

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**DİABETES MELLİTUS'UN BEYİN İNSÜLİN-PI3K SİNYAL YOLAĞI ve TAU
HİPERFOSFORİLASYONU ÜZERİNE OLASI ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

DUYGU ŞAHİN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. NİLGÜN ALTAN

ANKARA
2013 Haziran

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**DİABETES MELLİTUS'UN BEYİN İNSÜLİN-PI3K SİNYAL YOLAĞI ve TAU
HİPERFOSFORİLASYONU ÜZERİNE OLASI ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

DUYGU ŞAHİN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. NİLGÜN ALTAN


Bu tez, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2010-54 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2013 Haziran


T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya (Tıp) Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi : 26/06/2013


İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu

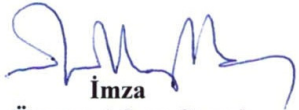
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı


İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof. Dr. Nilgün Altan

Gazi Üniversitesi


İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof. Dr. Ceyla İrkeç

Gazi Üniversitesi


İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof. Dr. Neslihan Bukan

Gazi Üniversitesi


İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof. Dr. Cahide Öznur Ongun

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekil ve Grafikler	V
Tablolar	VII
Semboller ve Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Diabetes Mellitus.....	4
2.1.1. Diabetes Mellitusun Tanımı ve Sınıflandırılması.....	4
2.1.1.1. İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM, Tip I DM).....	5
2.1.1.2. İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM, Tip II DM).....	6
2.2. İnsülin.....	8
2.2.1. İnsülin Biyosentezi ve Salınımı.....	8
2.2.2. İnsülin Reseptörü.....	10
2.2.3 Periferde ve Merkezi Sinir Sisteminde İnsülin-Glukoz İlişkisi... ..	11
2.2.4 Beyin Dokusunda İnsülin Fonksiyon ve Sinyali.....	14
2.2.4.1 Beyin Dokusunda İnsülin Reseptörü.....	14
2.2.4.2 Serebral İnsülin Kaynağı.....	15
2.2.4.3 Beyinde İnsülin Aktivitesi.....	16
2.2.5 İnsülin Sinyal Yolağı.....	18
2.2.5.1 İnsülin ve Serebral Amiloidozis.....	21
2.2.5.1.1 IDE (İnsülin Degrade Enzim).....	23
2.2.5.2 İnsülin ve Tau Fosforilasyonu.....	25
2.3 Diabetes Mellitus Ve Beyin Dokusu.....	27
2.3.1 Diabetes Mellitus ve Bilişsel Fonksiyon Bozuklukları.....	27
2.3.2 Diabetes Mellitus'ta Bilişsel Disfonksiyon Patofizyolojisi.....	28

2.3.2.1 Hipergliseminin Rolü.....	28
2.3.2.2 Hipogliseminin Rolü.....	30
2.3.2.3 İnsülin Rezistansının Rolü	30
2.4 Diabetes Mellitus ve Alzheimer Arasındaki Olası İlişki	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1 Kullanılan Gereçler.....	37
3.1.1 Deney Gruplarının Oluşturulması	37
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	38
3.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.1.4 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	40
3.1.4.1 Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Tampon	40
3.1.4.2 SDS-Poliakrilamid Jel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler.....	40
3.1.4.3 Western Blot İşleminde Kullanılan Çözeltiler	42
3.2 Uygulanan Yöntemler.....	44
3.2.1 Kan Glukoz Tayini	44
3.2.2 İnsülin Konsantrasyonlarının Tayini.....	44
3.2.3 Amiloid β 1-42 Konsantrasyonlarının Tayini	44
3.2.4 Patolojik İnceleme	44
3.2.5 Doku Homojenizasyonu.....	45
3.2.6 Protein Miktar Tayini.....	45
3.2.7 Western Blot ile Protein Tayini.....	45
3.2.8 İstatistiksel Analiz Yöntemleri	47
4. BULGULAR.....	48
4.1 Western Blot Bulguları	51
4.1.1 IR/p-IR Protein Düzeyleri	51
4.1.2 Akt/p-Akt Protein Düzeyleri.....	52
4.1.3 GSK3 α /p-GSK3 α Protein Düzeyleri.....	53
4.1.4 GSK3 β /p-GSK3 β Protein Düzeyleri.....	54
4.1.5 p-TAU Protein Düzeyleri.....	55

5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ.....	66
7. ÖZET	68
8. SUMMARY	70
9. KAYNAKLAR	72
10. EKLER	92
11. ÖZGEÇMİŞ.....	94

ŞEKİL ve GRAFİKLER

Şekil 1	: İnsülinin Yapısı	8
Şekil 2	: İnsülin ve IGF1 sinyal yolağı	11
Şekil 3	: İnsülin sinyal yolağının glukoz alınımı (kas,adipoz doku), glukoneogenez (karaciğer), protein sentezi ve hücre büyümesi üzerine düzenleyici etkisi	12
Şekil 4	: İnsülin reseptörlerinin beyin dokusunda yoğunluklarına göre dağılımı	14
Şekil 5	: Beyin dokusunda insülin reseptör sinyali	19
Şekil 6	: Normal koşullar altında İnsülin/İnsülin reseptörünün tau protein ve A β peptid metabolizması üzerindeki etkileri	20
Şekil 7	: Beyin insülin rezistansı ve APP-A β agregasyonu	23
Şekil 8	: Tau patolojisinde insülin rezistansı ve eksikliğinin rolü	24
Şekil 9	: Diabetes Mellitus'da kognitif fonksiyon patofizyolojisine katkısı olduğu düşünülen olası mekanizmalar	28
Şekil 10	: Hafıza ilişkili nöronal aktivasyonun insülin/insülin aracılı regülasyonunun olası özeti	32
Grafik 1	: Tüm gruplara ait serum insülin konsantrasyonları (ng/mL)	49
Grafik 2	: Tüm gruplara ait serum Amiloid β 1-42 konsantrasyonları (pg/mL)	50

Grafik 3	: Hipokampüs dokusunda IR ve pIR protein ifadenme düzeyleri	51
Grafik 4	: Hipokampüs dokusunda AKT ve pAKT protein ifadenme düzeyleri	52
Grafik 5	: Hipokampüs dokusunda GSK3 α ve pGSK3 α protein ifadenme düzeyleri	53
Grafik 6	: Hipokampüs dokusunda GSK3 β ve pGSK3 β protein ifadenme düzeyleri	54
Grafik 7	: Hipokampüs dokusunda pTAU protein ifadenme düzeyleri	55

TABLÖLAR

Tablo 1	: Beyin insülin rezistansının Alzheimer oluşumu üzerine etkileri	35
Tablo 2	: %5'lik paketleyici jel için kullanılan reaktifler ve miktarları	41
Tablo 3	: %12'lik ayırıcı jel için kullanılan reaktifler ve miktarları	42
Tablo 4	: Ratların vücut ağırlığı ve kan glukoz değerleri	48
Tablo 5	: Ratların serum İnsülin ve Amiloid β 1-42 konsantrasyonları	49

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

IDDM	: İnsüline bağımlı Diabetes Mellitus
NIDDM	: İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus
MRDM	: Malnütrisyona ilişkili Diabetes Mellitus
IGT	: Glukoz toleransı bozukluğu
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
MODY	: Gençlerin erişkin tipi diyabeti
c-AMP	: Siklik adenozin monofosfat
IP₃	: İnozitoltrifosfat
Ca⁺²	: Kalsiyum
K⁺	: Potasyum
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
4EBP1	: 4E bağlayıcı protein 1
ACh	: Asetilkolin
BIM	: BCL-2 ilişkili hücre ölümü aracı protein
ERK	: Ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz
ELK	: ETS benzeri transkripsiyon faktörü
FOXO	: Forkhead kutu protein O
GSK3	: Glikojen sentaz kinaz 3
IGFBP	: IGF bağlayıcı protein
mTOR	: Memeli rapamisin hedef proteini
SOD	: Süperoksit dismutaz
ULK	: Ankoordine benzeri kinaz
PI3K	: Fosfoinozidit 3-kinaz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
GLUT	: Glukoz Taşıyıcısı
IRS	: İnsülin reseptör substrat

MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
PIP2	: Fosfotidilinozitol-4,5-difosfat
PIP3	: Fosfotidilinozitol-3,4,5-trifosfat
PDK1	: Fosfoinozitol bağımlı protein kinaz 1
Akt	: Protein Kinaz B
G6Pase	: Glukoz 6-fosfataz
PEPCK	: Fosfoenol pirüvat karboksikinaz
GABA	: γ -aminobütirik asit
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionikasit
CSF	: Serebrospinal sıvı
IR	: İnsülin reseptörü
mRNA	: Haberci ribonükleikasit
5-HT	: 5-hidroksitriptamin
AgRP	: Agouti ilişkili protein
Aβ	: Amiloid β
APP	: Amiloid Prekürsör Proteini
PS	: Presenilin
ApoE-ϵ4	: Apolipoprotein E ϵ 4
IDE	: İnsülin-degrade enzim
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör α
ADDL	: APP-A β kaynaklı dağılılabılır ligandlar
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
JNK	: Janus kinaz
PP-2A	: Protein fosfataz 2A
ROS	: Reaktif oksijen türleri
PHF	: Anormal filament yapısı
NFT	: Nörofibriler yumak
ATP	: Adenozin trifosfat
AGE	: Gelişmiş glikasyon son ürünleri
RAGE	: Gelişmiş glikasyon son ürünleri reseptörü
NMDA	: N-metil D aspartat

IL-6	: İnterlökin 6
Na⁺	: Sodyum
DAG	: Diaçilgliserol
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PKC	: Protein kinaz C
IAPP	: Pankreas adacık amiloid proteini
İcv	: İntraserebroventriküler
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
STZ	: Streptozotosin
HCl	: Hidroklorik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: Tetrametilendiamin
BSA	: Bovine Serum Albumin
Na₃VO₄	: Sodyum ortovanadat
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon assay
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florid

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus, pankreasın insülin salgısının tam ya da kısmi yetersizliği ya da insülin etkisinin yetersizliği ile oluşan, kendini hiperglisemi ile belli eden, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğu ile de karakterize bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır.

İnsülin, pankreas β hücrelerinden salınan, gelişme-büyüme için gerekli enerji depolarının sürdürülebilirliği ve plazma glukoz seviyelerinin regülasyonu olmak üzere tüm metabolik homeostazi yakından ilgilendiren oldukça önemli fonksiyonlara sahip anabolik bir hormondur. İnsülinin başlıca periferel hedefleri karaciğer, kas, ve yağ dokusudur. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda beyinde insülin reseptörlerinin keşfi ile, insülinin beyin fizyolojisinde önemli bir rol oynadığı, serebral insülin sinyalinde ve glukoz homeostazında meydana gelen bozuklukların beyin patolojisine katkıda bulunduğu belirtilmiştir. İnsülin periferdeki etkisini, glukoz alınımını insülin-sensitive glukoz taşıyıcısı GLUT-4 aracılığıyla sağlayarak, kan glukoz seviyelerinin düşmesine neden olarak gösterir ve glukozun düşük seviyeleri β hücreleri tarafından insülin-insensitive GLUT-2 aracılığıyla tanımlanarak insülin sekresyonu azaltılır. Periferel dokuların aksine, Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nde glukoz transportunun çoğunluğu insülininden bağımsız olsa da, nöronlarda transport insülin-duyarlı GLUT-4 ve GLUT-8 ile gerçekleşmektedir. Glukozun hafızayı güçlendirici etkisinin olduğu, insülin'in bilişsel ve sinaptik gelişime katkısının bulunduğu, yapılan insan ve hayvan davranış çalışmalarında belirtilmiştir.

İnsülin, reseptör aracılı doyunluk duyarlı transport mekanizması ile kan-beyin bariyerini aşarak santral sinir sistemine girer. İnsülin' in beyinde pleiotropik aktivite gösterdiği belirtilmiştir, insülin beyin

glukoz metabolizmasındaki regülatör etkisine ek olarak, nöromodülatör ve nöroendokrin bir molekül gibi davranmakta, nöronal gelişim ve sağkalımda önemli bir rol almaktadır. İnsülin' in, MSS de sinirsel gelişim ve sinaptogenez üzerinde bir büyüme hormonu gibi rol oynadığı belirtilmiştir. İnsülin, regülatör peptid ve nörotransmitterlerle etkileşimi sayesinde yemek yeme, hafıza ve öğrenme davranışları ile ilişkili süreçleri aktive edebilir.

İnsülin periferde olduğu gibi, beyinde de etkilerini, reseptörü aracılığıyla, insülin reseptör substrat/fosfotidilinozitol-3-kinaz yolu (IRS/PI3K) ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolu aracılığıyla gösterir. PI3K sinyal yolağının aktivasyonu, beyinde ve periferde insülin sinyal aktarımının önemli biyokimyasal basamağıdır. İnsülin, in vitro nöronal apoptozisi protein kinaz B aktivasyonu aracılığı ile inhibe ederken, in vivo tau fosforilasyonu ve amiloid β ($A\beta$) protein metabolizmasının regülasyonunda da etki göstermektedir. Diabetes Mellitus ile nörodejeneratif hastalıklar arasındaki klinik ilişki son yıllarda giderek artan çalışmalarla belirlenmektedir. Alzheimer ve Parkinson'da, beyinde insülin reseptör ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli etkiye sahip ve insülin sinyal mekanizmasının hedefi olan çeşitli moleküller tanımlanmıştır. Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) bu moleküllerden biri olup, tau proteininin fosforilasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Transjenik hayvan modelleri ve hücre kültürü ortamında yapılan çalışmalarla, GSK-3 β 'nin aktif formunun overekspresyonunun tau hiperfosforilasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarla, in vivo nörofibril-yumak patolojisinde insülin ve IGF-1'in direkt etkilerinin yanısıra, $A\beta$ üzerindeki etkileri aracılığıyla tau fosforilasyonu üzerinde indirekt etkilerinin de olabileceği belirtilmektedir.

Çalışmamızda stz enjeksiyonu ile oluşturulan diyabetin, beyin dokusunda tau hiperfosforilasyonu üzerine etkisi ve de fosfo-tau oluşumunun insülin sinyal yolağı ile etkileşimi incelenerek, Diabetes Mellitus ve Alzheimer arasındaki olası ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

2.1.1. Diabetes Mellitusun Tanımı ve Sınıflandırılması

Diabetes Mellitus, pankreasın insülin salgısının tam ya da kısmi yetersizliği ya da insülin etkisinin yetersizliği ile oluşan, kendini hiperglisemi ile belli eden, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğu ile de karakterize bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır^{1, 2}.

Diyabet primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Primer diyabet, Tip I (IDDM) ya da insüline bağımlı, Tip II ya da insüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM) olarak sınıflandırılmaktadır. Sekonder diyabet ise hormonal dengesizlikten ve cerrahi sonrasında kullanılan ilaçlar tarafından pankreasın harabiyetine bağlı gelişebilmektedir³.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Sınıflamasına Göre:³⁻⁵

1. İnsüline bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM)
2. İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM)
 - Obezler
 - Obez olmayanlar
3. Malnütrisyonla ilişkili Diabetes Mellitus (MRDM)
4. Sendrom ve bazı koşullara bağlı olan Diabetes Mellitus
 - Hormonal kaynaklı hastalıklar,
 - Pankreatik hastalıklar,
 - Genetik bozukluklar,
 - Kimyasal ya da ilaçlara bağlı durumlar
 - İnsülin veya reseptörlerinin anomalisi
5. Glukoz toleransı bozukluğu (IGT)
 - Obezler

Obez olmayanlar

Sendrom ve şartlara bağılı olanlar

6. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

2.1.1.1. İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM, Tip I DM)

Tip I diyabet (insüline bağımlı diyabet), endojen insülin salgılama kapasitesinin büyük bir kısmının ya da tamamının ortadan kalkmasıdır. Hücrel kaynaklı otoimmün yıkım sonucu pankreatik β hücrelerinin harabiyetine bağılı olarak, kan-glukoz konsantrasyonunun yükselmesi ile karakterizedir. β hücrelerindeki harabiyete bağılı olarak glukoz alımının ardından, pankreastan insülin salgılanamaz ve Tip I diyabetiklerde insülin eksikliğinin tipik bulguları görülür⁶⁻⁸. Diyabetin bu tipi genellikle çocukluk ya da adolesan çağında görülür. Polidipsi, poliüri, ketoasidoz, kilo kaybı gibi semptomlar gösterir. Organizmada karbonhidrat kaybından ortaya çıkan kalori açığına kapatmak için yağ ve protein yıkımının artması, glikozüriye bağılı kalori kaybı, dehidratasyon, zayıflamanın başlıca sebebidir. Tip I diyabetiklerde oluşan insülin yetersizliği, metabolik hastalıkların çoğunun temelini oluşturur. Sadece insülin eksikliği değil aynı zamanda glukagonun ve pankreatik polipeptidlerin konsantrasyonlarının yüksekliği de Tip I diyabeti gösterir³.

Diyabetiklerde, insülin eksikliğine bağılı olarak glukozun kullanımı azalır. Hücrede glukoz yetersizliği, amino asitlerden glikoneogenezi uyarır. Yağ asidi oksidasyonu ve ketogenez artar⁸.

Beta (β) hücrelerinin harabiyetinden üç mekanizmanın sorumlu olduğu düşünülür; Bunlar çevresel etkiler, genetik duyarlılık ve otoimmünitedir.

Tip I diyabetin komplikasyonları arasında katarakt, nöropati, nefropati ve anjiopati vardır. Bunların gelişmesi ve ilerlemesi tamamen hipergliseminin kontrol derecesine bağlıdır^{6,9}.

Tedavi edilmemiş Diabetes Mellitusta, hiperglisemi ve ketoasidoz görülür. Hiperglisemi, glukozun hepatik yapımının artmasıyla beraber, periferik kullanımının azalması nedeniyle meydana gelmektedir. Ketozis ise, adipoz dokudan yağ asidi salınımının artışına bağlı olarak karaciğerde 3-Hidroksibütirat ve asetoasetat sentezinin uyarılması sonucu oluşmaktadır. Ancak, karaciğere gelen yağ asitlerinin hepsi oksidasyon ya da keton cismi sentezinde kullanılmaz, bir kısmı triaçilgliserole dönüşür ve VLDL olarak paketlenerek kana verilir. Şilomikronlar yemek sonrası, diyet lipitlerinden barsak mukoza hücrelerinde sentezlenir. Diyabetiklerde, yağ dokusunda, lipoprotein lipaz tarafından, lipoprotein yıkımının düşük olması nedeniyle, plazma şilomikron ve VLDL düzeyleri yükselir ve sonuçta hipertrigliseridemi oluşur. Bu metabolik değişiklikler, insülin yetersizliği ve glukagonun kısmen yükselmesi nedeniyle oluşmaktadır⁷. İnsülin tedavisine bağlı olarak serbest yağ asit değerleri düşer, lipoprotein lipaz değerleri yükselir ve hipertrigliseridemi hızla kontrol altına alınır ve LDL değerleri düşer, HDL değerleri de normal ya da diyabeti bulunmayan kontroller ile karşılaştırıldığında, normal değerlere ulaşır¹⁰.

2.1.1.2. İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM, Tip II DM)

Tip II diyabet, insülin sekresyonundaki yetersizlik ya da bazı vakalarda glukoz yüklemesine karşı göreceli bir yetmezlik ve buna eklenen periferik dokuların insüline yanıt vermedeki yetmezliği (İnsülin rezistansı) ile ilişkilidir. NIDDM'de pankreasın β hücrelerinin bir kısmı fonksiyonlarını

korurlar ve glukoz homeostazını korumak için yeterli olmayan düzeylerde insülin salgırlarlar⁶. IDDM'nin aksine, insülin yetersizliğinin şiddetli olmadığını ve NIDDM'nin patogeneğinde temel rolü insülin rezistansının oluşturduğunu belirtmek gerekir^{5, 11}.

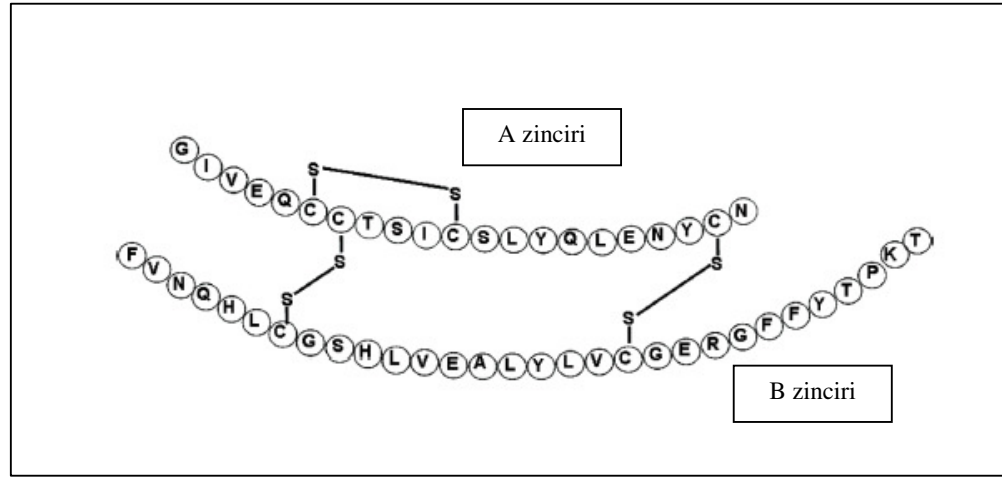
Tip II diyabet, kesinlikle diyabetin en yaygın tipidir ve yaşlılarda daha sık görülür. Hastalığın bu türünde endojen insülin salgılama kapasitesi korunmuştur. Susama, poliüri ve kilo kaybı bulunabilir ancak çok nadiren bu bulgular şiddetlidir. Kadınlarda ise, vulva puriritis en sık bulunan semptomlarıdır³.

Tip II DM'nin, bazı bireylerde normal insülin duyarlılığına sahip oldukları halde monogenik β hücre (MODY: maturity onset diabetes of the young/Gençlerin erişkin tipi diyabeti) fonksiyon defektine bağlı olarak gelişebildiği görülebilmektedir. Bu alt gruplar MODY 1-5 olarak adlandırılmaktadır. MODY-1' de hepatik nükleer faktör- 4 α , MODY-2'de glukokinaz, MODY- 3'de hepatik nükleer faktör-1 α , MODY- 4'de insülin promotor faktör 1, MODY- 5'de ise hepatosit nükleer faktör- 1 β genlerinde hatalar gözlenmektedir¹².

