beyin fizyolojisi bağlamındaki bir diğer ilginç rolü gıda alımı ve enerji dengesinin düzenlenmesidir (Kaushik ve ark., 2011). Son çalışmalar, memeli beyinlerinde enerji metabolizmasının nöronal plastisite ile direkt olarak ilişkili olduğunu ve AMPK'nın uzun dönemli güçlenme (long term potentiation, UDG)'nin düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (Potter ve ark., 2010). Ayrıca Alzheimer hastalığı gibi nöronal enerji metabolizması ile ilişkili

hastalıklarda AMPK'nın inhibisyonunun UDG'deki bozulmaları düzeltiğine ilişkin bilgiler de mevcuttur (Ma ve ark., 2014). Bunların yanısıra beyinde otofajinin aşırı aktivasyonunun nöronal ölüme sıradışı bir ölüm yolu olduğu, ancak otofajinin yetersizliğinin, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda nöronların kaybına neden olan lizozoma bağlı hücre ölümü formuyla bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Nixon ve Yang, 2012).

2.12. ATG8/ LC3

Besin yoksunluğu veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi gibi çeşitli hücresel stresler tarafından otofaji indüksiyonu üzerine, çoklu otofaji ile ilgili (Atg) proteinleri membran oluşumuna kullanan hücre içi membran kaynaklarından izolasyon membranı olarak adlandırılan bir fincan şeklindeki çift membran yapısı oluşturulur. Otofagozomun uzaması ve mühürlenmesinden sonra, sırasıyla endozom veya lizozom ile füzyon yoluyla bir amfizom veya bir otolizozom halinde olgunlaşır. Otolizozomda, sitozolik kargo nihayet birkaç lizozomal hidrolaz tarafından parçalanır. Otofajik süreç sırasında, otofagozom oluşumu ve olgunlaşması, birkaç Atg çekirdek proteini tarafından oldukça kontrollü bir şekilde düzenlenir (Xie ve ark., 2007). Otofaji ile ilişkili 8 protein (Atg8'ler), yüksek düzeyde korunmuş ökaryota özgü 62 protein ailesinden biridir. (Wood ve ark., 2002). Maya ve diğer mantar türleri tek bir Atg8 genine sahipken, çok hücreli hayvanlar, yeşil bitkiler ve bazı protistler birkaç taneye sahiptir. İnsanlarda tek bir GATE-16 geni, iki GABARAP geni ve dört LC3 geni bulunur. Ayrıca, LC3A alternatif eklemeyen kaynaklanan iki izoformu kodlar. Atg8/LC3'ün otofagozomdaki hücresel lokalizasyonu, olgunlaşması sırasında otofagozomun kapanması, hemi-füzyonu veya taşınması ile ilişkilendirilmiştir. LC3'ün kendisi, otofajik bir substrat olduğunu gösteren otofaji ile bozulabilir. Bundan böyle, LC3, otofagozomlara ek olarak otofajik aktivitenin sayısını izlemek için yaygın olarak kullanılmıştır (Rogov ve ark., 2014). Ayrıca ortaya çıkan kanıtlar, seçici otofaji sırasında, LC3'ün, kargo reseptörleri ile etkileşim yoluyla otofagozoma seçici kargoyu almak için bir adaptör proteini olarak işlev gördüğünü göstermiştir (Weidberg ve ark., 2011). Kanonik seçici otofaji modelinde, kargoda yerleşik olan veya ubikuitin zincirleri yoluyla bağlanan otofaji reseptörleri, LC3/GABARAP'a bağlanan bir LC3-etkileşim bölgesi (LIR) motifi aracılığıyla izolasyon zarlarını alabilir. Otofaji reseptörü ve

LC3/GABARAP etkileşimleri, otofaji mekanizmasını kargo ile köprüler, böylece otofagozom tarafından seçici yutulmayı teşvik eder ayrıca, klasik çift zarlı otofagozoma sahip olmayan LAP (LC3 ile ilişkili fagositoz) olarak adlandırılan bir süreci de düzenler (Birgisdottir ark., 2013). Bunun yerine, ölü hücrelerin etkili bir şekilde temizlenmesinde yer alan tek zarlı bir yapı oluşturulur (Martinez ve ark., 2011).

Atg8/LC3 ailesi üyeleri her yerde ifade edilse de, ifadelerinde bir miktar doku özgüllüğü vardır. GABARAPL1 veya GABARAPL2 için mRNA'lar ağırlıklı olarak merkezi sinir sisteminde, özellikle beyinde eksprese edilir. İlginç bir şekilde GABARAPL1, pons veya diensefalon gibi somatomotor veya endokrin fonksiyonu düzenlemek için önemli olan bölgelerde spesifik olarak eksprese edilir (Tolle ve ark., 2008) Buna karşılık, GABARAP'ın ifadesinin endokrin bezlerde çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. İlginç bir şekilde, ATG8/LC3 ailesi üyeleri arasında, LC3C ekspresyonunun, yüksek oranda eksprese edildiği akciğer dışında, incelenen hemen hemen tüm dokularda nispeten düşük olduğu bulunmuştur (Sagiv ve ark., 2000).son olarak kanser hastalıklarının yanında nörodejeneratif hastalıklarda da LC3 ve GABARAP'ın seviye veya dağılımının değiştiğini göstermektedir (Tanji ve ark., 2013).

2.13. Beclin-1

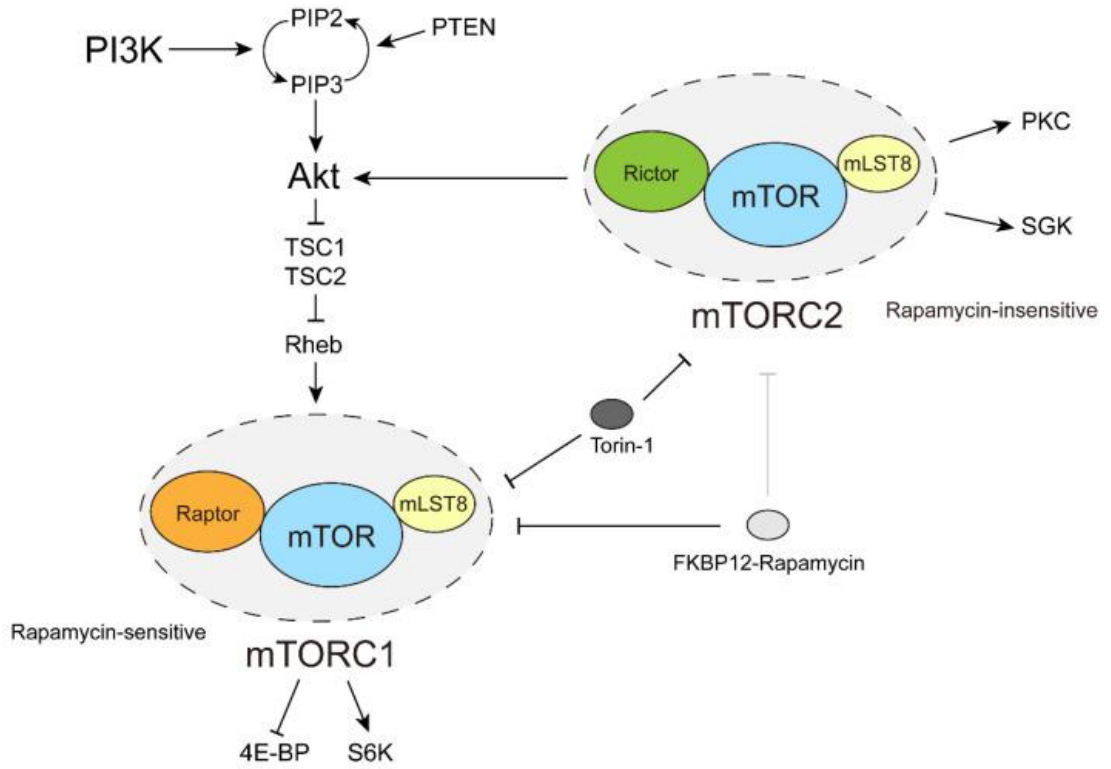
Keşfedilen ilk Beclin-1 ortolojisi, otofajiyi ve maya vakuolar protein sıralama yolunu düzenleyebilen gen ürünleri için iki ayrı taramada tanımlanan ATG6/VPS30 mayasıdır (Robinson ve ark., 1988). Otofajik başlatma sürecinde çok önemli bir rolü vardır (Hamacher-Brady, 2012). Beclin 1, PI3KC3-C1'e bağlı fosfatidilinositol 3-fosfat (PtdIns(3)P) oluşumunu ve ardından otofagozom oluşumunu yöneten ek Atg proteinlerinin alımını düzenleyerek otofajik süreci yönetir (Wirawan ve ark., 2012). Nörodejeneratif bozukluklarla ilgili çalışmalar, BECN1 ile mitokondriyal membran proteinleri PTEN kaynaklı kinaz 1 (PINK1) ve E3-ubikuitin ligazları Parkin (PRKN) arasında, risk altındaki mitokondri veya mitofajinin seçici sekestrasyonunu teşvik eden bir etkileşimi de ortaya çıkarmıştır (Choubey ve ark., 2014). Ayrıca, Beclin1, farklı Beclin1 ile etkileşime giren proteinlere bağlanarak farklı aşamalarda otofajiyi düzenler. Beclin1 ve ilişkili proteinleri ayrıca potansiyel olarak otofajik hücre

ölümünü modüle ederek anti-tümör aktiviteye sahip olabilir (Biochem, 2003). Genetik analiz, BECLIN1'in, sporadik yumurtalık ve meme kanserlerinin %40-75'inde monoalelik olarak silinmiş aday bir tümör baskılayıcı olduğunu ortaya koydu (Aita ve ark., 1999). Ek olarak klinik veriler, düşük BECN1 protein seviyelerinin meme kanserinin kötü prognozu ve hızlı ilerlemesi ile ilişkili olduğunu doğrulamaktadır (Tang ve ark., 2015).

2.14. mTOR

Rapamisin (TOR) hedefi ilk olarak 1991 yılında, rapamisine dirençli maya mutantlarının, immünosupresan ve antikanser ilaç rapamisinin hedefi olarak taranması sırasında keşfedildi. Kısa bir süre sonra, 1994'te memeli homolog mTOR'u birkaç bağımsız çalışmayla keşfedildi (Burman, 1978; Heitman ve ark., 1991). Memeli rapamisin hedefi (mTOR), hücre metabolizması, çoğalması, büyümesi ve hayatta kalması için ana düzenleyici olan yüksek oranda korunmuş bir serin-treonin kinazdır (Saxton ve ark., 2017). Merkezi sinir sisteminde, mTOR sinyal yolu, sinaptik plastisite, hafıza depolama ve biliş dahil olmak üzere fizyolojik fonksiyonları modüle etmede önemli bir rol oynar (Bockaert ve ark., 2015). mTOR, hormonlar (insülin), büyüme faktörleri (insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi), besinler (amino asitler), enerji seviyeleri ve oksijen içeriği dahil olmak üzere çeşitli uyarılara cevap vererek hücre çoğalmasını ve büyüme hızını düzenler (Laplanche, 2012). mTOR ayrıca otofajinin baskılanmasında rol oynar. Otofaji sırasında, gerekli olmayan veya işlevsiz bileşenler, lizozoma bağlı bir mekanizma aracılığıyla uzaklaştırılır ve geri dönüştürülür. Otofaji, mTOR tarafından iki yaklaşımla inhibe edilir. İlki, mTOR'un, otofaji indüksiyonunda anahtar faktör olan unc-51 benzeri kinaz 1'i (ULK1) doğrudan inhibe etmesidir (Kim ve ark., 2011).

İkincisi, mTOR, transkripsiyon faktörü EB'nin (TFEB) nükleer translokasyonunun inhibisyonu yoluyla lizozom biyogenezini bloke eder ve böylece dolaylı olarak otofajiyi inhibe eder (Settembre ve ark., 2012) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. mTOR sinyal yolağı. mTOR yolu. mTORC1 ve mTORC2'nin ana sinyal yolları. Oklar, kolaylaştırmayı ve aktivasyonu, bloklar ise engellemeyi gösterir.

2.15. Diyabet

Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre 2007 itibari ile dünyada 220 milyon diyabetli bireyin yaşadığı ve önlem alınmazsa 2030 yılına gelindiğinde bu sayının 2 katına çıkacağı bildirilmiştir. International Diabetes Federation: IDF DiabetesAtlas, 4th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation 2009). Ancak şu anki veriler gelinen durumun öngörülerin çok ötesinde olduğunu ve şimdiden 2030 yılı için belirlenen rakamlara ulaşıldığını göstermektedir (Guariguata, 2014).

Diyabet, insülin salgılanması, dokunun insüline cevap verebilirliği ya da her ikisinde meydana gelen bozukluklar sonucunda oluşan kronik kan glukoz yüksekliğiyle karakterize metabolik bir hastalıktır. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki düzensizliklerle birlikte seyreden diyabetin etiyolojisi değişiklikler göstermektedir. Çok sık idrara çıkma, su içme, görme bulanıklığı gibi karakteristik semptomlar göstermektedir. Belirtiler erken dönemde hafif olmakla

beraber hiç belirti göstermeyebilir. Bu nedenle diyabet tanısı verilmeden önce hiperglisemi nedeniyle patolojik ve fonksiyonel farklılıklar görülebilir. Hastalığın uzun dönemdeki komplikasyonları arasında; böbrek yetmezliğine kadar varabilen nefropati, ayak ülserasyonları, periferik nöropati, retinopati, seksüel disfonksiyona neden olabilen otonomik nöropati sayılabilir. Diyabetli hastalarda kardiyovasküler, periferik vasküler ve serebrovasküler hastalık riski artmaktadır. Diyabetin Tarihçesi Diyabet hastalığının ismi, hastalığın klinik tablosunu tam anlamıyla çizen Aretaeus (M.S. 135) tarafından konulmuştur. Deneysel diyabet yönünden ilk önemli başarı ise von Mering ve Minkowski'ye (1858) aittir. Bu araştırmacılar köpeklerde pankreatektomi yapılmasının hızlı, şiddetli ve ölümlü sonuçlanan diyabet oluşturduğunu göstermişlerdir. Bu pankreas ve diyabet arasındaki ilk ilişkilendirme olmuştur. Paul Langerhans ise 1869 yılında kendi adını verdiği Langerhans adacıklarını tanımlamıştır. 1916 yılında Sir Edward Sharpey-Schafer bu adacıkların karbonhidrat metabolizmasını kontrol eden maddeler ürettiğini öne sürmüştü ve bu 4 varsayımsal madde için 'insülin' adını önermiştir.

2.15.1. Diyabet tipleri

Tip I diyabet

Pankreastaki beta adacıklarının hasar görmesiyle insülin üretme kabiliyetlerini kaybetmeleri sonucu dışarıdan insülin tedavisi gerektiren ve insüline bağımlı diyabet olarak isimlendirilen Tip I diyabettir. Tip I diyabet genellikle erken dönem küçük yaşlarda görülmektedir.

Tip II diyabet

Yetişkin diyabeti olarak isimlendirilir. En sık görülen diyabet tipi olup tüm diyabetlileri %90-95'ini oluşturmaktadır. İnsülin rezistansı ile karakterizedir. Tip II diyabette insülin eksikliği yoktur. Diyabet tiplerinin başlangıç sebepleri farklı olabilmekle birlikte hastalığın seyrinde tüm tiplerde insülin salgılanmasında ya da insülin hormonu hassasiyetinde ya da her ikisinde birden sorun olması olasıdır (American Diabetes Association, 2015).

2.15.2. Diyabetik nöropati

Nöropati sinirlerin bozulması, hastalanması anlamına gelir. Birçok hastalık sinirlerde bozulmalara yol açabilir. Ancak bunların en sık rastlanımı diyabettir. Diyabette yüksek kan şekeri birçok organda olduğu gibi sinirler üzerine de zararlı etkiler gösterir. Böylece diyabet sinirleri hastalandırır, bozar ve doğru çalışmalarını engeller. Yüksek kan şekerinin sinirleri bozması hem birbirinden farklı hem de birbiri ile bağlantılı birçok farklı yolla olur. Sinir hücrelerinin metabolizması, hücreler içinde önemli işlevleri olan proteinler bozulur. Bir yandan da sinirleri besleyen damarlar hasar görür. Sinirlerin hastalanması basit, tek bir yolla olmadığı için de tedavisinde kullanılan ilaçlar da kesin bir çözüm sağlamaz. Diyabetik nöropati sıklığı oldukça karışık bir konudur. Her şeyden önce tüm dünyada diyabetlilerin neredeyse yarısı tanı konulmamış diyabetlidir. Yani bunlar diyabetli olduklarını bilmemektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun 2017 yılı raporlarına göre ülkemiz Avrupa'da en yüksek diyabet oranına sahip ülkedir. 2017 yılı itibariyle 6,5 milyondan fazla diyabetli hastamızın 2,5 milyonu diyabetli olduğunu bilmemektedir. Ülkemiz nüfusu giderek yaşlanmakta bu durum da diyabet sıklığını ve diyabetik hasta sayısını hızla arttırmaktadır. 12 yıl ara ile yapılan TURDEP isimli tarama çalışmasına göre yetişkin nüfusta diyabet sıklığı neredeyse iki kat, %90 civarında artmıştır. Diyabet hastalığı tanısı alanlarda yapılan çalışmalarda diyabetik nöropati sıklığı da %10-90 gibi çok büyük değişkenlikler göstermektedir. Sıklık, değerlendirmeye alınan hastaların ne kadar süredir diyabetli olduğuna ve ayrıca nöropatiyi değerlendirme usulüne göre değişmektedir. Yalnızca hastalar üzerinde yapılan anket ve muayeneye dayanan çalışmalarda nöropati sıklığı düşük çıkmakta, eğer değerlendirme yöntemlerine sinir ileti hızını ölçen, titreşim algılamayı ölçen, EMG vs gibi cihazlar dahil edilirse daha yüksek çıkmaktadır. Yine ülkemizde diyabetli hastalarda nöropati sıklığını araştıran bir çalışmada nöropati sıklığı yalnızca klinik muayene ile %40,6, eğer değerlendirmeye sinir ileti çalışmaları da eklenirse %62,2 oranında saptanmıştır. Sinirler görevlerine göre üç değişik grupta sınıflandırılabilirler. Kasları istemli olarak çalıştıran sinirlere “**motor**” sinirler, dış dünyadan gelen algıları, uyarıları beynimize taşıyan sinirlere “**duyu**” sinirleri, vücutta istemsiz olarak işleyen çeşitli fonksiyonlara ait sinirlere ise “**otonom**” sinirler adı verilir. Diyabet bu sinirlerin hepsini bozar ve

bozduğu sinirin özelliğine göre de çeşitli bozukluklar, aksaklıklar ortaya çıkar (IDF Diabetes Atlas 8th ed. <http://www.diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>).

2.16. Demans

Latince “mens” kelimesinden türemiş olan ve zihin anlamına gelen demans zihnin yitirilmesi anlamına gelmektedir. Demans, kronik ve genellikle ilerleyici bir hastalık olarak, bellek ve entellektüel kapasitenin azalması ile bellek, konuşma, algılama, yargılama, hesaplama, soyut düşünme ve problem çözme gibi bilişsel işlevlerden en az ikisinde bozukluk olması ile karakterize bir tablodur. Bilişsel işlevlerde bozukluğa bağlı olarak hastanın günlük yaşam aktivitelerinde kısıtlama, sosyal ve mesleki yaşantısında bozukluk oluşmaktadır (Şahin ve ark., 2005; Wimo ve ark., 2003). Demans hastalığı dejeneratif, travmatik, demiyelinizan, vasküler, neoplastik, inflamatuvar, infeksiyöz, sistemik ve toksik sebepler başta olmak üzere çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Koçer, 1999). Diyabetin hafif ve orta derecede bilişsel işlev bozukluğu ile ilişkili olduğu bunama ve Alzheimer hastalığı için önemli bir risk faktörü olduğu bildirildi (Kopf ve ark., 2009).

2.17. Alzheimer

Alzheimer patolojisinin başlıca özellikleri amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklardır. Yaygın nöronal ve sinaptik disfonksiyonla birlikte nöron kaybı gelişir. Beyinde medial temporal lob (hipokampus) tutulumu ile bellek kaybı biçiminde başlayan hastalığa neokortikal tutulum sonrası diğer bilişsel kayıplar eşlik etmektedir (Çınar, 2012). Hastalık, özellikle kişinin epizodik belleğini etkileyen, yani anılarını ve aynı zamanda kişisel deneyimlerini hedef alan, kronik ve ilerleyici bir süreçtir. Çoklu görevleri yerine getirememe, depresif belirtiler ve güven kaybının yanı sıra ileri dönemlerde hastalarda saldırganlık ve ajitasyon gibi davranış değişiklikleri, halüsinasyon ve psikotik nöbetler de ortaya çıkabilir (Lane ve ark., 2018). Diyabetin Alzheimer hastalığı riskini anlamlı ölçüde artırdığı, obezitenin de Alzheimer hastalığı için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (Karşıdağ, 2012).

2.18. Medial temporal lob epilepsisi

MTLE’li hastalarda temel nöropsikolojik bozukluk materyale özgü bellek bozukluklarıdır. İlk olarak Milner ve ark.’nın çalışmalarıyla ortaya konulan bu

kavram, temelde sağ ve sol temporal lobların farklı tipteki bellek materyalini işlemleri olarak tarif edilir (Delaney ve ark., 1980).

‘Uzun süreli bellek’ (yeni öğrenilmiş bilginin geri çağırılması) bozukluğu görülür. Tutulum gösteren hemisferde dil dominansına bağlı olarak hafif orta dereceli materyale özgü bellek bozukluğu da bulunur. Eğer sol hemisfer dominantsa, sözel bellek bozukluğu sol hemisferi lateralize edebilir. Buna karşın görsel bellek bozukluğu ile sağ temporal lob arasında ilişki kurmak güç olmaktadır (Helmstaedter ve ark., 2003).

Meziyal temporal lob epilepsili hastalarda bellek fonksiyonundaki bozulmanın hipokampal patolojiden dolayı ilişkisi net bilinmesine karşın, dikkat ve frontal lob fonksiyonunda da bozulma görülebilmektedir. Epilepsi hastalarında dikkat, öğrenme, mental işleme hızı, bellek ve yürütücü işlevler gibi farklı mental alanların birinde veya birkaçında bozulmalar olabilir (Kneebone, 2001).

2.19. Deneysel diyabet oluşturma modelleri

Diyabeti daha geniş araştırmak için birçok deneysel bilimsel çalışma yapılmakta ve diyabetik hayvan modelleri sıklıkla tercih edilmektedir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan çeşitli ilaçlar ve kimyasallar, diyabete neden olur. Streptozotosin ve Alloxan bu amaçla kullanılan diyabetojenik ajanlardır ve hücre yıkımı ile insanlardaki Tip I Diyabet’e benzer şekilde diyabet oluştururlar (Öztürk ve ark., 2002).

2.20. Streptozotosin (STZ)

STZ [2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D glukopiranoz], Streptomyces achromogenes tarafından sentezlenir (Szkudelski, 2001). Streptomyces griseus’un metaboliti olan STZ’in antibiyotik, antitümöral ve karsinojenik etkileri vardır (Bell ve Hye, 1983). STZ pankreas dokusu dışında böbrek ve karaciğere de hasar verir. Dokulara karşı irritan olduğundan uygulama sırasında damar dışına sızdırılmamalıdır. STZ -20°C’de ışıktan korunarak saklanmalıdır. Çözeltisi uygulanmadan hemen önce taze olarak ve pH’sı 4 sitrat tampon içinde çözülerek hazırlanmalı ve 4°C’de ışıktan korunarak hemen kullanılmalıdır. Sıçanlarda 40-100 mg/kg dozunda I.V. veya I.P. uygulanabilir (Bell ve ark., 1983). Multiple dozaj, birbirini izleyen 5-6 gün boyunca

çok kez ve ufak dozlar fleklinde (5 mg/kg/gün) de uygulanabilir, buna subdiyabetojenik doz uygulaması denir (Like ve Rossini, 1976). Çalışmamızda 45 mg/kg tek dozda streptozotosinin 0.1 M sitratta pH 4,5 iken intraperitoneal olarak uygulanmasının ratları diyabetik yapmaya yettiği gözlemlendi ve çalışmamız bu dozda gerçekleştirildi.

2.21. Streptozotosin (STZ) etki mekanizması

İntraperitonel veya intravenöz uygulama sonrası, Glut-2 taşıyıcısı yoluyla pankreasın beta hücresine girer ve DNA alkilasyonuna sebep olur (Szkudelski, 2001). PARP'ın (polimeraz) aktivasyonu müteakip NAD⁺ tükenmesine, hücresel ATP'de azalmaya ve insülin üretiminin daha sonraki inhibisyonu neden olur (Sandler ve Swenne, 1983). STZ bir serbest radikal kaynağıdır. DNA hasarına ve sonraki hücre ölümüne sebep olur (Dekel ve ark., 2009).

STZ, pankreas beta hücrelerine aracısız toksik etkilidir. Yapısında bir glukoz molekülü içerdiği için plazma membranındaki glukoreseptörlere bağlanan STZ glukozla uyarılan insülin salımını durdurur. STZ'in temel etki yerlerinden biri de nükleer DNA'dır. STZ'in hücre içinde dekompozisyonu ile oluşan reaktif karbonyum iyonları DNA bazlarında alkilasyona sebep olur. Bunu DNA tamiri izler ve tamir sırasında görev alan poli (ADP riboz) sentetaz hücre içindeki nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) kullanarak NAD depolarını boşaltır ve ATP içeriğini azaltır. Böylece hücresel enerji depolarının tüketimi beta hücresinde nekroza sebep olur (Bell ve ark., 1983; Pickup, 2002; Szkudelski, 2001). STZ 'ye bağlı oluşan DNA hasarında, STZ'nin nitrik oksit (NO) donörü etkisinin olduğu ileri sürülmektedir. Beta hücrelerine alınan STZ, NO'nun hücre içinde serbets kalmasına, dolayısıyla DNA ayrılmasına sebep olmaktadır (Kröncke, 1995). STZ uygulaması sonrası ksantin oksidaz sisteminin aktive olduğu ve buna bağlı hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin üretildiği bildirilmektedir (Nukatsuka ve ark., 1990).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Demirbaş malzemeler aletler

- Mikrotom (Leica)
- IHC boyama seti (Bio-Optica)
- Su banyosu (Leica)
- Kurutma tablası (Thermo)
- Buzdolabı (Siemens)
- Derin dondurucu -80 (New Brunswick Scientific)
- Triple boyama seti (Bio-Optica)
- Araştırma mikroskobu (Olympus BX51)
- Kamera ve görüntüleme Sistemi (Olympus DP72)
- Stereo mikroskop (Zeiss 2000-C)
- Stero mikroskop kamerası (Canon 550D)
- Preparat saklama kutusu (Bio-Optica)
- Otomatik mikropipetler (Thermo Scientific)
- Deney hayvanları kafes sistemi
- Mikrodalga fırın (Siemens)
- Vorteks cihazı (Velp)
- Terazî (Sartorius)
- Cerrahi set (Tıp-Kim sanayi)
- Etüv (Memmert)
- Parafin Dispenser (Kunz instruments)

- Distile su cihazı (Elga)
- Ph metre (InoLab)
- Manyetik karıştırıcı (Schott)

3.1.2. Sarf malzemeler ve kimyasal maddeler

- Pikrik asit (Aldrich)
- Formaldehit (Merck)
- Asetik asit (Merck)
- 96 alkol (Merck)
- Absol (Supelco)
- Ksilol (İsolab)
- Benzol (Merck)
- Parafin (Tudamelt)
- Ksilazin (Rompun)
- Ketamin (Alfamin)
- Metil benzoat (Merck)
- Hidrojen peroksit (Thermo Scientific)
- Protein blocking solüsyonu (Thermo Scientific)
- Avidin biotin peroksidaz (Thermo Scientific)
- Biotinli sekonder antikor (Thermo Scientific)
- DAB kromojen (Thermo Scientific)
- Hemotoksilen (Merck)
- Anilin blue (Sigma-Aldric)
- Asit fuksin (Sigma-Aldric)
- Sikrik asit asetat (Merck)
- Eldiven (Tenty)
- Enjektör (10-5-1 ml) (Beybi)
- Lam (Menzel-Glaser)
- Lamel (Menzel-Glaser)
- Entellan (Merck)
- Mikrotom bıçağı (Thermo Shandon)

- Pipet uçları (İsolap)
- Ethanol 96 (İsolab Chemicals)
- Sodyum clorid (Merck)
- Potasyum chloride (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Merck)
- Disodyum dihidrojen fosfat dihidrat (Merck)
- Sodyum sitrat dihidrat (Merck)
- Monoklonal mouse anti-Bec1-1(Santa Cruze)
- Monoklonal mouse anti-LC3 (Santa Cruze)
- Monoklonal mouse anti-AMPK (Santa Cruze)
- Monoklonal mouse mTOR (Santa Cruze)

3.2. Deneysel prosedür

3.2.1. Deney hayvanlarının elde edilmesi

Çalışma materyalini Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM)’nden temin edilen ağırlıkları 180-200 gr arasında değişen 24 adet erkek Wistar albino ırkı sıçan oluşturdu. Çalışma boyunca *ad libitum* olarak pellet sıçan yemi ve suyu ile beslendi. Sıçanlar için ideal olan % 65 rölatif nem oranında ve 21-24 °C ortam sıcaklığına sahip odalarda barındırılarak merkezi havalandırma ile hava sirkülasyonu sağlandı. Doğal gece/gündüz döngüsü olan 12 saat gece / 12 saat gündüz uygulaması yapıldı.

3.2.2. Diyabet modelinin oluşturulması

Diyabet oluşturmak için 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH: 4.5) içerisinde taze olarak hazırlanmış streptozotosin (STZ) çözeltisi 45 mg/kg olacak şekilde (tek doz) periton içi yolla sıçanlara enjekte edilerek diyabet oluşturuldu (Bell ve ark., 1983; Öztürk ve ark., 2002).

STZ enjeksiyonundan 3 gün sonra sıçanların kuyruk venasından enjektör ile bir damla kan alınıp glukoz düzeyi ölçülerek diabetes mellitus oluşumu kontrol edildi. Kan glukoz düzeyinin ölçümünde on call plus glukometre cihazı ve on call plus nano kan stripleri kullanıldı (Al-Awar ve ark., 2016; Büyükleblebici ve ark., 2012; Malcangio ve Tomlinson, 1998).

Deney grupları

Deney grupları 8 sıçandan oluştu ve bütün gruplar deneyin başlangıcında ve haftalık olarak çalışmanın 7., 14., 21., 28., 35., ve 40. günlerinde kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukometre (call on plus) ile stripe kan damlatılarak açlık kan glukoz düzeyleri ölçüldü.

Grup 1 (Kontrol grubu)

8 sıçandan oluşturuldu ve 5 haftalık süreçte standart yem ve suyla beslendi. Çalışmanın 1. gününde bu gruba sadece 0.1 M 0.5 ml sitrat fosfat tamponu i.p. yolla enjekte edildi.

Grup 2 (Diyabetik grup)

Diyabet grubu 8 sıçandan oluşturuldu ve 5 haftalık deneme boyunca standart yem ve suyla beslendi. Bu gruptaki hayvanlara çalışmanın 1. gününde diyabet oluşturulmak üzere her birine 45 mg/kg olacak şekilde tek doz Streptozotosin (Cayman) 0.1 M sitrat fosfat tamponu pH: 4,5 içerisinde intraperitoneal (i.p.) yolla verildi. Çalışmanın 3. gününde ratların kuyruk veninden alınan kan örnekleri glukometre (on call plus) ile stripe kan damlatılarak açlık kan glukoz değerleri ölçüldü. Açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik kabul edilip çalışmaya devam edildi.

3.3. Kan glukoz düzeylerinin lm

Tüm gruplardaki sıçanların deneme başlangıcında ve bitiminde olmak üzere kuyruklarından alınan kan örneklerinde glikometre cihazı kullanılarak glikoz düzeylerinin ölçümü yapıldı.



Şekil 3.1. Sıçanların kuyruklarından kan glukoz ölçümü.

3.4. Doku örneklerinin alınması

Tüm denemeler sonrası kontrol, stz ile diyabet oluşturulan gruba ait hayvanlar anestezi protokolüne uygun biçimde anestezi edildi (Van Pelt, 1977). Daha sonra çalışma materyalini oluşturacak olan beyin doku örnekleri alındı. Bouin tespit sıvısının kardiyak perfüzyonla beyin dahil tüm dokulara ulaştırılarak bu dokular tespit edildi.



Şekil 3.2. Bouin tespit solüsyonu kullanılarak kardiyak perfüzyon uygulanması.



Şekil 3.3. Bouin tespit solüsyonuna maruz kalan bir sıçan beyini.

3.4.1. Histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için doku örneklerinin alınması

Çalışmada histoloji, immünohistokimya ve immünfloresan analizleri için her bir gruba ait anestezi altındaki 8'er hayvana Bouin tespit solüsyonu kullanılarak kardiyak perfüzyon uygulandı. Perfüzyon bitiminde hayvanların beyinleri çıkarılarak Bouin solüsyonunda 6 saat süreyle postfiksasyona maruz bırakıldı. Tespitten sonra tüm dokular sırasıyla %50, 70, 80, 96 ve absol alkoller ile metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı.

3.4.2. Beyin doku örneklerinin histolojik ve immünohistokimyasal boyama teknikleri için hazırlanması

Kontrol ve deney gruplarındaki her bir hayvanın beynine ait doku bloklarından 4 mikron kalınlığında seri kesitler alındı ve 36 seri preparat hazırlandı. Her bir lama belirli aralıklarla en az 3 kesit alındı. Genel yapıyı incelemek için preparatların ilk 12 serisi krezil viyole boyası ile, otofaji ile ilişkili proteinlerin hipokampusdeki lokalizasyonlarını saptamak için preparatların diğer 24 serisi immünohistokimya boyama tekniği ile boyandı.

3.4.3. Nisli boyama yöntemi (Krezil viyole boyama yöntemi)

Beyin dokusunun genel yapısını incelemek amacıyla dokulara krezil violet asetat boyama yöntemi uygulandı. Hazır hale getirilen preparatlar deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemi bittikten sonra %0.1'lik krezil violet asetat içerisinde 5 dakika süreyle 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 3 dakika süreyle distile suda bekletildi. Önce %96'lık sonra absol alkolde 3'er dk tutularak, ardından ksilen'de 2 kez 5'er dakika bekletilerek ve entellan ile kapatıldı.

3.4.4. İmmünohistokimyasal analiz (Strep-avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immünoperoksidaz tekniği)

İmmünohistokimyasal incelemeler için hazırlanan preparatlar deparafinizasyon işlemi ve rehidrasyon için hazırlanan preparatlar 2'şer kez 5'er dakika ksilen içerisinde bekletildi. Ardından dehidratasyon işlemi için sırasıyla absol alkol I, absol alkol II, % 96 alkol, % 80 alkol ve % 70 alkol olmak üzere dereceli alkol serilerinden 3'er dakika süreyle geçirildi ve distile suda 5 dakika bekletildi. Takibinde fosfat buffer salin (PBS)'de yıkandı. Takiben dokular sitrat bufferda (pH 6,0) 600W'da 4x5 dakika süreyle mikrodalga fırın içerisinde kaynatıldı ve aynı solüsyon içinde 20 dakika oda ısında soğutuldu ve doku antijeninin yeniden kazanımı sağlandı. Tekrar PBS ile dört kez yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları önlemek için kesitler 5 dakika protein bloklama solüsyonu, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış % 3' lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 15 dakika bekletilerek, PBS ile 4 kez 5'er dakika süreyle yıkandı.

Uygun dilüsyonlarda hazırlanmış primer antikörler (anti-Beclin-1, anti-LC3, anti-AMPK ve anti-mTOR) kesitler üzerine eklendi ve bir gece inkübasyon için 4°C’de bekletildi. Negatif kontroller olarak alınan prefrontal korteks örnekleri ise primer antikör kullanılmadan PBS’ye maruz bırakıldı. İnkübasyonu takiben PBS’te 4x5 dakika yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikör ile 20 dakika oda ısısında inkube edilip, tekrar 4x5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı streptavidinde 15 dakika maruz bırakıldı. Tekrar 4 kez PBS ile yıkanarak 5-10 dakika kromojen solüsyonunda (DAB) bekletildi. Gill’in Hematoksilen’inde 5 dakika boyandıktan sonra çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı ve takiben dereceli alkollerden ve ksilenlerden geçirilip üzerine yapıştırıcı damlatılıp lamelle kapatıldı. Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda (Olympus, BX51) incelenerek fotoğraflandı.

Elde edilen görüntüler semikantitatif ve kantitatif olarak değerlendirildi;

3.5. İmmünohistokimyasal boyamanın kalitatif değerlendirmesi

Boyalı bölümler incelendi ve dijital kamera (DP74, Olympus, Tokyo, Japonya) ile donatılmış BX51 mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı. Bu immün boyamalar, dört puanlık bir yoğunluk skoru (IS) kullanılarak niteliksel olarak değerlendirildi. Beyin dokularındaki Beclin-1, LC3, AMPK ve mTOR boyanma yoğunlukları, 100x ve 400x büyütmelelerde mikroskopik olarak değerlendirildi. Bu yöntem için boyama yoğunlukları şu şekilde puanlandı: -, negatif (yüksek büyütmede bile leke yok, 400X); +, zayıf boyama (yalnızca yüksek büyütmede, 400X görünür); ++, orta boyama (düşük büyütmede kolayca görülebilir, 100X); ve +++, güçlü boyama (düşük büyütmede çarpıcı şekilde pozitif, 100X).

3.6. İmmünohistokimyasal boyamanın kantitatif değerlendirmesi

Bu çalışmada Beclin-1, LC3, AMPK ve mTOR kantitatif olarak aşağıdakilere göre belirlendi: Jensen (2013) tarafından açıklanan yöntemle göre; NP’ler için boyama yoğunluklarının kantitatif analizleri, beyin kortekslerinden elde edilen görüntülerde yapıldı. Bu tüm görüntü için immün boyama yoğunluğu ölçüldü (400X büyütme). Bunun için, her grup için on iki görüntü kullanıldı. İçerik aktardıktan sonra ilgili görüntüler yazılım ImageJ 1.51 sürümüne eklendi (Java 1.8.0_112, <https://imagej.nih.gov/ij/>), ardından görüntüler color deconvolution eklentisine

gönderildi, burada hematoksin ve DAB boyaması seçildi. Tek DAB, hematoksin ve arka plan içeren 3 farklı panel görüntü oluştu. Ardından, yalnızca DAB görüntüleri kullanılarak elde edilen DAB görüntüleri için eşik değerler belirlendi. Bundan sonra, alan ve alan kesri parametreleri (boyama alanı yüzdesi, yani “boyama yoğunluğu”) ayarlandı. Daha sonra boyanan alanın alanı ve yüzdesi her görüntü için ölçüldü.

3.7. İstatistiksel analiz

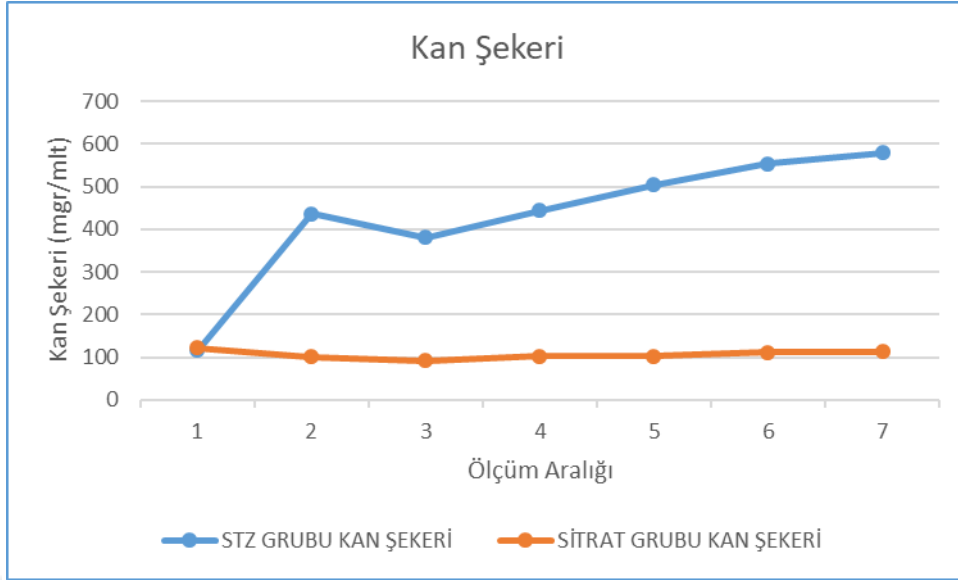
İstatistiksel analiz GraphPad kullanılarak yapıldı. Boyama yoğunluğu verilerinin (% boyama alanı) kantitatif analizini yapmak için elde edilen boyama alanı yüzdesi sonuçları GraphPad Prism 7 (Windows için Sürüm 7.04)’e aktarıldı. Bundan sonra kontrol ve diyabet grubu görüntü analizi miktarlarında herhangi bir anlamlı fark olup olmadığını belirlemek için unpaired student t test uygulandı. Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilir. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

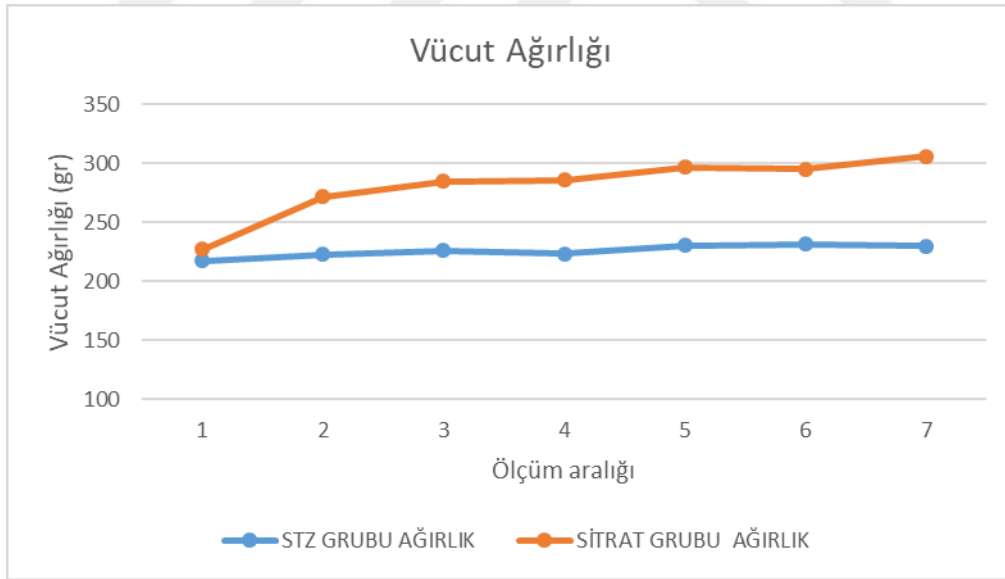
En az 8 (ideal olarak 10) saat aç kaldıktan sonra ölçülen şeker düzeyine, “açlık kan şekeri” adı verilir. Normal değeri; 70-100 mg/dl’dir. Yemeğe başladıktan 2 saat sonra ölçülen kan şekeri “tokluk kan şekeri” adı verilir ve normal koşullarda 140 mg/dl’nin altında olması gerekir. Şekerin hücre içine girmesi için mutlaka insüline gereksinim vardır. İnsülin, şekerin hücre içine girmesinde hücrenin kapısını açan anahtar görevi yapar. Pankreas, yeterli insülin üretilmediğinde veya insülin anahtar görevini yapamadığında (insülin direnci) şeker, hücre içine girip enerjiye dönüşmez. Dolayısıyla şeker kanda yükselmeye başlar (<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/diyabet/tip-2-diyabet.html>). Metabolizma glukozu enerji için kullanamaz bunu yerine yağlar ve proteinler kullanılmaya başlanır.

Tüm gruplarda kan glukoz düzeylerinin deneme sürecinde sıçanların büyümesine paralel olarak değişip değişmediği, gruplara göre farklılık gösterip göstermediği ve farklılığın önem taşıyıp taşımadığı incelendi.

Deneme başlangıcında tüm gruplara ait sıçanlardan alınan kan örneklerinde glikoz düzeylerinin anlamlı farklılık taşımadığı belirlendi.



Şekil 4.1. Kontrol ve STZ ile indüklenen sıçanlar için kan şeker seviyeleri. Haftalık kan şeker ortalamaları alınan gruba 2.haftadan sonra STZ uygulaması yapıldı. Başlangıçtaki ve STZ tedavisinden sonraki 3, 4, 5, 6 ve 7. ölçüm aralığı kan glukoz seviyeleri, kontrolünkilerden önemli ölçüde farklıydı. Kan glukoz seviyeleri, STZ ile indüklenen hayvanlarda sürekli artarak yükseldi.



Şekil 4.2. Kontrol ve STZ ile indüklenen sıçanların vücut ağırlıkları. Kontrol grubunun vücut ağırlıkları giderek arttı.

4.1. Histolojik bulgular:

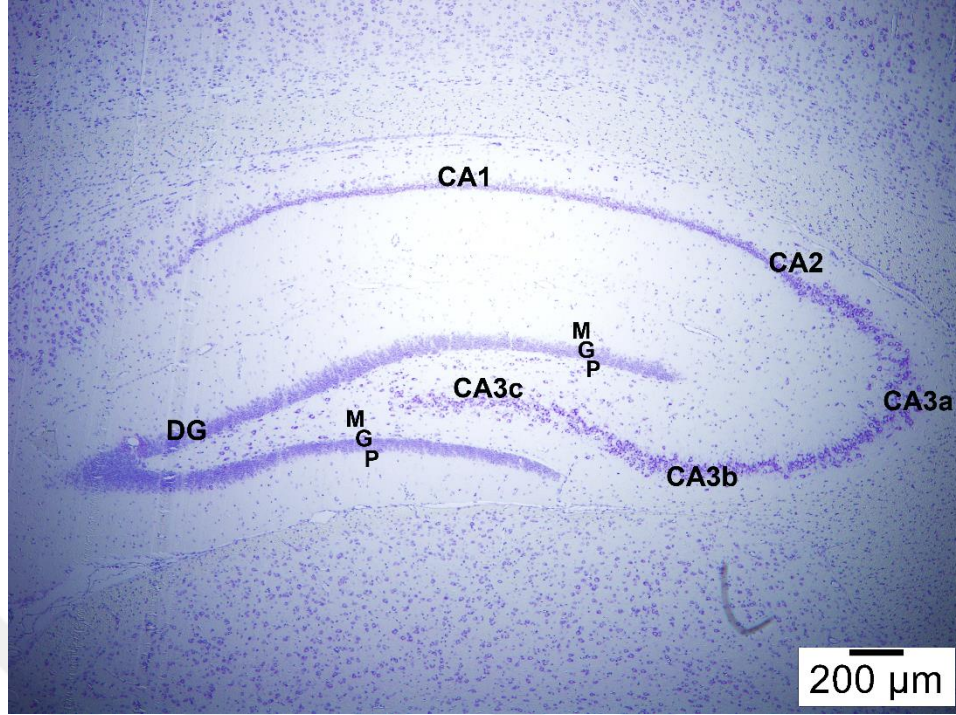
Sitrat grubu (Sahm grubu) ve kontrol grubu arasında dokuların incelenmesi açısından da bir fark görülmemiştir. Bu nedenle mikrobik incelemelerde sitrat ve kontrol grubu ortak tek bir kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Hipokampus'un histolojik yapısının incelenmesi amacıyla bu dokulara Nissl boyama (Crezel violet asetat boyaması) yöntemi uygulandı.

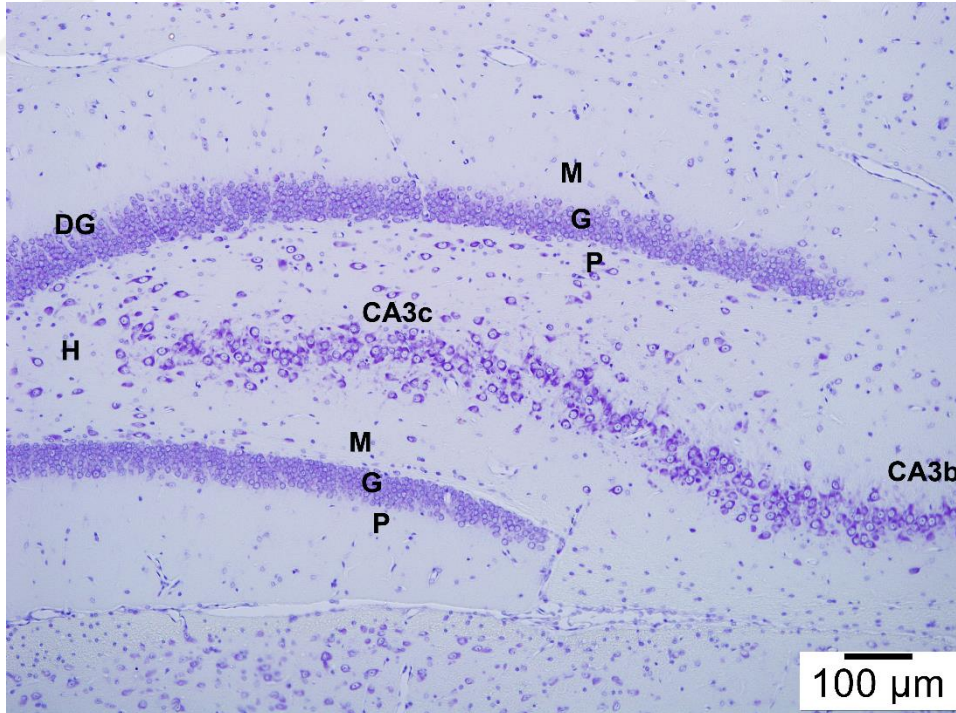
Kontrol ve diabetik gruplara ait sıçanların beyinlerinde hipokampusun histolojik incelemesinde bu beyin yapısının kornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) olmak üzere iki ana unsurdan oluştuğu belirlendi. Kornu ammonisin uzantısı U veya V şeklindeki dentat girusun içine doğru uzanırken kornu ammonis CA1, CA2 ve CA3 olarak adlandırılan sıkıca paketlenmiş piramidal nöronlara sahip farklı alt bölgelere ayrılmıştı. CA3'de kendi içinde CA3a, CA3b ve CA3c olarak bilinen bölgelere ayrılarak analiz edildiler. CA3c DG'a en yakın olan hilusa giren kısım olarak tanımlandı.

Ayrıca, ventriküler yüzeyden itibaren dentat girusa gire kadar CA'nın histolojik olarak; 1. Dış pleksiform katman, 2. Stratum oriens, 3. Stratum pramidale, 4. Stratum radiatum, 5. Stratum lakunozum ve Stratum molekülere katmanlarından oluştuğu belirlendi. Dentat grusta da 1. Moleküler katman 2. Granüler hücre katmanı ve Polimorfik katman olmak üzere 3 belirlendi.

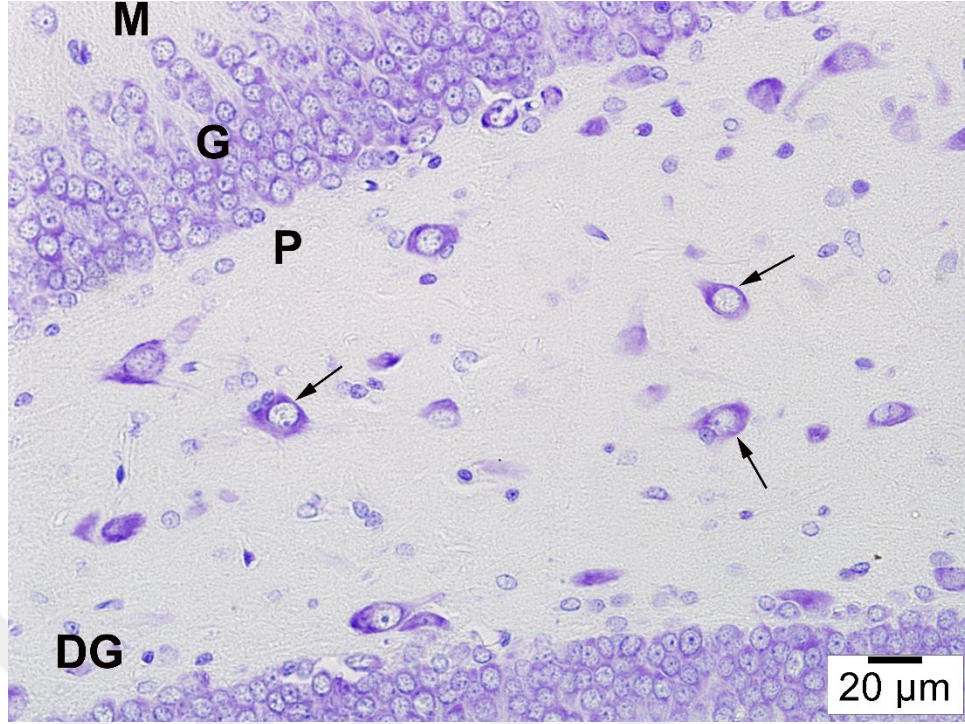
Hipokampusun bu yapıları incelendiğinde kontrol gruplarına göre diyabetik gruptaki hayvanların bu bölgelerindeki katmanlarda nörodejenerasyona uğramış nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen sinir hücrelerine rastlanılmıştır.



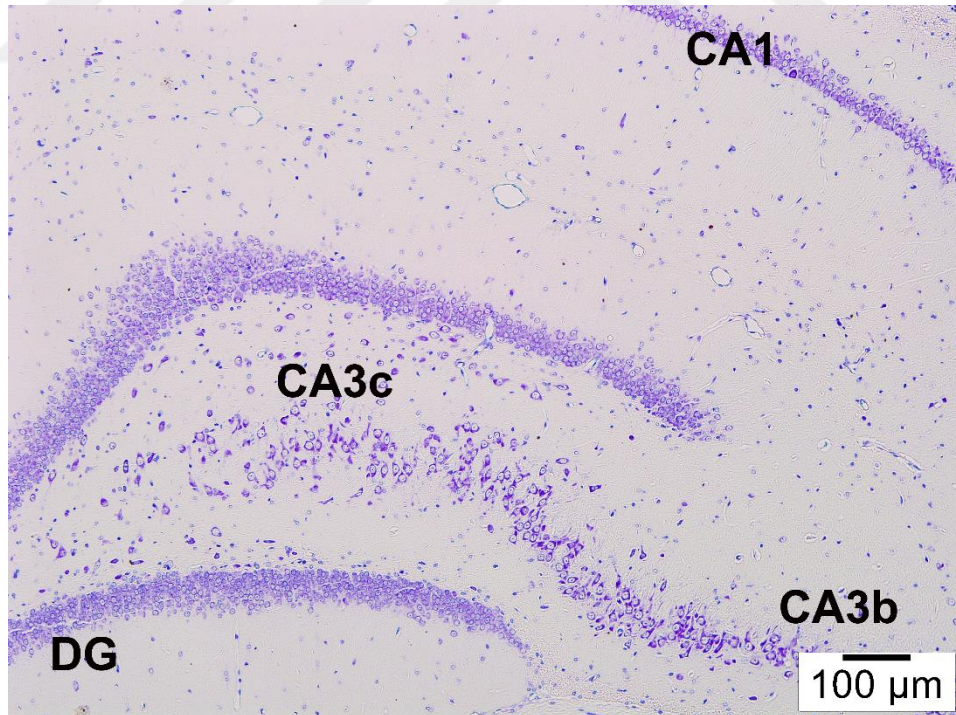
Şekil 4.3. Hipokampusün histolojik genel görünümü. DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, Nisll boyaması, Bar; 200 μ m.