Kısacası, NIDDM, hedef organ yanıtında azalma, bozulmuş insülin sekresyonu ile karakterli, karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalık olarak tanımlanabilir. İnsülin rezistansı, β hücreleri üzerinde, sürekli yüksek insülin ihtiyacını karşılama stresi ve giderek yetmezliğe neden olabilecek bir hiperinsülinizm oluşturabilir. Olasılıkla NIDDM'li hastalarda, pankreatik β hücreleri, genetik olarak bu tip streslere duyarlıdır. Böylece, insülin rezistansı, zamanla, yetersiz ya da bozulmuş insülin sekresyon yanıtına yol açabilecek olaylar zincirini başlatabilir¹¹.

2.2. İnsülin

İnsülin iki zincirde toplam 51 aminoasidi olan 5600 dalton ağırlığında bir polipeptid hormondur. Kısa olan A zinciri 21, uzun olan B zinciri 30 aminoasit içermektedir. Zincirler arasında iki disülfid bağı vardır, bu bölge majör 'loop' olarak adlandırılırken; zincir içi disülfid bağı minör 'loop' olarak adlandırılmaktadır¹³ (Şekil 1).



Şekil 1. İnsülinin Yapısı¹⁴.

2.2.1. İnsülin Biyosentezi ve Salınımı

İnsülin, pankreasın Langerhans adacıklarında, β hücrelerinde insülin prekürsörü olan preproinsülin olarak sentezlenmektedir. Preproinsülin, 109 aminoasit rezidülü bir polipeptiddir, ribozomlarda oluştuktan sonra endoplazmik retikuluma geçerek 23 aminoasitli hidrofobik pre-bölgesini kaybeder. Böylece 86 aminoasitli proinsüline dönüşür. Golgi kompleksi içindeki mikroveziküllere giren proinsülin, proteazların etkisiyle, C peptid segmentini kaybeder¹⁵.

Proinsülinin insüline dönüşümünde tripsin, karboksipeptidaz ve çeşitli proteazlar rol oynamaktadır¹⁶.

Pankreasın β hücrelerinden insülin salınımı, depo veziküllerinin hücre membranına taşınması, membranın yapışma noktasından delinmesi ve sonunda vezikülün dışarı atılmasıyla gerçekleşir. β hücresi stimülasyonu ile insülin salınması arasındaki bağlantıyı Ca^{+2} sağlar. Bu yolda cAMP'nin ve fosfoinozitol hidrolizi sonucu hücrede oluşan inozitol trifosfatın (IP_3) da katkısı vardır. Ca^{+2} hücre içinde kalmodulin ve ona bağlı bir protein kinaz aracılığı ile, insülin veziküllerinin hücrenin içinden membranın iç yüzüne taşınmalarını ve emiyositoza uğramak üzere veziküller içindeki insülinin salınımını sağlar. cAMP ve IP_3 mitokondriler ve endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımına neden olur^{17, 18}.

İnsülin salınımı besinler, gastrointestinal hormonlar, diğer hormonlar ve sinirsel uyarılar ile stimüle edilmektedir. Glukoz, insanda, insülinin hem biyosentezini hem de salınımını uyaran tek besin öğesidir¹⁹.

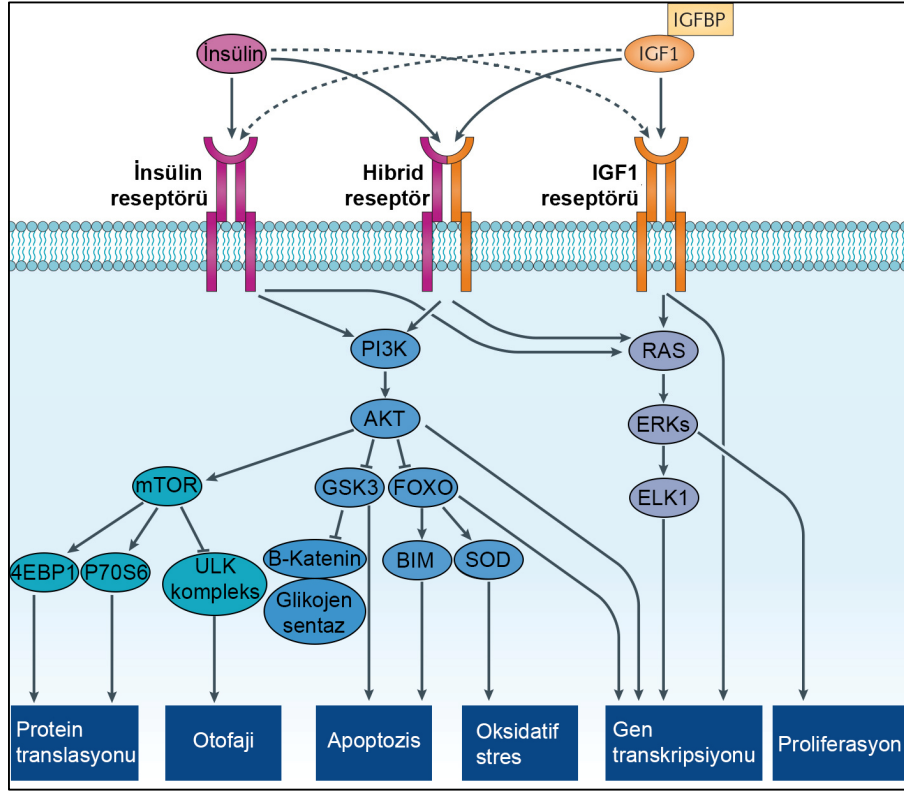
β hücrelerinden insülin salınımı intraselüler K^+ konsantrasyonu ile kontrol edilir. K^+ konsantrasyonunun kontrolü de K-ATP kanalları ile sağlanır. Bu por sistemi, voltaj bağımlıdır, hücre membranının depolarizasyonunu takiben açılır. İnsülin salgılanması K^+ transport mekanizmasındaki dengeye bağlıdır²⁰.

2.2.2. İnsülin Reseptörü

İnsülin etkisini hücre yüzeyinde yer alan spesifik reseptörüne bağlanarak gösterir. Reseptör, birbirine disülfid bağları ile bağlı iki ekstraselüler α alt ünitesi ve iki transmembran β alt ünitesi içeren heterotetramer yapıda bir glikoproteindir. Her α alt birimi ~130 kDa ağırlığında olup ligand bağlanma bölgesi içerirken, β alt birimi ise ~95-97 kDa ağırlığında ve tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir²¹. β alt birimlerinin, α alt birimlerine bağlı küçük bir hücre dışı kısım, yaklaşık 20 aminoasitlik bir transmembran kısım ve tirozin kinaz aktivitesine sahip büyük bir hücre içi kısım olmak üzere üç bölgesi vardır. İnsülin molekülünün reseptöre bağlanarak aktive etmesi tirozin kinaz etkinliğini artırır, tirozin kinaz etkinliği ise sinyal iletimi için gereklidir^{7, 18}.

İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) reseptörleri %50'den daha fazla aminoasit sekans homolojisi ve %84 oranında da tirozin kinaz bölge homolojisi gösterirler. İnsülin ve IGF-1 yarı reseptörlerinin (bir α ve bir β alt ünitesi) heterodimerizasyonu ile insülin/IGF-1 hibrid reseptörleri oluşur. Hibrid reseptörlerin biyolojik rolü hala tam olarak açık olmamakla birlikte, fonksiyonel çalışmalar IGF-1'e insüline kıyasla daha yüksek afinite gösterdiklerini dolayısıyla IGF-1 reseptörleri gibi davrandıklarını düşündürmektedir²¹.

İnsülin reseptör ve IGF-1 reseptör aktivasyonu ortak sinyal kaskadını indüklemesine rağmen, aktivasyonun biyolojik etkileri farklıdır. İnsülin, güçlü bir metabolik hormon etkisi gösterirken, IGF-1 büyüme-uyarıcı bir sinyal oluşturmaktadır²² (Şekil 2).



Şekil 2. İnsülin ve IGF1 sinyal yolağı²².

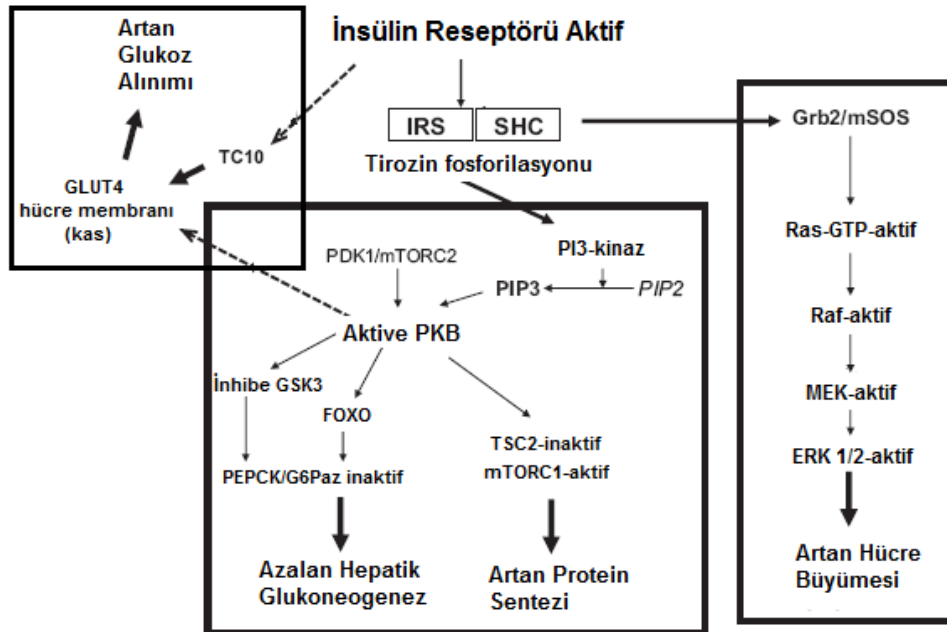
2.2.3 Periferde ve Merkezi Sinir Sisteminde İnsülin-Glukoz İlişkisi

İnsülin'in, birçok doku ve organ üzerinde çok çeşitli etkileri olmasına rağmen, plazma seviyelerini belirleyen tek hücre tipi, pankreatik β hücreleri'dir²³. İnsülin, gelişme-büyüme için gerekli enerji depolarının sürdürülebilirliği ve plazma glukoz seviyelerinin regülasyonu olmak üzere tüm metabolik homeostazı yakından ilgilendiren oldukça önemli iki temel fonksiyona sahiptir. Bu fonksiyonların gerçekleşebilmesinde Merkezi Sinir Sistemi (MSS) anahtar bir rol oynamaktadır²⁴.

İnsülin periferdeki etkisini, glukoz alımını insülin-duyarlı glukoz taşıyıcısı GLUT-4 aracılığıyla sağlayarak, kan glukoz seviyelerinin

düşmesine neden olarak gösterir ve glukozun düşük seviyeleri β hücreleri tarafından insülin-duyarsız GLUT-2 aracılığıyla tanımlanarak insülin sekresyonu azaltılır²³. İnsülin yağ ve kas dokusunda, GLUT 4' ün intraselüler bölgeden plazma membranına translokasyonunu uyararak, glukoz alımını arttırmaktadır.

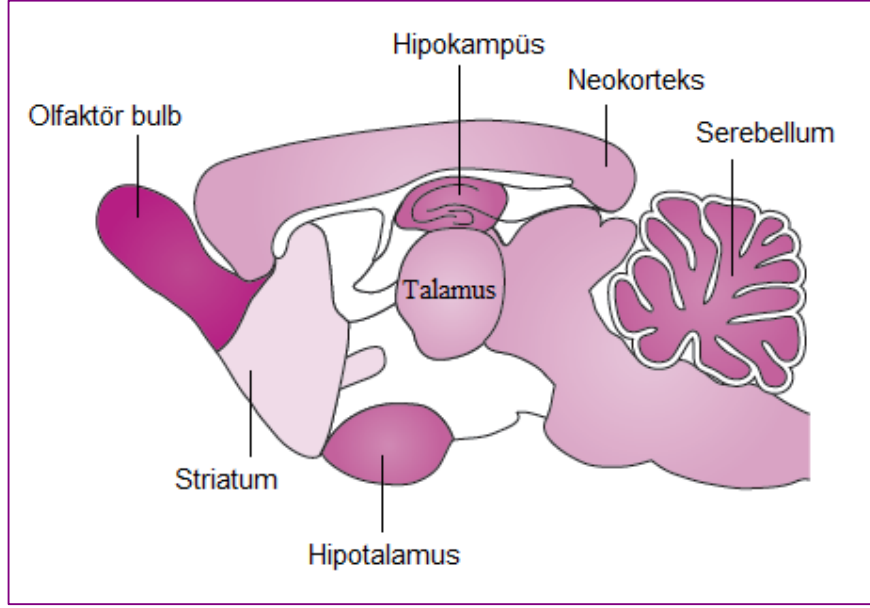
İnsülin aynı zamanda hücre büyümesi ve farklılaşması üzerine uyarıcı etkiler göstermektedir. Yağ, kas ve karaciğer dokusunda, lipogenezi, glikojen ve protein sentezini uyararak; lipoliz, glikojenoliz ve protein yıkımını inhibe ederek substratların depolanmasını desteklemektedir. İnsülin, karaciğerde glukoz alımını stimüle etmemesine rağmen, glikojenoliz ve glukoneogenezi bloke ederken, glikojen sentezini stimüle eder ve bu şekilde açlık kan glukoz düzeylerini regüle eder²⁵ (Şekil3)²⁶.



Şekil 3. İnsülin sinyal yolağının glukoz alımını (kas,adipoz doku), glukoneogenez (karaciğer), protein sentezi ve hücre büyümesi üzerine düzenleyici etkisi²⁶.

Periferal dokuların aksine, Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nde glukoz transportunun çoğunluğu insülin-den bağımsız olsa da^{23, 27}, nöronlarda transport insülin-duyarlı GLUT-4 ve GLUT-8 ile gerçekleşmektedir²⁷. Serebellum, hipotalamus ve hipokampus insülin-duyarlı GLUT-4 içermektedir, GLUT-8 ise intraselüler lokasyon göstermektedir, glukoz internalizasyonundan ziyade endoplazmik retikulumda protein glikozilasyonuna katılmaktadır²³. İnsülin-duyarsız GLUT-1, glukozun kan beyin bariyerinden transportunu difüzyon aracılığıyla yapmaktadır, enerjiye gereksinim yoktur, transport doygunluğa göre devam etmektedir²³. İnsülin-duyarsız glukoz taşıyıcıları GLUT-1 (astrositlerde), GLUT-3 (nöronlarda) ve GLUT-5 (mikroglia), MSS tarafından glukoz alınımının büyük bir kısmını gerçekleştirmektedir²⁸. Pankreas tarafından kullanılan glukoz taşıyıcısı insülin-duyarsız GLUT-2, hipotalamusta bazı hücrelerde gözlenmiştir²³. İnsülin'in bilişsel ve sinaptik gelişim üzerine etkilerinin bir kısmının, insülin duyarlı glukoz taşıyıcıları aracılığıyla olabileceği düşünülmektedir²⁸.

İnsan ve hayvan davranış çalışmalarında glukozun hafızayı güçlendirici etkisinin olduğu²⁹, insülin'in bilişsel ve sinaptik gelişime katkısını γ -aminobütirik asit (GABA), glutamat reseptörleri ve alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionikasit (AMPA) reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirdiği tanımlanmıştır³⁰.



Şekil 4. İnsülin reseptörlerinin beyin dokusunda yoğunluklarına göre dağılımı²².

2.2.4 Beyin Dokusunda İnsülin Fonksiyon ve Sinyali

2.2.4.1 Beyin Dokusunda İnsülin Reseptörü

Oldukça uzun yıllar boyunca, beyin dokusu insülin-duyarsız bir organ olarak tanımlanmıştır^{27, 31}. İlk defa 1960 ların sonunda köpek serebrospinal sıvısında (CSF) immunoreaktif insülin varlığının belirlenmesi, dolaşımdaki insülinin kan-beyin bariyerini geçebildiğine dair bir kanıt olarak kabul edilmiştir³². 1970 lerin sonunda ratlarda yapılan çalışmada, beyinde insülin reseptörlerinin keşfi ile³³, insülinin beyin fizyolojisinde önemli bir rol oynadığı, serebral insülin sinyalinde ve glukoz homeostazında meydana gelen bozuklukların beyin patolojisi üzerinde etkisinin olabileceği belirtilmiştir²⁷. İnsülin reseptörleri (IR) beyin dokusunda özellikle olfaktör bulb, hipotalamus, serebral korteks, serebellum ve hipokampüste yüksek konsantrasyonda olmak üzere çeşitli bölgelerde bulunmaktadır^{31, 34} (Şekil4). Ayrıca insülin reseptörleri nöronlarda yüksek, gliada ise düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır²⁴. Yetişkin memeli beyinde, nöronlarda yüksek konsantrasyonda nöron-

spesifik tip ve glial hücrelerde düşük yoğunlukta periferik tip olmak üzere iki tip IR gözlenmiştir³⁵. Nöronal insülin reseptörünün moleküler yapısı ve birçok biyokimyasal özelliği bakımından periferik dokularda bulunan reseptöründen farksız olduğu belirtilmiştir³⁶. Ancak, nöronal insülin reseptörünün α ve β altünitelerinin moleküler ağırlığı periferik dokulardakine oranla daha azdır³⁷. Nöronal insülin reseptörü, periferik dokulardaki insülin reseptörünün aksine yüksek insülin konsantrasyonlarına maruz kaldığında down-regülasyona uğramaz³⁸.

2.2.4.2 Serebral İnsülin Kaynağı

Yetişkin beyninde insülin büyük oranda periferik kaynaklıdır, pankreatik β hücrelerde sentezlendikten sonra CSF aracılığıyla beyin dokusuna taşınmaktadır³⁹⁻⁴².

İnsülin, reseptör aracılı doygunluk duyarlı transport mekanizması ile kan-beyin bariyerini aşarak santral sinir sistemine girer^{24, 34, 39-42}. İnsülin kan-beyin bariyerini, yaklaşık 0.5–0.6 $\mu\text{l/g}$ -dak oranında, çeşitli çalışmalarda belirtildiği şekilde ise sınırlar biraz daha genişletilecek olursa 0.2-1.7 $\mu\text{l/g}$ -dak oranında geçmektedir⁴³. İnsülin transportu beyin dokusunun farklı bölgelerinde farklı hızda gerçekleşmektedir. Olfaktör bulbul, transportun en hızlı olduğu bölgedir, diğer beyin bölgelerine göre transport 2-6 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Olfaktör bulbul aynı zamanda insülin proteininin⁴⁴ ve reseptörlerinin en yüksek konsantrasyonda bulunduğu bölgedir^{45, 46}. Yapılan çalışmalarla, insülinin kan-beyin bariyerini geçişinin çeşitli durumlardan etkilendiği gösterilmiştir; uzun süreli açlık, obezite, yaşlılık, deksametazon tedavisi gibi faktörler insülinin MSS'ye transportunu azaltırken, Diabetes Mellitus'un bazı modellerinde ve neonatal dönemde artmaktadır³⁹. Buna karşın, hem olgunlaşmamış hem de olgun memeli nöronal hücrelerinde preproinsülin I

ve II mRNA varlığının ve insülin sentezinin belirlenmesi^{47, 48, 49} ile insülinin küçük bir kısmının beyinde, de novo sentezlenebildiği⁵⁰ onaylanmıştır. Lacroix ve ark.nın çalışmasında memelilerde ekstrahepatik insülin kaynağının sadece olfaktör mukozadaki küçük bir hücre grubu olduğu belirtilmiştir⁵¹. Ek olarak, insülin mRNA' sı hipokampüsün piramidal hücrelerinde, medial prefrontal kortekste, enthorinal kortekste, perirhinal kortekste, talamusta, olfaktör bulb'ın granül hücrelerinde ve hipotalamusta yüksek oranda bulunmuştur^{52, 53}. Buna karşın, glial hücrelerde insülin mRNA' sının varlığına ya da sentezine dair bir kanıt bulunamamıştır⁵³.

Yükselen periferal insülin seviyeleri, akut olarak beyin ve serebrospinal sıvı insülin seviyelerini yükseltir, buna karşın uzayan periferal hiperinsülinemi kan-beyin bariyeri insülin reseptörlerinin down-regülasyonunu uyarak beyin dokusuna insülin transportunu azaltır^{54, 55}.

2.2.4.3 Beyinde İnsülin Aktivitesi

İnsülinin beyinde pleiotropik aktivite gösterdiği belirtilmiştir⁵⁶, insülin beyin glukoz metabolizmasındaki regülatör etkisine ek olarak, nöromodülatör ve nöroendokrin bir molekül gibi davranmakta, nöronal gelişim ve sağkalımda önemli bir rol almaktadır^{56, 57}. İnsülinin, MSS de sinirsel gelişim ve sinaptogenez üzerinde bir büyüme hormonu gibi rol oynadığı belirtilmiştir⁵⁸.

Çevresel faktörler, metabolik ve hormonal sinyallere cevaben besin alımı ve enerji tüketiminin regülasyonu ve enerji dengesinin kontrolü hipotalamusta gerçekleşir. İnsülin, regülatör peptid ve nörotransmitterlerle etkileşimi sayesinde yemek yeme, hafıza ve öğrenme davranışları ile ilişkili süreçleri aktive edebilir. Beyinde insülinin etkin aktivitesini gösterebilmesi için enerji, glukoz ve lipid homeostazının sürdürülebilirliğine

ihtiyaç duyduğu kabul edilmektedir²⁴. Beyinde insülin, yeme davranışının kontrolü ile ilgili olarak enerji ve glukoz homeostazının korunması için oreksijenik ve anoreksijenik nöromodülatörlerle etkileşim halindedir. Hipotalamusta insülinin etkileşim içinde olduğu katabolik faktörler; serotonin, 5-hidroksitriptamin (5-HT), leptin, melanokortinler iken; anabolik nöropeptidler ise nöropeptid Y, agouti related protein (AgRP) ve melatonin'dir²⁴. İnsülin, ayrıca kognitif fonksiyonlar üzerinde etkileri olduğu bilinen asetilkolin ve norepinefrin'in MSS seviyelerinin regülasyonunda da etki gösterir^{59, 60}.