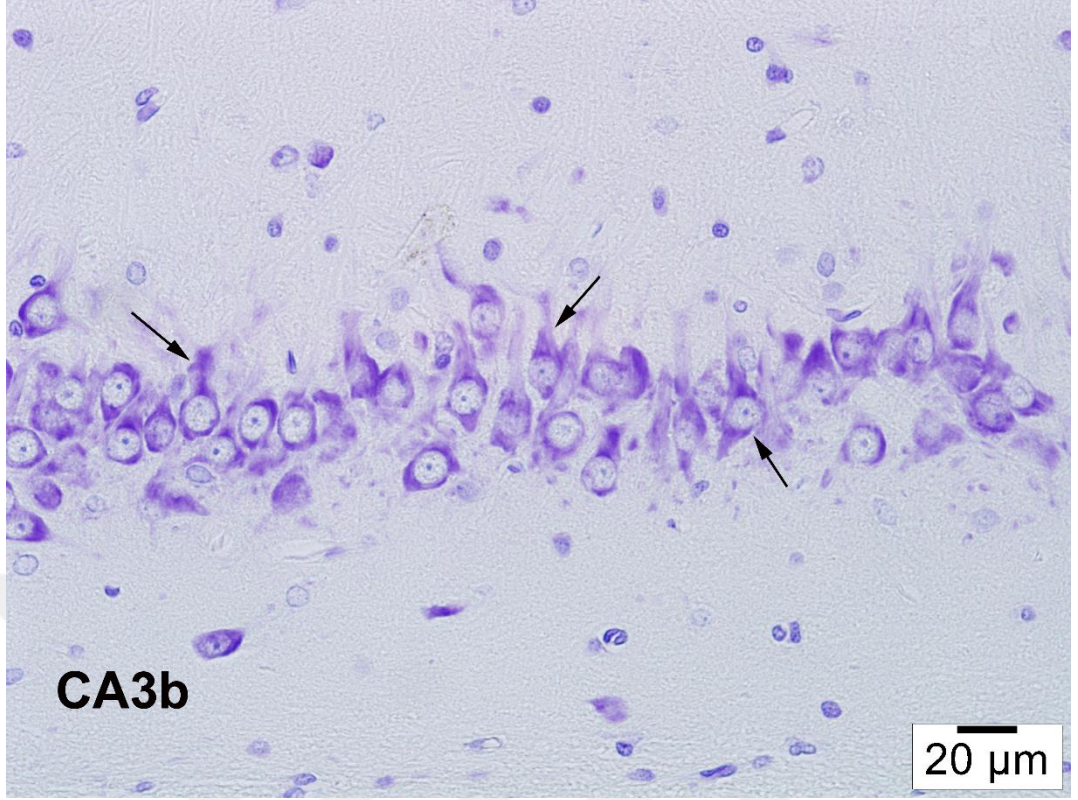
Şekil 4.4. Hipokampüste Dentat girusun (DG) histolojik genel görünümü. CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, H; Hilus, Nisll boyaması, Bar; 100 μ m.



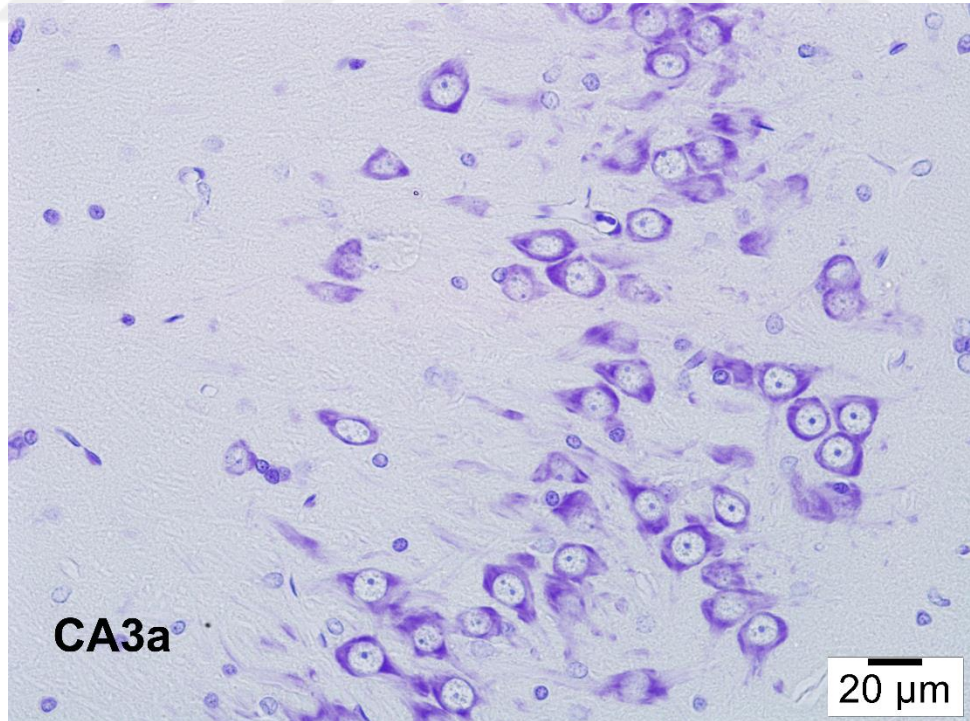
Şekil 4.5. Hipokampüste Dentat girusun (DG) yakın histolojik genel görünümü. M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, Nissl boyaması, Bar; 20 µm.



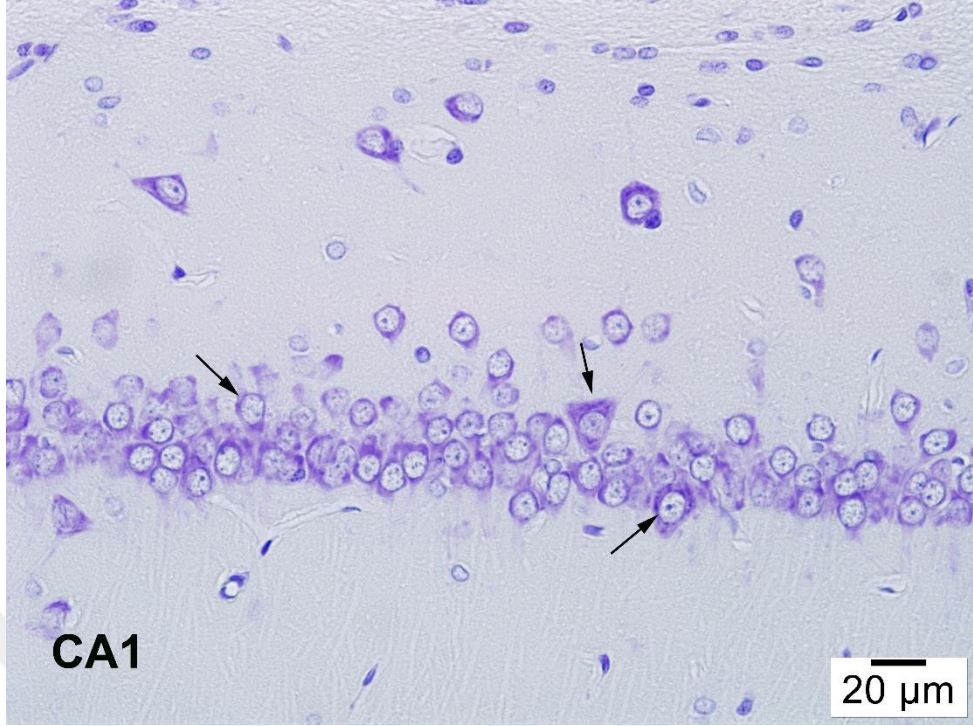
Şekil 4.6. Hipokampüste Dentat girusun (DG) histolojik genel görünümü. CA; Kornu ammonis, Nissl boyaması, Bar; 100 µm



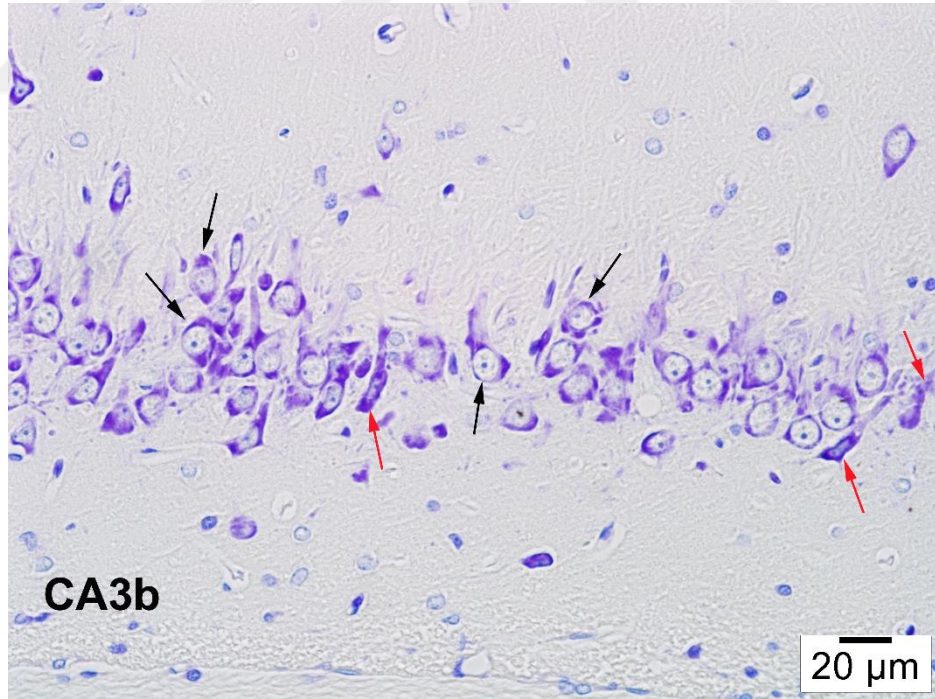
Şekil 4.7. Hipokampüste CA3b (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar), Nissl boyaması, Bar; 20 µm.



Şekil 4.8. Hipokampüste CA3a (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar, Nissl boyaması, Bar; 20 µm.



Şekil 4.9. Hipokampüste CA1 (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar), Nissl boyaması, Bar; 20 µm.



Şekil 4.10. Diyabetli bir sıçanın hipokampusün'de CA3b (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (kırmızı oklar), Nissl boyaması, Bar; 20 µm.

4.2. İmmunohistokimyasal bulgular:

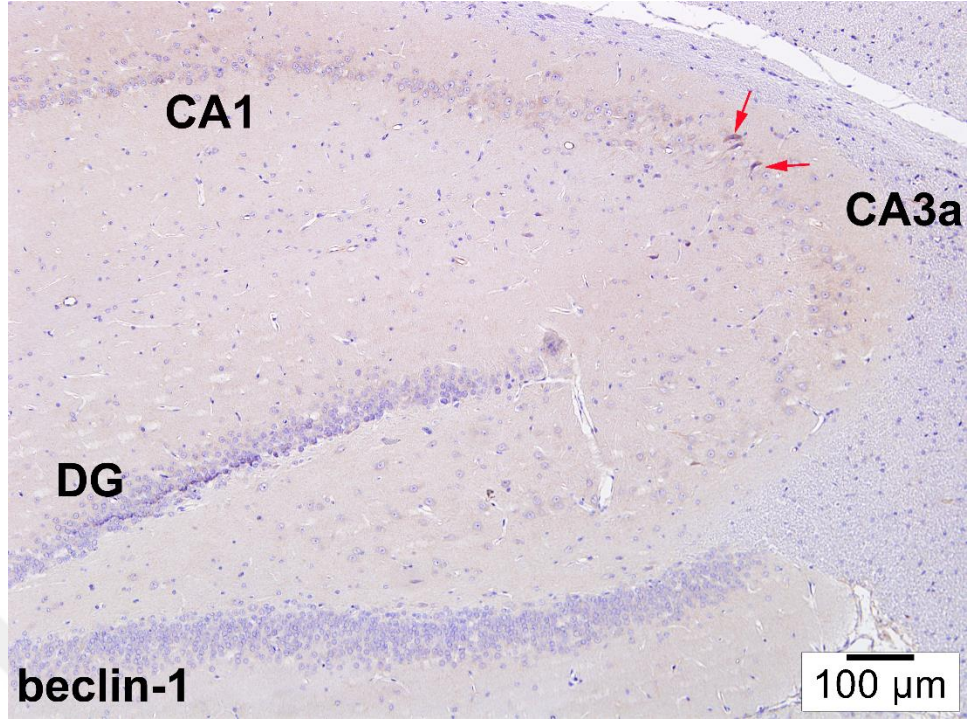
4.2.1. Beclin-1 immunreaktivitesi:

Sıçan beyin hipokampüslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerinde Beclin-1 immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-beclin-1 primer antikorları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir.

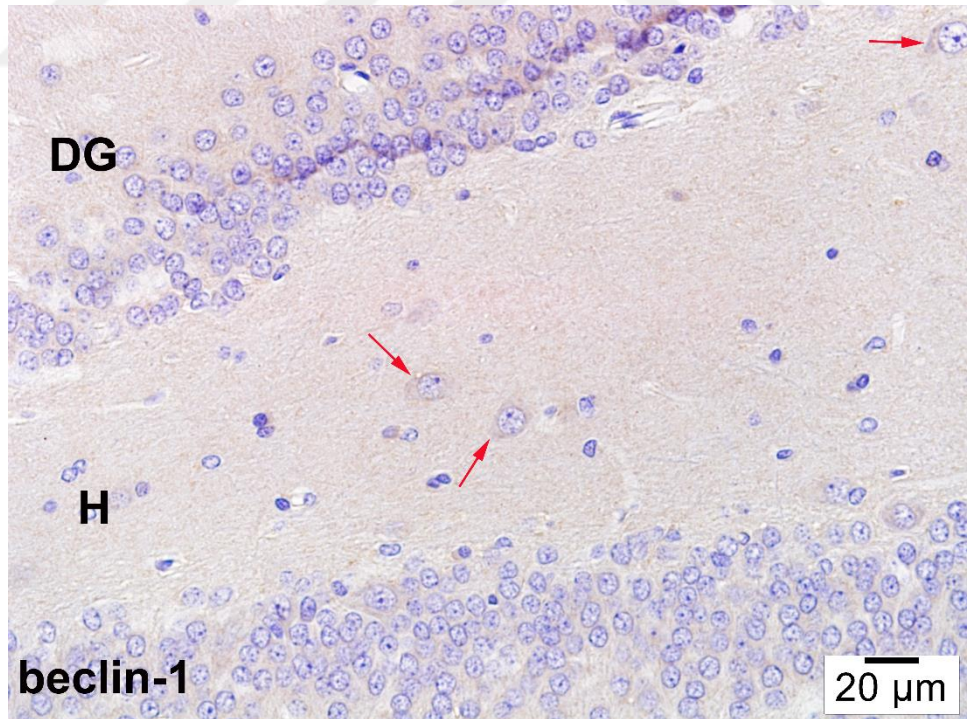
Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de diyabetik gruptaki hayvanların hipokampüslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların sitoplazmalarında beclin-1 pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, beclin-1 immunreaktivitesinin diyabetik gruptaki nöronların sitoplazmalarında kontrol gruplarına göre daha yoğun bir boyanmanın olduğu dikkati çekti.

Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi sonucunda diyabetik gruptaki sıçanların hipokampüslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P<0,05$). Ayrıca hipokampüslerin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre diyabetik gruptaki hayvanların bu hipokampus bölgelerindeki yapılarda nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti.

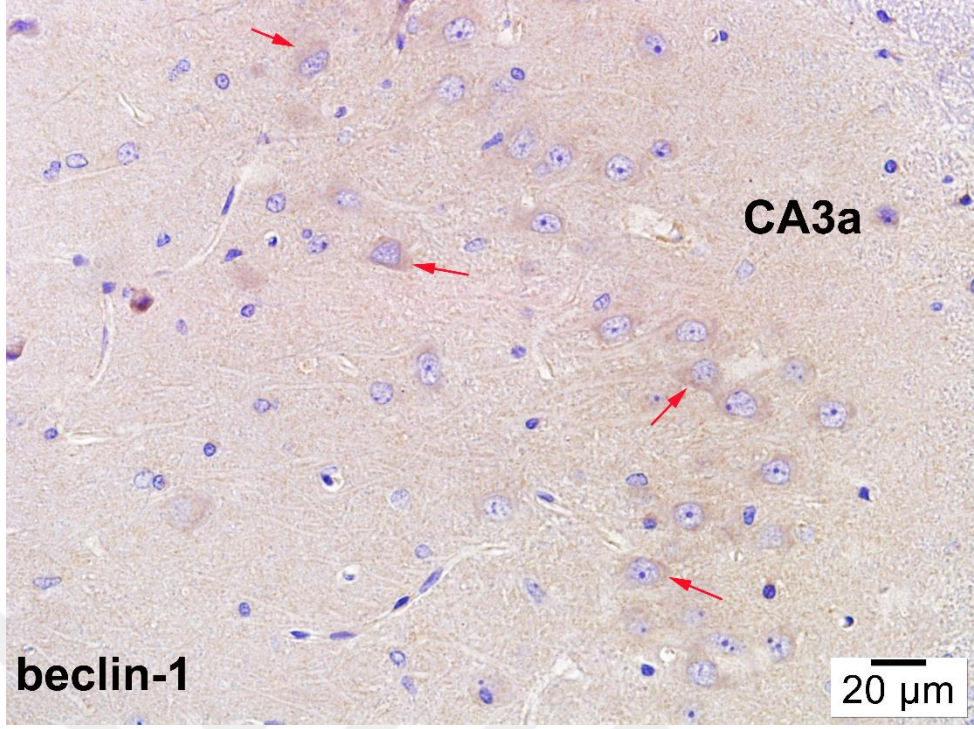
Çalışmada beclin-1 immunoreaktivitesinin kontrolü için pozitif kontrol olarak sıçan kalp dokusu örnekleri kullanılmıştır.



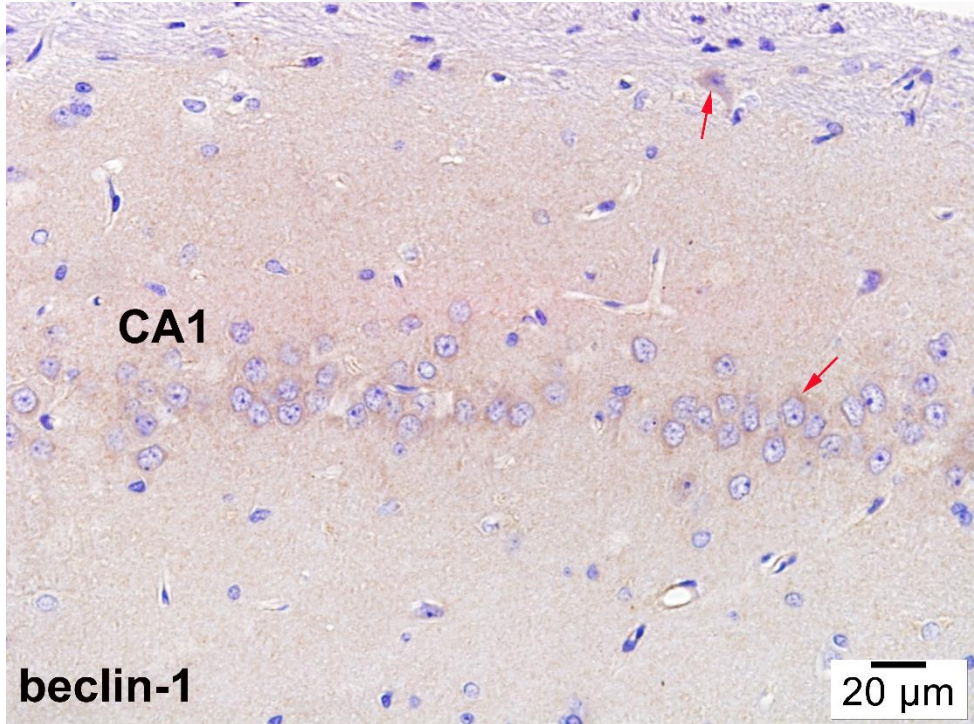
Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusun'de beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



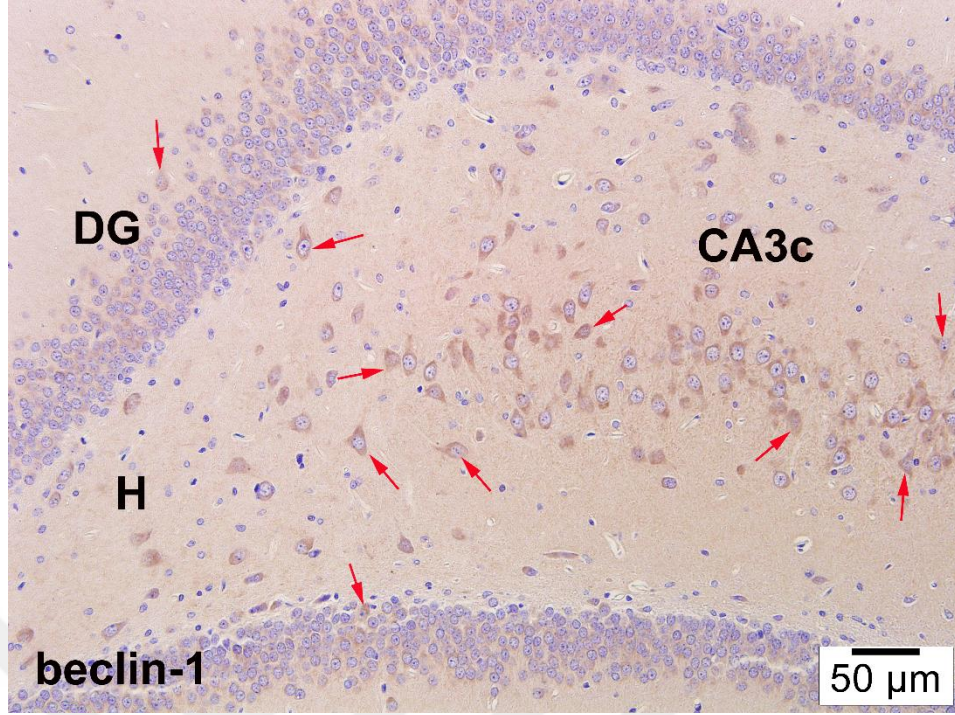
Şekil 4.12. Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusun'de beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



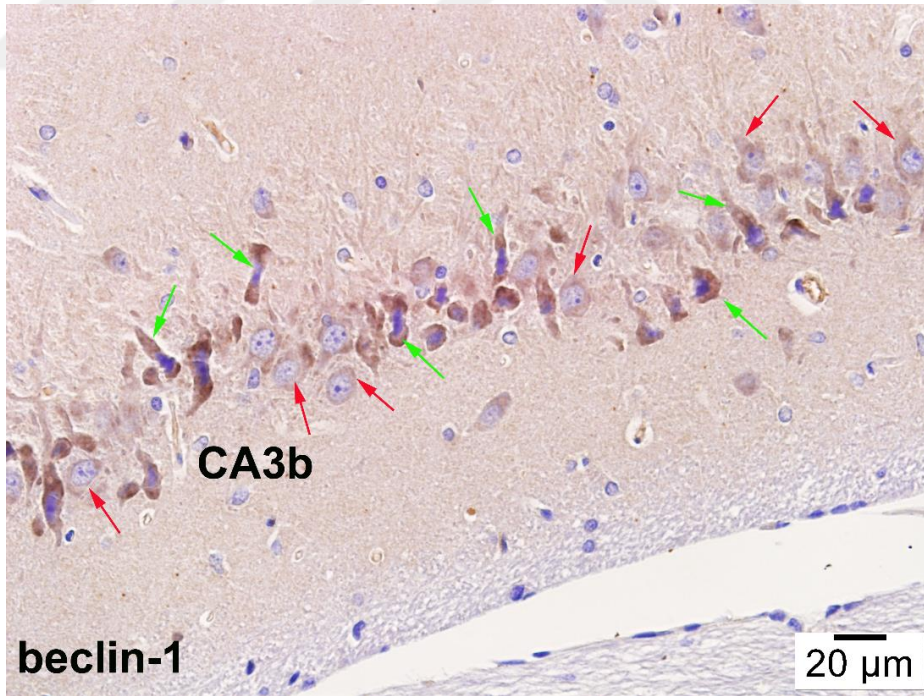
Şekil 4.13. Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de CA3a bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



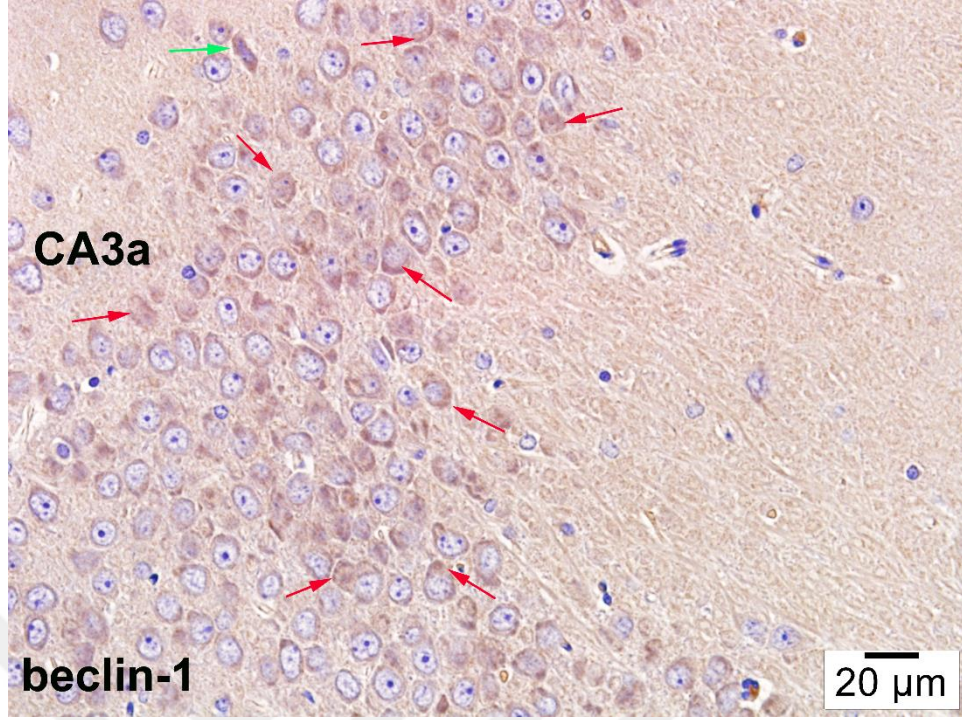
Şekil 4.14. Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de CA1 bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



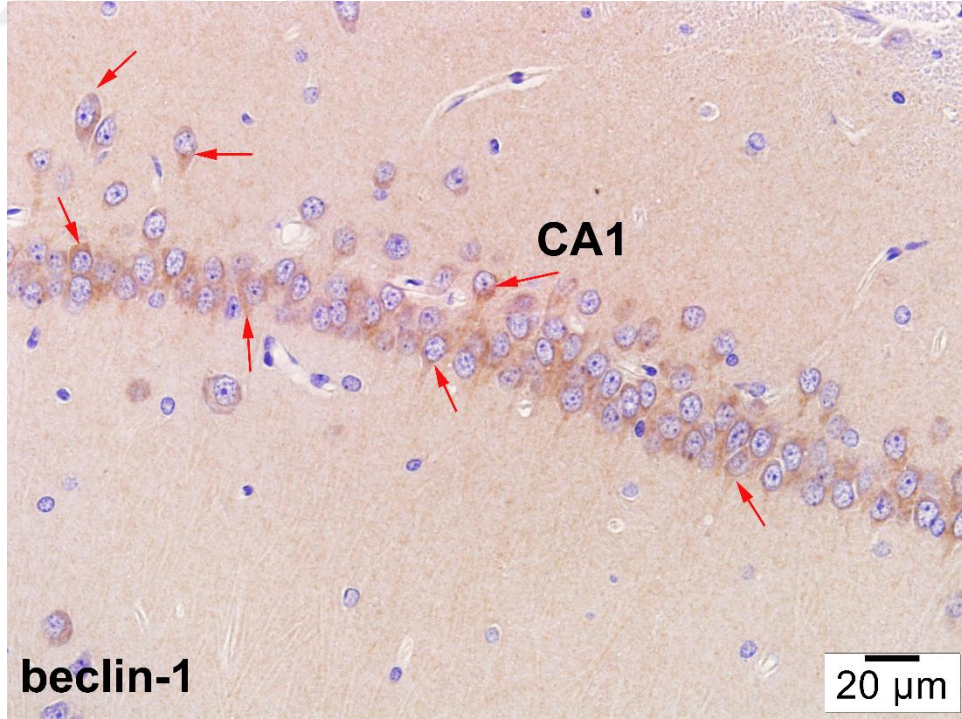
Şekil 4.15. Diyabet grubuna ait bir sıçanın hipokampüsü'nün dentat girusunda beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA3c; Kornu ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



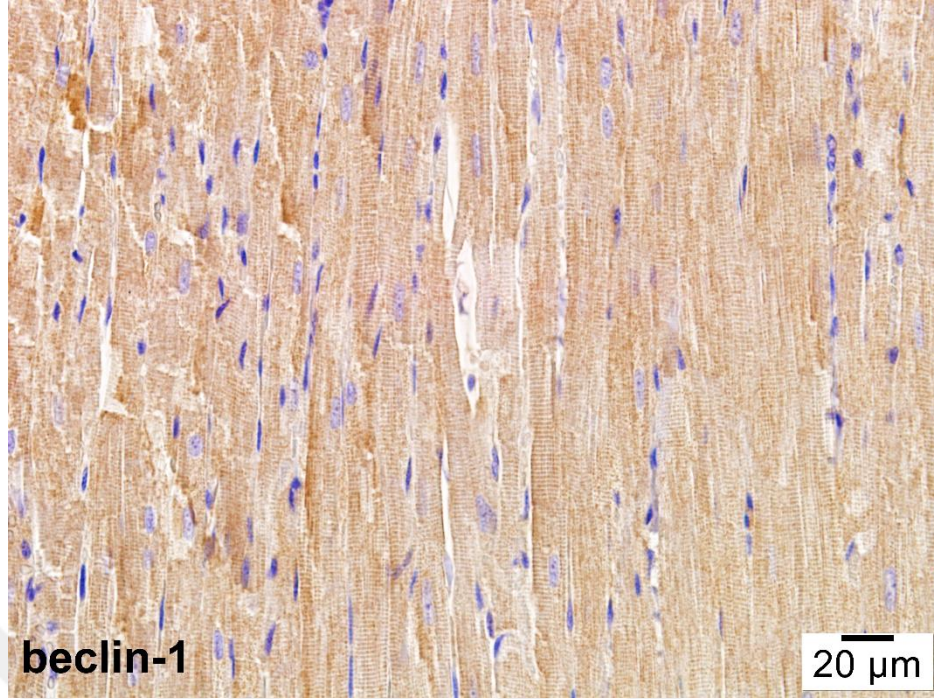
Şekil 4.16. Diyabet grubuna ait bir sıçanın hipokampüsü'nün CA3b bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.17. Diyabet grubuna ait bir sıçanın hipokampüsü'nün CA3a bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif bir nöron (yeşil ok), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.18. Diyabet grubuna ait bir sıçanın hipokampüsü'nün CA1 bölgesinde beclin-1 immunpozitif nöronlar (kırmızı oklar) CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.19. Beclin-1 pozitif kalp kası hücreleri, pozitif kontrol, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.