Serebral insülin reseptörünün akut stimülasyonu, insülinin intraserebroventriküler enjeksiyonu ile de artabilir. Bu durum, serebral kortekste glikolitik enzimler heksokinaz ve fosfofruktokinazın doz bağımlı stimülasyonunu aktive eder⁶¹, aynı zamanda insülinin beyin pirüvat dehidrogenaz⁶² ve kolin asetiltransferaz⁶³ enzimleri üzerinde de stimülatör etkisi vardır. Bu bulgular, beyinde hem glikolitik akışın hem de pirüvat oksidasyonunun insülin tarafından, non-nöronal dokulardaki hormonal etkisine paralel bir şekilde, stimüle edildiğini göstermektedir³⁶.

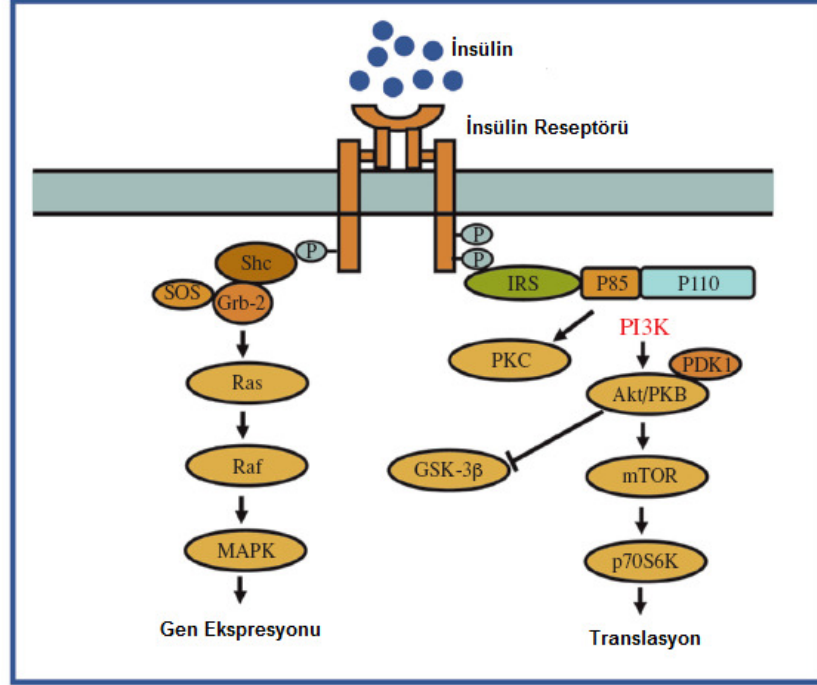
Ayrıca insülin, glutamat ve GABA reseptörleri gibi stimülatör ve inhibitör reseptör aktivitelerinin modülasyonunda ve uzun dönem hafızanın korunmasında gerekli gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol alan sinyal yollarını tetiklenmesinde rol oynamaktadır³⁰.

2.2.5 İnsülin Sinyal Yolağı

İnsülin periferde olduğu gibi, beyinde de etkilerini, reseptörü aracılığıyla, insülin reseptör substrat/fosfotidilinozitol-3-kinaz yolu (IRS/PI3K) ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolu aracılığıyla gösterir^{23, 64, 65}. Beyin dokusunda, insülin ve IGF1 sinyalinin ilişkili olduğu belirtilmiştir²⁷. Merkezi sinir sisteminde, insülin ve IGF1 sinyali, bilişsel fonksiyonun regülasyonu ve sürdürülmesinde önemli bir rol almaktadır⁶⁶. İnsülin ve IGF1 reseptörü tetramerik yapıda olup, 2 α ve 2 β alt ünitelerinden oluşmaktadır⁶⁷. İnsülin α alt birimine bağlanarak, β alt biriminin transfosforilasyonuna ve konformasyonel değişikliğine neden olarak sinyal kaskadının başlamasını uyarır⁶⁷. Aktive IR'nin intraselüler substratlarında biri olan IRS, insülin reseptörünün fosforile rezidüsüne bağlanarak, hücre için metabolik ya da mitojenik etkilerine bağlı olarak PI3K ya da Ras yolağını aktive eder⁶⁸.

PI3K yolağında, regülatör p85 altbirimi ve katalitik p110 altünitesi, fosfotidilinozitol-4,5-difosfatı (PIP2) fosforilleyerek fosfotidilinozitol-3,4,5-trifosfatın (PIP3) oluşumunu sağlar. PIP3, fosfoinozitol bağımlı protein kinaz 1'in (PDK1) fosforilasyonunu uyararak serin/threonin kinaz Akt (Protein Kinaz B) ve Protein Kinaz C'yi içeren kaskattaki diğer enzimleri aktive eder^{24, 68}. Akt aktivasyonu glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) ve 6-fosfofrukto-2-kinaz gibi metabolik enzimleri ve ayrıca GLUT-4'ün intraselüler kompartımandan plazma membranına translokasyonunu uyararak glukoz metabolizması üzerine etki eder^{68, 69, 70}. Aktive Akt, önemli bir proapoptotik protein olan Bcl-2 ailesi üyesi BAD'ı fosforilleyerek inhibisyonuna neden olur⁷¹. Ayrıca aktive Akt, apoptoziste (Bcl-2 ailesi üyesi Bim aracılığıyla) ve hücre büyümesinin inhibisyonunda rol alan sinyal moleküllerinden forkhead box (FoxO) proteinlerinin fosforilasyonunu da tetikler⁷². Hücre büyümesi ve metabolizması üzerine insülin sinyali

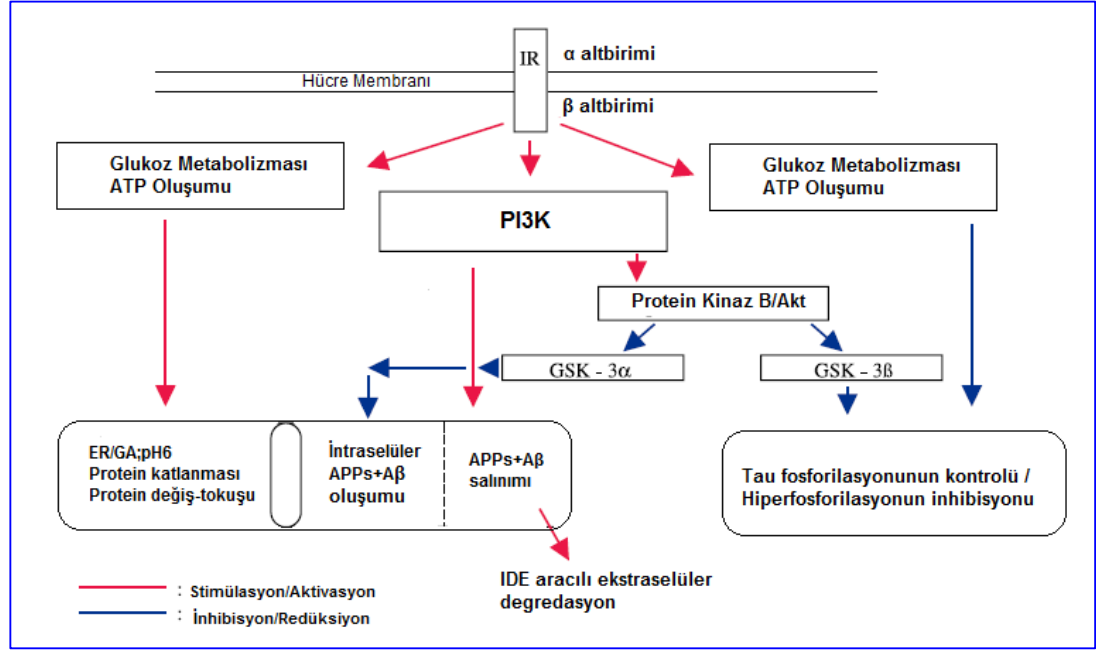
aracılığı ile etki eden “mammalian target of rapamisin” (mTOR) yolu da PI3K-Akt aktivasyonu ile regüle edilmektedir⁶⁸ (Şekil 5).



Şekil 5. Beyin Dokusunda İnsülin Reseptör Sinyali⁷³.

PI3K, insülin ve IGF1'in mitojenik ve metabolik aktivitesinde oldukça önemli bir role sahiptir²⁵. Aktive PI3K/Akt sinyal yolu glikojen sentaz kinaz 3 (GSK-3)'ün α ve β sitozolik formlarını serin 21 ve 9 rezidüsünden fosforilleyerek inhibe eder^{31, 36}. GSK-3, glikojen metabolizması, gen transkripsiyonu, apoptozis ve mikrotübül stabilitesi gibi çeşitli hücrel olaylarda yer almaktadır. GSK-3 aktivitesi, insülin ve Wnt sinyal yolları tarafından kontrol edilir⁷⁴. GSK3- α 'nın Amiloid β (A β) peptid oluşumunun regülasyonuna katkısının olduğu⁷⁵ ve diğer taraftan GSK3- β 'nin tau fosforilasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir⁷⁶. Yapılan nöronal hücre kültür çalışmasında GSK3- β 'nin tau fosforilasyonunu arttırdığı ve tau'nun mikrotübül affinitesini azalttığı belirlenmiştir⁷⁷ (Şekil 6).

Wnt sinyali, GSK3- β 'nin regüle ettiği β -katenin aracılığıyla ise, MSS'de sinaptik plastisiteye aracılık etmektedir⁶⁶.



Şekil 6. Normal koşullar altında İnsülin/İnsülin reseptörünün tau protein ve A β peptid metabolizması üzerindeki etkileri³⁶.

Belirtildiği gibi hem insülin mRNA sını hem de IR, öğrenme ve hafıza için önemli bir bölge olan hipokampüste yüksek oranda eksprese edilmektedir, ki bu durum insülinin bilişsel fonksiyonda rolü olabileceğini desteklemektedir³⁰. İnsülinin bu etkisinin tam mekanizması açık olmamakla birlikte, insülin tarafından uyarılan PI3K ve MAPK sinyal yollarının öğrenme ve hafızada kritik katkılarının olabileceği düşünülmektedir³¹.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, IR sinyalinin sinaptik fonksiyon ve dendritik morfoloji için önemli olduğu belirtilmiştir. İnsülinin

nöronal sağkalım üzerindeki etkisini GABA sinyal yolağını aktive ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir²³.

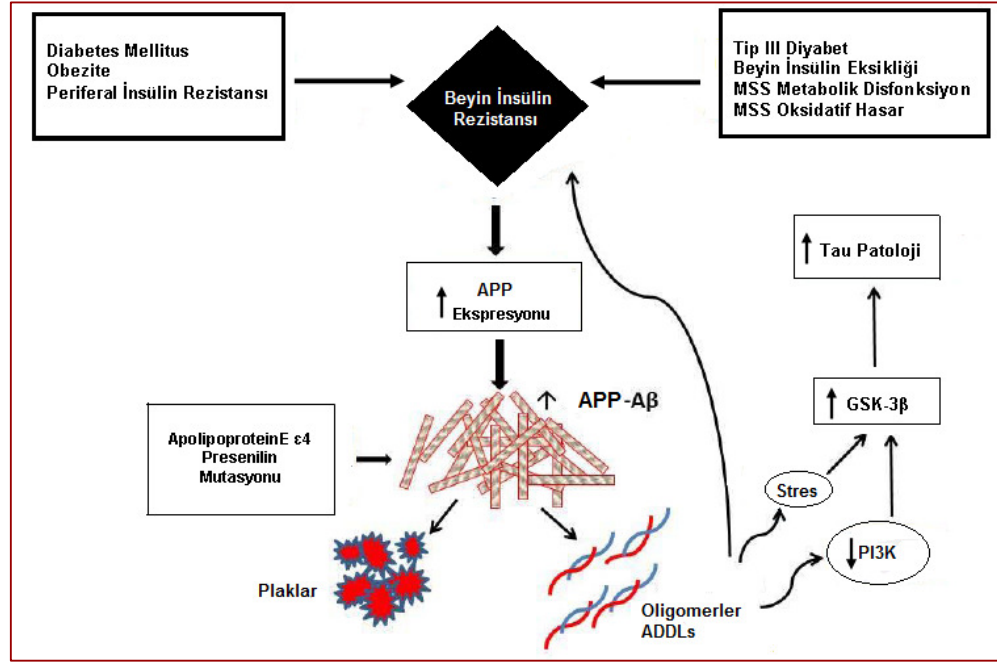
2.2.5.1 İnsülin ve Serebral Amiloidozis

Beyin dokusunda Amiloid- β (A β) birikiminin nöronal fonksiyon bozukluğu, nörodejenerasyon ve demansa yol açan olaylar zincirini başlattığı ileri sürülmektedir⁷⁸. A β peptidin öncül proteini olan Amiloid Prekürsör Proteini (APP) hücre dışı büyük bir N terminal domain, hücre zarını geçerek sitoplazmaya uzanan transmembran domain ve kısa sitoplazmik C terminal domainden oluşan integral tip 1 membran glikoproteindir⁷⁹. APP'nin normal fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır fakat elde edilen kanıtlar ile APP'nin hücre bağlantılarında, nöronların canlılığının, akson ve dendritlerin uzamasının düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu ileri sürülmektedir. APP'nin hücre dışından sinyalleri olarak hücre içine ileten hücre yüzey reseptörü olarak fonksiyon gördüğüne dair görüşler olmakla birlikte APP'nin ligandları ve sinyal yolağındaki etkileşimleri tam olarak belirlenememiştir⁸⁰. Nörotoksik APP-A β oligomerik fibrillerinin veya çözünemeyen agregat fibrillerin (plak) birikimiyle sonuçlanan APP'nin disregülasyonu Alzheimer'ın patolojik karakteristiklerinden biridir. APP, β ve γ sekretazların ardışık olarak proteolitik yıkımı ile A β peptidini oluşturmaktadır⁸¹. Patofizyolojik olarak APP gen ekspresyonunun artışı değişen proteolizi ile birliktedir ve 40 veya 42 aminoasit uzunluğunda A β peptid agregatlarının birikimi ile sonuçlanır. Presenilin1 (PS1), Presenilin2 (PS2) ve APP genlerinde mutasyon veya Apolipoprotein-E ϵ 4 (ApoE- ϵ 4) allelindeki kalıtsal bir hasar, beyin dokusunda A β peptid sentezi ve birikiminin artışından sorumludur⁶⁶ (Şekil 7).

İnsülin ve IGF-1'in A β metabolizmasında etkilerinin olduğu bilinmektedir^{82, 83}. İnsülin, direkt olarak intraselüler A β peptid sekresyonunu artırır ve nöronal intraselüler etkileşimi stimüle ederek intraselüler A β peptid seviyelerini azaltır⁸². İntraselüler A β (1-40) ve A β (1-42) seviyeleri, MAPK sinyali tarafından uyarılan, golgiden plazma membranına APP/A β transportunu hızlandırılarak, azaltılır⁸². Dolayısıyla, beyin dokusunda düşük insülin seviyeleri, A β 'nin intraselüler ortamdan ekstraselüler ortama salınımının azalması üzerine etki edebilir⁸⁴. Buna ek olarak, insülinin ekstraselüler A β seviyelerini, ekstraselüler ortama APP sekresyonunu artırarak ve degradasyonunu insülin-degrade enzim (IDE) aracılığıyla inhibe ederek, arttırdığı belirtilmiştir^{31, 34, 82}. İlginç bir şekilde çözünebilir A β 'nin insülin reseptörüne bağlanarak beyin insülin sinyal iletiminin bozulmasına neden olabileceği belirtilmiştir⁸⁵.

Carro ve ark.ın yaptığı çalışmada, IGF-1'in de A β metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı, rat ve farelerde serebral A β seviyeleri ile serum IGF-1 seviyelerinin korele olduğu belirtilmiştir⁸³.

Albumin ve transtretinin A β nın beyinden transportuna katkıda bulunduğu, tümör nekrozis faktör α 'nın (TNF- α) ise A β 'nin yıkımında IGF-1 üzerine bloke edici bir etkisinin olduğu belirtilmiştir. İntrakarotid TNF- α eklenmesi, IGF-1 indüklü albümin ve transtretinin koroid pleksusa geçişini engellemektedir. Bu etki, CSF'de çözünebilir A β 'nin birikmesini indükleyen IGF-1'in inhibisyonu ile paralellik göstermektedir. İnsülin-IGF1 sinyali serebral amiloidozisin düzenlenmesinde, TNF- α nın etkilerine zıt görev alarak önemli bir rol üstlenmektedir⁵⁷.

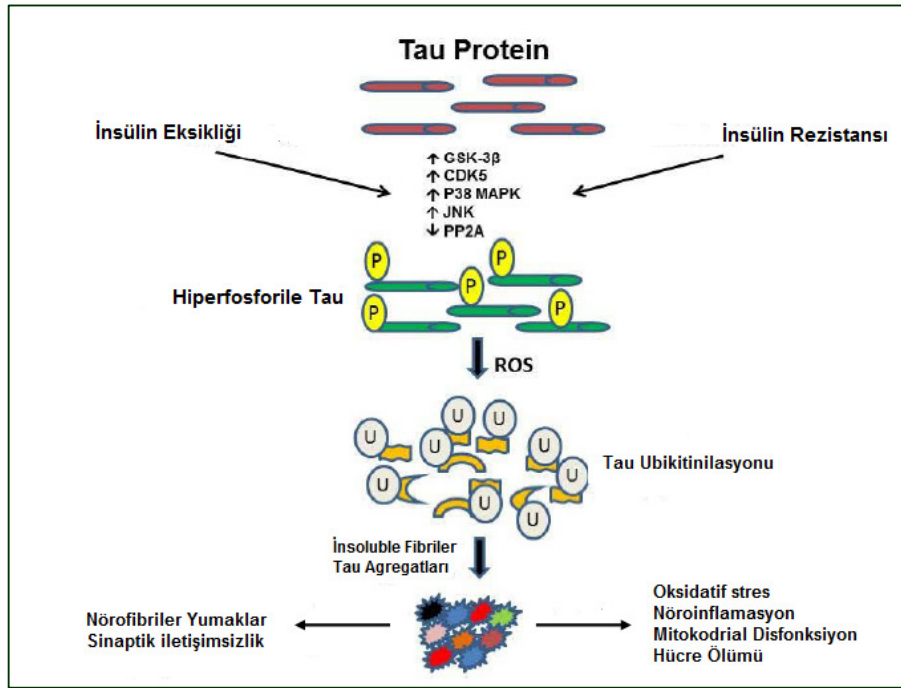


Şekil 7. Beyin insülin rezistansı ve APP-Aβ agregasyonu⁶⁶.

2.2.5.1.1 IDE (İnsülin Degrade Enzim)

IDE farklı dokularda farklı şekilde eksprese edilen 110 kDa molekül ağırlığında bir sitozolik metalloendoproteazdır¹⁸. Karaciğer, böbrek ve kas dokusunda olduğu gibi beyin dokusunda da⁸⁶ yüksek oranda eksprese edilerek, Aβ'nin beyin dokusundan uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynamaktadır⁸⁷⁻⁸⁹. IDE, farklı grup substratı degrade edebilir. İnsülin, transforming growth faktör α, atrial natriüretik peptid ve insülin benzeri büyüme faktörü II, yüksek affinite ($k_m \sim 0.1 \mu M$) gösteren substratlar iken; glukagon, epidermal growth faktör, insülin benzeri büyüme faktörü I ve Aβ analogları düşük affinite ($k_m > 2 \mu M$) göstermektedir^{87, 90}. IDE'nin insülin ve Aβ' ya degrade edici kapasitesi, intraselüler metabolik duruma göre değişiklik gösterebilir. Normal insan beyinde, nötral pH'da⁸⁷ IDE temel çözünebilir Aβ peptid degrade edici enzimdir, fakat en yüksek Aβ

peptid degrade edici aktivitesini pH 4 ile 5 arasında gösterir³⁶. Rat kortikal hücrelerinde, IDE'nin, A β (1-40) ve A β (1-42)'nin nörotoksik etkilerini ortadan kaldırabileceği gösterilmiştir⁹¹. Aşırı insülinin, A β (1-40) ve A β (1-42)'nin degradasyonunu neredeyse tamamıyla inhibe edebileceği belirtilmiştir⁹⁰. IDE'nin yüksek insülin konsantrasyonlarında, insüline A β 'dan çok daha yüksek affinite gösterdiği, dolayısı ile hiperinsülineminin A β atılım mekanizmasını engellediği belirtilmektedir⁹².



Şekil 8. Tau patolojisinde insülin rezistansı ve eksikliğinin rolü ⁶⁶.

2.2.5.2 İnsülin ve Tau Fosforilasyonu

Tau, mikrotübül-ilişkili protein ailesine ait, mikrotübül oluşumu ve stabilizasyonundan sorumlu bir proteindir⁹³. Fizyolojik şartlar altında N-terminal domain ve mikrotübül bağlayıcı domaine bölünür; N-terminal domain nörofilamentler, spektrin, aktin gibi diğer sitoskeletal proteinlerle etkileşim halinde iken, mikrotübül bağlayıcı domain aksonal transportunun regülasyonu ile tübülün polimerizasyonu ve stabilizasyonunu sağlamaktadır¹⁰¹.

Tau proteini için fosforilasyon, ubiquitinilasyon, glikozilasyon, nitrasyon, glikasyon, oksidasyon ve deaminasyon gibi pekçok post-translasyonel modifikasyon tanımlanmaktadır. Tau proteininin serin, tirozin ve threonin bölgelerinden fosforilasyonu ve defosforilasyonu, çeşitli protein kinaz ve protein fosfatazlar tarafından regüle edilir³⁶. Tau fosforilasyonundan sorumlu protein kinazlar arasında; ATP-bağımlı PK^{erk36} ve PK^{erk40 95}, protein kinaz-1-glikojen sentaz kinaz-3 β ⁷⁶ bulunmaktadır, ve tümü insülin bağımlı görev yapmaktadır³⁶. Tau proteininin aşırı fosforilasyonu “taupathies” olarak isimlendirilen nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılıdır. Aşırı fosforile tau'nun mikrotübülle bağlantısı zayıfladığı için mikrotübül stabilizasyonu dağılmaktadır. Nöronlarda, hiperfosforile tau' nun tersiyer yapısının bozulduğu, anormal filament yapısına büründüğü “Paired Helical Filament” (PHF) ve bunların oluşturduğu “neurofibrillary tangle” nörofibriler yumak (NFT) yapılarının Alzheimer hastalığının temel karakteristik özelliği olduğu bilinmektedir^{95, 96}. Fibriler tau'nun intranöronal birikimi, nöronal sitoskeletal ağı ve aksonal transportun bozulmasına yol açarak sinaptik iletişimsizliğe ve nörodejenerasyonun ilerlemesine neden olur⁶⁶.

İnsülin ve IGF'nin tau gen ekspresyonunu⁶⁶ ve fosforilasyonunu in vivo⁹⁷ ve in vitro⁷⁶ olarak regüle ettiği belirtilmiştir (Şekil 8). Alzheimer'da beyin insülin ve IGF rezistansı, PI3K-Akt sinyalinin⁹⁸ ve Wnt/ β -katenin sinyalinin azalması, GSK3- β aktivasyonunun artması ile sonuçlanır⁹⁹. Ek olarak, tau hiperfosforilasyonu, siklin-bağımlı kinaz 5 (cdk-5) ve c-Abl kinazların artmış aktivasyonu¹⁰² ve protein fosfataz 1 ve 2A'nın inhibisyonu^{99, 101} ile ilişkilidir. Hong et al.'un çalışmasında glikojen sentaz kinaz 3 (GSK-3)'ün insan nöron hücre kültürlerinde mikrotübül ilişkili protein tau'nun fosforilasyonunda rol alabileceği gösterilmiştir⁷⁷. Hem nöron kültürleri hem de transjenik farelerde yapılan çalışmalarda aktif form GSK3- β 'nin overekspresyonunun tau fosforilasyonunu arttırdığı gözlenmiştir¹⁰². Bunlara ek olarak, insülin ve ilişkili hormonu IGF-1, GSK3- β aktivitesini inhibe ederek tau fosforilasyonunu azaltmaktadır⁷⁷. IRS-2 (insülin reseptör substrat) knockout farelerde yapılan bir çalışmada insülin veya IGF-1 sinyalindeki bozulmanın beyinde tau fosforilasyonunu arttırdığı belirlenmiştir⁹⁸. Bu çalışmalarla, in vivo nörofibril-yumak patolojisinde insülin ve IGF-1 in direkt etkilerinin yanısıra, A β üzerindeki etkileri aracılığıyla tau fosforilasyonu üzerinde indirekt etkilerinin de olabileceği belirtilmektedir⁵⁷. İnsülinin, tau regülasyonu üzerinde çift yönlü etki gösterdiğine dair bulgular da bulunmaktadır. Kısa süreli insülin tedavisinden (1 dak) sonra, tau protein fosforilasyonu ve GSK3- β aktivitesi artmaktadır¹⁰³. Oysaki uzun süreli insülin maruziyeti GSK3- β aktivitesinin down-regülasyonunu tetiklemektedir⁷⁷.

Bu bilgiler, APP metabolizmasının, intraselüler APP sekresyonu ve amiloid- β peptid oluşumunun, APP nin ve A β 'nin ekstraselüler boşluğa salınımının ve de tau fosforilasyonunun dengesinin, ATP ve asetilkolin aktivasyonunun dahil olduğu insülin/insülin reseptör sinyal iletiminin kontrolü altında olduğunu desteklemektedir³⁶. (Şekil 6)

2.3 Diabetes Mellitus Ve Beyin Dokusu

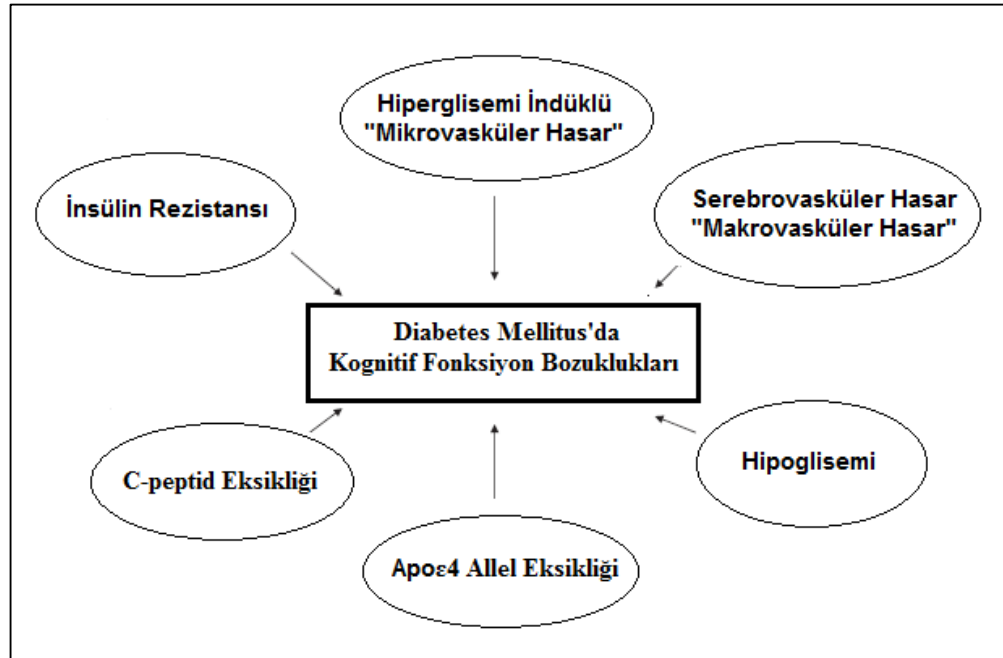
2.3.1 Diabetes Mellitus ve Bilişsel Fonksiyon Bozuklukları

Diyabetli ve bilişsel fonksiyon bozukluğuna sahip ilk hasta 1922 yılında görülmüştür¹⁰⁴ ve o tarihten itibaren diyabette bilişsel disfonksiyonların önemini anlamak için çok sayıda çalışma dizayn edilmiştir¹⁰⁵. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, bilişsel disfonksiyon bozuklukları ve demans Diabetes Mellitus'un komplikasyonları arasında gösterilmektedir¹⁰⁶. Yapılan çok sayıda çalışma obezite ve/veya insülin homeostazındaki değişikliklerin sadece vasküler demans değil Alzheimer için de risk faktörlerinin artışı ile ilişkili olduğunu belirtmektedir¹⁰⁶. Ayrıca Tip I ve Tip II Diabetes Mellitus, çeşitli nörofizyolojik fonksiyonların azalışında önemli risk faktörleridir¹⁰⁶. Diyabetli hastalarda yapılan post-mortem beyin çalışmalarında, demansa beyin dokusunda mikrovasküler lezyonların ve Alzheimer karakteristiği olan amiloid plakların eşlik ettiği ortaya çıkmıştır¹⁰⁶.

Tip I diyabetli hastalarda en çok gözlenen bilişsel bozukluklar; bilgi işleme hızının, psikomotor yetkinliğinin, dikkatin ve mental fleksibilitenin azalması yönünde iken, Tip II diyabetik hastalarda hafıza ile ilgili sorunların arttığı, psikomotor hızda ve frontal lob fonksiyonlarda azalma şeklinde gözlenmektedir¹⁰⁵. Diyabetin kontrol altına alınması ve diyabetik komplikasyonların azaltılmasıyla bilişsel fonksiyon bozukluklarının gerilediği görülmektedir¹⁰⁵.

Diabetes Mellitus'da gözlenen serebral lezyonlar ve bilişsel disfonksiyonların patofizyolojisinde hiperglisemi, vasküler hastalıklar, hipoglisemi ve insülin rezistansının etkili bir rol oynayabileceği düşünülmektedir¹⁰⁵. Diyabetin beyin yaşlanma sürecinde serebral atrofiyi

hızlandırarak etkili olabileceği belirtilmektedir¹⁰⁷. İnsülin ve glukoz homeostazındaki değişikliklerin, beyin insülin ve reseptörünün fonksiyonlarını etkileyebileceği ve diyabetin bu şekilde β -amiloid oligomerizasyonu ve tau hiperfosforilasyonuna katkısının olabileceği düşünülmektedir⁵⁷.



Şekil 9. Diabetes Mellitus'da kognitif fonksiyon patofizyolojisine katkısı olduğu düşünülen olası mekanizmalar¹⁰⁵.

2.3.2 Diabetes Mellitus'ta Bilişsel Disfonksiyon Patofizyolojisi

2.3.2.1 Hipergliseminin Rolü

Glukoz, beyin dokusu için temel enerji kaynağıdır, ancak kronik hiperglisemi beyin için istenmeyen bir durumdur¹⁰⁶. Hiperglisemi, periferal organlarda etkilerini, poliol pathway aktivasyonu, gelişmiş glikasyon son ürünleri (AGEs), protein kinaz C'nin diaçilgliserol aktivasyonu ve heksozamin yolağının artmış glukoz şantı^{105, 107} ile

gösterirken beyinde de aynı mekanizmalar geçerli olabilir, diyabetik hastalarda belirlenen bilişsel fonksiyon değişikliklerine bu şekilde katkı yapabilir¹⁰⁵.

Beyin yaşlanma sürecinden sorumlu olan hiperglisemi/hiperinsülinemi'nin toksik etkilerine 1) AGE birikimi, 2) artan oksidatif strese eşlik eden reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı 3) mikrovasküler patoloji olarak sınıflandırılan 3 mekanizmanın aracılık ettiği düşünülmektedir^{105,106}.

Diyabette beyin yaşlanmasının arttığı, yapılan deneysel hayvan modeli çalışmaları tarafından da desteklenmiştir¹⁰⁶. Streptozotosin enjekte edilmiş ratlarda (glukoz konsantrasyonları $27,4\pm 0,3$ mmol/litre, kontrol grubunda ise $5,9\pm 0,1$ mmol/litre) kranial sinirlerde, siyatik sinirde, serebral korteks ve retinada artmış polioll yolağı aktivasyonu sonucu artmış sorbitol miktarları ölçülmüştür¹⁰⁸. Bu yolağın diyabetik insanlarda nörobilişsel disfonksiyona katkısı net olarak bilinmemektedir¹⁰⁵.

AGE ve reseptörü RAGE'lerin diyabetin serebral komplikasyonlarının gelişimine katkısı çok açık olmamakla beraber, diyabetik farelerde (32% HbA1c, kontrol grubunda 12%) bilişsel hasarla birlikte nöronlar ve glial hücrelerde RAGE ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir¹⁰⁹. İnsanlarda yapılan postmortem doku çalışmalarında ise Diyabet+Alzheimer grubunda N-karboksimetillizin (AGE türevi) konsantrasyonlarının sadece Alzheimer grubuna oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur¹¹⁰.

Hiperglisemi aynı zamanda, reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırarak son organ hasarının oluşmasına neden olur¹⁰⁵. Streptozotosin indüklü diyabetik ratlarda (kan glukoz seviyeleri $20,72\pm 2,25$, kontrol

grubunda ise $6,04 \pm 0,64$ mmol/litre) RAGE, galektin-3 (proaterojenik molekül) ve poliol yolağı aktivasyonlarının beyin dokusunda artmış olduğu; glikolitik bir enzim olan gliseraldehit-3-P dehidrogenaz aktivitesinin azaldığı ve süperoksit seviyelerinin yükseldiğı belirtilmiştir¹¹¹.

Diyabetik hayvanların beyin dokularında gözlenen diğere biyokimyasal değışiklikler ise, azalan asetilkolin seviyeleri¹¹², serotonin turn-overı, dopamin aktivitesi ve artan norepinefrin seviyeleridir¹¹³. Bu değışikliklerin de bilişsel fonksiyon bozukluklarına katkısının olabileceğı¹⁰⁶ ve tümünün insülin tedavisi ile geri dönüştürülebilir olduğu belirtilmektedir.

2.3.2.2 Hipogliseminin Rolü

Hipogliseminin bilişsel disfonksiyonlar üzerindeki etkisi hala tartışmalı bir konu olsa da klinisyenler tarafından yaşa bağımlı bir etkisi olduğu belirtilmektedir. Hipogliseminin bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisi, genç yaşta gözlenirken, yaşlanmaya bağılı olarak bu etkinin azaldığı belirtilmiştir¹⁰⁵. Yapılan bazı hipotezler, hipogliseminin nöronal hasar üzerindeki etkisinin N-metil D aspartat (NMDA) reseptörlerinin aşırı aktivasyonu sonucu meydana geldiğini öne sürmektedir¹¹⁴. NMDA reseptör antagonistlerinin varlığının, nöronal nekrozu önlediğini ve bu şekilde hipogliseminin indüklediğı beyin hasarının potansiyel terapisi olabileceğini desteklemektedir¹¹⁵.

2.3.2.3 İnsülin Rezistansının Rolü

İnsülin, enerji homeostazı ve besin alımı üzerindeki modulator etkilerinin yanı sıra, önemli bir nörotrofik faktör olarak da rol almaktadır^{30, 39, 91, 116, 117}. Bir taraftan hiperinsülineminin Alzheimer için bir risk faktörü olduğu belirtilirken, diğere taraftan insülinin önemli bir nörotrofik

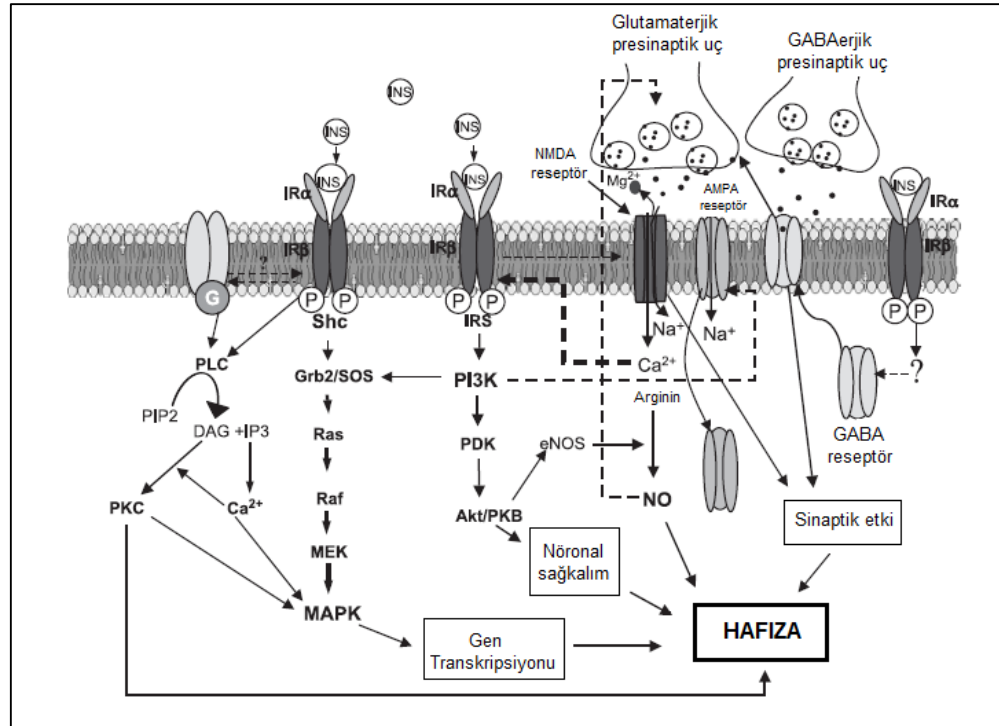
faktör olması, insülin rezistansının beyin dokusu üzerindeki paradoksal etkilerini açığa çıkarmaktadır¹⁰⁶. İnsülin'in, beyinde ılımlı konsantrasyonlarda nörotrofik etki gösterirken, çok yüksek konsantrasyonlarda A β atılımının azalması ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir⁹².

İnsülin rezistansının, bilişsel fonksiyonlar üzerindeki mekanizması çok açık olmamakla birlikte nörotransmisyon ve hafıza üzerine etkilerinin olduğu düşünülmektedir¹⁰⁵. İnsülinin serebral glukoz metabolizması üzerindeki tartışmalı etkilerine rağmen, tip 2 diyabet oluşumuna katkısı olan insülin rezistansının, Alzheimer'ın patogenezinde de rol oynayabileceği düşünülmektedir¹⁰⁵.

İnsülin rezistansı ve Tip 2 Diabetes Mellitus kognitif disfonksiyonların oluşumuna yukarıda anlatılan diğer mekanizmalara ek olarak 3 indirekt mekanizma ile katkıda bulunur. **1:** Tip 2 diyabetik hastalarda kognitif disfonksiyonlar inflamatuvar markerlarla koreledir, ve artan inflamasyon Alzheimer'ın veya makrovasküler hastalıkların gelişimine katkı sağlayabilir¹⁰⁵. Tip 2 diyabetik hastalarda, C-reaktif proteini, α -1-antikimotripsin, IL-6 ve interselüler adezyon molekülü-1 yüksek değerlerde görülmektedir¹¹⁸. Bu bulgular, insülin rezistansı ve Alzheimer hastalığının artan inflamasyon nedeni ile ortak bir patofizyolojiyi paylaştığını desteklemektedir¹⁰⁵. **2:** Hipotalamik-hipofiz adrenal aksinin bozulması. Tip 2 diyabetik insan¹¹⁹ ve hayvan¹²⁰ çalışmalarında hipotalamik-hipofiz adrenal aksinin artan serum kortizol seviyeleri ile birlikte up-regüle olduğu belirtilmiştir. Hiperkortizoleminin bilişsel disfonksiyonlara yol açtığı bilinmektedir¹⁰⁵. **3:** Senil plakların oluşumunu uyarmak. Ekstraselüler senil plakların ana bileşeni olan β -Amiloid ve intraselüler nörofibriler yumakların ana bileşeni olan tau proteini Alzheimer'ın patolojik belirteçidir^{121, 122}. İnsülin ve insülin rezistansı ile APP

ve Amiloid- β peptid metabolizması arasındaki ilişkide IDE'nin rolünün de olabileceği belirtilmiştir⁹².

İnsülin reseptör sinyalinin hafıza ve öğrenmede olası etkilerinin moleküler mekanizmaları Şekil 10'da özetlenmiştir. İnsülin reseptör aktivasyonu hafıza oluşumuna **1) Glutamaterjik ve GABAerjik transmisyon modülasyonu aracılığıyla, 2) Shc-MAPK yolağının aktivasyonunun uzun dönem hafıza için gerekli gen ekspresyon regülasyonu üzerine etkisi aracılığıyla, 3) G-protein ilişkili reseptör ve PLC interaksiyonunun PKC'yi aktive ederek kısa dönem hafıza üzerine etkisi aracılığıyla, 4) PI3K sinyal yolağının NO oluşumunu tetiklemesi aracılığıyla katkı yaptığı düşünülmektedir³⁰.**



Şekil 10. Hafıza ilişkili nöronal aktivasyonun insülin/insülin aracılı regülasyonunun olası özeti³⁰.

2.4 Diabetes Mellitus ve Alzheimer Arasındaki Olası İlişki

Tip I ve Tip II Diabetes Mellitus, etiyoloji ve patogenezi bakımından farklılık gösterse de, kronik hiperglisemi ve bozulmuş insülin aktivitesinin yarattığı aynı sonuçları paylaşır. Diabetes Mellitus, vasküler, renal rahatsızlıklar, periferik nöropati ve retinopati gibi çeşitli patofizyolojik bozukluklarla ilişkilidir¹²³.

Yapılan çalışmalar Diabetes Mellitus ve Alzheimer arasındaki olası ilişkiye dikkat çekmektedir. Alzheimer hastalarında yapılan çalışmada kontrol grubuna göre serebrospinal sıvı insülin seviyelerinin ve insülin aracılı glukoz kullanımının azaldığı gözlenmiştir^{124, 125}. İlk epidemiyolojik araştırma olan Rotterdam çalışmasında, Tip I diyabetli hastalarda anlamlı ölçüde yüksek demans prevalansı olduğu belirtilmiştir¹²⁶. Diyabet/insülin rezistansı ile hipokampal ve amigdalar atrofi arasındaki ilişkinin manyetik rezonans görüntülemesi ile incelendiği in vivo çalışmada; diyabetli bireylerde hipokampal ve amigdalar atrofi derecesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve insülin rezistans şiddeti ile korele olduğu gözlenmiştir¹²⁷.

Tip II diyabet ve Alzheimer, yaş-bağımlı süreçleri içermesi, kolesterol seviyelerinin artması, metabolik bozuklukların ortaya çıkışı, β -amiloid agregasyonu, ikincil mesajcı sistem anormallikleri (GSK3 aşırı aktivasyonu gibi), oksidatif stres artışı ve inflamasyon cevap artışı gibi ortak karakteristikleri paylaşmaktadır¹²⁸. Alzheimer'ın en belirgin iki patolojik karakteristiği, tau hiperfosforilasyonu ile oluşan intraselüler nörofibriler yumaklar ve temel olarak β -amiloid agregatlarının oluşturduğu ekstraselüler senil plaklar'dır¹²⁸. Her iki patolojik belirtecin Tip II diyabette de görüldüğü belirtilmiştir^{129, 130}. Tip 2 Diabetes Mellitus, pankreas adacıklarında β hücrelerinin kaybı ve adacık amiloid birikimi ile karakterize

nöropati ile ilişkili dejeneratif bir hastalık olarak tanımlanırken, Alzheimer da, bu duruma benzer şekilde büyük oranda nöronal hücre kaybının görüldüğü nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanmaktadır¹³¹. Pankreas adacık amiloid proteini (IAPP) ve amiloid APP %90 oranında yapısal benzerlik göstermektedir¹³¹. Hücre kaybı, amiloid plak birikimi ve dejeneratif değişikliklerle ilişkileri bakımından da Tip 2 DM ve Alzheimer ortak özellikler göstermektedir.

Pre-diyabet ve erken dönem Tip 2 diyabet hastalarında yapılan çalışmalarda, yüksek serum insülin seviyelerinin bilişsel fonksiyon bozukluklarıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir¹³². Artan A β seviyeleri ile artan serum insülin seviyeleri arasındaki ilişkiye dikkat çekilmektedir¹³³. Alzheimer ile Tip 2 diyabet arasındaki temel fizyolojik bağlantının periferik ve serebral insülin sinyal anormalliklerinden kaynaklandığı belirtilmektedir³⁶. Alzheimer'da bilişsel disfonksiyonlardan, insülin sinyalindeki hasarın kısmen sorumlu olduğu giderek artan bir şekilde kabul görmektedir^{57, 66, 128}. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, Alzheimer, MSS'deki insülin reseptör duyarlılığının bozulmasından kaynaklanan MSS'de insülin rezistansının gelişimine bağlı olarak medyana gelen tau ve A β metabolizmasındaki değişiklikleri içerdiğinden, Diabetes Mellitus'un beyin spesifik formu (Tip III DM) olarak tanımlanmaktadır¹³⁴.

Tablo 1 .Beyin insülin rezistansının Alzheimer oluşumu üzerine etkileri ⁶⁶.