4.2.2. LC3 immunreaktivitesi:

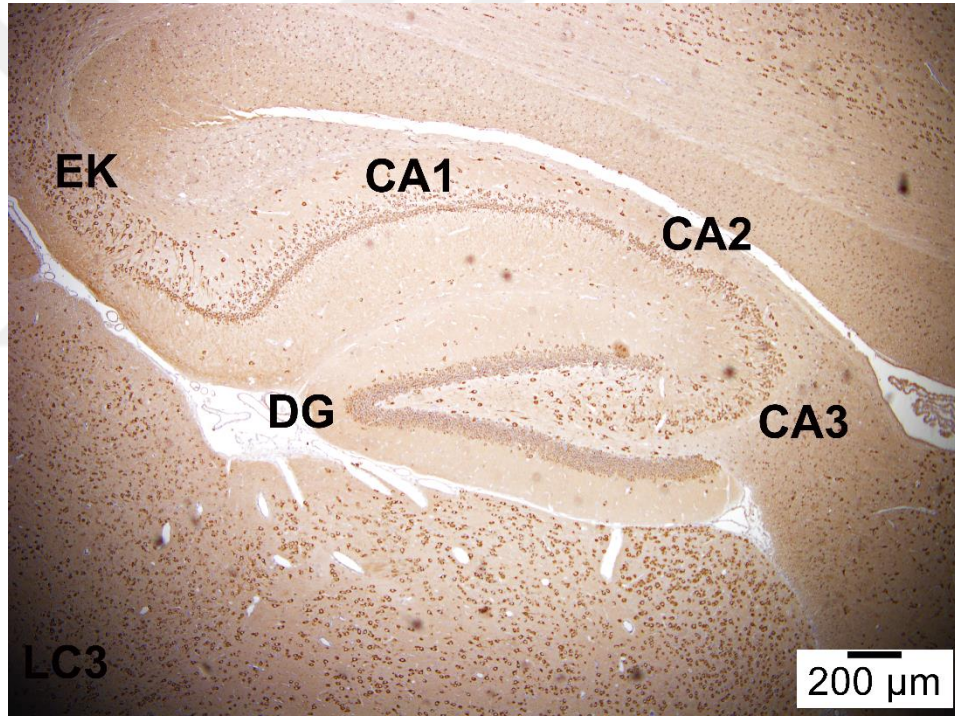
Sıçan beyin hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerinde LC3 immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-LC3 primer antikorları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir.

Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de diyabetik gruptaki hayvanların sıçan beyin hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların sitoplazmalarında LC3 pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, LC3 immunreaktivitesinin hem kontrol hem de diyabetik gruptaki nöronların sitoplazmalarında yoğun bir boyanmanın olduğu dikkati çekti.

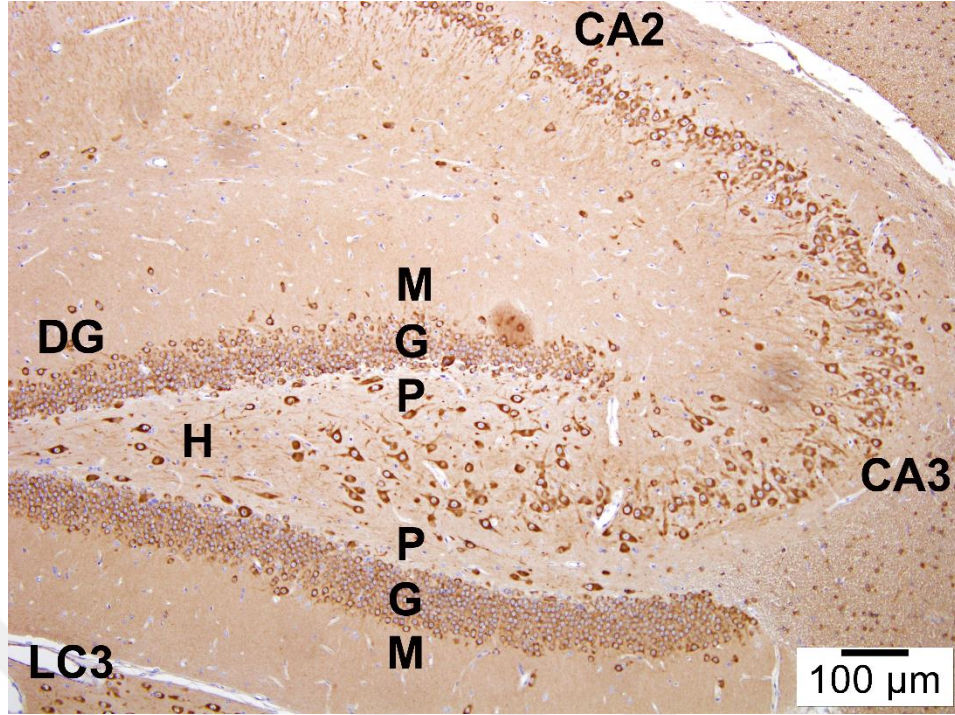
Kalitatif incelemelerde herhangi bir fark gözlenmemesine karşın araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile de değerlendirilmesi sonucunda diyabetik gruptaki sıçanların sıçan hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P < 0,05$).

Ayrıca, sıçan beyin hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre diyabetik gruptaki hayvanların bu korteks bölgelerindeki katmanlarda LC3 immunpozitif nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti.

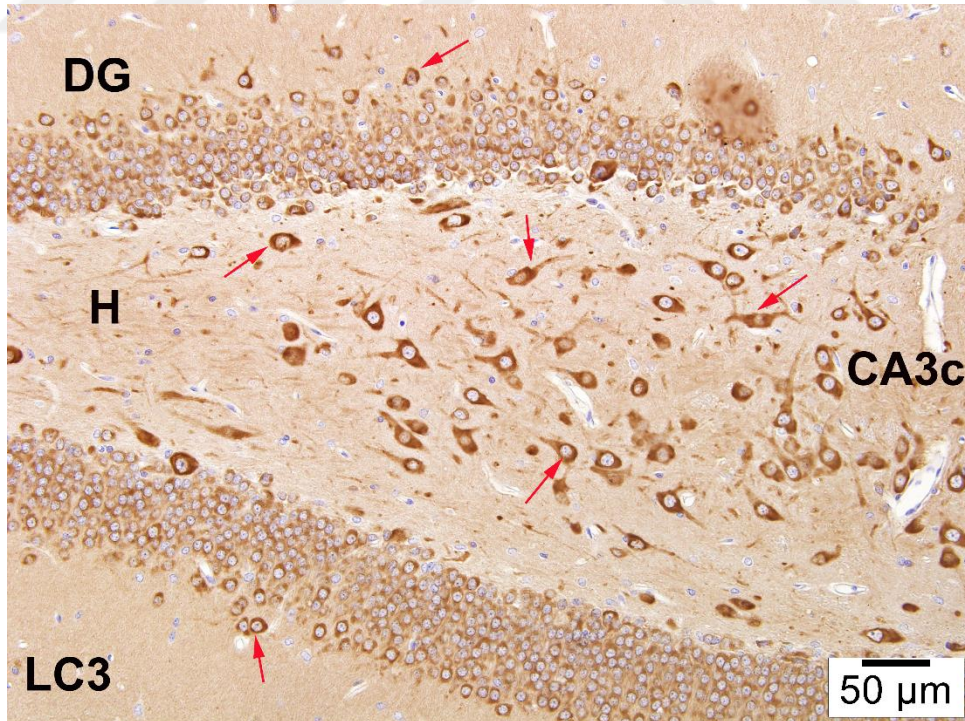
Çalışmada LC3 immunoreaktivitesinin kontrolü için pozitif kontrol olarak sıçan kalbi, böbrek ve testis dokusu örnekleri kullanılmıştır.



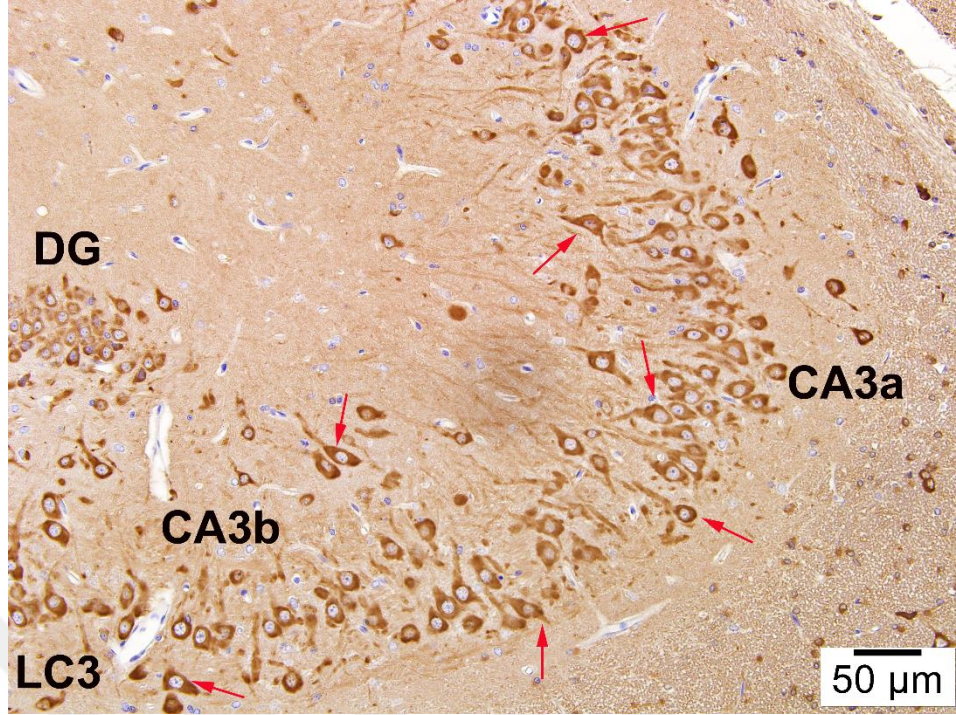
Şekil 4.20. Kontrol grubu hayvanların hipokampusünde LC3 immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, EK; Entorinal korteks, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



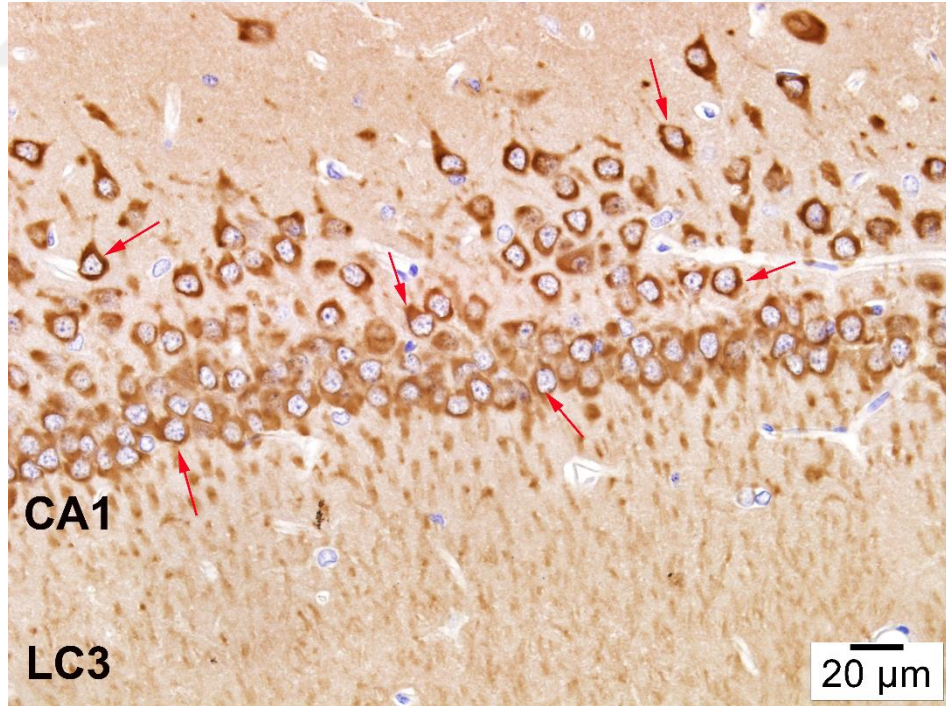
Şekil 4.21. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde LC3 immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



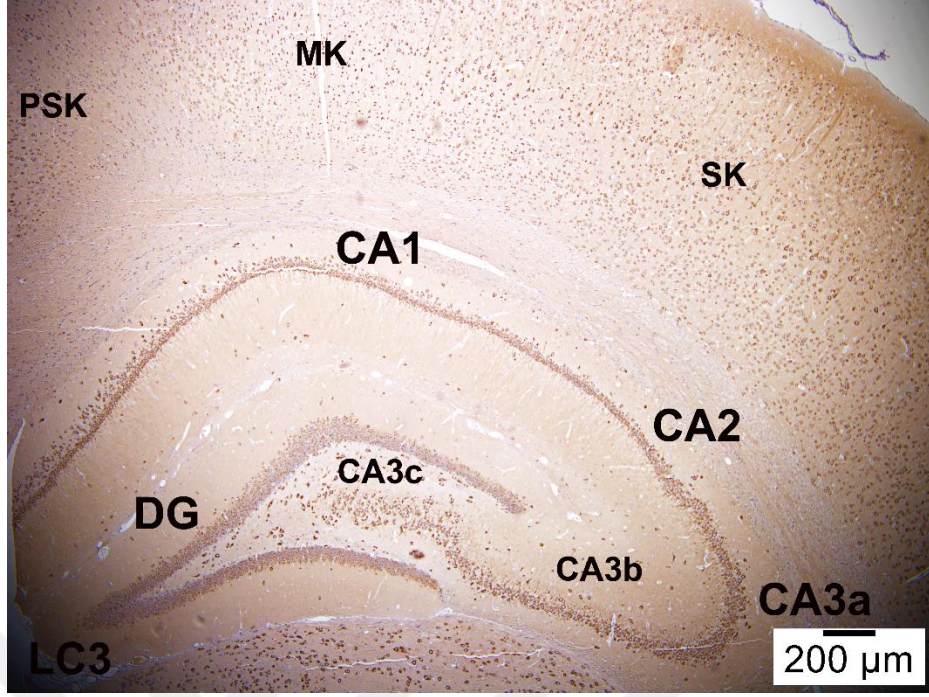
Şekil 4.22. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünün dentat girusunda LC3 immunpozitif hücreler (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



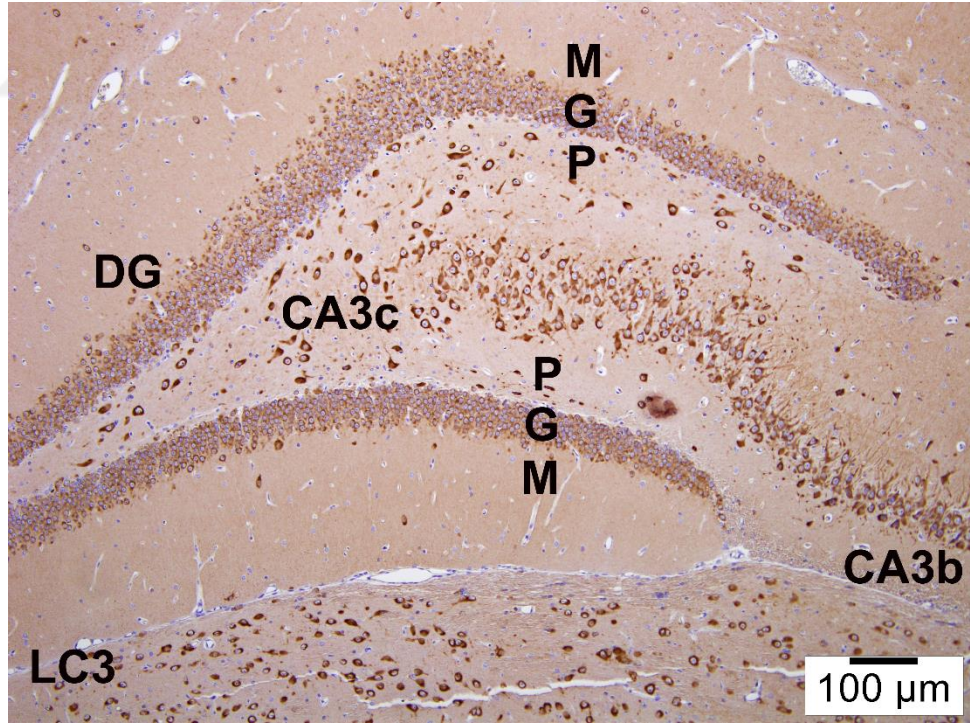
Şekil 4.23. Kontrol grubu hayvanların hipokampusünde LC3 immunpozitif hücreler (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



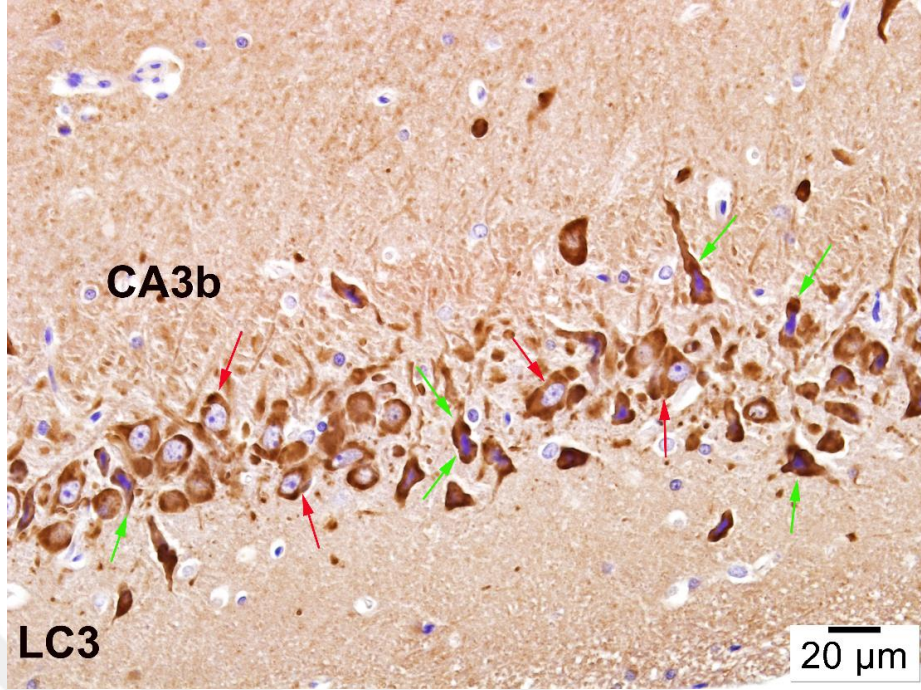
Şekil 4.24. Kontrol grubu hayvanların hipokampusünde CA1 bölgesinde LC3 immunpozitif hücreler (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



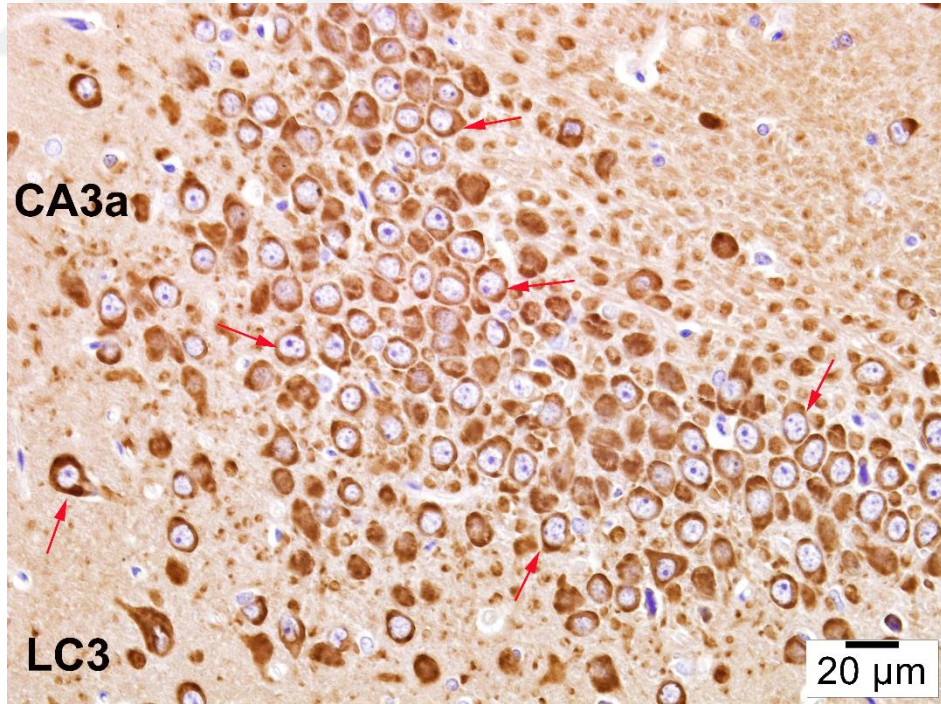
Şekil 4.25. Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde LC3 immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, PSK; Post singular korteks, MK; Motor korteks, SK; Sensorik korteks, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



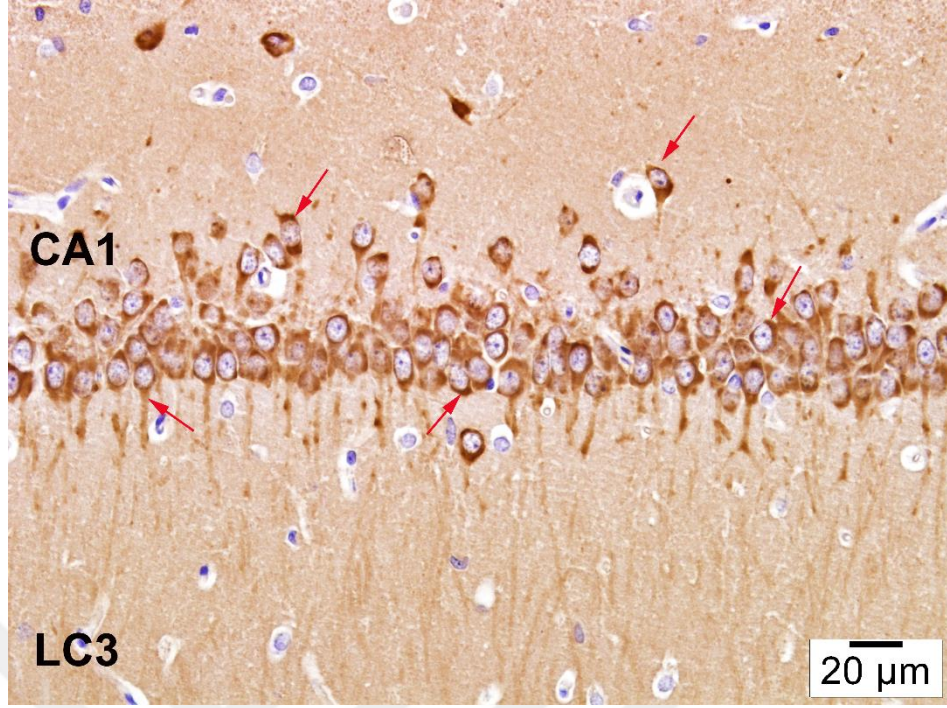
Şekil 4.26. Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde LC3 immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



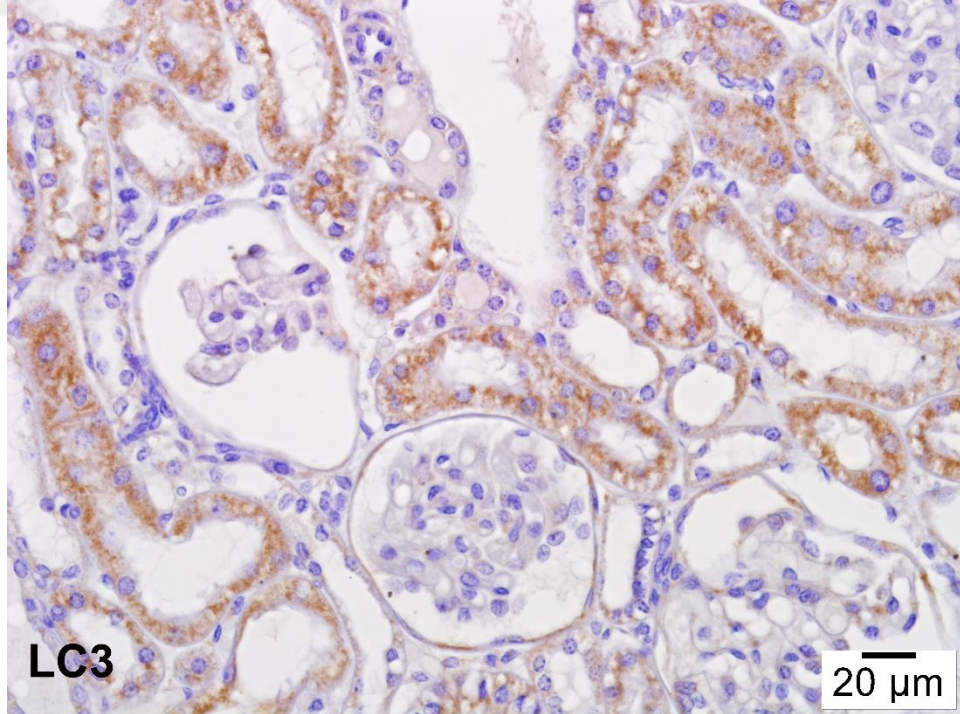
Şekil 4.27. Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde CA3b bölgesinde LC3 pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.