HASAR	ETKİSİ	ALZHEİMER ÜZERİNDEKİ ROLÜ
GLUT-4 fonksiyonu	Azalan glukoz alım ve kullanımı	Enerji eksikliği; nöronal hücre iskeletinin bozulması, sinaptik iletişimsizlik
İnsülin reseptör fonksiyonu	Azalan IRS/PI3K-Akt sinyali	Azalan oligodendroglial ve nöronal sağkalım, nöronal plastisite, miyelin kararlılığı
	Artan GSK3 β ve fosfataz aktivitesi	Artan tau fosforilasyonu, oksidatif stres, nöroinflamasyon, proapoptotik sinyal; Azalan Wnt sinyali
	Azalan insülin duyarlı gen ekspresyonu	Azalan kolin asetiltransferaz ekspresyonu, GAPDH ekspresyonu
İnsülin reseptör fonksiyonu veya hiperinsülinemi	Endotelial hücre hasarı	Mikrovasküler hasar ve serebral hipoperfüzyon
Mitokondrial fonksiyon	Artan oksidatif stres, ROS, RNS	DNA hasarı, lipid peroksidasyon, Artan APP ekspresyonu, A β 42 birikimi
İnsülin-IGF yetersizliği	Trofik faktör eksikliği	İnsülin-IGF bağımlı nöronlar ve glial hücrelerin ölümü veya bozulmuş fonksiyonu
Hiperglisemi	AGE birikimi	A β 42 atılımının bozulması

İntraserebroventriküler (icv) stz enjeksiyonunun beyin glukoz metabolizması, insülin reseptör fonksiyonu ve boyutsal öğrenme ve hafıza üzerinde hasara yol açtığı belirtilmektedir^{135, 136}. İcv stz rat beyinlerinde meydana gelen histopatolojik, biyokimyasal ve moleküler nörodejeneratif anormalliklerin Alzheimer'da görülen değişiklikler ile örtüştüğü belirtilmiştir. Bu ratların beyin dokusunda artan APP ve asetilkolinesteraz ekspresyonu¹³⁶, artan GSK3- β aktivasyonu, tau fosforilasyonu, APP-A β seviyeleri ve azalan kolinasetiltransferaz ekspresyonu^{135, 136}, Alzheimer'da da görülen benzer değişikliklerdir. İcv stz ratlarda meydana gelen nörodejeneratif anormallikler ve nörokognitif hasarlar, azalan insülin, insülin reseptör, IGF-I reseptör ve IRS-I gen ekspresyonları ile ilişkilidir. Bu kompleks etkiler beyin insülin/IGF sinyal mekanizmasının bozulmasına yol açmaktadır¹³⁴. Bu bilgilere dayanarak icv-stz hayvan modellerinde Alzheimer'ın karakteristik özelliklerinin gözlemlendiği ve insülin eksikliği ile rezistansı arasındaki neden-sonuç ilişkisinin kanıtlandığı ve Alzheimer tipi nörodejenerasyonun (Tip III Diyabet) görüldüğü belirtilmektedir^{117, 134}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Amacımıza uygun olarak streptozotosin (stz) ile diyabet oluşturulmuş ve sonrasında insülin tedavisi uygulanan deney gruplarının beyin hipokampus doku örneklerinde PI3K sinyal yolağı proteinlerinin ifadenme düzeyleri western blot yöntemi ile, serum örneklerinden gerekli analizler ise ELISA yöntemi ile saptanmıştır.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1 Kullanılan Gereçler

3.1.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (GÜDAM) tarafından sağlanan 250-300 gram ağırlığında, toplam 18 adet erkek Wistar rat kullanılmıştır.

Çalışmamızda deney hayvanlarına uygulanan yöntemin etik kurallara uygunluğu "Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı" tarafından B.30.2.GÜN.0.05.06.00/9-452 sayılı karar ile onaylanmıştır.

Ratlarda diyabet oluşturmak amacıyla streptozotosin (55mg/kg) 0,1 M sitrat tamponunda (pH=4,5) çözülerek intraperitoneal olarak uygulanmıştır. STZ uygulanması sonucunda enjeksiyonu izleyen 3. günde kan glukoz konsantrasyonları tespit edilerek (Glukometre, Ames glukoz oksidaz enzimatik metodu), kan glukozu 300 mg/dl ve üzerindeki

ratlar diyabetik olarak kabul edilmiştir. Deney grupları her grupta 6 rat olmak üzere, 3 grup şeklinde planlanmıştır.

Deney gruplarının tanımları;

1- Kontrol (K) Grubu (n=6): Ratlar standart şartlarda 12 hafta boyunca izlendi.

2- Diyabet (DM) Grubu (n=6): İntraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek ratlarda diyabet oluşturuldu ve 12 hafta boyunca izlendi.

3- Diyabet + İnsülin (DM+İ) Grubu (n=6): Ratlara intraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturuldu ve 12 hafta boyunca kan glukoz seviyeleri takip edilerek insülin (2-8 U/kg/gün,sc) tedavisi uygulandı.

12 haftalık deney protokolünün sonunda ratlara 12 saat açlık sonrası periton içine Ketamin HCl uygulaması ile anestezi sağlandı. Kalpten enjektörle kan alınarak serum kısmı ayrıldı, -80 °C'de muhafaza edildi. Ratların beyin dokuları çıkarılarak hipokampus bölgeleri alındı, sıvı nitrojende hızla dondurulup -80 °C'de saklandı.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Hassa terazi (Shimadzu)

Otomatik pipetler (Socorex)

Çeker ocak

Distile su cihazı

Homojenizatör (Schütt Homgen)

Vorteks (IKA)

Benmari

pH metre (JENWAY)

ELISA okuyucu ve yıkayıcı (BIOKIT)
Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C,-20 °C, -80°C)
Küçük poliakrilamid jel sistemi (Hofer)
Güç kaynağı (Hofer)
Western Blot transfer cihazı (BIO-RAD)
Sogutmalı santrifüj (Hermle)
Yatay çalkalayıcı

3.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Akrilamid
Bisakrilamid
Amonyum persülfat (APS)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)
Tris baz
Tetrametilendiamin (TEMED)
Bromfenol mavisi
Tris-HCl
Gliserol
Merkaptoetanol
Glisin
Metanol
Etil alkol
Asetik asit
Coomasie parlak mavisi
Ponceau kırmızısı
Yağsız süt tozu
BSA (Bovine Serum Albumin)
Sodyum klorür (NaCl)
Tween 20

Sodyum hidroksit (NaOH)
Hidroklorik asit (HCl)
RIPA tamponu
PMSF (Fenilmetilsülfonil florid)
Proteinaz inhibitör kokteyl

3.1.4 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

3.1.4.1 Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Tampon

20 mM Tris-HCL (pH=7,5)
150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA
%1 NP-40
%1 Sodyum deoksikolat
2,5 mM Sodyum pirofosfat
1 mM β -gliserofosfat
1 mM Na₃VO₄ içeren RIPA (radioimmunoprecipitation assay) lizis tamponu kullanıldı. RIPA tamponu içerisine kullanılmadan hemen önce 1 mM PMSF 1:50 (Fenilmetilsülfonil florid) ve proteaz inhibitör kokteyli 1:100 oranında eklendi.

3.1.4.2 SDS-Poliakrilamid Jel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

Akrilamid/Bisakrilamid Stok Çözeltisi (100 ml, %30)

29 gr akrilamid ve 1 gr bisakrilamid, distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözdürüldü ve +4°C'de koyu renkli cam şişe içerisinde muhafaza edildi.

Amonyum Persülfat Stok Çözeltisi (10 ml, %10)

1 gr amonyum persülfat (APS), distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak çözdürüldü ve her gün taze hazırlanarak karanlık ortamda muhafaza edildi.

Sodyum Dodesil Sülfat Stok Çözeltisi (100 ml, %10)

10 gr sodyum dodesil sülfat (SDS) distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözdürüldü ve oda ısısında muhafaza edildi.

Tris-HCL Stok Çözeltisi (100 ml, 1,5 M)

18,165 gr Tris baz distile su ile 90 ml'ye tamamlanarak çözdürüldü. Çözelti, hidroklorik asit kullanılarak pH 8.8'e ayarlandı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı, oda ısısında muhafaza edildi.

Tris-HCL Stok Çözeltisi (100 ml, 1 M)

12,11 gr Tris baz distile su ile 90 ml'ye tamamlanarak çözdürüldü. Çözelti, hidroklorik asit kullanılarak pH 6.8'e ayarlandı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı, oda ısısında muhafaza edildi.

Tablo 2. %5'lik Paketleyici Jel için Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

PAKETLEYİCİ JEL	5 ml	6 ml	8 ml
dH ₂ O	3.4 ml	4.1 ml	5.5 ml
%30 Akrilamid Karışımı	0.83 ml	1.0 ml	1.3 ml
1 M Tris-HCL, pH:6.8	0.63 ml	0.75 ml	1.0 ml
%10 SDS	0.05 ml	0.06 ml	0.08 ml
%10 APS	0.05 ml	0.06 ml	0.08 ml
TEMED	0.005 ml	0.006 ml	0.008 ml

Tablo 3. %12'lik Ayırıcı Jel İçin Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

AYIRICI JEL	10 ml	15 ml	20 ml
dH ₂ O	3.3 ml	5.0 ml	6.6 ml
%30 Akrilamid Karışımı	4.0 ml	6.0 ml	8.0 ml
1.5 M Tris-HCL, pH:8.8	2.5 ml	3.8 ml	5.0 ml
%10 SDS	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
%10 APS	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
TEMED	0.004 ml	0.006 ml	0.008 ml

3.1.4.3 Western Blot İşleminde Kullanılan Çözeltiler

Yükleme Tamponu

4X Laemmli Numune Tamponu (LSB)

Tris-HCL, pH=6,8 0,25M

Gliserol % 30

SDS % 8

Bromfenol mavisi % 0,2 olacak şekilde hazırlanır. Numuneler eklenmeden hemen önce %10 oranında olacak şekilde merkaptotanol eklenir.

Jel Elektroforez Tamponu (1000 ml)

25 mM Tris baz, 250 mM glisin ve % 0,1 SDS olacak şekilde distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak çözdürüldü. Tampon +4°C'de muhafaza edildi.

Jelden Membrana Proteinleri Transfer Tamponu (1000 ml)

25mM Tris baz, 192mM glisin ve %20 metanol olacak şekilde distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanarak çözdürülmesi ile hazırlandı.

Jel Boyama Çözeltisi (100 ml)

25 ml etanol, 10 ml asetik asit ve 0,115gr Coomasie parlak mavisi distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

TBS (Tris-tuz) Çözeltisi (500 ml)

10 mM Tris-HCl ve 50 mM sodyum klorür olacak şekilde distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

TBS-T (Tris-tuz-tween 20) Çözeltisi (100 ml)

TBS-T, 100 ml TBS çözeltisine 100 µl tween-20 eklenerek hazırlandı. Her Western blot işleminde yeni çözelti hazırlandı.

Bloklama Solüsyonu (50 ml)

2,5 gr yağsız süt tozunun, 50 ml TBS-T çözeltisi içinde çözdürülmesi ile hazırlandı.

Primer Antikor Çözeltileri (10 ml)

%5 BSA (Bovine serum albumin) içeren 10 ml TBS-T çözeltisi primer antikor çözme solüsyonu olarak hazırlandı. Primer antikor sulandırma oranları 1:1000 olarak kullanıldı.

Sekonder Antikor Çözeltileri (20ml)

%5 yağsız süt tozu içeren 20 ml TBS-T çözeltisi sekonder antikor çözme solüsyonu olarak hazırlandı. Sekonder antikor sulandırma oranları 1:2000 olarak kullanıldı.

3.2 Uygulanan Yöntemler

3.2.1 Kan Glukoz Tayini

Kan glukoz konsantrasyonu, glukoz oksidaz enzimatik assay yöntemi ile tespit edildi (Ames Glucometer-Miles Laboratories Inc. Elkhart, USA). Sonuçlar, mg/dL olarak belirlendi.

3.2.2 İnsülin Konsantrasyonlarının Tayini

Serum insülin seviyelerinin tayini Millipore ELISA kiti ile gerçekleştirildi. Sonuçlar ng/mL olarak belirlendi.

3.2.3 Amiloid β 1-42 Konsantrasyonlarının Tayini

Serum Amiloid β 1-42 konsantrasyonlarının tayini, CUSABIO ELISA kiti ile yapıldı. Sonuçlar pg/mL olarak belirlendi.

3.2.4 Patolojik İnceleme

Hipokampüs doku örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Dokular 3-4 mm kalınlığında küçültülerek bir gece çeşme suyunda yıkandı. Doku takip cihazında alkol, ksilol ve parafin serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoxilen-Eosin (HE) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.

3.2.5 Doku Homojenizasyonu

Hipokampüs doku örnekleri PMSF, proteaz inhibitör kokteyl ve fosfataz inhibitör kokteyl içeren RIPA tamponu ile 1/10 oranında buz içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. Doku homojenatları +4 °C, 20.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar, western blot protein tayininde kullanıldı.

3.2.6 Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini için BCA protein miktar tayin kiti kullanıldı.

1. BCA çalışma solusyonu reagent A:B = 50:1 oranında, örnek sayısına bağlı olarak hazırlandı.
2. 96 kuyucuklu plağa her bir örnek iki tekrarlı olacak şekilde 5 µL eklendi.
3. Hazırlanan BCA çalışma solusyonu çok kanallı pipetle her kuyucuğa 95 µL eklendi.
4. Plak 37°C etüvde 30 dk inkübe edildi.
5. Proteinlerin 562 nm'da absorbans değerleri okundu.
6. Absorbans değerleri okunan örneklerin protein miktarları, standart grafik üzerinden belirlendi.

3.2.7 Western Blot ile Protein Tayini

IR, fosfo-IR (β altünitesi), Akt, fosfo-Akt (Ser473), GSK3- β , fosfo-GSK3- β (ser9), GSK3- α , fosfo-GSK3- α (Ser21), fosfo-TAU (Thr231), fosfo-TAU (Ser262) ve β -Aktin genlerinin protein ekspresyonları Western

blot yöntemiyle belirlenmiştir. Western blot, bir hücre özütünde ya da protein solüsyonunda, spesifik bir proteinin saptanmasında kullanılan yarı-ölçülebilir yöntemdir.

1. Protein Örneklerinin Hazırlanması: Protein miktar tayini yapılan protein örnekleri ependorf tüplere eşit protein konsantrasyonunda konup, eşit miktarda olması için de 4X LSB tamponuyla tamamlandı. Yükleme tamponu eklendikten sonra 95°C 'de 5 dk bekletilerek jele yüklenmeye hazır hale getirildi.

2. SDS Poliakrilamid Jelin Hazırlanması ve Yürütülmesi: Jel, sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle hazırlandı ve örnekler bu jel üzerinde yürütüldü. Proteinler, dikey elektroforezde yüklerine göre değil moleküler ağırlıklarına göre ayrılmaktadır. Bu nedenle küçük moleküler ağırlıktaki proteinler daha yüksek yüzdeli jel hazırlanarak, büyük moleküler ağırlıktaki proteinler ise daha düşük yüzdeli jel hazırlanarak tayin edildi. Elektroforez tamponu eklenerek proteinlerin yürümesi sağlandı. Elektroforez 100V, 250mA'de yaklaşık 2,5 saat yapıldı.

3. Jelin Membrana Aktarılması: Dikey elektroforez işlemiyle proteinler ayrıldıktan sonra jeldeki proteinler nitroselüloz membrana aktarıldı. Bunun için ıslak emdirim uygulandı. Aktarım 250mA, 100V 'da yaklaşık 90 dk yapıldı.

4. Membran, aranan proteine özgü birincil ve ikincil antikorda inkübe edilerek, antijen-antikor bağlantısının gerçekleşmesi sağlandı. Transfer sonrası membran Ponceu ile boyandıktan ve bloklama solüsyonuyla muamele edildikten sonra BSA'da hazırlanan primer antikorda bir gece +4°C 'de inkübasyona bırakıldı. Birincil antikordan alınan membran enzim konjuge ikincil antikora 2 saat boyunca inkübe edildi.

5. Antikorla inkübasyon sonrası membran Lumiglo çözeltisi ile muamele edildi ve görüntüleme sisteminde protein ekspresyonu gözlemlendi.

3.2.8 İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 istatistik paket programı ile yapıldı. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney-U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Western blot protein bant yoğunlukları Image J 14.4 (NIH) programı kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

Kontrol, Diabetes Mellitus (DM), Diabetes Mellitus+İnsülin (DM+İ) gruplarına ait vücut ağırlıkları (gr), kan glukoz seviyeleri (mg/dL), serum insülin konsantrasyonları (ng/mL), serum Amiloid β 1-42 konsantrasyonları (pg/mL) ölçülerek gerekli değerlendirmeler yapılmış olup, istatistiksel sonuçları (ortalama \pm standart hata) Tablo 4 ve 5' de sunulmuştur.

DM grubunda vücut ağırlıklarının Kontrol'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı, kan glukozu seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4).

Tablo 4. Ratların vücut ağırlığı ve kan glukoz değerleri

	<i>Vücut Ağırlığı (gr)</i>	<i>Kan glukozu (mg/dL)</i>
Kontrol	310.91 \pm 17.47	153.00 \pm 2.00
DM	239.68 \pm 51.54*	369.40 \pm 61.09*
DM+İ	306.18 \pm 25.81 [▲]	195.00 \pm 29.85* [▲]

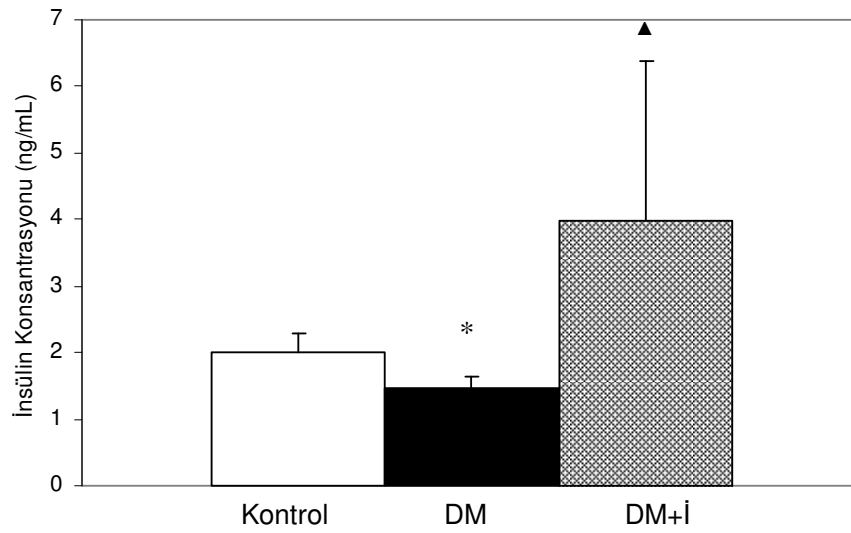
* : Kontrole göre $p<0.05$; [▲] : DM'ye göre $p<0.05$

DM grubunda serum insülin konsantrasyonlarının Kontrol'e göre anlamlı şekilde azaldığı, serum Amiloid β 1-42 konsantrasyonlarının ise anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 5).

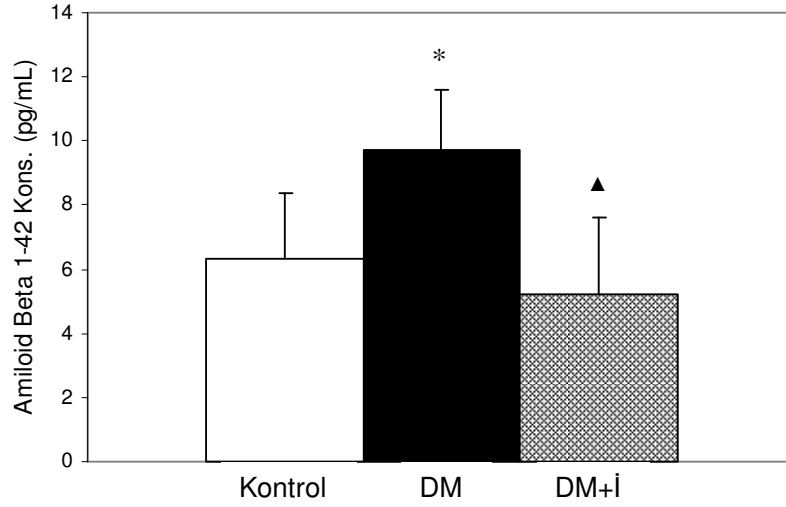
Tablo 5. Ratların serum İnsülin ve Amiloid β 1-42 konsantrasyonları

	<i>Serum İnsülin (ng/mL)</i>	<i>Serum Aβ1-42 (pg/mL)</i>
Kontrol	1,99 \pm 0,28	6,30 \pm 2,05
DM	1,46 \pm 0,17*	9,73 \pm 1,85*
DM+İ	3,97 \pm 2,41 \blacktriangle	5,20 \pm 2,43 \blacktriangle

* : Kontrole göre p<0.05; \blacktriangle : DM'ye göre p<0.05



Grafik 1. Tüm gruplara ait serum insülin konsantrasyonları (ng/mL)



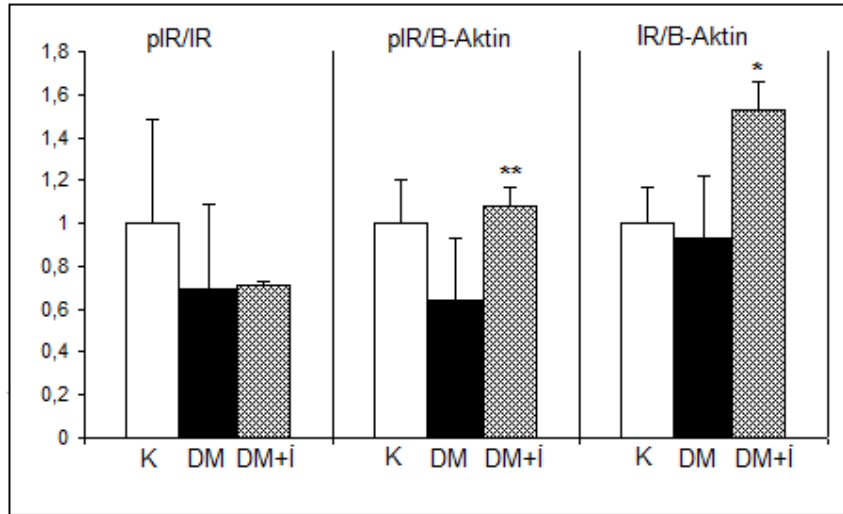
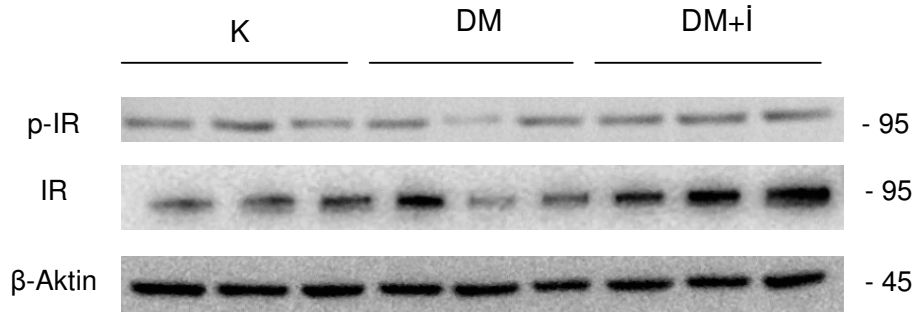
Grafik 2. Tüm gruplara ait serum Amiloid β 1-42 konsantrasyonları (pg/mL)

Dokulardan hazırlanan preperatların histolojik incelemesinde, damarların hiperemik olduğu görüldü. Bunun dışında herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı.