Şekil 4.28. Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde CA3a bölgesinde LC3 pozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.



Şekil 4.29. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde CA1 bölgesinde LC3 pozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μm.



Şekil 4.30. Böbrek dokusunda LC3 immunreaksiyonu, pozitif kontrol, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μm.

4.2.3 AMPK immunreaktivitesi:

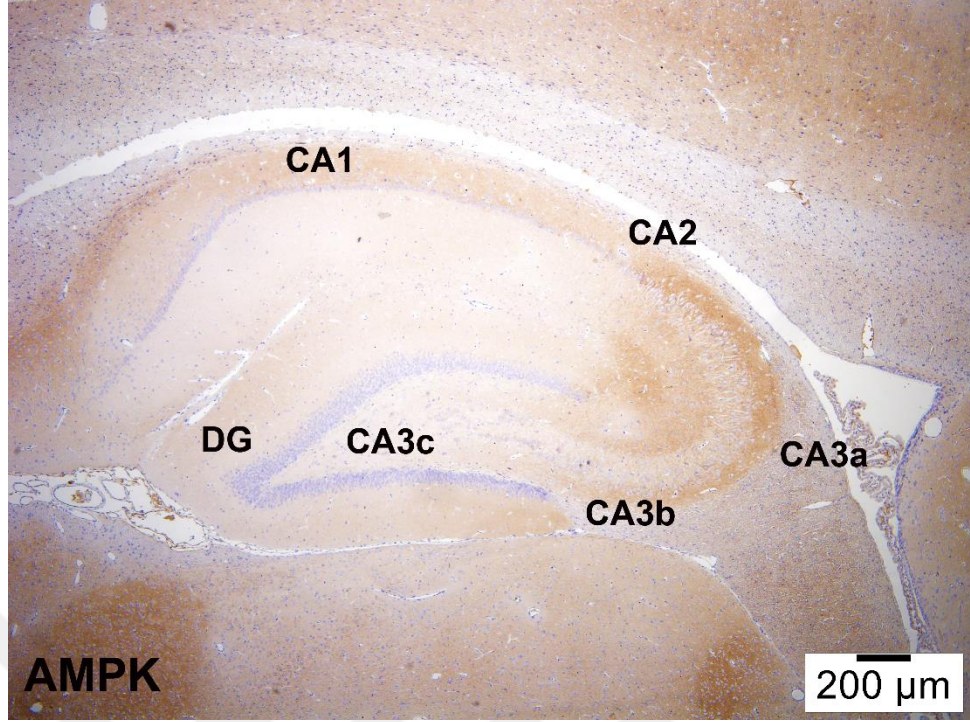
Sıçan beyinlerinin hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki AMPK immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-AMPK primer antikorları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir.

Yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de diabetik gruptaki hayvanların hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki bazı nöronların hücre mebranlarında ve az olmak şartıyla membrana yakın sitoplazmalarında AMPK pozitif reaksiyon gözlemlendi.

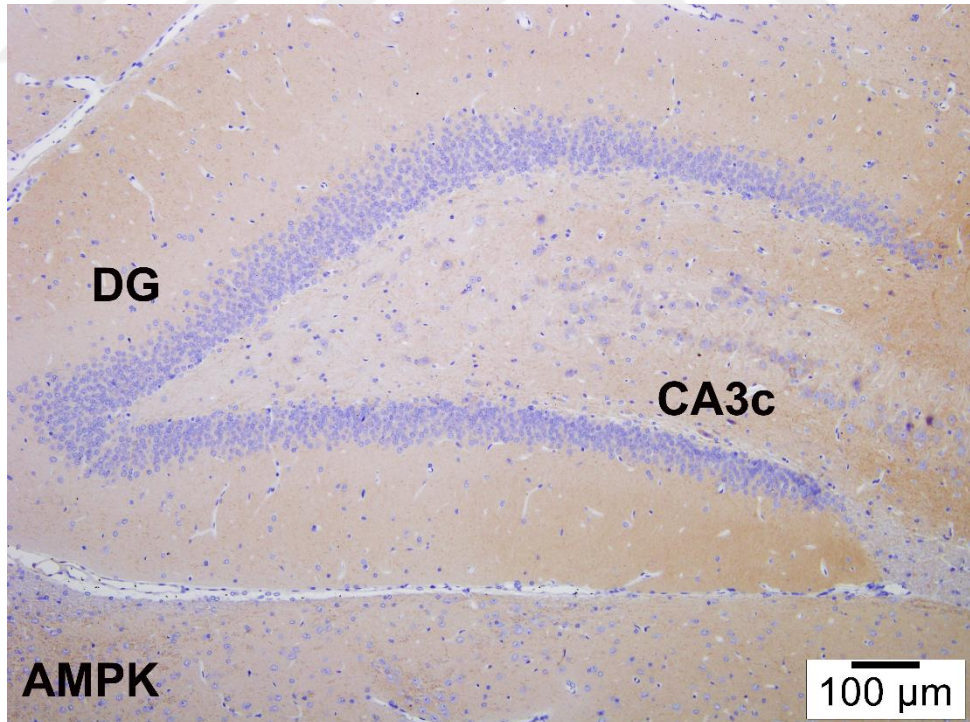
Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi sonucunda diabetik gruptaki sıçanların hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis gibi yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlenmedi ($P>0,05$).

Ayrıca, hipokampuslerin dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre diabetik gruptaki hayvanların bu korteks bölgelerindeki katmanlarda beclin-1 ve LC3 için yapılan boyamalarda olduğu gibi nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti.

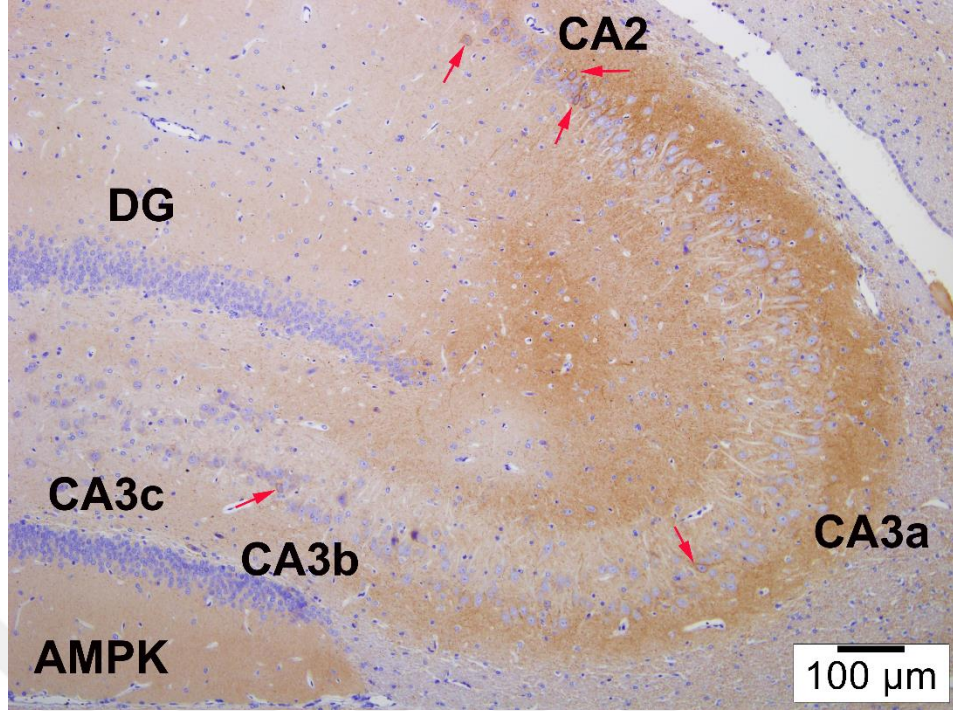
Çalışmada AMPK immunoreaktivitesinin kontrolü için pozitif kontrol olarak sıçan dilindeki iskelet kası ve kolon dokusu örnekleri kullanılmıştır.



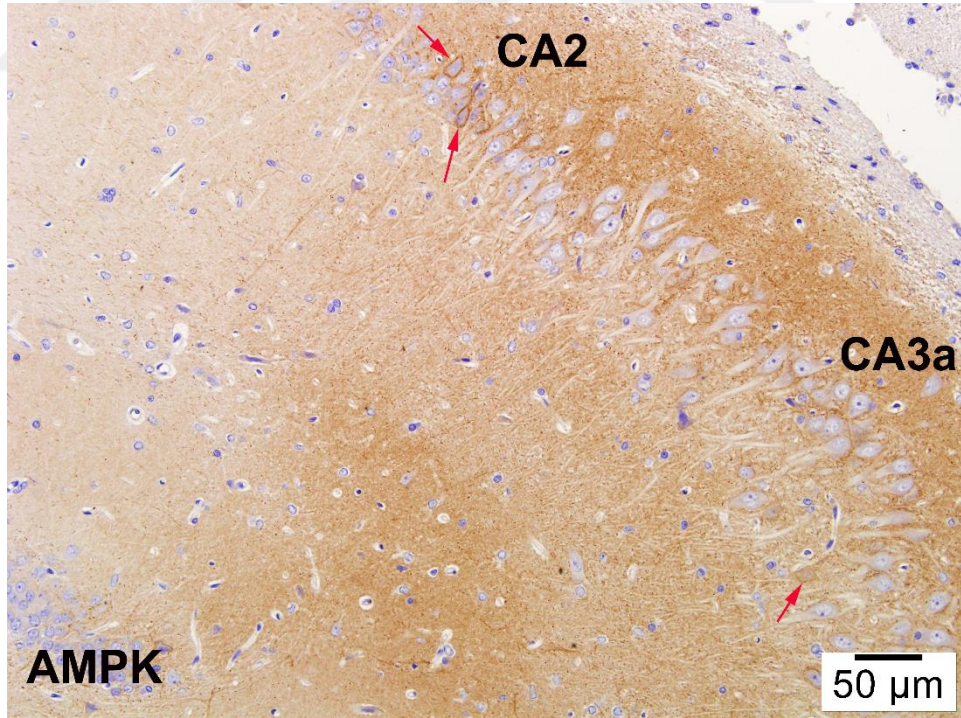
Şekil 4.31. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde AMPK immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



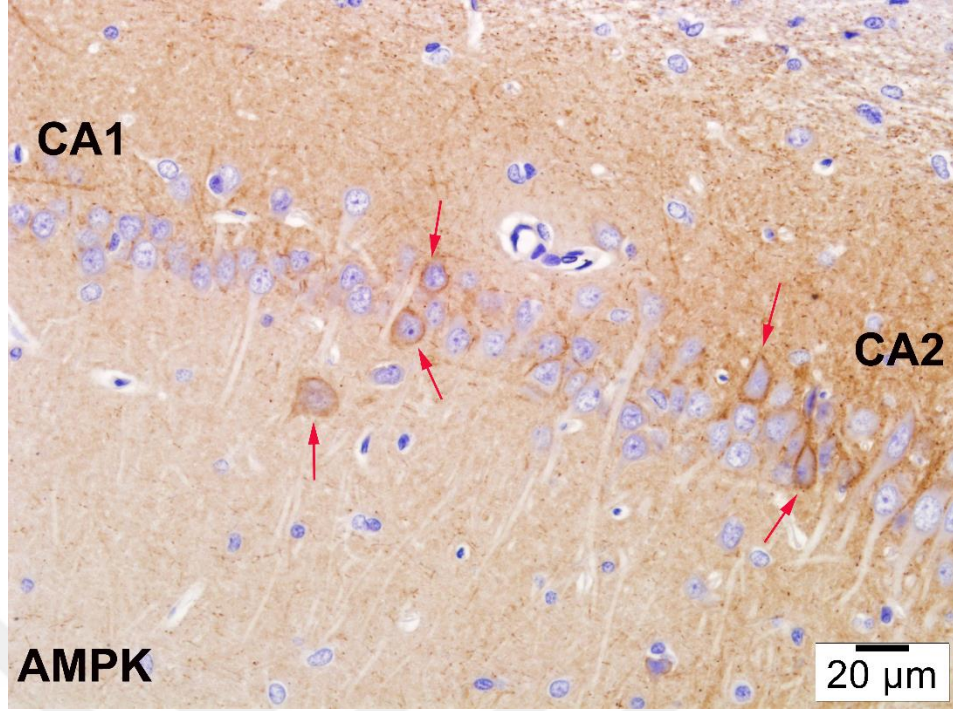
Şekil 4.32. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsü'nün dentat girusunda AMPK immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



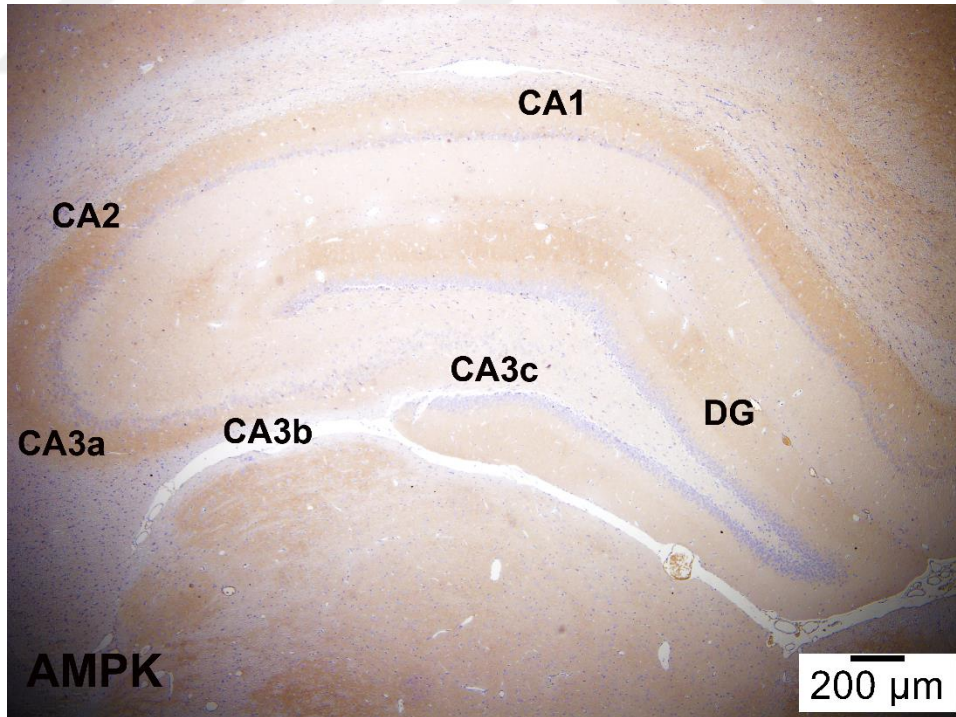
Şekil 4.33. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



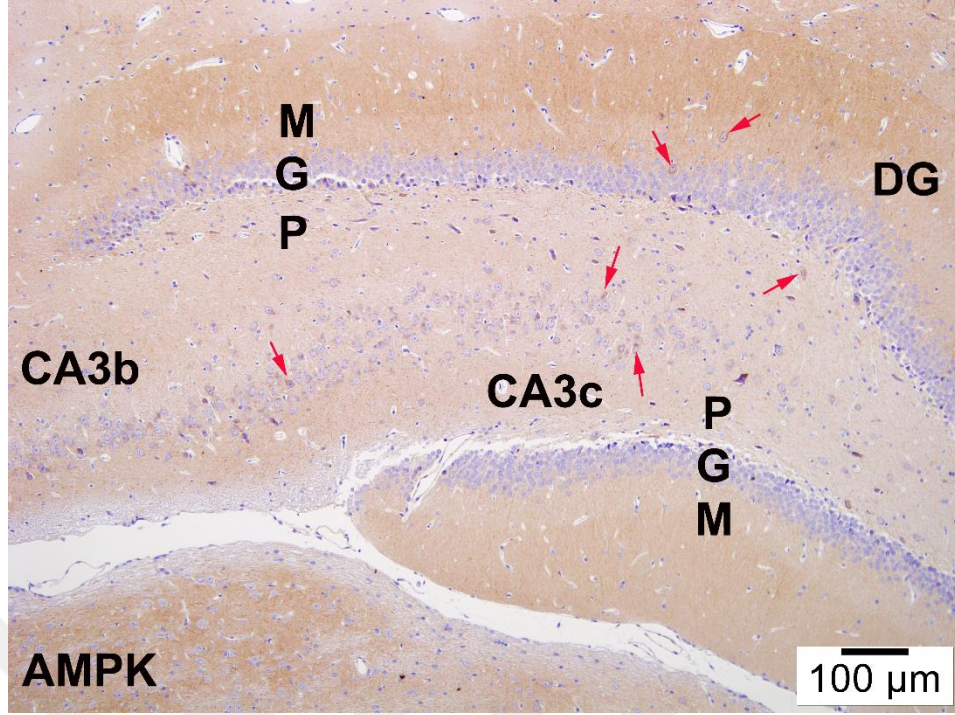
Şekil 4.34. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde CA2 ve CA3a bölgelerinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



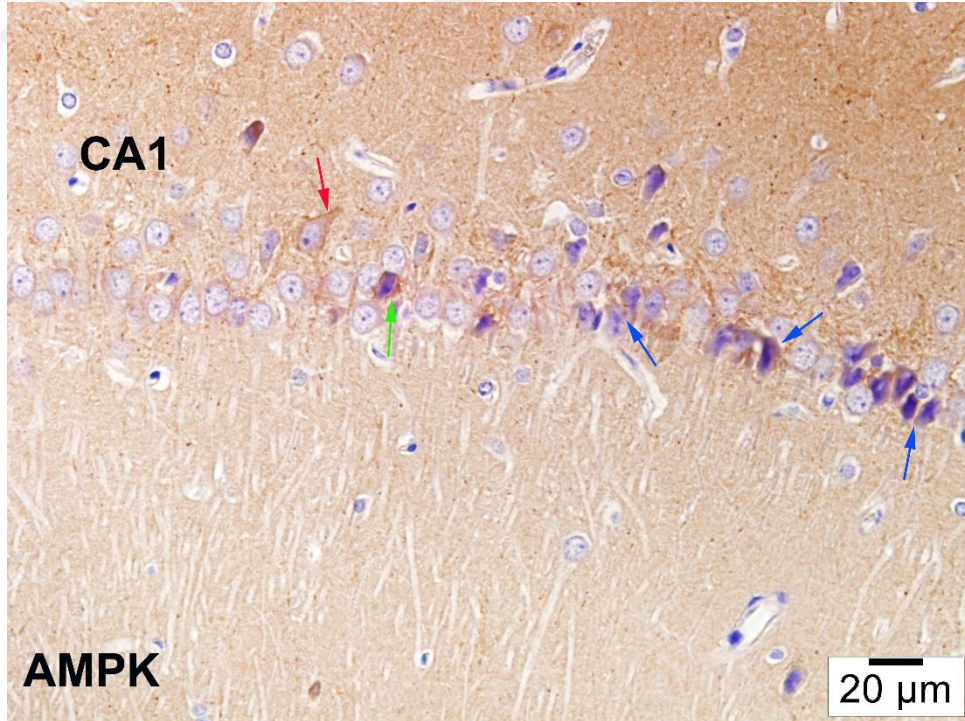
Şekil 4.35. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde CA1 ve CA2 bölgelerinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



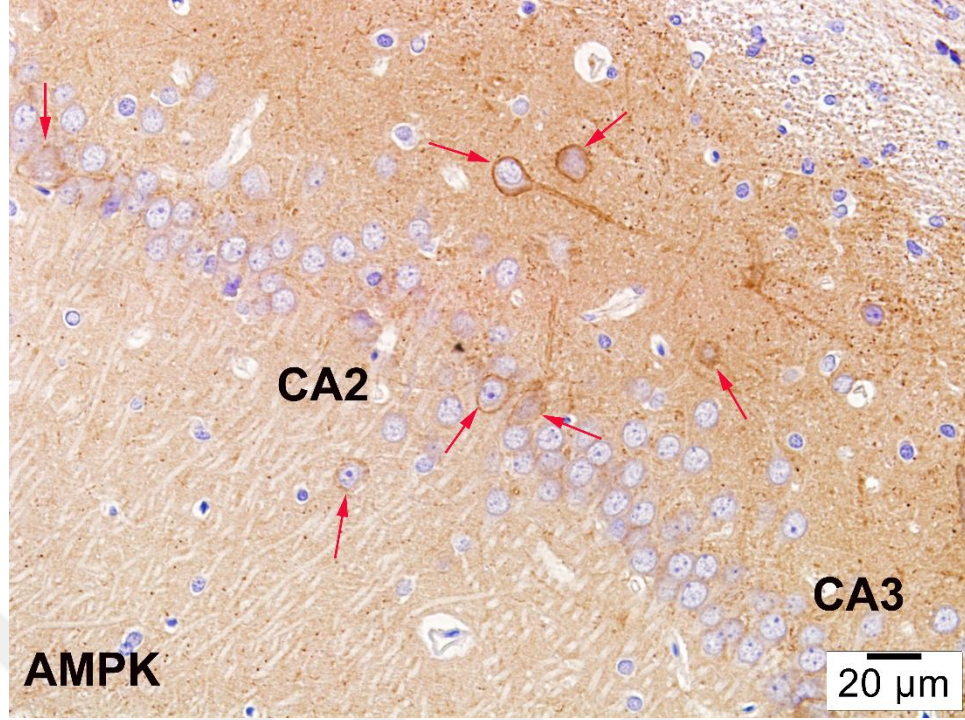
Şekil 4.36. Diyabet grubu hayvanların hipokampüsünde AMPK immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



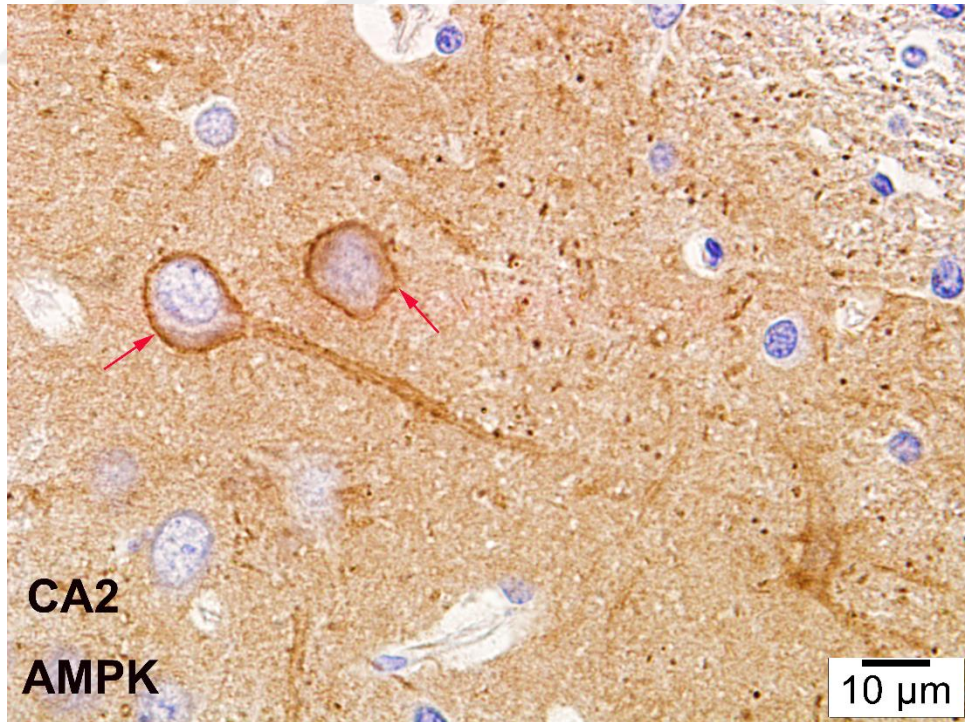
Şekil 4.37. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün dentat girusunda AMPK immunreaktivitesi (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



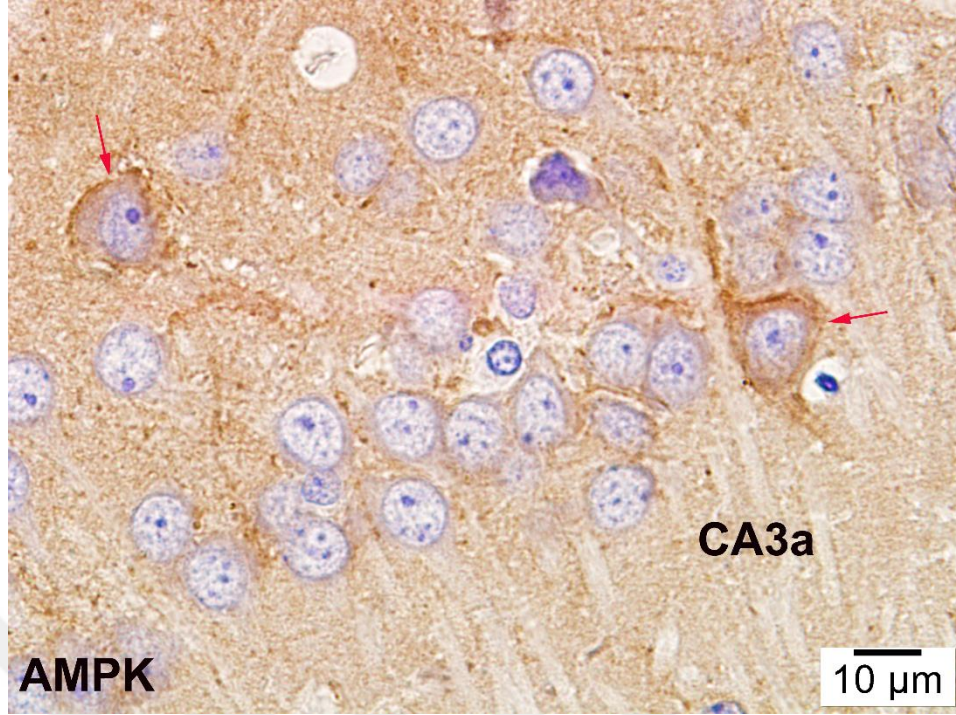
Şekil 4.38. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün CA1 bölgesinde bir AMPK pozitif hücre (kırmızı ok), bir nörodejeneratif nöron (yeşil ok) ve dark nöronlar (mavi oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



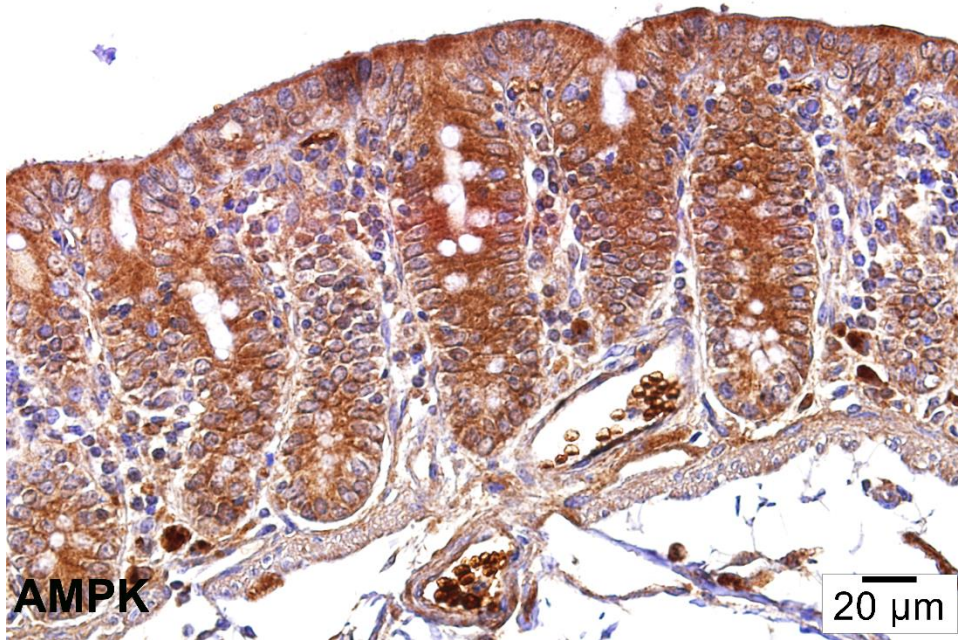
Şekil 4.39. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün CA2 bölgesinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.40. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün CA2 bölgesinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 10 µm.



Şekil 4.41. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünün CA3a bölgesinde AMPK pozitif hücreler (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 10 µm.



Şekil 4.42. Kolonda AMPK immunreaktivitesi, pozitif kontrol, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.

4.2.4. mTOR immunreaktivitesi:

Sıçan beyinlerinin hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki mTOR immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-mTOR primer antikoları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir.

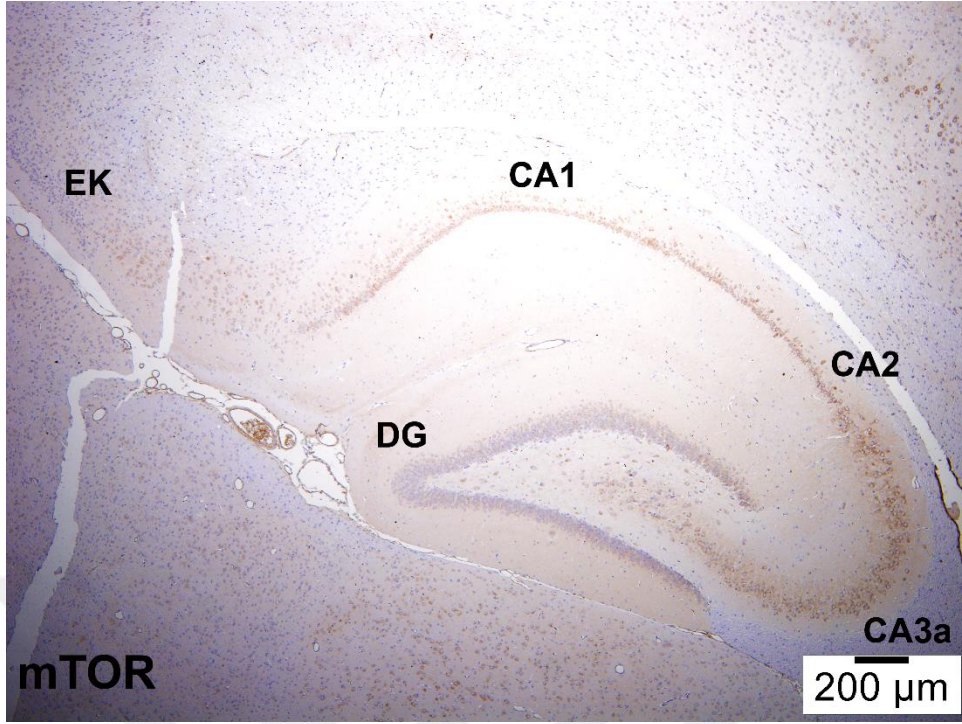
Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de diyabetik gruptaki hayvanların beyinlerinin hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki nöronların sitoplazmalarında mTOR pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, mTOR immunreaktivitesinin hem kontrol hem de diyabetik gruptaki nöronların sitoplazmalarında yoğun bir boyanmanın olduğu dikkati çekti.

Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin J-image programı ile değerlendirilmesi sonucunda diyabetik gruptaki sıçanların beyinlerinin hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis gibi yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P<0,05$). Diyabet grubunda mTOR boyanma alan yoğunluğunda azalma vardı.

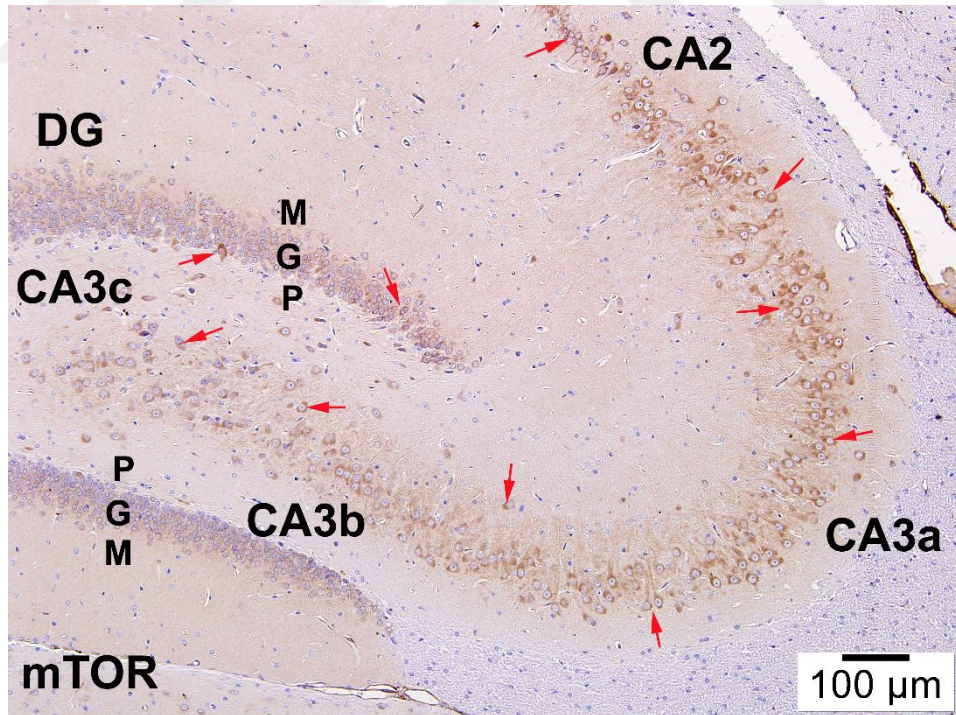
Ayrıca, hipokampuslerin dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre diyabetik gruptaki hayvanların bu korteks bölgelerindeki katmanlarda mTOR immunpozitif nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti.

Çalışmada mTOR immunreaktivitesinin kontrolü için pozitif kontrol olarak sıçan böbrek ve akciğer dokusu örnekleri kullanılmıştır.

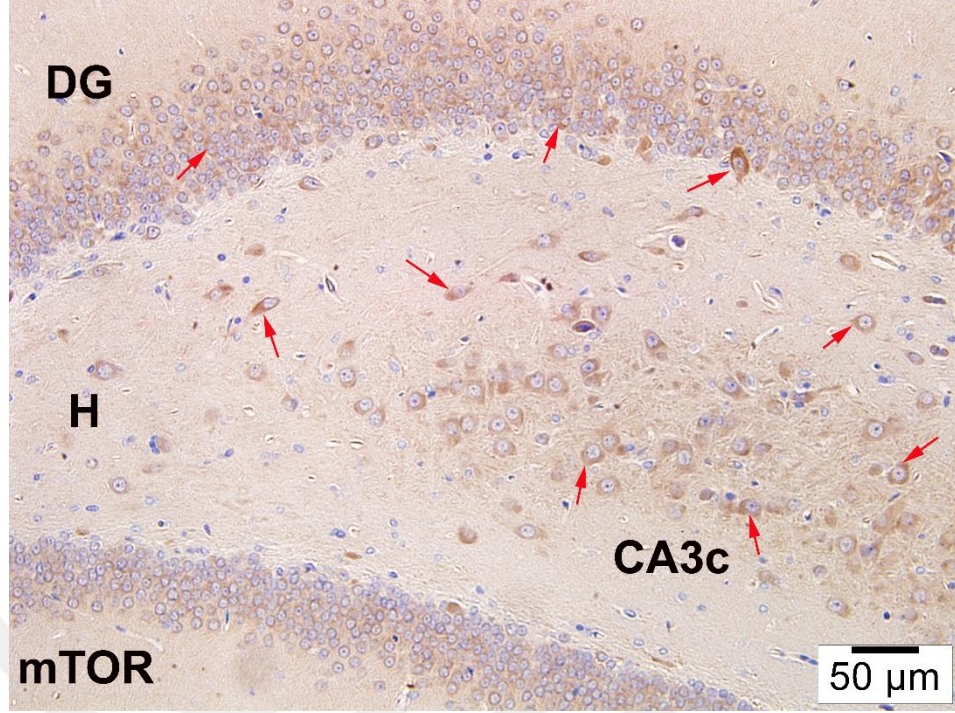
Tüm immunohistokimyasal boyamaların kalitatif değerlendirmeleri Tablo 4.1, kantitatif değerlendirmeleri ise Şekil 4.54’de gösterilmiştir.



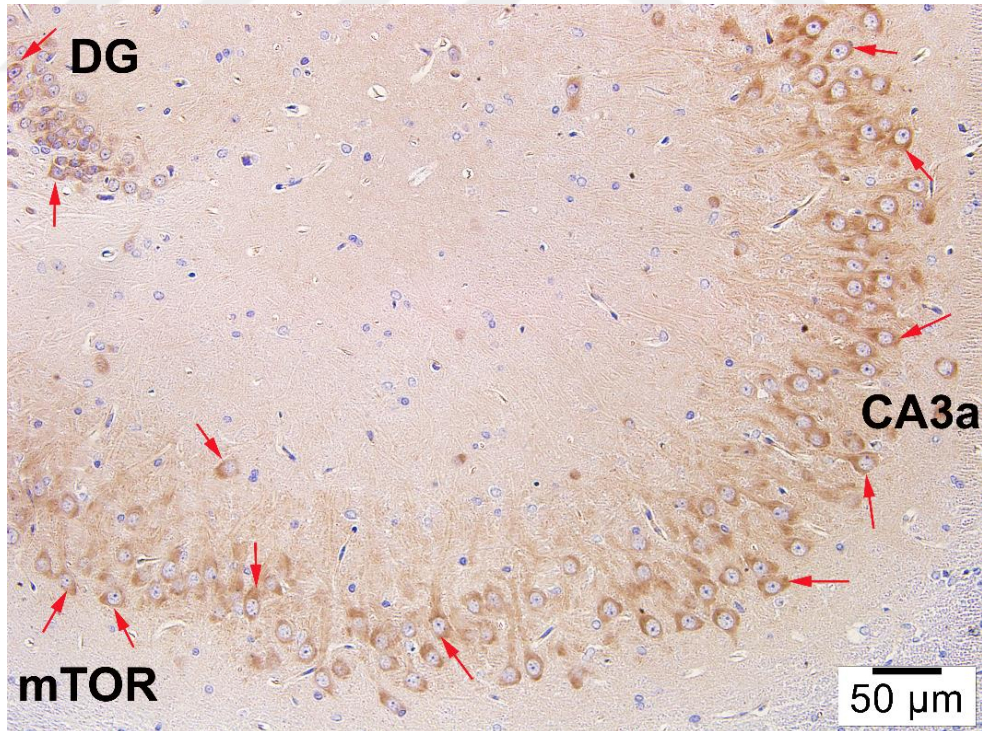
Şekil 4.43. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde mTOR immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, EK; Entorinal korteks, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



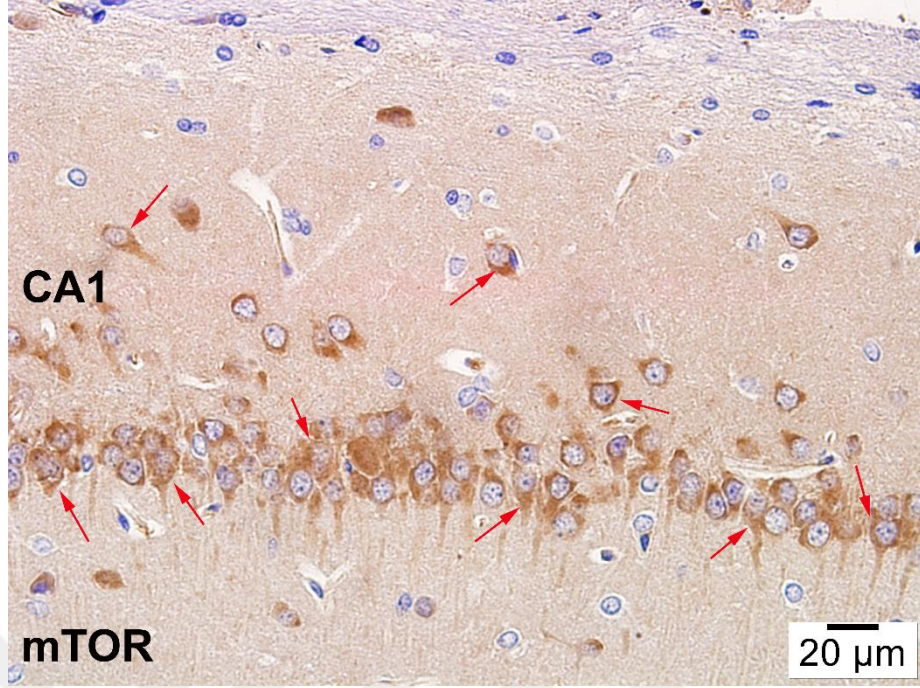
Şekil 4.44. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



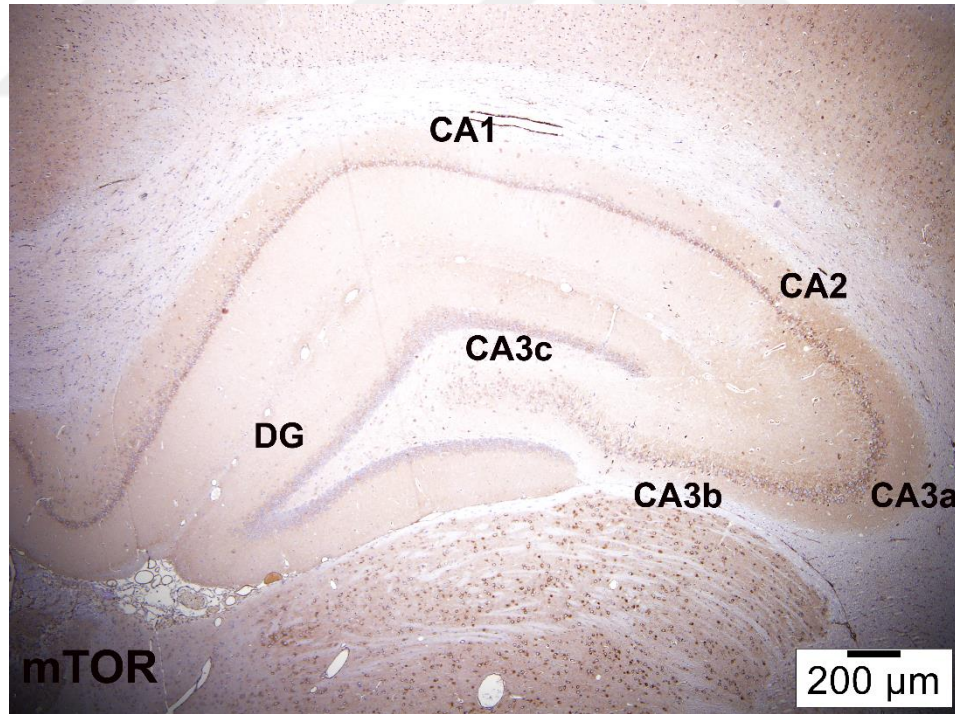
Şekil 4.45. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünün girus dentatusunda mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Korni ammonis, H; Hilus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 μ m.



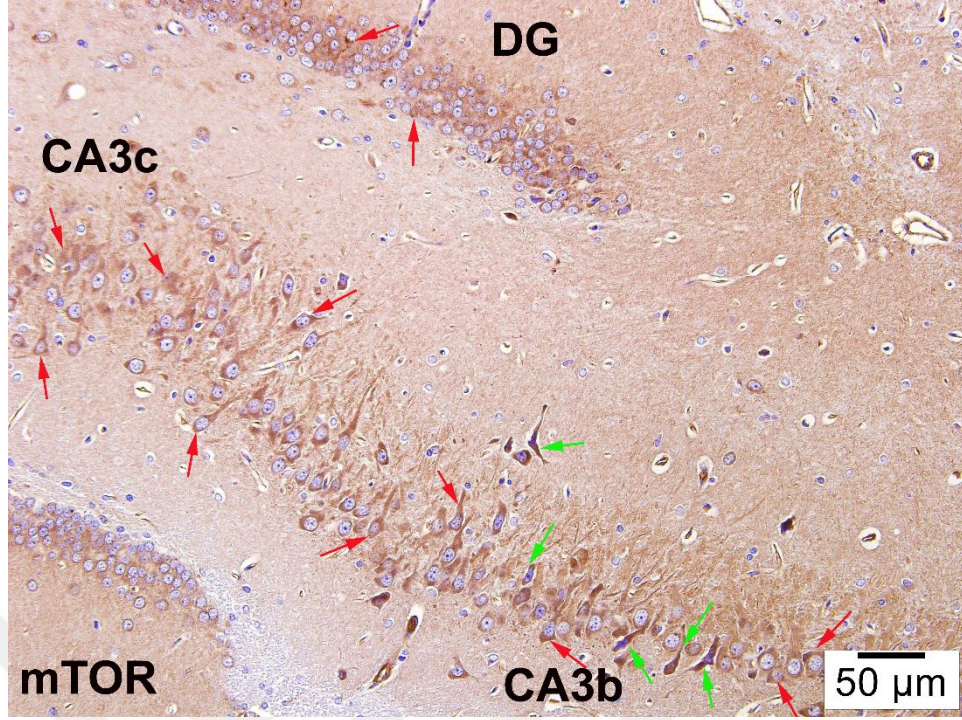
Şekil 4.46. Kontrol grubu hayvanların hipokampüsünün DG ve CA3a bölgelerinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar), DG; Dentat girus, CA; Korni ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 μ m.



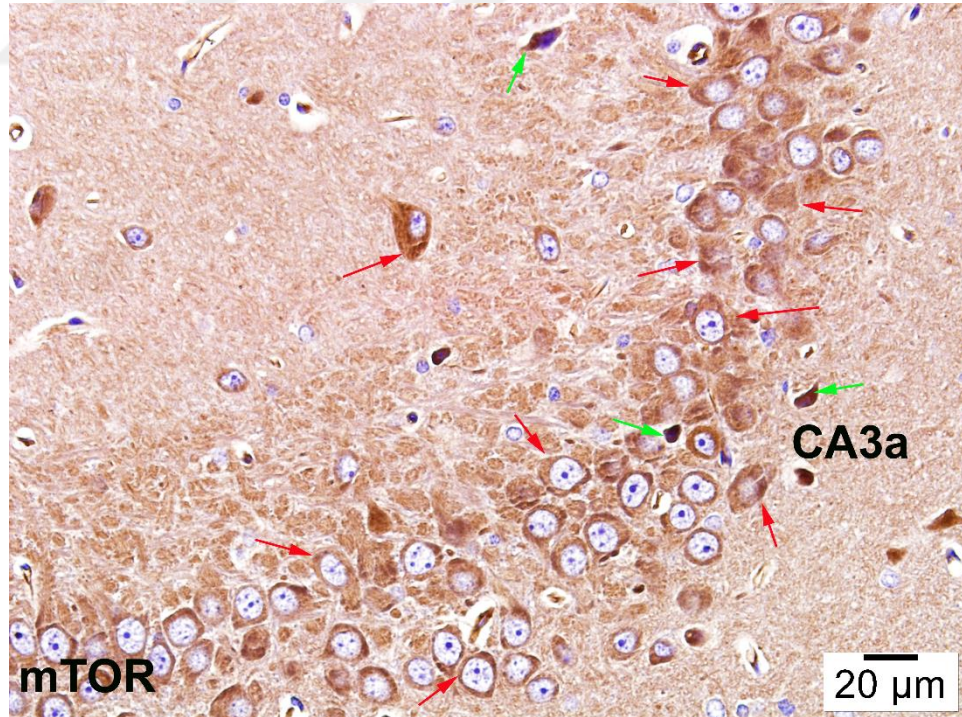
Şekil 4.47. Kontrol grubu hayvanların hipokampusunun CA1 bölgesinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.



Şekil 4.48. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde mTOR immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 μ m.



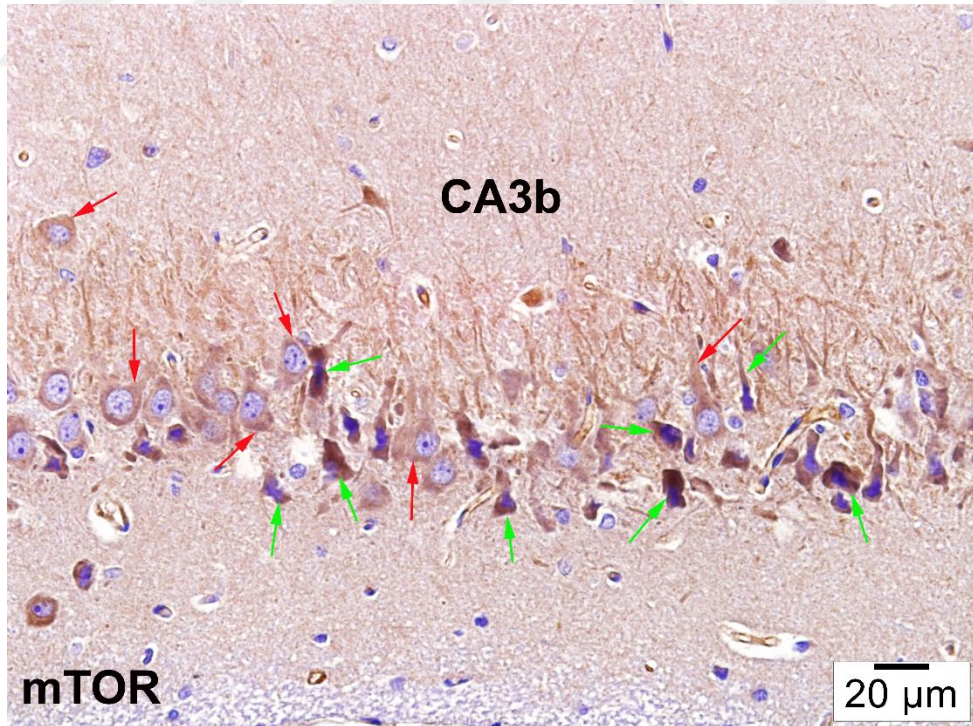
Şekil 4.49. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil oklar), DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 μ m.



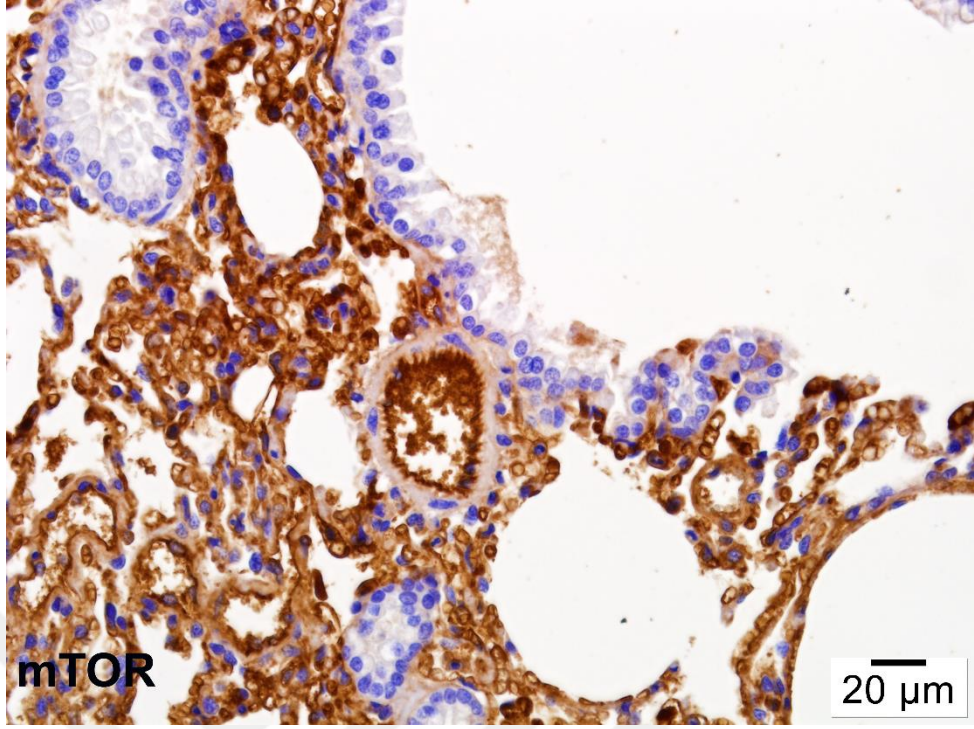
Şekil 4.50. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde CA3a bölgesinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 μ m.



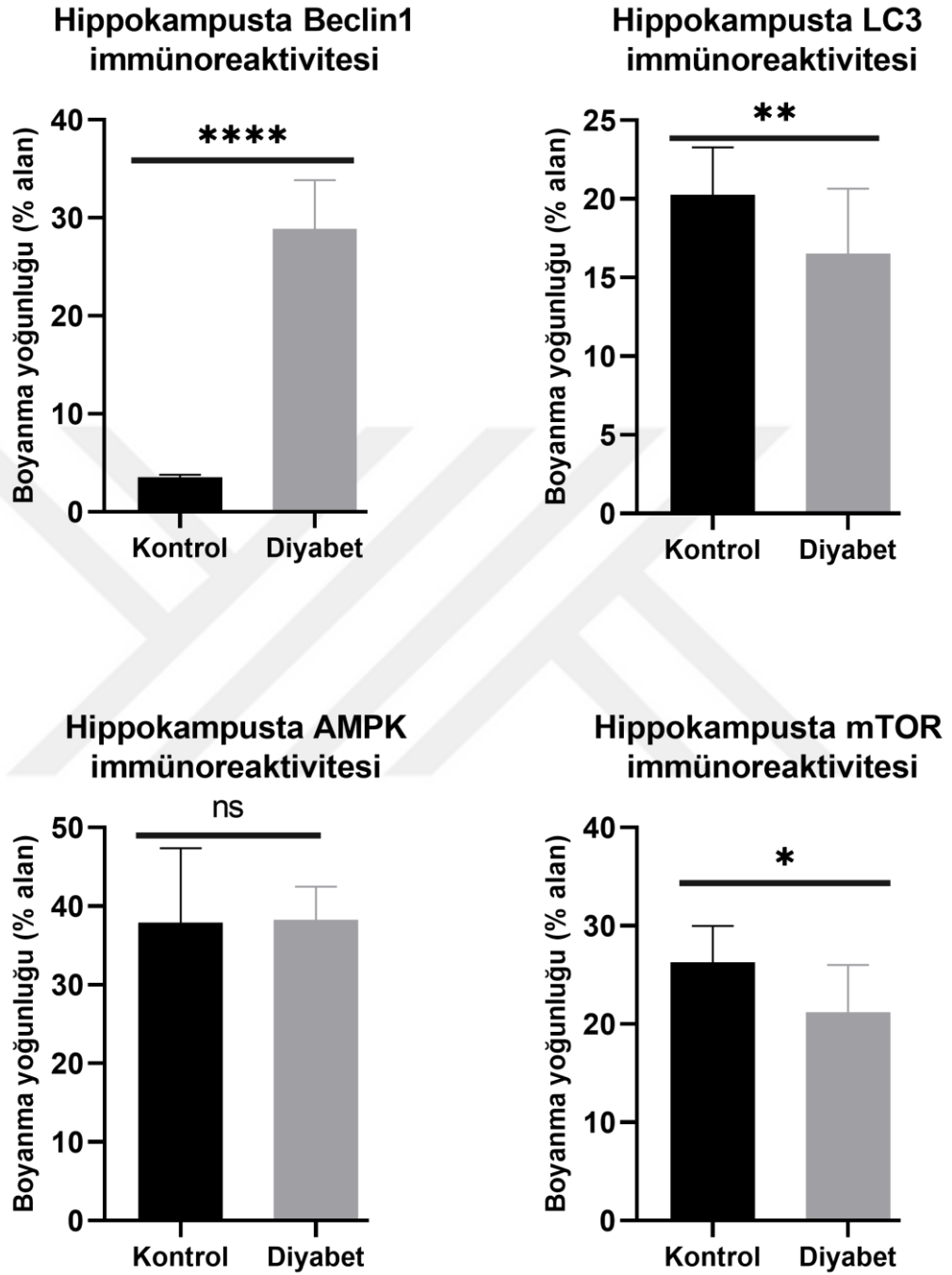
Şekil 4.51. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde CA1 bölgesinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif bir nöron (yeşil ok), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.52. Diyabet grubu hayvanların hipokampusünde CA3b bölgesinde mTOR pozitif nöronlar (kırmızı oklar) ve nörodejeneratif nöronlar (yeşil oklar), CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.53. Akciğer dokusunda mTOR immunreaktivitesi, pozitif kontrol, Strept-
avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.54. Kontrol ve diyabetli sıçanların Hipokampuslerinde Beclin1, LC3, AMPK ve mTOR'un immunohistokimyasal ekspresyonları. Image J görüntüleri ile elde edilen boyanma alan yoğunlukları ($P < 0,05$).