4.1 Western Blot Bulguları

İnsülin/PI3K sinyal yolağı proteinlerinin ifadenme düzeyleri densitometrik olarak bant yoğunlukları baz alınarak fosforile proteinin/total proteine oranı, fosforile proteinin/aktine oranı ve total proteinin/aktine oranı şeklinde hesaplanmıştır.

4.1.1 IR/p-IR Protein Düzeyleri

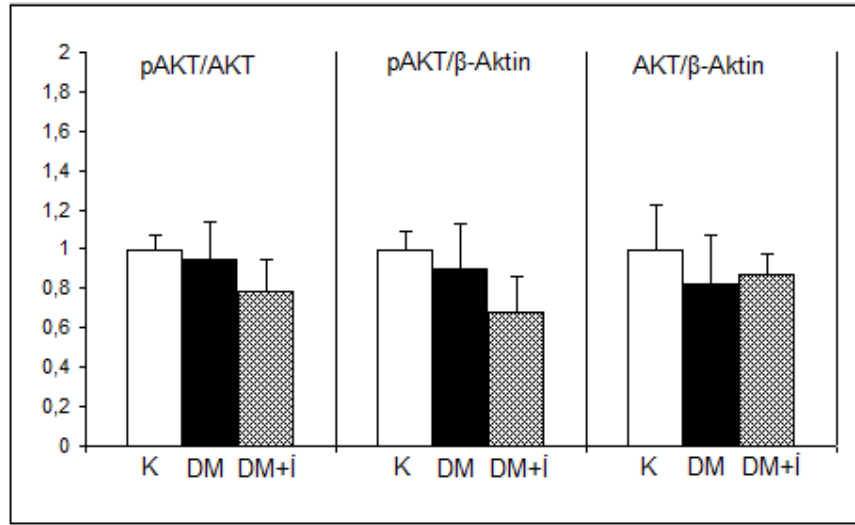
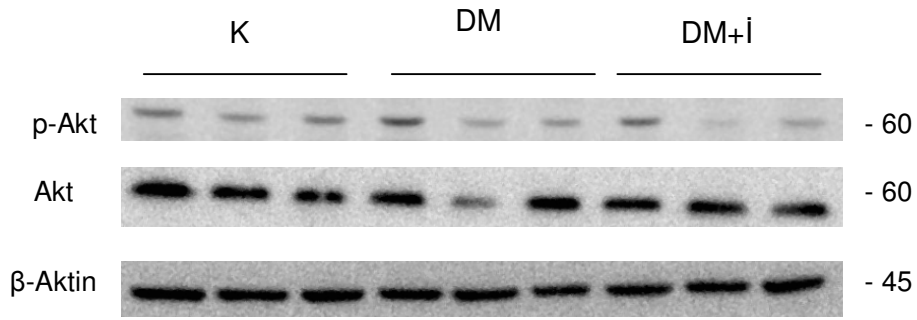


Grafik 3. Hipokampus dokusunda IR ve pIR protein ifadenme düzeyleri

* : Kontrole göre p<0.05 ** : DM'ye göre p<0.05

Rat beyin hipokampüs bölgesinde, pIR protein düzeyleri 12 haftalık diyabet süresinin sonunda, DM grubunda kontrol grubuna göre 0,64 kat azalmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Grafik 3).

4.1.2 Akt/p-Akt Protein Düzeyleri



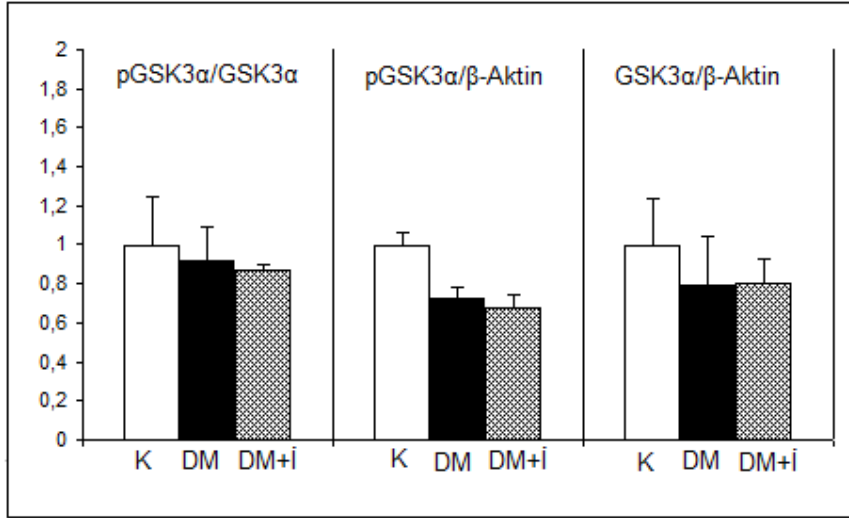
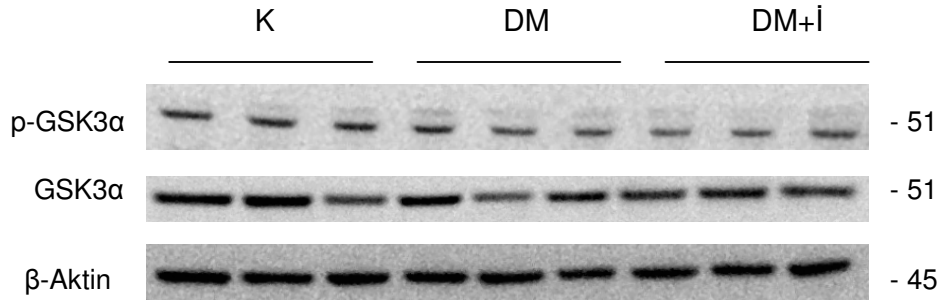
Grafik 4. Hipokampüs dokusunda AKT ve pAKT protein ifadenenme düzeyleri

* : Kontrolle göre $p < 0.05$ **: DM'ye göre $p < 0.05$

Rat beyin hipokampüs bölgesinde 12 haftalık diyabet süresinin sonunda, p-AKT protein düzeyleri, DM grubunda kontrol grubuna

göre 0,89 kat azalmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Grafik 4).

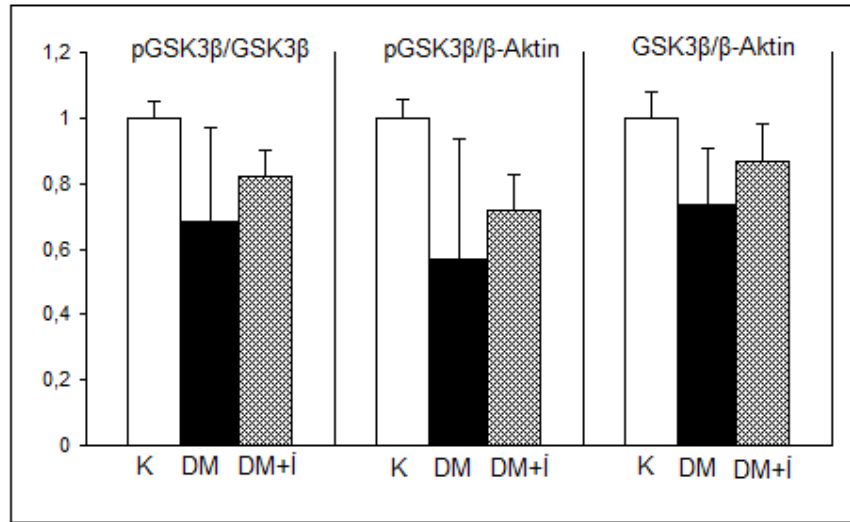
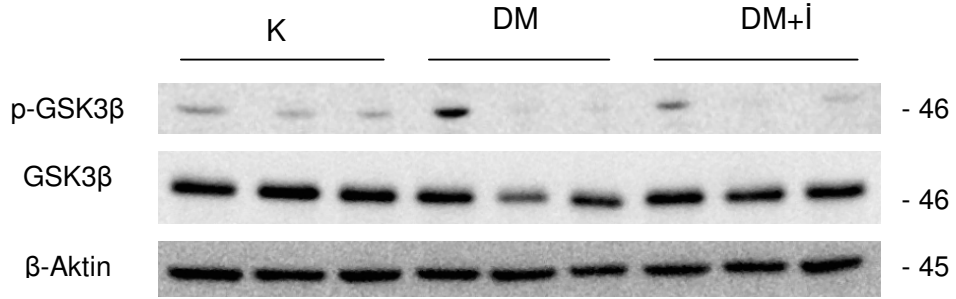
4.1.3 GSK3 α /p-GSK3 α Protein Düzeyleri



Grafik 5. Hipokampus dokusunda GSK3 α ve pGSK3 α protein ifadenme düzeyleri
* : Kontrole göre p<0.05 **: DM'ye göre p<0.05

Rat beyin hipokampus bölgesinde 12 haftalık diyabet süresinin sonunda, p-GSK3 α protein düzeyleri, DM grubunda kontrol grubuna göre 0,85 kat azalmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Grafik 5).

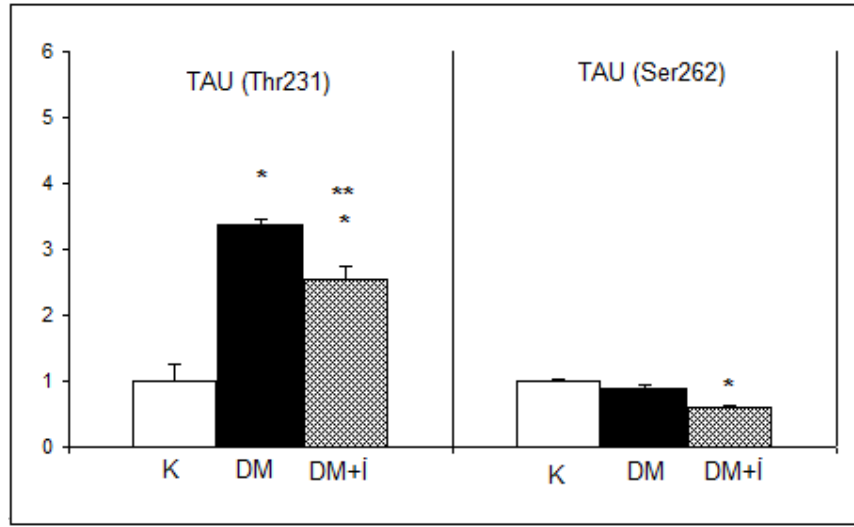
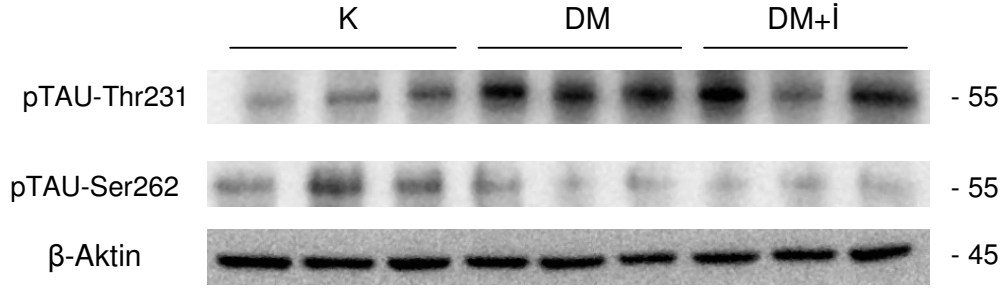
4.1.4 GSK3 β /p-GSK3 β Protein Düzeyleri



Grafik 6. Hipokampüs dokusunda GSK3 β ve pGSK3 β protein ifadenme düzeyleri
* : Kontrole göre $p < 0.05$ **: DM'ye göre $p < 0.05$

Rat beyin hipokampüs bölgesinde 12 haftalık diyabet süresinin sonunda, p-GSK3 β protein düzeyleri, DM grubunda kontrol grubuna göre 0,57 kat azalmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Grafik 6).

4.1.5 p-TAU Protein Düzeyleri



Grafik 7. Hipokampüs dokusunda pTAU protein ifadenleme düzeyleri

* : Kontrole göre $p < 0.05$ **: DM'ye göre $p < 0.05$

Rat beyin hipokampüs bölgesinde 12 haftalık diyabet süresinin sonunda, p-TAU (Thr231) protein düzeyleri, DM grubunda kontrol grubuna göre 3,36 kat anlamlı artış, insülin tedavisi uygulanan DM+İ grubunda ise 2,54 kat anlamlı artış göstermiştir. P-TAU (Ser262) protein düzeyleri ise DM grubunda bir değişiklik göstermemiştir (Grafik 7).

5. TARTIŞMA

Beyin dokusunda insülin reseptörlerinin keşfi ile, insülinin beyin fizyolojisinde önemli bir rol oynadığı, serebral insülin sinyalinde ve glukoz homeostazında meydana gelen bozuklukların beyin patolojisine katkıda bulunduğu belirtilmiştir²⁷. Bulgular, nöronal IR sinyalinin enerji homeostazı ve nöronal hastalıkların gelişimi arasındaki ilişkide direkt bir rol oynadığını göstermektedir³⁴. Alzheimer ve Parkinson hastalarında yapılan çalışmalarda, beyinde IR ekspresyonunun azaldığı, bu durumun nörodejenerasyonun nedeni ya da sonucu olabileceği, dolayısıyla Diabetes Mellitus ve nörodejeneratif hastalıklar arasında bir ilişkinin söz konusu olabileceği belirtilmiştir^{137, 138}.

Çalışmamızda Wistar ratlarda 55 mg/kg i.p stz enjeksiyonu ile deneysel diyabet modeli oluşturulmuştur, 12 haftalık deney süresi sonunda ratların beyin doku hipokampus bölgelerinde insülin/PI3K sinyal yolağı protein ekspresyonları ve Alzheimer'ın önemli patolojik belirteçlerinden biri olan tau hiperfosforilasyonu incelenmiştir. Sonuçlarımıza göre IR (insülin reseptörü), Akt, GSK3- α (glikojen sentaz kinaz 3- α) ve GSK3- β (glikojen sentaz kinaz 3- β) protein fosforilasyonunda azalma, bozulan insülin sinyal iletimini desteklemektedir. Bozulan sinyal iletimi sonucunda tau (Thr-231) epitopunda fosforilasyon artışı, diyabetin beyin dokusunda Alzheimer benzeri etkileri oluşturduğunu düşündürmektedir. İnsülin tedavisi uygulanan ratlarda, insülinin tau (Thr-231) hiperfosforilasyonuna kısmi bir etkisinin olduğu, düzeylerin kontrol grubu seviyesine ulaşamadığı gözlenmiştir.

Jolival ve ark.ları¹³⁹ swiss webster farelerde oluşturdukları stz indüklü 9 haftalık tip 1 diyabette (kan glukoz seviyeleri > 600 mg/dl) ve

db/db farelerde spontan oluşan 8 haftalık tip 2 diyabette (kan glukoz seviyeleri ~350 mg/dl) beyin dokusunda (serebellum kısmı çıkarılmış) insülin sinyal yolağındaki değişimleri inceleyerek, Tip 1 diyabet modelinde gözlenen IR, Akt, GSK3 fosforilasyonunda anlamlı azalmayı, IDE ekspresyonunda anlamlı azalmayı ve öğrenme kapasitesindeki bozulmaları tau fosforilasyonu ve A β protein seviyelerindeki artış ile ilişkilendirmişlerdir. Ancak bu değişiklikler tip 2 diyabet modelinde gözlenmemiştir. Dolayısıyla GSK3 aktivitesindeki değişikliğin ve bunun sonuçlarının, diyabetin süresi ile ilişkili olabileceği, insülin-eksik hiperglisemik tip 1 diyabetik farelerde, insülin-rezistans hiperglisemik tip 2 diyabetiklere kıyasla daha erken gelişebileceği belirtilmiştir¹³⁹. Bizim bulgularımız, yükselen kan glukoz ve azalan plazma insülin düzeylerinin gözlendiği DM grubu Wistar ratlarda IR, Akt, GSK3- α ve GSK3- β protein fosforilasyonunda azalma olduğunu, ancak bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir. Li ve ark.¹⁴⁰ BB/Wor ve BBZDR/Wor diyabetik ratlarda yaptıkları çalışmada Alzheimer benzeri değişikliklerin oluştuğunu gözlemlemiştir. BB/Wor ratlarda yaklaşık 73.günden itibaren tip 1 diyabet, BBZDR/Wor ratlarda ise yaklaşık 76. günden itibaren tip 2 diyabet gelişmektedir. 8 aylık diyabetin sonunda BB/Wor ratlar (plazma glukoz seviyeleri 24,9 mmol/dl, plazma insülin seviyeleri 51 pmol/L) ve BBZDR/Wor ratlar (plazma glukoz seviyeleri 23,9 mmol/dl, plazma insülin seviyeleri 568 pmol/L) feda edilerek beyin frontal korteks dokularında, APP, β -sekretaz, β -amiloid protein ekspresyonlarının her iki diyabetik rat grubunda da kontrole göre artış gösterdiği, tip 2 diyabetik BBZDR/Wor ratlarda bu artışın tip 1 diyabetik BB/Wor ratlara göre daha anlamlı olduğu belirtilmiştir¹⁴⁰. Çalışmamızda bu bulgularla uyumlu şekilde 12 hafta boyunca takip edilen diyabetik Wistar ratlarda plazma A β 1-42 peptid seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği, insülin tedavisinin A β 1-42 peptid seviyelerini anlamlı bir şekilde azalttığı gözlenmiştir. Beyin frontal korteks bölgesinde, IR β alt ünitesi tip 1 diyabetik BB/Wor ratlarda anlamlı olarak azalmışken, tip 2 diyabetik

BBZDR/Wor ratlarda değişiklik görülmemiştir, fosforile Akt ve GSK3- β ekspresyonları her iki diyabet modelinde kontrole göre azalmıştır¹⁴⁰. Çalışmamızda ise beyin hipokampüs bölgesinde incelemiş olduğumuz IR β alt ünitesi, GSK3- α ve GSK3- β fosforilasyonlarının diyabet grubunda kontrole göre azaldığı görülmektedir, ve bu sonuçlara dayanarak beyin dokusunun farklı bölgelerinde diyabetin benzer sonuçlara yol açtığı düşünölmektedir. Tip 2 diyabetik BBZDR/Wor ratlarda ise insülin sinyal aktivitesi bozulmuş olmasına rağmen IR ekspresyonunda bir değişiklik görülmemiştir¹⁴⁰. Bu durum, perifer dokularda olduğu gibi MSS'nin de insülin rezistansı geliştirerek insülin sinyalinin bozulmasına neden olabileceğine işaret etmektedir. Çalışmamızda, insülin tedavisinin DM+İ grubu ratlarda beyin dokusu hipokampüs bölgesinde IR ve pIR protein seviyeleri üzerine etkisinin olmasına rağmen, insülin yolağı proteinlerinden Akt ve GSK3- α aktivasyonu üzerine etki etmediği gözlenmiştir. Bulgularımız doğrultusunda plazma insülin düzeylerinin beyin dokusu IR ekspresyonu üzerinde gösterdiği etki, beyin dokusunun insülin-duyarlı bir organ olduğunu desteklemektedir.

Yaklaşık son on yıldır insülinin beyinde hayati bir rolü olduğu, çeşitli serebral fonksiyonlara katkıda bulunduğu kabul edilmektedir. İnsülin reseptörlerinin insan ve rodent beyin dokusunda, insülin tarafından stimölasyonu ile fosfolipaz C, MAPK, PI3K gibi çeşitli sinyal yolları aktive olmaktadır¹³⁹. İn vivo, insülin, intraselüler ve plazma glukoz seviyelerini Akt ve GSK3'ün de dahil olduğu multi-enzim sinyal kaskadı ile kontrol eder. Kaskatta Akt pozitif regölator olarak görev alır, insülin sinyali tarafından Thr³⁰⁸ ve Ser⁴⁷³ fosforilasyonu ile aktive edilir. GSK3 aktivitesi ise, Akt tarafından α izoformunun Ser²¹, β izoformunun ise Ser⁹ fosforilasyonu ile inhibe edilir¹⁴¹. Çalışmamızda 12 haftalık diyabetik beyin hipokampüs dokusunda Akt Ser⁴⁷³ fosforilasyonunda 0,89 kat, GSK3- α Ser²¹ fosforilasyonunda 0,85 kat, GSK3- β Ser⁹ fosforilasyonunda ise 0,57 kat azalma olduğu gözlenmesine karşın bu azalma istatistiksel olarak

anlamli değildir. İnsülin tedavisi uygulanan DM+İ grubunda, insülinin Akt ve GSK3- α fosforilasyonu üzerine etkisi olmadığı gözlenirken GSK3- β fosforilasyonunu kısmi olarak arttırdığı görölmektedir. Zhongsen Qu ve ark.nın yaptıkları çalışmada ise 4 aylık Sprague Dawley ratlarda 55 mg/kg i.p stz enjeksiyonu ile oluşturdukları diyabette 30 günlük deney protokolünün sonunda beyin hipokampüs dokusunda, Akt enzim aktivitesi ve Akt Ser⁴⁷³ fosforilasyonunun stz grubunda kontrole göre anlamli olarak azalmış olduğu, stz grubunda kontrole göre GSK3 enzim aktivitesinin 1,5 kat arttığı, GSK3 Ser⁹ fosforilasyonunun ise azaldığı gzlenmiřtir¹⁴¹. GSK3 aktivitesinin regülasyonunun bozulması çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Nöronlarda GSK3 aktivite regülasyonunun nemi Hong-Lee'nin insan nöronal NT2N hücrelerinde yaptıkları çalışma ile belirlenmiştir. GSK3'n tau fosforilasyonunu tetiklemesi ile tau' nun mikrotübül ilgisinin azalması arasındaki ilişki ve IGF-1 stimlasyonunun tau fosforilasyonunu azalttığı gsterilmiřtir⁷⁷. Schubert et.al un çalışmasında nöron-spesifik insülin reseptör knockout farelerde azalan Akt ve GSK3- β fosforilasyonuna, artan tau fosforilasyonunun eşlik ettiği gsterilmiřtir⁹⁸. Bizim bulgularımız 12 hafta takip edilen stz ile indüklenen diyabetik rat beyni hipokampüs dokusunda, insülin sinyal yolağındaki bozulmanın artan tau fosforilasyonuna neden olabileceğini desteklemektedir.

İcv stz enjeksiyonu ile beyin dokusunda lokal insülin eksikliğinin, insülin ve insülin reseptör mRNA downregülasyonunu tetiklediği ve aynı zamanda GSK3 aktivitesi ile A β birikimini arttırdığı Lester-Coll¹³⁵ ve Salkovic-Petrisic'in¹⁴² çalışmalarında belirtilmiştir. GSK3'n APP (Amiloid prekürsör protein, β -Amiloid öncülü) mekanizmasını artıran etkilerine ek olarak, soluble ve insoluble A β 'nin diyabetik-APP transjenik farelerde birikmesi, IDE tarafından degradasyonunun azalması ile ilişkili olabilir. IDE (insülin degrade enzim) upregülasyonu, insülin aracılı Akt aktivasyonu ile gerçekleşir. Dolayısıyla

insülin eksikliği ve PI3K aracılı azalmış insülin sinyali, A β degradasyonunun azalmasına bağılı olarak A β protein seviyelerinin artışına katkıda bulunur¹⁴³. Bizim bulgularımız da azalan plazma insülin seviyelerinin artan A β 1-42 seviyeleri ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Çalışmamızda insülin tedavisinin plazma A β 1-42 düzeyleri üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu gözlenmiştir. Craft ve ark.nın¹⁴⁴ çalışmasında APP plazma seviyeleri, insülin rezistansı ve Alzheimer varlığında - hiperinsülinemik, öglisemik durumda - düşmüştür. Bu durum insülin rezistansının, APP degradasyonunun azalmasına neden olabilirdiği ile açıklanabilir. Gasparini ve ark.nın⁸² yaptığı çalışmada ise, insülin, β -Amiloid salınımını uyararak ve IDE aracılığıyla degradasyonunu inhibe ederek, intraselüler β -Amiloid seviyelerini azaltırken, ekstraselüler β -Amiloid seviyelerini arttırmaktadır. Bu sonuç, hafıza kaybına karşı insülinin koruyucu etkisi olduğu ile çelişmektedir.

Hiperfosforile tau, Alzheimer hastalığı ile ilişkili anormal filament yapılarının oluşturduğu nörofibriler lezyonların en önemli bileşenidir. Hiperfosforilasyon, tau'nun mikrotübüllere olan ilgisini azaltmaktadır, ve bu durumun taupati patogenezinde oldukça önemli bir rolünün olduğu düşünülmektedir. NIRKO farelerde (nöron spesifik IR gen knockout fareler) Akt ve GSK3- β 'nin fosforilasyonunun azalması, tau hiperfosforilasyonunu tetiklemektedir⁹⁸. Ek olarak, IRS-2 yoksun farelerde yaşlanma süresince tau hiperfosforilasyonunun arttığı gözlenmiştir⁹⁷. Bu bulgular, IR ve IGF-1 sinyal yollarının, tau fosforilasyonunun regülasyonunda temel rolü oynadığını düşündürmektedir³⁴. Daha önce yapılmış olan in vitro ve in vivo çalışmalar, insülin ve IGF-1'in güçlü bir şekilde Akt'yi aktive ederek, anti-apoptotik Bcl-2 nin fosforilasyonunu uyararak nöronal sağkalımı desteklediği yönündedir. Diğer taraftan NIRKO fareler ve IRS-2 yoksun farelerde IR ve/veya IGF-1 reseptör (IGF-1R) sinyal sisteminin tau hiperfosforilasyonuna yol açmasına rağmen nöronal sağkalımda, önemli olmadığı gösterilmiştir. Bu sinyal yollarının

nöropatolojik durumlarda, nöronal sağkalıma nasıl katkı sağladıkları tam olarak açıklanamamıştır. IR ve IGF-1R aracılı sinyaller, ayrıca APP salınımını da regüle etmektedir. Diyet indüklü obezitenin neden olduğu insülin rezistansı, Tg2576 farelerde (APP-K670N/M671L double mutasyonuna sahip, Alzheimer modeli iyi geliştirilmiş hayvanlardır, 2.ayın başlarında β -amiloid seviyeleri artmaya başlar ve ekstraselüler plak formu 8-12. ayda görülür, çok az nöronal kayba sahiptirler) β -amiloid seviyelerinin artmasına ve yaş bağımlı hafıza bozukluklarına yol açmaktadır¹⁴⁵. Carro ve ark.nın çalışmasında Tg2576 farelerde amiloidozisin gelişimi üzerinde IGF1'in koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir⁸³. Azalmış insülin ve/veya IGF-1 seviyelerinin beyin dokusu A β birikimini arttırabildiği ve böylece, tau patolojisine indirekt bir katkısının olabileceği belirtilmektedir²³. Çalışmamızda azalmış plazma insülin seviyeleri ile artmış plazma A β düzeyleri arasındaki ilişki gösterilmiş olup, plazma A β seviyelerinin özellikle tanıda bir belirteç olarak kullanılabilirliğinin oldukça önemli olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda Tau fosforilasyonunun, diyabet grubunda Thr-231 rezidüsünde 3,36 kat anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Jolival ve ark.nın¹⁴³ çalışmasında hAPP transjenik fareler (A β 1-42 seviyeleri yüksek) ve 90 mg/kg stz enjeksiyonu ile diyabet oluşturulan fareler 12 haftalık deney süresinin sonunda feda edilerek beyin dokuları (serebellum kısmı çıkarılmış) kullanılmıştır. Fosforile tau (Thr 231) protein düzeyleri, stz diyabet grubunda bizim bulgularımızın aksine anlamlı bir artış göstermezken (p=0,054), APP-stz grubundaki artış anlamlı bulunmuştur¹⁴³. Li ve ark.nın bulgularına göre tau fosforilasyonu (Ser396) tip 2 diyabetik BBZDR/Wor ratlarda anlamlı artış gösterirken, tip 1 diyabetik BB/Wor ratlarda artış anlamlı değildir¹⁴⁰. Qu ve ark.nın çalışmasında ise tau'nun Ser396 ve Ser404 epitoplarında fosforilasyon artışı olduğu, insülin tedavisinin tau fosforilasyonu üzerinde bir etkisinin olmadığı, tau fosforilasyonunun regülasyonu üzerinde GSK3'ün etkisine ek

olarak, önemli bir protein fosfataz olan PP-2A'nın etkisinin önemi belirtilmektedir¹⁴¹. Sonuçlarımızda diyabet grubunda azalan GSK3- β fosforilasyonuna artan tau (Thr231) fosforilasyonu eşlik etmektedir, insülin tedavi grubunda ise GSK3- β ve tau (Thr231) fosforilasyonunun kısmi olarak düzeldiği gözlenmiştir, bu sonuçlar tau fosforilasyonunun regülasyonu üzerinde GSK3- β 'nin etkisini açıkça göstermektedir. Kim ve ark.nın¹⁴⁶ yaptığı çalışmada db/db fareler (tip 2 diyabetin en iyi karakterize edildiği genetik model) ve stz indüklü tip 1 diyabetik farelerde tau proteininin farklı rezidülerde (Thr231, Ser396, Ser199/202) fosforilasyonu beyin korteks ve hipokampus dokularında incelenmiştir. Tip 1 diyabetik ratlara stz enjeksiyonu iki farklı şekilde uygulanmıştır. Düşük doz grubunda, stz birbirini takip eden 5 gün boyunca 50 mg/kg şeklinde uygulanmıştır. Yüksek doz grubunda ise 150 mg/kg tek doz şeklinde enjekte edilmiştir. Tip 1 diyabetik farelerde 12 haftalık diyabetin sonunda Thr231 ve Ser199/202 rezidülerinde yüksek doz stz grubunda fosforilasyon artışı gözlenirken, Ser396 rezidüsünde anlamlı fark görülmemiştir. Düşük doz stz grubunda, artan glukoz seviyeleri ve pre-diyabetik duruma rağmen tau fosforilasyonunda bir artış görülmemiştir. Tip 2 diyabetik db/db farelerde tau fosforilasyon artışının yaş bağımlı etkisi gösterilmiştir¹⁴⁶. Meske ve ark.¹⁴⁷ nöronal hücre kültüründe GSK3- β aracılı tau fosforilasyonunun regülasyonunda sadece PI3K sinyalinin değil, mTOR sinyalinin de katkısı olduğunu belirtmişlerdir. Meske ve ark. insülin/PI3K sinyal yolağındaki bozunmanın GSK3- β bağımlı tau hiperfosforilasyonunu direkt olarak tetiklemediğini, GSK3- β ve PP-2A arasındaki dengenin etkili olduğunu ve tau Ser262 fosforilasyonunun GSK3- β tarafından değil, PP-2A tarafından regüle edildiğini vurgulamaktadır¹⁴⁷. GSK3 ve PP-2A arasındaki denge tau fosforilasyon ve defosforilasyonunu kontrol ederek tau agregatlarının oluşumunun önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar¹⁴¹. Bizim bulgularımız, bozulan IR/PI3K sinyalinin GSK3- β aracılı tau hiperfosforilasyonunu direkt olarak etkilediğini göstermektedir.

Clodfelder-Miller ve ark.¹⁴⁸ intraperitoneal stz enjeksiyonu uyguladıkları C57BL/6 farelerde, stz indüklü insülin eksikliğinin serebral korteks ve hipokampüste tau fosforilasyonunun incelenen tüm epitoplarında (Thr181, Ser199, Ser202, Thr212, Thr 231, Ser262 ve Ser396/404) arttığını belirtmişlerdir. Tau'nun çeşitli rezidülerinden artan fosforilasyonu, kinaz aktivasyonu ve fosfataz inhibisyonu ile regüle edilmektedir. Stz uygulamasının, fosforilasyon üzerinde rolü olduğu bilinen kinazlardan, GSK3- β , p38, JNK fosforilasyonunu arttırdığı, cdk5 katalitik alt ünitesi p35 ve ERK1/2 fosforilasyonu üzerinde ise etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Tau fosforilasyonu üzerinde rol alan en iyi tanımlanan protein fosfataz PP-2A aktivitesinin stz uygulaması ile serebral kortekste %44, hipokampüste %55 oranında azaldığı belirtilmiştir. Tau fosforilasyonunun geri dönüşümlü olabilirliği akut insülin tedavisi (i.p insülin tedavisi (5IU/kg) ile denenmiştir. İnsülin tedavisinin stz indüklü tau hiperfosforilasyonunu sadece Thr231 ve Ser396/404 epitoplarında 15 dakika içinde azalttığı, diğer epitoplarda ise bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir. Çalışmamızda ise diyabet grubu hipokampus dokusunda tau Thr-231 epitopunda artan fosforilasyonun, insülin tedavisi ile göreceli bir azalma sağladığı görülmekte iken, tau Ser-262 epitopunda diyabet grubunda değişiklik göstermeyen fosforilasyonun insülin tedavisi ile azaldığı görülmektedir. Bulgularımız stz indüklü insülin eksikliğinin tau fosforilasyonu üzerindeki rolünün etkili olduğunu düşündürmektedir. Planel ve ark.nın¹⁴⁹ C57BL/6NJcl farelerde yaptıkları çalışmada 200 mg/kg stz enjeksiyonu ile oluşturdukları diyabet modelinde tau hiperfosforilasyonunun zamana bağlı değişimini inceleyerek, Tau Ser202, Thr205, Ser396, Ser404 epitoplarının fosforilasyonunda 10, 20, 30. günlerde ılımlı bir artış görülürken, 40. günden sonra şiddetli bir artış görülmektedir. Dolayısıyla tau fosforilasyonunun stz enjeksiyonuna cevabının bifazik olduğu belirtilmiştir. Planel et al.un daha önceki çalışmasında¹⁵⁰ glukoz metabolizmasındaki değişikliklerin hipotermiyi

indükleyerek tau fosforilasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Planel ve ark.nın başka bir çalışmasında¹⁵¹ hipotermi'nin tau fosforilasyonu üzerinde oldukça güçlü bir düzenleyici etkisinin olduğu, vücut ısısında 1°C düşüşün tau AT8 epitop fosforilasyonunda %100 bir artışa neden olduğu gösterilerek belirtilmiştir. Farklı hayvan türleri ile yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda tau hiperfosforilasyonunun farklı rezidülerde meydana gelebileceği, hiperfosforilasyon üzerine stz enjeksiyon metodu, yaş, hipotermi ve temel tau fosfataz olarak bilinen PP-2A aktivitesinin oldukça önemli etkilerinin olduğu görülmektedir.

Çeşitli klinik çalışmalar, diyabette hiperinsülinemisinin nörodejeneratif bozukluklarda rol oynayabileceğini belirtmektedir. Yapılan Rotterdam çalışmasında tip 2 diyabetik hastalarda Alzheimer demans riskinin neredeyse 2 kat arttığı rapor edilmiştir¹⁵². Hala moleküler mekanizmaların tam olarak açık olmamasıyla birlikte diyabet ve Alzheimer arasındaki ortak bağlantının serebral insülin reseptör sinyali olabileceği düşünülmektedir. Daha önceki çalışmalarda insülinin tau fosforilasyonu üzerine zıt etkilerinin hücre tipine göre değiştiği belirtilmiştir. İnsülin tedavisinin tau fosforilasyonunu, insan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde¹⁰³ ve rat kortikal nöron primer kültürlerinde arttırdığı¹⁵³, insan nöronal kültüründe (NT2 hücreleri) ise azalttığı⁷⁷ belirlenmiştir.

CNS insülininin bilişsel aktivite ile ilişkili etkileri in vivo ve in vitro çalışmalarla belirtilmiştir. Periferal insülinin artışı, insülin rezistansı ve metabolik sendromun diğer belirtileri AD için risk faktörü oluşturmaktadır. Beyinde insülin, insülin reseptörü ve C peptid konsantrasyonlarının AD hastalarında ve yaşlılıkta azaldığı gözlenmiştir. Doz-bağımlı intranasal insülin tedavisinin, AD hastalarında, sağlıklı gönüllülerde ve hafıza sorunu olan yetişkinlerde, sözel hafızayı ve plazma Aβ peptid seviyelerini regüle edebildiği gözlenmiştir²³. Burns et al.un çalışmasında erken evre

Alzheimer hastalarında yüksek plazma insülin seviyelerinin, azalmış total beyin ve hipokampal atrofi ile ilişkisi olduğu, ancak plazma glukoz düzeylerinin korele olmadığı belirtilmiştir⁴⁰. Diyabetin beyin dokusunda meydana getirdiği etkilere benzer şekilde Alzheimer hastalarında CSF örneklerinde, tau fosforilasyonunun Ser181, Thr231 ve Ser396/404 rezidülerinde arttığı belirtilmiştir¹⁵⁴. Çeşitli çalışmalarda, diyabetik hastalarda artan Alzheimer riski rapor edilmiştir. Tip 1 ve tip 2 diyabet, yükselen kan glukoz seviyeleri ve bozulan bilişsel fonksiyonlarla ilişkili hiperglisemi ile karakterizedir. Tip 2 diyabette oluşan hiperinsülinemi ve insülin rezistansının neden olduğu obezite, dislipidemi, hipertansiyon ve inflamasyon gibi metabolik risk faktörlerinin ortaya çıkması, tip 1 diyabetin temel nedeninin ise pankreatik β hücre harabiyetinden kaynaklanan insülin eksikliği olması, ileri yaşlarda tip 2 diyabetiklerde tip 1 diyabetiklere oranla daha sık ve farklı düzeyde görülen öğrenme ve hafıza bozukluklarının nedeni olarak gösterilebilir¹⁴⁶.

Bulgularımız, hipergliseminin ve plazma insülin eksikliğinin eşlik ettiği diyabetik rat beyin dokusu hipokampüs bölgesinde bozulan insülin sinyal yolağı ve tau fosforilasyonunun ve de insülinin serebral regülasyondaki etkin rolü dolayısıyla Diabetes Mellitus'un Alzheimer gelişiminde risk faktörü olabileceğini desteklemektedir. Bu süreçteki moleküler mekanizmaların aydınlatılmasının beyinde oluşabilecek nörodejeneratif hasara karşı tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bilgiler vereceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Diabetes Mellitus ve Alzheimer, insülin sinyal yolağının bozulması, kolesterol seviyelerinin artması ve metabolik bozuklukların insidans artışı gibi ortak karakteristikleri paylaşmaktadır. Alzheimer'ın en belirgin iki patolojik karakteristiği, ekstraselüler amiloid β plaklarının ($A\beta$) oluşumu ve tau proteinin hiperfosforilasyonudur. İnsülinin, Alzheimer'ın oluşumunda etkili olan tau fosforilasyonu ve β -amiloid metabolizması gibi moleküler ve hücrel mekanizmalarda direkt etkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda wistar ratlarda stz indüksiyonu ile deneysel diyabet modeli oluşturulmuştur, 12 haftalık deney süresi sonunda ratların beyin doku hipokampus bölgelerinde insülin/PI3K sinyal yolağı protein ekspresyonları ve Alzheimer'ın önemli patolojik belirteçlerinden biri olan tau hiperfosforilasyonu incelenmiştir. Sonuçlarımıza göre IR, Akt, GSK3- α ve GSK3- β protein fosforilasyonunda azalma, bozulan insülin sinyal iletimini desteklemektedir. Bozulan sinyal iletimi sonucunda tau (Thr-231) epitopunda fosforilasyon artışı, diyabetin beyin dokusunda Alzheimer benzeri etkileri oluşturduğunu düşündürmektedir. İnsülin tedavisi uygulanan ratlarda, insülinin tau (Thr-231) hiperfosforilasyonuna kısmi bir etkisinin olduğu, düzeylerin kontrol grubu seviyesine ulaşamadığı gözlenmiştir.

Diabetes Mellitus ile nörodejeneratif hastalıklar arasındaki klinik ilişki yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Alzheimer ve Parkinson'da, beyinde insülin reseptör ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli etkiye sahip ve insülin sinyal mekanizmasının hedefi olan çeşitli moleküller tanımlanmıştır. GSK-3 bu moleküllerden biri olup, tau proteininin fosforilasyonu ile ilişkili olduğu

belirtilmiştir. Transjenik hayvan modelleri ve hücre kültürü ortamında yapılan çalışmalarla, GSK3- β 'nin aktif formunun overekspresyonunun tau hiperfosforilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, insülin ve ilgili hormon IGF-1'in, GSK3- β aktivitesini inhibe ederek tau fosforilasyonunu azalttığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda artan plazma A β 1-42 seviyeleri, hipokampus tau fosforilasyonu, azalan insülin/PI3K sinyal yolağı protein fosforilasyonu bulguları Diabetes Mellitus'un Alzheimer gelişiminde risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir.

7. ÖZET

Diabetes Mellitus'un Beyin İnsülin-PI3K Sinyal Yolağı ve Tau Hiperfosforilasyonu Üzerine Etkileri

Diabetes Mellitus, pankreasın insülin salgısının tam ya da kısmi yetersizliğı ya da insülin etkisinin yetersizliğı ile oluşan, kendini hiperglisemi ile belli eden, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğı ile de karakterize bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır. Beyinde insülin reseptörlerinin keşfi ile, insülinin beyin fizyolojisinde önemli bir rol oynadığı, serebral insülin sinyalinde ve glukoz homeostazında meydana gelen bozuklukların beyin patolojisine katkıda bulunduğı belirtilmektedir. Çalışmamızda streptozotosin enjeksiyonu ile oluşturulan diyabetin, beyin dokusunda Alzheimer'ın önemli patolojik belirteçlerinden olan tau hiperfosforilasyonu üzerine etkisi ve de fosfo-tau oluşumunun insülin sinyal yolağı ile etkileşimi incelenerek, Diabetes Mellitus ve Alzheimer arasındaki olası ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratların beyin hipokampüs dokularında IRS/PI3K sinyal yolağı üyeleri IR, PKB/Akt, GSK-3 ve tau genlerinin protein ekspresyonları Western blot yöntemi ile incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda Wistar ratlar, 3 gruba ayrılarak 12 hafta boyunca takip edilmiştir: Grup I; kontrol, Grup II; diyabet (DM), Grup III; diyabet + insülin (DM+İ). Kan glukoz seviyeleri glukoz oksidaz metodu ile, plazma insülin ve Amiloid β 1-42 seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

Plazma Amiloid β 1-42 seviyelerinin ve hipokampüs Tau (Thr231) protein ekspresyonunun DM grubunda kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği gözlenmiştir.

Sonuçlarımız doğrultusunda artmış tau fosforilasyonu ve insülin sinyal yolağında meydana gelen değışiklikler, Diabetes Mellitus'un Alzheimer gelişiminde risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes Mellitus, İnsülin, Tau Hiperfosforilasyonu, Alzheimer

8. SUMMARY

The Effects of Diabetes Mellitus on Brain Insulin-PI3K Signaling Pathway and Tau Hyperphosphorylation

Diabetes Mellitus is a chronic hyperglycemic metabolic disease leading to disorders of carbohydrate, lipid and protein metabolism due to relative or definite deficiency of insulin function and/or insulin hormone secretion. Following the demonstration of insulin receptors in the brain, insulin appears to play a role in brain physiology, and disturbances of cerebral insulin signalling and glucose homeostasis are implicated in brain pathology. In our study we aimed to investigate the possible effects of Diabetes on the accumulation of the main pathologic hallmarks of Alzheimer Disease, tau hyperphosphorylation, and the relationship with insulin signaling pathways molecules in rat brain tissue.

Wistar rats were assigned randomly into three groups, Group I; control, Group II; diabetes (DM), Group III; diabetes+insulin (DM+I). Serum insulin and Amyloid β 1-42 ($A\beta$) levels were measured by ELISA. Using Western blot there were shown alterations of the insulin receptor (IR) signaling cascade at the level of PKB/Akt, GSK-3 and tau protein in the hippocampus, 12 weeks after i.p injection of stz in rats.