Dentat girus		Kornu ammonis				
GRUP	DG	CA1	CA2	CA3a	CA3b	CA3c
Kontrol	Beclin 1	n:- s:+ np:-	n:- s:+ np:-	n:- s:+ np:-	n:- s:+ np:-	n:- s:+ np:-
	LC3	n:- s:++ np:-	n:- s: ++ np:-	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-
	AMPK	n:- s:+ np:++	n:- s: + np:++	n:- s:+ np:++	n:- s:+ np:++	n:- s:+ np:++
	mTOR	n:- s:+++ np:-	n:- s:+++ np:-	n:- s:+++ np:-	n:- s:+++ np:-	n:- s:+++ np:-
Diyabet	Beclin 1	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-
	LC3	n:- s:++ np:-	n:- s: ++ np:-	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-
	AMPK	n:- s:+ np:++	n:- s: + np:++	n:- s:+ np:++	n:- s:+ np:++	n:- s:+ np:++
	mTOR	n:- s:++ np:-	n:- s: ++ np:-	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-	n:- s:++ np:-

n:çekirdek, s:sitoplazma, np: nöropil, -;negatif boyanma, +;zayıf boyanma, ++;orta boyanma, +++; güçlü boyanma.

Tablo 4.1. Kontrol ve Diyabetik sıçanların hipokampuslerinde DG ve KA bölgelerinde otofaji ile ilişkili proteinleri immunohistokimyasal lokalizasyonları ve boyanma yoğunlukları.

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Diyabet, artmış kas yıkımına yol açan hiperkatabolik sendroma bir örnek olup, oksidatif stres ile bir arada yürüyen bir hastalıktır. Diyabet santral sinir sistemini de etkileyen bir hastalıktır. Otofajinin diyabet veya metabolizmadaki rolü henüz net olmaktan uzaktır ve bu nedenle diyabetik komplikasyonların patogeneğinde ofofajinin rolü şu anda yoğun bir araştırma altındadır. Kronik hiperglisemi ile karakterize olan diyabetes mellitus (DM) kognitif fonksiyon bozuklukları da dahil santral sinir sistemini de etkileyen bir hastalıktır. Bu tez çalışmasında diyabete bağı olarak şekillendiğı bilinen bilişsel bozukluklarda ofofajik mekanizmalardaki değışikliklerin rolünün olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır. Yapılan tez çalışmasında, üç grupta olan sıçanların açlık kan glukoz seviyeleri ve vücut ağırlıkları deneyden önce benzer olarak gözlemlendi. Kan glukoz seviyeleri ortalama olarak da gösterilen şekildedir. Diabetik hayvanlar, deney süresince hiperglisemik bir durumda kaldı. Ancak sitrat grubu (Sham grubu) ve diğerkontrol grubundaki deneklerin kan glukoz düzeylerinde herhangi bir değışiklik saptanmadı. Her iki gruptaki sıçanların vücut ağırlıkları, deney süresi boyunca zamanla arttı. STZ enjeksiyonundan sonraki ilk haftanın sonunda, diyabet olan sıçanların kan glukoz değeri, kontrol ve sitrat grubuna göre yükselmişti. Bu sonuçlar, bu çalışmada kullanılan Tip 2 diyabet sıçan modelinin geçerliliğini doğrulamıştır. Sitrat grubu ve kontrol grubu arasında dokuların incelenmesi açısından da bir fark görülmemiştir. Bu nedenle mikrobik incelemelerde sitrat ve kontrol grubu ortak tek bir kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın başlangıcında sıçanların vücut ağırlık ortalamaları yaklaşık olarak 180-200 g arasındaydı. STZ ile indüklenerek deneysel diyabet oluşturulan Grup 2’de çalışma sonunda vücut ağırlık artışının kontrol grubuna (Grup 1) göre önemli düzeyde düşük olduğu ($P>0.05$) diğerkruplarda ise hafif azaldığı belirlendi ($P>0.05$). Kim ve ark., (1994) tarafından yapılan çalışmada

yüksek enerjili bir diyetle birlikte düşük dozda streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlara grubu arasında canlı ağırlıkta artış, vücut kitle indeksinde artış ve bel çevresinde kalınlaşmanın olduğu 6 hafta sonunda kontrol grubundaki ağırlık artışı %49.12 iken DC grubundaki sıçanlarda ağırlık artışı %48.02 düzeyinde olduğunu belirlendi (Kim ve ark., 1994). Stratton ve ark., (2001) tarafından yapılan çalışmada erkek wistar albino sıçanlarda diyabet oluşturmak için 65 (mg/kg) streptozotosin (STZ) verildiği bildirilmiştir. Çalışma sonunda sitrat grubunda % 8.1 oranında canlı ağırlıkta artma olduğu çalışma sonunda % 11.40 oranında canlı ağırlıkta artış olduğu görüldü. Essa ve ark., (2011) yaptıkları bir çalışmada Wistar Albino erkek sıçanlara 6 hafta yüksek yağlı diyet ile beslenip streptozotosin (STZ) 50 mg/kg uygulanıp diyabet oluşturdular. Çalışma sonunda sırayla kan glukoz seviyeleri düşük, orta ve yüksek doz gruplarında sırasıyla %25.7, %36.0 ve %38.6 azaldığı belirlendi. Yaptığımız çalışmada, deney sonunda kontrol gruplarına (Grup 1) göre diyabet grubu (Grup 2)'nin glukoz konsantrasyonunun önemli düzeyde yüksek olduğu saptandı. Bu da çalışmada başarılı bir şekilde deneysel diyabet oluşturulduğunu ortaya koymuştur.

Otofaji, artık gerekli olmayan veya hasar görmüş hücresel bileşenler için lizozom aracılı bir bozunma süreci olarak tanımlanır. Fizyolojik olarak organel biyogenezi, protein sentezi ve bunların temizlenmesi için gerekli olan otofaji, yanlış katlanmış proteinleri ortadan kaldırmak ve proteostazı sürdürmek için gerekli ve önemli hücre içi mekanizmalardan biridir. Yetersiz bir otofajinin çoğu nörodejeneratif hastalıklarda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir ve bu nedenle otofajinin düzenlenmesi bu hastalıklar için potansiyel bir terapötik yolak olarak önerilmektedir. Makrotofaji Yunanca'da uzun ömürlü proteinlerin ve proteazomun bozunamayacağı kadar büyük hasarlı organellerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan "kendi kendine yemek" anlamına gelir. Birçok çalışma, otofajinin nörodejeneratif hastalıklarla yakından bağlantılı olduğunu göstermiştir. Örneğin; otofaji sürecinde bir ara veziküler bölme olan otofajik vakuollerin miktarı, nörodejeneratif hastaların beyinlerinde sağlık kontrollerine göre çok daha fazla olarak tespit edilmiştir (Guo ve ark., 2018; Liman ve Suna, 2017; Menzies, 2015).

1955'te biyolog ve Nobel Ödülü sahibi Christian de Duve, hücrelerin hidrolitik enzimlerle dolu özel organellere sahip olduğunu keşfetti ve bu organeli lizozom adını Guiseppe Fortunmo Francesco verdi. 1990'larda, otofaji yolunun temel genleri,

ekmek mayasındaki genetik tarama çalışmalarıyla tanımlandı ve karakterize edildi. Otofajinin, organel bütünlüğünün korunması, protein kalite kontrolü, stres tepkisinin düzenlenmesi ve bağışıklık yanıtı dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte yer aldığı gösterildi (Arruri ve Vemuganti, 2022; Glick ve ark., 2010; Wollert, 2019; Yang ve ark. 2017).

Otofaji, nöronal homeostaz ve canlılığın düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Otofagozom oluşumu için gerekli çekirdek proteinler olan Atg5 veya Atg7'nin, sinir sisteminde genetik olarak etkisizleştirilmesi, akson şişmesine ve nöron ölümüne neden olmak için yeterlidir. Nöronal kayıp, serebral korteks ve hipokampustaki piramidal hücrelerde ve en belirgin şekilde serebellumun Purkinje hücre katmanında gözlenmiştir. Otofaji kaybı ayrıca, nöronları çevreleyen glia içinde değil, spesifik olarak nöronlar içinde ubikuitin-pozitif agregatlarda ilerleyici bir artış ile ilişkilidir (Guo ve ark., 2018; Kulkarni ve Maday, 2018, Kulkarni ve ark., 2020; Lee ve ark., 2019; Maday ve Holzbaur, 2016; Yue ve ark., 2008).

Beyin, yüksek oksijen tüketim oranı, bol lipid içeriği ve diğer dokulara kıyasla antioksidan enzimlerin görece azlığı nedeniyle özellikle oksidatif hasara karşı savunmasızdır. Nöronal hücreler özellikle oksidatif hareketlere duyarlıdır ve bu nedenle reaktif oksijen türleri (ROS) diyabetes mellitus gibi birçok nörodejeneratif süreçte rol oynamaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında ROS üretimi ile antioksidan mekanizmalar arasında bir denge olmasına rağmen, diğerlerinin yanı sıra antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalması nedeniyle yaşanan dokularda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. İnsülin en iyi, periferik dokularda glukoz metabolizmasının düzenlenmesindeki rolüyle bilinmesine rağmen, bu hormon aynı zamanda karmaşık insülin / insülin reseptörü (IR) sinyal yolları yoluyla biliş, hafıza ve sinaptik plastisite dahil olmak üzere birçok beyin fonksiyonunu da etkiler. Bu nedenle, hem periferik sinir sistemi hem de merkezi sinir sistemindeki nöronal fonksiyonun birçok yönünde insülinin önemli rolü göz önünde bulundurulduğunda, insülin sinyalinde bozulma olması oldukça olasıdır (de Mello ve ark., 2019; Gao ve ark., 2022; Muriach 2014; Rehni ve Dave, 2018).

Beyin, insülinin klasik bir hedef organı olarak sayılmasa da, son zamanlarda bu polipeptid hormonunun insan nörofizyolojisinde ve çeşitli merkezi sinir sistemi

hastalıklarında insülin reseptör sinyalinin düzensizliğinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. İnsülinin, reseptör aracılı endositoz yoluyla kan beyin bariyerini aşabildiği uzun zamandır bilinmektedir. Dahası, birçok beyin bölgesinin *in situ* insülin üretebildiği ortaya çıktı. İnsülin reseptörü ve insülin reseptörü substratı-1 (IRS1), hipotalamus, amigdalada, hipokampusta ve neokorteksteki nöronlarda eksprese edilir. Bu ifade modeline dayanarak, beyin insülin sinyal iletimi nörotransmisyon, beslenme ve bilişsel işlevlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Abdul-Rahman ve ark., 2012; Huang ve ark., 2010).

Biriken kanıtlar, otofajini nöronal disfonksiyon ve nörodejenerasyona katkıda bulunduğunu göstermektedir. Yapılan bu tezde, streptozotosin (Stz) ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda hipergliseminin hipokampus beyin dokusunda AMPK α 1, Mtor, Beclin-1 gibi otofaji ile ilişkili çeşitli proteinlerin ve otofagozom oluşumunda önemli rol oynayan LC3'ün ekspresyon düzeylerini değiştirip değiştirmediğinin; eğer değiştiriyorsa bu değişimin otofajinin indüklenmesi veya baskılanması yönünde olup olmadığının ve otofajinin indüklenmesinde AMPK sinyal yolağının rol oynayıp oynamadığının araştırılması hedeflenmiştir.

Beclin-1, bir BH3 alanı, bir sarmal alan ve bir C-terminal alan içerir ve 52 kDa'lık ve Atg6 olarak da bilinen prootofajik bir protein molekülüdür. Başlangıçta memelilerde etkileşen, Bcl-2 olarak tanımlanan Beclin-1 otofaji ve protein sınıflandırması dahil olmak üzere birkaç anahtar hücresel yolda önemli rol oynar (Liang ve ark., 1998). Bu alanlar, beclin 1'in çeşitli bağlanma ortaklarını bir araya getirmek için bir iskelet görevi görmesine izin veren protein etkileşimlerine aracılık eder (He ve Levine, 2010). Beclin 1, sınıf III Vps34 fosfatidilinositol 3-kinaz (PtdIns3K) kompleksini bağlayan ve otofaji başlangıcı sırasında stabilitesini ve kinaz aktivitesini düzenleyen temel bir otofaji proteinidir. Otofajide vezikül başlatma, uzama, füzyon ve bozunmanın ardışık adımlarını düzenleyen moleküler makine mayada tanımlanmıştır. Beclin-1 vezikül çekirdeklenmesini teşvik ederek otofajiyi başlatmaya yardımcı olur. Beclin 1'in maya ortologu olan Atg6'dan yoksun hücreler, besin açlığı altında otofajik vezikülleri biriktiremezler (Kuramoto ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2016).

Beclin 1 ve Atg14 arasındaki etkileşimi bozmak, otofajiyi inhibe etmek için yeterlidir. Beclin 1'in otofajideki rolünün, hastalıkla ilgili bir dizi süreç için önemli olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar, AD beyin dokusunda beclin-1 seviyelerinin azaldığını ortaya konulmuştur. Amiloid öncü proteini (APP) aşırı eksprese eden fareler, beclin-1 eksikliği olan farelerle karşılaştırıldığında, hastalığın iki temel patolojik özelliği olan artmış Ap birikimi ve sinaptik kaybı gözlemlenmiştir. Nöronlarda beclin-1'in yıkılması, hem toplam APP hem de Ap seviyelerini artırır. Tersine, artan beclin-1 seviyeleri, hem AD hem de Parkinson Hastalığının fare modellerinde nöronları korur. Bu veriler Beclin 1-aracılı fonksiyonların nörodejenerasyona karşı korumada önemli bir rol oynadığını göstermektedir (O'Brien ve Coray, 2014; Kuramoto ve ark., 2021). Guan ve ark., (2016) farelerde stz ile deneysel diabetes oluşturdukları çalışmalarında kontrol grubuna göre diabetik farelerin hipokampus ve amigdalalarında beclin-1 ekspresyonunun arttığını belirlemişler ve beclin-1 aracılı otofajinin özellikle yaşlı diabetik farelerin kognitif ve affektif bozukluklarında önemli bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

Sunulan çalışmada, sıçan beyin hipokampuslarının girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerinde Beclin-1 immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-beclin-1 primer antikoru uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir. Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de diabetik gruptaki hayvanların hipokampuslarının girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların sitoplazmalarında beclin-1 pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, beclin-1 immunreaktivitesinin diabetik gruptaki nöronların sitoplazmalarında kontrol gruplarına göre daha yoğun bir boyanmanın olduğu dikkati çekti. Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi sonucunda diabetik gruptaki sıçanların hipokampuslarının girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P < 0,05$). Ayrıca hipokampusların girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre diabetik gruptaki hayvanların bu hipokampus bölgelerindeki yapılarda nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti. Bu elde edilen

veriler ışığında, Guan ve ark., 2016 ve arkadaşlarının diabetik farelerin hipokampus ve amigdalalarında belirledikleri beclin-1 ekspresyonundaki artışa benzer olarak biz de çalışmamızda diabetik sıçanların hipokampuslarındaki nöronlarda immunohistokimyasal boyanma açısından beclin-1 immunreaktivitesinde artış belirledik. Bu da bize, çalışmamızda deneysel olarak stz ile oluşturulan diabetik sıçanlarda beclin-1 aracılı bir otofajinin gerçekleştiğini göstermiştir.

LC3, Atg8 mayasının bir otofagozomal ortologudur. LC3'ün lipitlenmiş bir formu, LC3-II, memelilerde bir otofagozomal belirteç olduğu gösterilmiştir ve nörodejeneratif ve nöromusküler hastalıklarda, otofajiyi incelemek için kullanılmıştır (Tanida ve ark., 2004). Otofaji süreci, LC3 yani sitosolik formunun lipidasyonunu içerir. LC3-I, nispeten spesifik olarak tamamlanmış otofagozomlarda bulunan LC3-II'yi oluşturmak için fagofor üzerinde bulunur. Otofajinin tamamen işlevsel olduğu koşullar altında, LC3-I, LC3-II'yi oluşturmak üzere lipitlenir, bu da bozunmaya yönelik kargo moleküllerine bağlı her yerde bulunan p62'nin işleme alınmasıyla sonuçlanır. p62-kargo kompleksi daha sonra büyüyen otofagozomlara alınır ve bozunma için lizozomlara iletilir. LC3-II molekülleri daha sonra bu hücrelerde sitozolik LC3-I havuzunu yenilemek için bozunmaya uğrar. Bununla birlikte, LC3-I'nin hücrelerde otofajik bozulma veya tam iptal sonucu biriktiği koşullar altında, p62 agregatları (işlevsiz otofajinin bir sonucu olarak oluşur), otofagozomlara benzeyen yapılar oluşturan fazla LC3-I moleküllerini ayırır. LC3-II molekülleri daha sonra bu hücrelerde sitozolik LC3-I havuzunu yenilemek için bozunmaya uğrar (Glick ve ark., 2010; Kabeya ve ark., 2000; Runwal ve ark., 2019). Guan ve ark., 2016 farelerde stz ile deneysel diabet oluşturdukları çalışmalarında kontrol grubuna göre diabetik farelerin hipokampus ve amigdalalarında beclin-1 ekspresyonunun arttığını belirlemişler ve beclin-1 aracılı otofajinin özellikle yaşlı diabetik farelerin kognitif ve efektif bozukluklarında önemli bir oynadığını ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte LC3 ekspresyonunda diabetik ve kontrol grupları arasında bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar diabetik farelerin beyin korteksleri ile ilgili herhangi bir veri paylaşmamışlardır.

Sunulan çalışmada, sıçan sıçan beyin hipokampuslarının girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerinde LC3 immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-LC3 primer antikoları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama

gerçekleştirmiştir. Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de diyabetik gruptaki hayvanların sıçan beyin hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların sitoplazmalarında LC3 pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, LC3 immunreaktivitesinin hem kontrol hem de diyabetik gruptaki nöronların sitoplazmalarında yoğun bir boyanmanın olduğu dikkati çekti. Kalitatif incelemelerde herhangi bir fark gözlenmemesine karşın, araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile de değerlendirilmesi sonucunda diyabetik gruptaki sıçanların sıçan hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P<0,05$). Ayrıca, sıçan beyin hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre diyabetik gruptaki hayvanların bu korteks bölgelerindeki katmanlarda LC3 immunpozitif nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti. Bu elde edilen veriler ışığında, Guan ve ark., 2016 ve arkadaşlarının diyabetik fareler ve kontrol gruplarındaki farelerin hipokampus ve amigdalalarında LC3 ekspresyonunda bir değişim olmadığının aksine çalışmamızda hem kontrol hem de diyabetik sıçanların hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis yapılarındaki nöronlarda immunohistokimyasal boyanma açısından LC3 immunreaktivitesinde bir azalma belirledik. Bu da bize, çalışmamızda deneysel olarak stz ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda LC3 aracılı bir otofajinin gerçekleşmediğini göstermiştir.

5'-adenosin monofosfat (AMP) ile aktive olan protein kinaz (AMPK), hücrenin enerjik durumunun gerçek sensörü ve enzimidir. AMP seviyelerindeki çok düşük artışlarla aktive edildiğinden, doğrudan adenilat enerji yüküne yanıt verir. ADP ve ATP tarafından devre dışı bırakılır. Doğru adenilat enerji yükünü geri yüklemek için, fosfo-aktif AMPK uyumlu bir şekilde glikoliz ve yağ asidi oksidasyonu gibi katabolik yolları uyarır. Protein ve yağ asidi sentezi gibi anabolik reaksiyonların hızını engeller ve otofajiyi aktive eder. Moleküler düzeyde, aktif AMPK, en az üç farklı mekanizma aracılığıyla otofajiyi uyarır. Bunlar Ser de mTORC1 inhibitörünün fosforilasyonunu tuberoskleroz 2 (TSC2) yer alır. RHEB GTPaz aktivitesini uyarır; Ser de mTORC1 bileşeni Raptor fosforilasyonu ve Ser 792, onun 14-3-3 bağlanma

için hazırlık olduğu ve ULK1'in Ser 317 ve Ser 777'de fosforilasyonunu içerir. AMPK tarafından katalize edilen ilk iki fosforilasyon, mTORC1'i inhibe eder ve ULK1 üzerindeki inhibitör etkilerini azaltır. ULK1, daha sonra AMPK ile etkileşime girmekte ve AMPK tarafından fosfoaktif hale getirilmekte serbesttir. Hücreler tarafından glukoz algılamasının, hücre içi enerji durumunun dolaylı dönüştürücüsü olarak yalnızca AMPK'ye bağlı olmadığı, aynı zamanda daha doğrudan mekanizmalara da dayandığı, böylece sistemi gereksiz ve çoklu seviyelerde kontrol ettiği bildirilmiştir. Glukolizin ilk adımından sorumlu mitokondride yer alan enzim olan heksokinaz II'nin (HKII) mTORC1'e bağlandığını ve onu inhibe ettiğini ve bu etkileşimin glukoz yoksunluğu ile glukoz-6-fosfat seviyelerinde bir azalma ile arttığını göstermiştir. Bu mekanizma, glukoz eksikliği durumlarında hücre metabolizmasının modülasyonuna katkıda bulunur. Mitokondriden ROS oluşumunu önlemede HKII'nin doğrudan bir rolü olduğunu savunan birçok endikasyonun yanı sıra, pentoz fosfat yolu aracılığıyla glukoz-6-fosfatın da birincil kaynak olduğu dikkate alınmalıdır. NADP^+ -to-NADPH indirgemesi için elektronlar, NADPH, biyoreduktif senteze doğrudan katılır ve tiyol redoks homeostazı için gerekli elektronları sağlar (Filomeni ve ark., 2015; Jeon, 2016; Ruiz ve ark., 2017).

Sunulan çalışmada, sıçan beyinlerinin hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki AMPK immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-AMPK primer antikoları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirmiştir. Yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de diabetik gruptaki hayvanların hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki bazı nöronların hücre mebranlarında ve az olmak şartıyla membrana yakın sitoplazmalarında AMPK pozitif reaksiyon gözlemlendi. Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi sonucunda diabetik gruptaki sıçanların hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis gibi yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlenmedi. Kalitatif incelemelerde herhangi bir fark gözlenmemesine karşın araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi sonucunda diabetik gruptaki sıçanların sıçan hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma

yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlenmedi ($P>0,05$). Ayrıca, hipokampusların dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre diyabetik gruptaki hayvanların bu korteks bölgelerindeki katmanlarda beclin-1 ve LC3 için yapılan boyamalarda olduğu gibi nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti. Bu elde edilen veriler ışığında çalışmamızda stz ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda beclin-1 aracılı oluşan otofajinin AMPK etkisinde gerçekleşmediği sonucuna varabiliriz.

mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) olarak adlandırılan yapısal ve işlevsel olarak farklı iki kompleksi çekirdeklerir. mTOR katalitik alt birimine ek olarak, mTORC1, rapamisinin memeli hedefinin düzenleyiciyle ilişkili proteininden (Raptor) oluşur. Sec13 protein 8 (mLST8, GBL olarak da bilinir) ile ölümcül memeli mTOR'un katalitik alanı ile birleşir ve kinaz aktivasyon döngüsünü stabilize eder. Aktive edilmiş mTORC1, proteinler, lipidler ve nükleotitler dahil hücre proliferasyonu için yapı taşlarının sentezini yukarı doğru düzenleyerek hücrenin metabolik programını katabolik metabolizmadan anabolik metabolizmaya kaydırır. Hem mTORC1 hem de AMPK, hücrenin enerji ve besin homeostazını sürdürmesi için gereklidir. Böylece, AMPK'nin, TSC2'yi aktive ederek veya mTORC1 bileşenini, Raptor on Ser722 ve Ser792'yi doğrudan fosforile ederek mTORC1'i inhibe ettiği gösterilmiştir. Son araştırmalar ayrıca lizozomun, AMPK ve mTORC1 için ortak bir aktivatör olarak lizozomal v-ATPase-Ragulator kompleksini bildirerek hem besinlere hem de enerjiye yanıt olarak sinyalleşmenin entegrasyonu için çok önemli bir merkez olarak işlev görebileceğini ortaya koymuştur. Otofajinin mTORC1 ve AMPK sinyali ile düzenlenmesi, en iyi otofagozom biyogenezi aşamasında anlaşılır. Otofaji yolu çoğunlukla, aralarında ULK1 ve Vps34 komplekslerinin otofaji indüksiyonu için önemli kapı bekçileri olarak görev yaptığı farklı kompleksleri çekirdekleyen Atg proteinleri tarafından yönetilir. ULK1 kompleksi üç düzenleyici alt birimden Atg13, 200KDa'nın (FIP200) fokal yapışma kinaz ailesi etkileşimli proteini, Atg101 ve çekirdek Ser/Thr kinaz ULK1'den oluşur. ULK1, amino asit açlığının neden olduğu otofaji için esastır ve Ser757'de fosforilasyon yoluyla mTORC1 tarafından doğrudan düzenlenir. ULK1'in geri

dönüşümlü fosforilasyonu, açlığın neden olduğu otofajinin düzenlendiği merkezi bir mekanizmadır. Amino asit bakımından zengin koşullarda, mTORC1, ULK1 ve Atg13'e bağlanır, fosforile eder ve böylece inaktive eder, oysa amino asit seviyelerinde bir azalmayı algıladığında, mTORC1, ULK1 kompleksinden ayrışır ve böylece ULK1'in inhibisyonunu hafifletir. Ek olarak, AMPK, otofajiyi düzenlemek için ULK1 ile koordine olur. AMPK, ULK1'deki (Ser555, Ser317 ve Ser777, fare ULK1 numaralandırma dahil) birkaç proteini doğrudan fosforile ederek otofajiyi teşvik eder ve bu da aktivasyonuna yol açar. Besin yeterliliği altında, yüksek mTORC1 aktivitesi, ULK1 Ser757'yi fosforile ederek ve ULK1 ile AMPK arasındaki etkileşimi bozarak ULK1 aktivasyonunu önler. Açlık altında ise, ULK1, AMPK aktivitesini aşağı regüle etmek için üç AMPK alt biriminin tümünü fosforile edebilir (Ruiz ve ark., 2017).