Plasma $A\beta$ levels were significantly increased in diabetes compared to control. And also, diabetes induced an increase of tau phosphorylation at the Thr 231 site.

Our results pointed out an increased $A\beta$ levels and tau hyperphosphorylation, suggested that the defects of insulin signal

transduction in brain that Diabetes Mellitus have an increase risk to develop Alzheimer Disease.

Key Words: Diabetes Mellitus, Insulin, Tau Hyperphosphorylation, Alzheimer Disease

9. KAYNAKLAR

1. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3 rd ed. WB Saunders Company; 1999.
2. Sack BS. Implications of the Revised Criteria for Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Clinical Chemistry 1997; 43: 2230-32.
3. Bendich A. Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM. The antioxidant role of vitamin C. Adv.Free Rad.Biol.Med 1986; 2: 419-44.
4. Bennett PH. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance. Joslin's Diabetes Mellitus. 13 th ed. Philadelphia: Lea&Febiger; 1994.
5. Bingöl G. Biyokimya. 4. Baskı. Ankara: Taş kitabevi; 1983.
6. Berne RM, Levy MN. Principles of physiology. USA. 1990.
7. Bloom A, Ireland J. A colour atlas of diabetes. 2 nd ed. Spain: Wolfe publishing; 1992.
8. Bothwell TH, Charlton RW. A general approach to the problems of iron deficiency and iron overload in the population at large. Semin. Hematol. 1982; 19: 54-67.
9. Bhagavan NV. Medical biochemistry. 2 nd ed. England: Bartlett pub; 1992.
10. Chance B, Sies H, Boveries A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. 1979; 59: 527-605.

11. Cavarocchi NC, O'Brein JF. Superoxide generation during cardiopulmonary bypass: Is there a role for vitamin E?, *J. Of Surgical Research* 1986; 40: 519-27.
12. Chaudhri G, Clark IA, Hunt NH, Cowden WB, Ceredig R. Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation. *J. Immunol.* 1986; 137 (8): 2646-52.
13. Montgomery R. Olgü Sunumlu Yaklaşım Biyokimya 6. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2000.
14. Mayer JP, Zhang F, DiMarchi RD. Insulin structure and function. *Biopolymers* 2007; 88(5): 687-713.
15. Peter FH, Karam JH, Saler PR. Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus in "Basic and Clinical Endocrinology". 3 rd ed. Toronto: Prentice Hall International Inc; 1992.
16. Virji MAG, Vassalli JD, Estensen RD, Reich E. Plasminogen activator of islets of Langerhans. Modulation by glucose and correlation with insulin production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980; 77(2): 875-9.
17. Flier JS, Haris M, Hollenberg AN. Leptin, nutrition and the thyroid: the why, the wherefore, and wiring. *J Clin Invest.* 2000; 105(7): 859-61.
18. Duckworth WC. İnsülin Degradation: Mechanisms, Products and Significance. *Endocrine Reviews* 1988; 9(3): 319-45.
19. Nelson WE, Vaughan VC, Behrman RE: *Nelson Textbook of Pediatrics.* 13 th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1987.

20. Karam JH. Basic and Clinical Endocrinology: Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. 5 th ed. Stanford: Greenspan FS, Strewler GJ(ed) Appleton-Lange; 1997.
21. Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem.* 2002; 277(42): 39684-95.
22. Fernandez AM, Torres-Alemán I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13(4): 225-39.
23. Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Ther.* 2012; 136(1): 82-93.
24. Gerozissis K. Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol.* 2008; 585(1): 38-49.
25. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 414(6865): 799-806.
26. Williamson R, McNeilly A, Sutherland C. Insulin resistance in the brain: an old-age or new-age problem? *Biochem Pharmacol.* 2012; 84(6): 737-45.
27. Biessels GJ, Bravenboer B, Gispen WH. Glucose, insulin and the brain: modulation of cognition and synaptic plasticity in health and disease: a preface. *Eur J Pharmacol.* 2004; 490(1-3): 1-4.
28. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: Relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 2004; 490: 13–24.

29. Messier C, Tsiakas M, Gagnon M, Desrochers A, Awad N. Effect of age and glucoregulation on cognitive performance. *Neurobiol Aging*. 2003; 24(7): 985-1003.
30. Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol*. 2004; 490(1-3): 71-81.
31. Correia SC, Santos RX, Perry G, Zhu X, Moreira PI, Smith MA. Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic Alzheimer's disease? *Ageing Res Rev*. 2011; 10(2): 264-73.
32. Margolis RU, Altszuler N. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* 1967; 215: 1375–1376.
33. Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 1978; 272: 827–829.
34. Plum L, Schubert M, Brüning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*. 2005; 16(2): 59-65.
35. Adamo M, Raizada MK, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the nervous system. *Mol. Neurobiol* 1989; 3: 71–100.
36. Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol*. 2004; 490(1-3): 115-25.
37. Heidenreich KA, Zahniser NR, Berhanu P, Brandenburg D, Olefsky, JM. Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. *J. Biol. Chem*. 1983; 258: 8527– 8530.

38. Zahniser NR, Goens MB, Hanaway PJ, Vynych JV. Characterization and regulation of insulin receptors in rat brain. *J. Neurochem* 1984; 42: 1354–1362.
39. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 490(1-3): 5–12.
40. Burns JM, Donnelly JE, Anderson HS, Mayo MS, Spencer-Gardner L, Thomas G, et al.. Peripheral insulin and brain structure in early Alzheimer disease. *Neurology* 2007; 69: 1094–1104.
41. Erol A. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2008; 13: 241–253.
42. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J. Neural Transm. Suppl.* 2007; 72: 217–233.
43. Banks WA, Kastin AJ. Peptides and the blood–brain barrier: Lipophilicity as a predictor of permeability. *Brain Res Bull* 1985; 15: 287–292.
44. Baskin DG, Porte D Jr, Guest K, Dorsa DM. Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology* 1983; 112: 898–903.
45. Gupta G, Azam M, Baquer NZ. Modulation of rat brain insulin receptor kinase activity in diabetes. *Neurochem Int* 1992; 20: 487–492.
46. Hill JM, Lesniak M A, Pert CB, Roth J. Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: Prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 1998; 17: 1127–1138.

47. Schechter R, Abboud M. Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2001; 127: 41–49.
48. Schechter R, Whitmire J, Holtzclaw L, George M, Harlow R, Devaskar, SU. Developmental regulation of insulin in the mammalian central nervous system. *Brain Res.* 1992; 582: 27–37.
49. Schechter R, Beju D, Gaffney T, Schaefer F, Whetsell L. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system. *Brain Res.* 1996; 736: 16–27.
50. Wozniak M, Rydzewski B, Baker SP, Raizada MK. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 1993; 22: 1–10.
51. Lacroix MC, Badonnel K, Meunier N, Tan F, Schlegel-Le Poupon C, Durieux, D., et al. (2008). Expression of insulin system in the olfactory epithelium: First approaches to its role and regulation. *J Neuroendocrinol* 20, 1176–1190.
52. Young 3rd WS. Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. *Neuropeptides* 1986; 8: 93–97.
53. Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 8445–8454.

54. Schwartz MW, Figlewicz DF, Kahn SE, Baskin DG, Greenwood MR, Porte D Jr. Insulin binding to brain capillaries is reduced in genetically obese, hyperinsulinemic Zucker rats. *Peptides* 1990; 11: 467–472.
55. Wallum BJ, Taborsky GJ Jr, Porte D Jr, Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC et al. Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987; 64: 190–194.
56. Cardoso S, Correia S, Santos RX, Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, et al. Insulin is a two-edged knife on the brain. *J. Alzheimers Dis* 2009; 18: 483–507.
57. Gasparini L, Xu H. Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2003; 26(8): 404-6.
58. Nelson TJ, Sun MK, Hongpaisan J, Alkon DL. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 76–87.
59. Figlewicz DP, Szot P, Israel PA, Payne C, Dorsa DM. Insulin reduces norepinephrine transporter mRNA in vivo in rat locus coeruleus. *Brain Res* 1993; 602: 161–164.
60. Kopf SR, Baratti CM. Effects of post-training administration of insulin on retention of a habituation response in mice: participation of a central cholinergic mechanism. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 71: 50–61.
61. Hoyer S, Prem L, Sorbi S, Amaducci L. Stimulation of glycolytic key enzymes in cerebral cortex by insulin. *NeuroReport* 1993; 4: 991– 993.

62. Rinaudo MT, Curto M, Bruno R, Marino C, Rossetti V, Mostert M. Evidence of an insulin generated pyruvate dehydrogenase stimulating factor in rat brain plasma membranes. *Ital. J. Biochem.* 1987; 19: 909–913.
63. Kyriakis JM, Hausman RE, Peterson SW. Insulin stimulates choline acetyltransferase activity in cultured embryonic chicken retina neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987; 84: 7463–7467.
64. Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers Jr. MG, et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 2003; 52: 227–231.
65. Plum L, Belgardt BF, Bruning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1761–1766.
66. de la Monte SM. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2012; 9(1): 35-66.
67. Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor—a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 1998; 9: 89–109.
68. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev.* 2009; 30(6): 586-623.
69. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3: 267–277.

70. Johnston AM, Pirola L, Van Obberghen E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Lett.* 2003; 546: 32–36.

71. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231–241.

72. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 183–189.

73. Huang CC, Lee CC, Hsu KS. The role of insulin receptor signaling in synaptic plasticity and cognitive function. *Chang Gung Med J.* 2010; 33(2): 115-25.

74. Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2008; 104(6): 1433-9.

75. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 2003; 423: 435–439.

76. Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, et al. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 1993; 325: 167–172.

77. Hong M, Lee VM. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 19547–19553.

78. Hardy J, Selkoe DJ. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-356.
79. Evin G, Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 2002; 23(7):1285–1297.
80. Vetrivel KS, Thinakaran G. Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 2006; 66: 69–73.
81. Vardy ER, Catto AJ, Hooper NM. Proteolytic mechanisms in amyloid-metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* 2005; 11: 464-472.
82. Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, et al. Stimulation of b-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal b-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signalling. *J. Neurosci.* 2001; 21: 2561–2570.
83. Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin growth factor 1 regulates brain amyloid-b levels. *Nat. Med.* 2002; 8: 1390–1397.
84. Cholerton B, Baker LD, Craft S. Insulin resistance and pathological brain ageing. *Diabet Med.* 2011; 28(12): 1463-75.
85. Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. Soluble Ab inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 2007; 282: 33305–33312.

86. Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Insulin-degrading enzyme. *Clin Invest Med* 1996; 19: 149–160.
87. Kurochkin IV, Goto S. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 1994; 345: 33–37.
88. McDermott JR, Gibson AM. Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem Res* 1997; 22: 49–56.
89. Qiu W, Walsh D, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny M et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 1998; 273: 32730–32738.
90. Perez A, Morelli L, Cresto JC, Castano EM. Degradation of soluble amyloid h-peptides 1 –40, 1 – 42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brain. *Neurochem. Res.* 2000; 25: 247– 255.
91. Mukherjee A, Song E, Kihiko-Ehmann M, Goodman Jr JP, St.Pyrek J, Estus S, Hersh LB. Insulysin hydrolyzes amyloid beta peptide to products that are neither neurotoxic nor deposit on amyloid plaques. *J. Neurosci.* 2000; 20: 8745– 8749.
92. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the betaamyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: 4162–4167.

93. Watanabe A, Hasegawa M, Suzuki T, Takio K, Morishima-Kawashima M, Titani K, et al. In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 25712– 25717.
94. Röder HM, Ingram VM. Two novel kinases phosphorylate tau and the KSP site of heavy neurofilament subunits in high stoichiometric ratios. *J. Neurosci.* 1991; 11: 3325–3342.
95. Johnson GVW, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science* 2004; 117: 5721-5729.
96. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiological Review* 2004; 84: 361–384.
97. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci.* 2003; 23(18): 7084-92.
98. Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9): 3100-3105.
99. De Ferrari GV, Inestrosa NC. Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 33(1): 1-12.
100. Morales I, Farias G, Maccioni RB. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation* 17(3):202-204 (2010).

101. Hanger DP, Seereeram A, Noble W. Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 2009; 9(11): 1647-1666.
102. Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear β -catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. *EMBO J.* 2001; 20: 27–39.
103. Lesort M, Jope RS, Johnson GVW. Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3 β and Fyn tyrosine kinase. *J. Neurochem.* 1999; 72: 576– 584.
104. Miles WR, Root HF. Psychologic tests applied to diabetic patients. *Arch Intern Med* 1922; 30: 767–777.
105. Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 2008; 29(4): 494-511.
106. S Roriz-Filho J, Sá-Roriz TM, Rosset I, Camozzato AL, Santos AC, Chaves ML, et al. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792(5): 432-43.
107. Biessels GJ, Van der Heide LP, Kamal A, Bleyers RL, Gispen WH. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 441: 1–14.
108. Sredy J, Sawicki DR, Notvest RR. Polyol pathway activity innervous tissues of diabetic and galactose-fed rats: effect of dietary galactose withdrawal or tolrestat intervention therapy. *J Diabet Complications* 1991; 5: 42–47.

109. Toth C, Schmidt AM, Tuor UI, Francis G, Foniok T, Brussee V et al. Diabetes, leukoencephalopathy and rage. *Neurobiol Dis* 2006; 23: 445–461.
110. Girones X, Guimera A, Cruz-Sanchez CZ, Ortega A, Sasaki N, Makita Z, et al. N-epsilon carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1241–1247.
111. Aragno M, Mastrocola R, Medana C, Restivo F, Catalano MG, Pons N, et al. Up-regulation of advanced glycated products receptors in the brain of diabetic rats is prevented by antioxidant treatment. *Endocrinology* 2005; 146: 5561–5567.
112. Welsh B, Wecker L. Effects of streptozotocin-induced diabetes on acetylcholine metabolism in rat brain. *Neurochem Res* 1991; 16: 453–460.
113. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1994; 37: 643–650.
114. Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9: 127–140.
115. Wieloch T. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 1985; 230: 681–683.
116. Gerozissis K. Brain insulin and feeding: a bi-directional communication. *Eur. J.Pharmacol.* 2004; 490: 59–70.

117. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers Dis.* 2005; 7: 63–80.
118. Hak AE, Pols HA, Stehouwer CD, Meijer J, Kiliaan AJ, Hofman A, et al. Markers of inflammation and cellular adhesion molecules in relation to insulin resistance in nondiabetic elderly: the Rotterdam study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4398–4405.
119. Lee ZS, Chan JC, Yeung VT, Chow CC, Lau MS, Ko GT, et al. Plasma insulin, growth hormone, cortisol, and central obesity among young Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22: 1450–1457.
120. Tojo C, Takao T, Nishioka T, Numata Y, Suemaru S, Hashimoto K. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in WBN/Kob rats with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Endocr J* 1996; 43: 233–239.
121. Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 351–357.
122. Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 1985; 4: 2757–2763.
123. de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous

system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005; 7(1): 45-61.

124. Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte Jr D. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology* 1998; 50: 164–168.

125. Craft S, Asthana S, Cook DG, Baker LD, Cherrier M, Purganan K, et al. Insulin dose-response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28: 809–822.

126. Ott A, Stolk RP, Hofman A, van Harskamp F, Grobbee DE, Breteler MM. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia* 1996; 39(11): 1392-7.

127. den Heijer T, Vermeer SE, van Dijk EJ, Prins ND, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetologia.* 2003; 46(12): 1604-10.

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

129. Churcher I. Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Top Med. Chem.* 2006; 6: 579–595.

130. Glabe CG. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging* 2006; 27: 570–575.

131. Ristow M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J Mol Med (Berl)*. 2004; 82(8): 510-29.
132. Stolk RP, Breteler MM, Ott A, Pols HA, Lamberts SW, Grobbee DE, et al. Insulin and cognitive function in an elderly population. The Rotterdam Study. *Diabetes Care* 1997; 20: 792–795.
133. Watson GS, Peskind ER, Asthana S, Purganan K, Wait C, Chapman D, et al. Insulin increases CSF Aβ₄₂ levels in normal older adults. *Neurology* 2003; 60: 1899–1903.
134. de la Monte SM. Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep*. 2009; 42(8): 475-81.
135. Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 2006; 9: 13-33.
136. de la Monte SM, Tong M, Lester-Coll N, Plater M Jr, Wands JR. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 2006; 10: 89-109.
137. Frolich L. et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 1998; 105, 423–438.
138. Frolich L. et al. A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999; 893, 290–293.

139. Jolivalt CG, Lee CA, Beiswenger KK, Smith JL, Orlov M, Torrance MA, et al. Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J Neurosci Res.* 2008; 86(15): 3265-74.
140. Li ZG, Zhang W, Sima AA. Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes.* 2007; 56(7): 1817-24.
141. Qu Z, Jiao Z, Sun X, Zhao Y, Ren J, Xu G. Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Res.* 2011; 1383: 300-6.
142. Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J. Neurochem.* 2006; 96: 1005–1015.
143. Jolivalt CG, Hurford R, Lee CA, Dumaop W, Rockenstein E, Masliah E. Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. *Exp Neurol.* 2010; 223(2): 422-31.
144. Craft S, Asthana S, Schellenberg G, Baker L, Cherrier M, Boyt AA, et al. Insulin effects on glucose metabolism, memory, and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease differ according to apolipoprotein-E genotype. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 903: 222–228.
145. Stein TD, Johnson JA. Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J. Neurosci.* 2002; 22: 7380–7388.

146. Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL. Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2009; 150(12): 5294-301.
147. Meske V, Albert F, Ohm TG. Coupling of mammalian target of rapamycin with phosphoinositide 3-kinase signaling pathway regulates protein phosphatase 2A- and glycogen synthase kinase-3 -dependent phosphorylation of Tau. *J Biol Chem*. 2008; 283(1): 100-9.
148. Clodfelder-Miller BJ, Zmijewska AA, Johnson GV, Jope RS. Tau is hyperphosphorylated at multiple sites in mouse brain in vivo after streptozotocin-induced insulin deficiency. *Diabetes* 2006; 55, 3320–3325.
149. Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Liu L, Wang L, Herman M, et al. Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *J Neurosci*. 2007; 27(50): 13635-48.
150. Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, et al. Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2004; 24: 2401–2411.
151. Planel E, Richter KEG, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, et al. Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 2007; 27: 3090 –3097.
152. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM: Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam Study. *Neurology* 1999; 53: 1937–1942.

153. Lesort M, Johnson GV: Insulin-like growth factor-1 and insulin mediate transient site-selective increases in tau phosphorylation in primary cortical neurons. *Neuroscience* 2000; 99: 305–316.

154. Formichi P, Battisti C, Radi E, Federico A. Cerebrospinal fluid tau, A beta, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Cell Physiol.* 2006; 208(1): 39-46.

10. EKLER

Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

08.12.2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 9 - 452
KONU:

Sayın
Prof.Dr.Nilgün ALTAN
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-10.007 kod numaralı ve "*Diyabetin Beyin İnsülin Sinyal İletim Yolu Üzerine Olası Etkileri*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-10.007 and entitled "*The Effects of Diabetes Mellitus on Insulin Signaling Pathway in Rat Brain Tissue*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

Teşekkür

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktararak, desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Nilgün Altan'a,

Eğitimimde emeği geçen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarımdan her birine,

Tez çalışmalarım sırasında sonsuz desteğini her zaman hissettiğim sevgili Doç. Dr. Aylin Sepici-Dinçel'e,

Tezimin patoloji kısmında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ayhan Özkul ve Arş. Gör. Gözde Yücel'e,

Her zaman yanımda olan, doktora eğitimim süresince gösterdikleri sonsuz sabır ve destek için sevgili babam Mehmet Şahin, annem Nurhan Şahin ve kardeşim Tuğçe Şahin'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Duygu ŞAHİN

Doğum Tarihi : 27.11.1980

Doğum Yeri : Ankara

Eğitim:

1999 – 2003 : Lisans, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

2004 – 2007 : Yüksek lisans, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD

2007 – : Doktora, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD

2010 Mart – Haziran : Erasmus öğrencisi, Kopenhag Üniversitesi, Klinik Farmakoloji AD

Yüksek Lisans Tezi: Tiroid Hormonlarının Diyabetik Rat Karaciğer Glukokinaz Enzimi Üzerine Olası Etkileri

SCI ve SCI-EXP Tarafından Taranan Bilimsel Dergilerde Yapılan

Yayınlar:

1- Güler G, Tomruk A, Ozgur E, **Sahin D**, Sepici A, Altan N, Seyhan N. The effect of radiofrequency radiation on DNA and lipid damage in female and male infant rabbits. Int J Radiat Biol. 88(4):367-73. 2012.

2- Altan N, Sepici-Dinçel A, **Sahin D**, Kocamanoğlu N, Kosova F, Engin A. Oxidative DNA damage: the thyroid hormone-mediated effects of insulin on liver tissue. Endocrine, 38(2):214-20, 2010.

3- Karacay O, Sepici-Dinçel A, Karcaaltincaba D, **Sahin D**, Yalvaç S, Akyol M, Kandemir O, Altan N. A quantitative evaluation of total antioxidant status and oxidative stress markers in preeclampsia and gestational diabetic patients in 24-36 weeks of gestation. Diabetes Res Clin Pract., 89(3): 231-8, 2010.

4- Gulcelik MA, Dincer H, **Sahin D**, Demir OF, Yenidogan E, Alagol H. Glucan Improves Impaired Wound Healing in Diabetic Rats. Wounds-A Compendium Of Clinical Research And Practice, 22(1): 12-16, 2010.

5- Soğukpınar I.Cenk, **Şahin Duygu**, Demirağ Alp, Sepici-Dinçel Aysin, Kısakürek Mustafa, Akkuş M.Ali, Altan Nilgün. Hepatik İskemik Önkoşullamanın İnce Bağırsak İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisi. Türk Biyokimya Dergisi-Turkish Journal Of Biochemistry, 33 (3): 111-116, 2008.

Kurslar:

1- "XIII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu", 13-17 Aralık 2010, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli

2- "Mechanisms, Consequences and Detection of Free Radical-Mediated Oxidative Protein Modification" (Tübitak Destekli), 15-20 Nisan 2009, Antalya

3- "Kromatografi Kursu" 26-28 Kasım 2007, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara

4- "Biyokimya ve Moleküler Biyolojide Modern Teknikler Lisansüstü Yaz Okulu" 18-28 Haziran 2007, Ege Üniversitesi

5- "DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi" 14-17 Mayıs 2007, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir

6- "Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu" 8,9 Haziran 2006, Gazi Üniversitesi, Ankara