Ayrıca amino asit yoksunluğunun, mTORC1'in kimyasal inhibisyonundan daha hızlı otofajiyi tetiklediği öne sürülmüştür. mTORC1'in inhibisyonuna ek olarak, amino asit açlığı, PP2A'nın ULK1'e yönelik fosfataz aktivitesinde bir artışa neden olur, bu da ULK1'in hızlı fosforilasyonunu tetikler ve sonuç olarak, otofajik yanıtı hızlandırır. Spesifik olarak, amino asit çekilmesi, PP2A'yı aktif olmayan bir durumda tuttuğuna inanılan inhibitör protein a4'ten ayrılmasını indükleyerek PP2A aktivitesini uyarır. Otofaji indüksiyonu için gerekli olan başka bir otofajik kompleks olan Atg14, Vps15 ve Beclin-1'i içeren Vps34 kompleksi, amino asit yeterliliği ile düzenlenebilir. Amino asit/besin bolluğu üzerine, Atg14 içeren Vps34 kompleksinin mTORC1'e bağlı fosforilasyonu, otofagozom biyogenezini inhibe eder ve otofajiyi baskılar. Tersine, amino asitlerin tükenmesi, mTORC1 inhibisyonuna neden olur, böylece otofajiyi uyarmak için bu pro-otofaji kompleksini rahatlatır. Vps34, çeşitli hücresel fonksiyonlara katkıda bulunur ve yukarıda tartışıldığı gibi, bu lipid kinaz ayrıca mTORC1'in amino aside bağımlı aktivasyonuna da katılır. Vps34 mayada olduğu gibi Beclin-1 ilişkisi olan ve olmayan iki farklı popülasyonda bulunabilir (Ruiz ve ark., 2017).

Beyinde mTORC ve AMPK sinyali; mTOR sinyali, nörogelişimi (proliferasyon ve farklılaşma) ve beyin fonksiyonunu (nöronal plastisite) düzenleyen süreçlerde yer alır. Bu nedenle, mTOR sinyallemedeki düzensizlik, nörodejenerasyon, epilepsi, otizm ve nörodavranışsal değişiklikler gibi nöronal işlev bozukluğu ve hücre ölümü

ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Önceki incelemeler, mTOR'un beyin işlevi ve gelişimindeki rolüne odaklanmıştı. Beyinde, hipotalamustaki enerjiyi algılayan nöronlar, AMPK sinyali yoluyla organizmanın enerji dengesinin düzenlenmesinde yer alır. Beyin metabolizması, farklı hücre türleri arasındaki karmaşık bir etkileşim ile karakterize edilir. Glukoz, beyin birincil enerji substratıdır ve nöronlarda ve astrositlerde iki tamamlayıcı metabolik yolla metabolize edilmesi önerilmiştir. Nöronlar, antioksidan savunma için gerekli NADPH'yi üretmek için ağırlıklı olarak pentoz fosfat yolu (PPP) yoluyla glikozu metabolize ediyor gibi görünmektedir. Diğer yandan, astrositler esas olarak glukozu glukoliz yoluyla metabolize ederek laktat üretirler; burada laktat, nöronlarda oksidatif fosforilasyon için bir enerji substratı olarak taşınır. Bu astrosit-nöron laktat etkileşimi durağan halde hareket ediyor gibi görünse de, son çalışmalar enerji gerektiren koşullar sırasında nöronların glikolizi yukarı regüle etme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Normal beyin metabolizmasında hem AMPK hem de mTOR sinyalinin rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Beyinde Raptor (mTORC1) veya Rictor'un (mTORC2) silinmesi nörogelişimsel değişikliklere yol açar, ancak bu etkilerin hücre metabolizmasındaki değişikliklerle ilgili olup olmadığı net değildir. AMPKα2'nin beyin ve omurilikteki nöronlar ve astrositlerdeki baskın katalitik alt birim olduğu bildirilmiştir. mTOR'un aksine AMPK, nöronal gelişim veya hayatta kalma için gerekli değildir ama hiperaktivasyonu, mTORC1'in inhibisyonu yoluyla akson büyümesini bozmaktadır. Aslında AMPK, nöronlardaki nörotrofik faktörler tarafından mTOR aktivasyonunu antagonize eder. mTOR ve AMPK, metabolizmanın düzenlenmesi için gerekli olduğundan, bunların düzensizliği, hücre ölümüne ve hastalığın ilerlemesine yol açan olumsuz etkiler yaratabilir (Garza-Lombó, 2018).

Sunulan çalışmada, sıçan beyinlerinin hipokampuslarının dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki mTOR immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-mTOR primer antikorları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir. Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de diabetik gruptaki hayvanların beyinlerinin hipokampuslarının dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki nöronların sitoplazmalarında mTOR pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, mTOR

immunreaktivitesinin hem kontrol hem de diyabetik gruptaki nöronların sitoplazmalarında yoğun bir boyanmanın olduğu dikkati çekti. Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile de değerlendirilmesi sonucunda diyabetik gruptaki sıçanların beyinlerinin hipokampuslerinin dentat girus ve kornu ammonis gibi yapılarının incelenmesinde kontrol gruplarına göre alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P<0,05$). Ayrıca, hipokampuslerin dentat girus ve kornu ammonis bölgelerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre diyabetik gruptaki hayvanların bu korteks bölgelerindeki katmanlarda mTOR immunpozitif nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti. Bu elde edilen veriler ışığında çalışmamızda stz ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda beclin-1 aracılı oluşan otafajinin mTOR'un azalması etkisinde gerçekleştiği sonucuna varabiliriz.

Beyin için önemli bir metabolik substrat olan glukoz ile bilişsel performans arasında doğrudan bir ilişki vardır. Glukoz yoksunluğunun (hipoglisemi) erişkin nörogenez ile sinaptik plastisitede yer alan sinyal yollarını değiştirerek otofajiyi indüklediği ve nörodejeneratif bozukluk riskini artırdığı bilinmektedir. Kan şekerinin yükselmesi kan damarlarına zarar verir ve öğrenme, hafıza, motor hızı ve diğer bilişsel işlevlerde sorunlara yol açar. Şeker hastası olmayan kişilerde bile yüksek şeker tüketimi olanlar bilişsel işlev testlerinde daha düşük puan alır. Ayrıca yine araştırmalar bize yüksek oranda şeker tüketiminin öğrenme için gerekli olan bir beyin kimyasalı olan, BDNF üretimini azalttığını gösteriyor. Demans ve demansın en yaygın türü olan Alzheimer da düşük BDNF seviyesi ile ilişkili. Bu yüzden bazı bilim insanları Alzheimer hastalığını, tip-3 diyabet olarak da adlandırıyor. Bununla birlikte, diyabet durumu gibi hiperglisemi ve insülin yüksekliğinin olduğu durumların otofajik değişikliklere neden olduğu ile ilgili fazla veri bulunmamaktadır (Boland ve ark., 2008). Diyabetin beyin üzerindeki uzun vadeli etkileri yapısal, nörofizyolojik ve nöropsikolojik düzeyde kendini gösterir ve hipoglisemik epizodlar, serebrovasküler değişiklikler, diyabetin rolü gibi diyabetteki serebral disfonksiyonun patogeneğinde birden fazla patojenik faktör rol oynar gibi görünmektedir. Beyin, yüksek oksijen tüketim oranı, bol lipid içeriği ve diğer dokulara kıyasla antioksidan enzimlerin görece azlığı nedeniyle özellikle oksidatif hasara karşı savunmasızdır. Nöronal hücreler özellikle

oksidatif saldırılara duyarlıdır ve bu nedenle reaktif oksijen türleri (ROS) diyabet gibi birçok nörodejeneratif süreçte rol oynar. Normal fizyolojik koşullar altında ROS üretimi ile antioksidan mekanizmalar arasında bir denge olmasına rağmen, diğerlerinin yanı sıra antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalması nedeniyle yaşanan dokularda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Filemoni ve ark., 2015). Otofajinin diyabet veya metabolizmadaki rolü henüz net olmaktan uzaktır ve bu nedenle diyabetik komplikasyonların patogeneğinde otofajinin rolü şu anda yoğun bir araştırma altındadır. Beyin için önemli bir metabolik substrat olan glikoz ile bilişsel performans arasında doğrudan bir ilişki vardır. Glikoz yoksunluğunun (hipoglisemi) erişkin nörojeniz ile sinaptik plastisitede yer alan sinyal yollarını değiştirerek otofajiyi indüklediği ve nörodejeneratif bozukluk riskini artırdığı bilinmektedir. Kan şekerinin yükselmesi kan damarlarına zarar verir ve öğrenme, hafıza, motor hızı ve diğer bilişsel işlevlerde sorunlara yol açar. Şeker hastası olmayan kişilerde bile yüksek şeker tüketimi olanlar bilişsel işlev testlerinde daha düşük puan alır. Ayrıca yine araştırmalar bize yüksek oranda şeker tüketiminin öğrenme için gerekli olan bir beyin kimyasalı olan, BDNF üretimini azalttığını gösteriyor. Demans ve demansın en yaygın türü olan Alzheimer da düşük BDNF seviyesi ile ilişkili. Bu yüzden bazı bilim insanları Alzheimer hastalığını, tip-3 diyabet olarak da adlandırıyor. Bununla birlikte, diyabet durumu gibi hiperglisemi ve insülin yüksekliğinin olduğu durumların otofajik değişikliklere neden olduğu ile ilgili fazla veri bulunmamaktadır (Boland ve ark., 2008). Diyabetin beyin üzerindeki uzun vadeli etkileri yapısal, nörofizyolojik ve nöropsikolojik düzeyde kendini gösterir ve hipoglisemik epizodlar, serebrovasküler değişiklikler, diyabetin rolü gibi diyabetteki serebral disfonksiyonun patogeneğinde birden fazla patojenik faktör rol oynar gibi görünmektedir. Beyin, yüksek oksijen tüketim oranı, bol lipid içeriği ve diğer dokulara kıyasla antioksidan enzimlerin görece azlığı nedeniyle özellikle oksidatif hasara karşı savunmasızdır. Nöronal hücreler özellikle oksidatif saldırılara duyarlıdır ve bu nedenle reaktif oksijen türleri (ROS) diyabet gibi birçok nörodejeneratif süreçte rol oynar. Normal fizyolojik koşullar altında ROS üretimi ile antioksidan mekanizmalar arasında bir denge olmasına rağmen, diğerlerinin yanı sıra antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalması nedeniyle yaşanan dokularda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Filemoni ve ark., 2015). Otofajinin diyabet veya metabolizmadaki

rolü henüz net olmaktan uzaktır ve bu nedenle diyabetik komplikasyonların patogeneğinde otofajinin rolü şu anda yoğun bir araştırma altındadır. Sunulan çalışmada, hipokampusün girus dentatus ve kornu ammonis katmanlarındaki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre diyabetik gruptaki hayvanların bu korteks bölgelerindeki katmanlarda tüm immunohistokimyasal ve Nissl boyamalarında nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu belirlendi. Buna göre deneysel STZ ile oluşturulan sıçanların beyinlerindeki nöronlarda hiperglisemiye bağlı olarak bir nörodejenerasyonun gerçekleştiği sonucuna varabiliriz.

Otofaji temelde, organizmalara karşı korunmayı, enfeksiyonları, nörodejenerasyonu, yaşlanmayı, kalp rahatsızlığını ve kanseri anlayıp karşı mekanizma geliştirme açısından bilinmesi gereken bir süreçtir. Otofajinin sinyal kontrolünün sağlanması, Atg proteinlerinin moleküler etkileri, otofagozom/lizozom füzyonunun düzenlenmesi ve otofaji aktivasyonunda yaşla ilgili ve hastalığa özel kusurların anlaşılması ve mekanizmaların çözümlenmesi gerekmektedir. Sonuç olarak otofajinin hücrelere ve hastalıklara özel sınıflandırılması ve özel mekanizmalarının bilinmesi hastalık süreçlerinin aydınlatılması ve çözümlenebilmesi için gereklidir.

Çalışmamızda tüm elde ettiğimiz bulgular ışığında, deneysel STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların beyin kortekslerinde kontrol gruplarına göre beclin-1 ekspresyonlarındaki artışın belirlenmesi diyabetik sıçanların beyin kortekslerinde otofajinin gerçekleştiği sonucunu göstermektedir. Bununla birlikte Wester blot analizleriyle de verilerin doğruluğu desteklenmelidir.

6. KAYNAKLAR

- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 1999; 59; 59–65.
- Amaral D, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Anderson P, Morris R, Amaral, Bliss T, O'Keefe J (eds.), *The hippocampus book*. First edition, Oxford University Press, New York, 2007; p.37
- Ambrogini P, Cuppini R, Ferri P, Mancini C, Ciaroni S, Voci A, Gerdoni E, Gallo G. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology*, 2005; 81(4): 244–253.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2015; 38 (Suppl 1): 8- 16.
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus book*, Oxford University Press 2007; p.83-90.
- Aparicio IM, Espino J, Bejarano I, Gallardo-Soler A, Campo ML, Salido GM, Pariente JA, Peña FJ, Tapia JA. Autophagy-related proteins are functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility. *Sci Reports*, 2016; 6: 33647-54.
- Ayoğlu F, Işık AF, Bumin MA. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Servisine başvuran adli vakaların analizi, V. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi Bildiri Kitabı, Marmara Üniversitesi, İstanbul 12-16 Ekim 1996; s.96-100.
- Bauer M, Schlagenhauf F, London E, Miller K, Whybrow PC, Rasgon N, van Herle KV, van Herle, AJ, Phelps ME, Silverman DHS. Effects of hypothyroidism on brain metabolism and its associations with neuropsychiatric impairments. *Endocrine Abstracts*, 2006; 11: 16.

- Bayer SA. The rat nervous system: forebrain and midbrain (1st ed), In: George Paxinos, Sydney, Academic Press, 1985; 335–352.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*, 2002; 23: 38–89.
- Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif- crucial for autophagy. *J Cell Sci*, 2013; 126; 3237–3247.
- Bliss TV. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Lomo T J Physiol*, 1973; 232(2): 331–356.
- Bockaert J, Marin P. mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiol Rev*, 2015; 95(4): 1157-1187.
- Burman ABD, Stevens JK, Evans, AW. Streptococci as indicators in water supplies. In: Skinner, F. A. ed. Streptococci. Society for Applied Bacteriology, Academic Press Symposium Series, 1978; 7: 335-347.
- Choubey V, Cagalinec M, Liiv J, Safiulina D, Hickey MA, Kuum M, Liiv M, Anwar T, Eskelinen E-L, Kaasik A. BECN1 is involved of initiation of mitophagy. *Autophagy*, 2014; 10; 1105–1119.
- Tassa A, Roux MP, Attaix D, Bechet DM. Class III phosphoinositide 3-kinase–Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem J*, 2003; 15; 577.
- Cooke GE, Mullally S, Correia N, O'Mara SM, Gibney J. Hippocampal volume is decreased in adults with hypothyroidism, *Thyroid*, 2014; 24(3); 433–440.
- Crane PK, Walker R, Larson EB. Glucose levels and risk of dementia. *N Engl J Med*, 2013; 369(19); 1863–1864.
- Cukierman–Yaffee T. The relationship between dysglycemia and cognitive dysfunction. *Curr Opin Invest Dr*, 2009; 10(1): 70–74.
- Çınar N. Alzheimer Hastalığında Epidemiyoloji ve Klinik Bulgular. *Türkiye Klin J Neurol-Special Top*, 2012; 5(3): 1–6.
- de Jong FJ, den Heijer T, Viser TJ, de Rijke YB, Drexhage HA, Hofman A, Breteler MM. Thyroid hormones, dementia, and atrophy of the medial temporal lobe. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91(7): 2569–2573.

- Dekeyzer S, De Kock I, Nikoubashman O, Vanden Bossche S, Van Eetvelde R, De Groote J, Acou M, Wiesmann M, Deblaere K, Achten E. "Unforgettable" – a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus. *Insights Imaging*, 2017; 8(2): 199–212.
- Delaney RC, Rosen AJ, Mattson RH, Novelly RA. Memory function in focal epilepsy: a comparison of non-surgical, unilateral temporal lobe and frontal lobe samples. *Cortex* 1980;16:103-117.
- Denver RJ, Hu F, Scanlan TS, Furlow JD. Thyroid hormone receptor subtype specificity for hormone-dependent neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 2009; 326: 155–168.
- D'Udine B, Gozzo S. Archicortex and neocortex in the precocial murid *Acomys cahirinus*. A comparison with two altricial species: *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*. *Int J Neurosci*. 1983; 20(3–4): 255–263.
- Elias MF, Goodell AL, Waldstein SR. Obesity, cognitive functioning and dementia: back to the future, *J Alzheimer's Dis*, 2012; 30(2): 113–125.
- Erickson EJ, Watts KD, Parent MB. Septal co-infusions of glucose with a GABAB agonist impair memory. *Neurobiol Learn Mem*, 2006; 85(1): 66–70.
- Essa R, El Sadek AM, Baset ME, Rawash MA, Sami DG, Badawy MT, Mansour M. E, Attia H, Saadeldin MK, Abdellatif A. Effects of Turmeric (*Curcuma longa*) Extract in streptozocin-induced diabetic model. *Journal of Food Biochemistry*, 2019; 43(9): 12988.
- Fusco S, Pani G. Brain response to calorie restriction. *Cell Mol Life*, 2013; 70(17): 3157–3170.
- Gilbert ME. Alterations in synaptic transmission and plasticity in area CA1 of adult hippocampus following developmental hypothyroidism. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004; 148(1): 11–18.
- Ginet V, Spiehlmann A, Rummel C, Rudunskiy N, Grishchuk Y. Role of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death. *Basic Res Paper*, 2013; 846-860.
- Gonzalez CD, Lee MS, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MI, Watada H, Wiley JV. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy*. 2011; 7(1): 2–11.

- Grasso D, Ropolo A, Lo Re A, Boggio V, Molejon MI, Lovanna JL, Gonzalez CD, Urrita R, Vaccaro MI. Zymophagy, a novel selective autophagy pathway mediated by VMP1-USP9x-p 62, prevents pancreatic cell death. *J. Biol. Chem*, 2011; 286: 8308–8324.
- Guan Z-F, Zhou X-L, Zhang X-M, Zhang Y, Wang Y-M. Beclin-1- mediated autophagy may be involved in the elderly cognitive and affective disorders in streptozotocin-induced diabetic mice. *Transl Neurodegener*, 2016; 5: 22.
- Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clinical Prac*, 2014; 103: 137-49.
- Guo F, Liu X, Cai H, Le W. “Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy”. *Brain Pathol*, 2018; 28 (1): 3-13.
- Hall J, Gonder-Frederick LA, Chewning WW, Silveira J, Gold PE. Glucose enhancement of performance on memory tests in young and aged human. *Neuropsychologia*, 1989; 27(9): 1129–1138.
- Hamacher-Brady. Autophagy regulation and integration with cell signaling. *Antioxid Redoks Signal*, 2012; 17(5): 756 – 765.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 1991; 253: 905-909.
- Helmstaedter C, Kurthen M, Lux S, Reuber M, Elger CE. Chronic epilepsy and cognition: a longitudinal study in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 2003; 54: 425-432.
- Hestings NB, Tanapat P, Gould E. Neurogenesis in the adult mammalian brain. *Clin Neurosci Res*, 2001; 1(3): 175–182.
- Hogervorst E, Huppert F, Matthews FE, Brayne C. Thyroid function and cognitive decline in the mrc cognitive function and ageing study. *Psychoneuroendocrinology*, 2008; 33(7): 1013–1022.
- Holdsworth CD, Besser GM. Influence of gastric emptying–rate and of insulin response on oral glucose tolerance in thyroid disease. *Lancet*, 1968; 2(7570): 700–702.

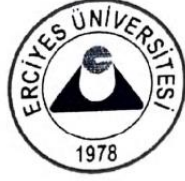
- Hoyland A, Lawton CL, Dye L. Acute effects of macronutrient manipulations on cognitive test performance in healthy young adults: a systematic research review. *Neurosci Biobehav*, 2008; 32(1): 72–85.
<http://braininfo.rprc.washington.edu/centraldirectory.aspx?type=a&ID=2336>, erişim tarihi: 20.12.2020.
- IDF Diabetes Atlas 8th ed. <http://www.diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*, 1990; 295(4): 580–623.
- Kamal A, Spoelstra K, Biessels GJ, Urban IJA, Gispen WH. Effects of changes in glucose concentration on synaptic plasticity in hippocampal slices. *Brain Res*, 1999; 824(2): 238–242.
- Karşıdağ S. Alzheimer Hastalığında Risk Faktörleri ve Koruyucu Faktörler. *Türkiye Klin J NeurolSpecial Top*, 2012; 5(3): 18–23.
- Katz HP, Youlton R, Kaplan SL, Grumbach MM. Growth and growth hormone. 3. Growth hormone release in children with primary hypothyroidism and thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1969; 29(3): 346–351.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 2011; 13: 132–141.
- Kneebone AC. Presurgical Neuropsychological Evaluation for Localization of the Epileptogenic Zone. *Epilepsy Surgery* 2.ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2001; p.487-946.
- Koçer B. Demans epidemiyolojisi. *Demans Dizisi* 1999; 1: 41-44.
- Kopf D, Frolich L. Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *J Alzheimer Dis*, 2009; 16(4): 677-685.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins ve Cotran Patolojik Hastalık Temeli, Sekizinci Baskı, Saunders Elsevier, 2010: s. 2686, 2710-1, 2730-1.
- Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 2018; 25(1): 59–70.
- Laplane M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 2012; 149: 274–293.

- Liman N, Suna DC. Hücre koruyucu bir mekanizma: otofaji. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2017; 26: 275-28.
- Madeira MD, Sousa N, Lima-Andrade MT, Calheiros F, Cadete-Leite A, Paula-Barbosa MM. Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. J Comp Neurol, 1992; 322: 501–518.
- Mainardi M, Fusco S, Grassi C. Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. Neural Plasticity, 2015; (1): 10.
- Manning CA, Stone WS, Korol DL, Gold PE. Glucose enhancement of 24-h memory retrieval in healthy elderly humans. Behavioural Brain Research, 1998; 93(1–2): 71–76.
- Martin JH. Lymbic system and cerebral circuits for emotions, learning, and memory. In: Michael W, Peter JB. Neuroanatomy: text and atlas (fifth ed.). McGraw–Hill Medical, New York, 2003: p.382.
- Martinez J, Almendinger J, Oberst A, Green DR. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. PNAS, 2011; 108: 17396–17401.
- Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. Int J Biochem Cell Biol, 2004; 36(12): 2445–2462.
- Muriach M, Flores-Bellver M, Romero FJ, Barcia JM. “Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy, Oxid Med Cell Longev, 2014; 102158.
- Onar B, Özçakmak SY, Turan İ, Özçakmak HV. ”Diyabete bağlı kognitif bozukluk sıçanların hipokampuslerinde NLRP3 ve nitrotirozin seviyelerinin artışı ile ilişkilidir”. Türk Diyab Obez, 2019; 3: 123-129.
- Parsons MW, Gold PE. Glucose enhancement of memory in elderly humans: an inverted-U dose-response curve. Neurobiology of Aging, 1992; 13(3): 401–404.
- Potter WB, O’Riordan KJ, Barnett D, Osting SMK, Wagoner M, Burger C, Roopra A. Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. PLoSOne, 2010; 5(2): 8996–9005.

- Reed L, Pangaro LN. Physiology of the thyroid gland I: synthesis and release, iodine metabolism, and binding and transport. In: Becher KL. Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Lippincott Company, Philadelphia, 1995: p.285–291.
- Ribak CE, Seress L. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol*, 1983; 12: 577–597.
- Robinson JS, Klionsky DJ, Banta LM, Emr SD. Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol*, 1988; 8: 4936–4948.
- Rogov V, Dotsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*, 2014; 53: 167–178.
- Ross HM, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile Çeviri Editörü: Barış Baykal 6. baskı. 2014: s.784-809.
- Ruan YW, Zou B, Fan Y, Li Y, Lin N, Zeng YS, Gao TM, Yao Z, Xu ZC. Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*, 2006; 140: 191–201.
- Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z. Bir membran taşıma modülatörü olan GATE-16, NSF ve Golgi v-SNARE GOS-28 ile etkileşime girer. *EMBO J*, 2000; 19: 1494–1504.
- Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signalling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 2017; 169 (2): 361-371.
- Scharfman HE, Myers CE. Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Front Neural Circuits*, 2013; 6: 106.
- Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res*. 2012; 226(1): 56–65.
- Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome mTOR and TFEB. *EMBO J*, 2012; 31: 1095–1108.

- Shah JH, Motto GS, Papagiannes E, Williams GA. Insulin metabolism in hypothyroidism. *Diabetes*, 1975; 24(10): 922–925.
- Shin JH, Seong JK, Yi SS. Sequential alterations of glucocorticoid receptors in the hippocampus of STZ-treated type 1 diabetic rats. *J Vet Sci*, 2014; 15(1): 19–26.
- Sloviter RS, Lomo T. Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization. *Front Neural Circuit*, 2012; 6: 102.
- Son HJ, Shim HJ, Kim HK, Ha JY, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative disease. *Exp Mol Med*, 2012; 44(2): 89-98.
- Stanton BA. *Physiology* (5th ed.). Çeviri: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği. Bölüm Çeviri: Aşçıoğlu M. Hipotalamus ve hipofiz bezi. Kitap: Fizyoloji. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara 2008; s. 819-859.
- Şahin M, Özer C, Ölüç F, Tunç Z. Huzurevinde kalan yaşlılarda demans ve depresyon. *Türk Geriatri Dergisi*, 2005; 8(1):249-51.
- Tang H, Sebti S, Titone, Zhou Y, Isidoro C, Ross TS, Hibshoosh H, Xiao G, Packer M, Xie Y. Decreased *BECN1* mRNA Expression in Human Breast Cancer is Associated with Estrogen Receptor-Negative Subtypes and Poor Prognosis. *Ebiomedicine*, 2015; 2: 255–263.
- Tanji K, Odagiri S, Maruyama A, Mori F, Kakita A. Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol Dis*, 2013; 49: 190–198.
- Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E. Specific regional distribution of *gec1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res*, 2008; 1210: 103–115.
- Turner DA, Buhl EH, Hailer NP, Nitsch R. Morphological features of the entorhinal–hippocampal connection. *Prog Neurobiol*, 1998; 55(6): 537–562.
- Van Groen T, Miettinen P, Kadish I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*. 2003; 13(1): 133–149.
- Van Pelt LF. Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats. *J Am Vet Med Assoc*, 1977; 171(9): 842-844.

- Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and Cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem*, 2011; 80: 125-156.
- Wimo A, Winblad B. Çev. Sevinçok J. Demans ve sağlık ekonomisi. *Demans Dergisi*, 2003; 3: 121-126.
- Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, Romagnoli A, Fimia GM, Piacentini M, Vandenabeele P. Beclin1: a role in membrane Dynamics and beyonds. *Autophagy*, 2012; 8(1): 6 – 17.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhöft A, Fritz C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Domínguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*. 2002; 415(6874): 871-80.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 2007; 9: 1102–1109.



Tarih: 07.04.2021

Toplantı Sayısı: 04

Karar No:21/81

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 07.04.2021 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi	
İzzet Burçin SATICIOĞLU	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTAM	
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)	
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye	
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ tarafından sunulan "Streptozotosin (STZ) İle Diyabet Oluşturulmuş Sıçanların Hipokampusunda Otofajinin Araştırılması" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih

: 07.04.2021

Etik Kurul Başkanı

: Prof. Dr. Gültekin ATALAN

İmza

:

STREPTOZOTOSİN (STZ) İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN HİPOKAMPÜSÜNDE OTOFAJİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**21**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**21**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

%**10**

2

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**6**

3

adumilas.adu.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

4

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

5

yaho.meb.k12.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

6

www.haberturk.com

İnternet Kaynağı

%**1**

7

www.thefreelibrary.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

www.kalkinmakutuphanesi.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

9

acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı,Soyadı : Şazimet TAŞ

EĞİTİM

DERECE	KURUM	MEZUNİYET
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi	
Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Lise	Behice Yazgan Kız Lisesi	

İŞ DENEYİMLERİ

YIL	KURUM	GÖREV
6 YIL	Erciyes Üniversitesi	Hemşire

YABANCI DİL

A 2