T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİYABETİK SIÇANLARDA ANGİOTENSİN IV'ÜN KOGNİTİF FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ

AYSU KILIÇ

DANIŞMAN
PROF. DR. EMİNE GÜLDEREN ŞAHİN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

Bu çalışma 25.11.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Nermin YELMEN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. İsmail MERAL
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Tıp Fakültesi

BEYAN

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

Aysu KILIÇ



İTHAF

Rahmetli dedem İsmail KILIÇ'a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın her aşamasında sonsuz desteğini gördüğüm hocam Öğr. Gör. Dr. Savaş ÜSTÜNOVA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında benden desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım; Prof. Dr. İsmail MERAL'e, Prof. Dr. Kadriye AKGÜN-DAR'a, Dr. Öğr. Üyesi Birsen ELİBOL'a, , Dr. Öğr. Üyesi Aslı KANDİL'e ve Arş Gör. Dr. Huri BULUT'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, her konuda desteklerini gördüğüm Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki uzman ve asistanlara da teşekkür ederim.

Son olarak, ilgi ve alakalarını benden esirgemeyen kıymetli aileme de teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33339

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. DİABETES MELLİTUS 2
2.2. HİPOKAMPUS, ÖĞRENME VE BELLEK 3
2.3. DİABETES MELLİTUS VE KOGNİTİF FONKSİYON BOZUKLUKLARI 7
2.4. DİABETES MELLİTUS VE OKSİDATİF STRES 10
2.5. RENİN–ANGİOTENSİN SİSTEMİ VE BEYİN 12
2.6. ANGİOTENSIN IV 14
3. GEREÇ VE YÖNTEM 20
3.1. DENEY HAYVANLARI 20
3.2. DENEYSEL UYGULAMALAR 20
3.3. PASİF SAKINMA TESTİ 22
3.4. MORRIS SU LABİRENTİ TESTİ 23
3.5. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR 24
3.5.1. Gereçler 25
3.5.2. ELISA Kitleri 25
3.5.3. Total Protein Tayini 25
3.5.4. Glutatyon Peroksidaz (GPx) ELISA Test Protokolü 26
3.5.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) ELISA Test Protokolü 27
3.5.6. Malondialdehit (MDA) ELISA Test Protokolü 28
3.5.7. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) ELISA Test Protokolü 28
3.6. WESTERN BLOT ÇALIŞMALARI 29

3.6.1. Doku Analizi 29
3.6.2. Western blot analizi 29
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 30
4. BULGULAR 31
4.1. AĞIRLIK BULGULARI 31
4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR 31
4.2.1. Kan Glikoz Bulguları 31
4.2.2. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Seviyesi 32
4.2.3. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Malondialdehit (MDA) Seviyesi 33
4.2.4. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Glutatyon Peroksidaz (GPx) Seviyeleri 34
4.2.5. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyeleri 34
4.3. WESTERN BLOT BULGULARI 35
4.3.1. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda N-metil-D-aspartik asit (NMDA) Seviyeleri 35
4.3.2. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Gama-Aminobütrik Asit A Reseptörü ($GABA_A$) Seviyeleri 36
4.3.3. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Angiotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE2) Seviyeleri 37
4.4. PASİF SAKINMA TESTİ BULGULARI 37
4.5. MORRIS SU LABİRENTİ TESTİ BULGULARI 38
4.5.1. Deney Hayvanlarının Öğrenme Periyodunda Platformu Bulma Süreleri 38
4.5.2. Deney Hayvanlarının Öğrenme Periyodunda Katettikleri Mesafe 40
4.5.3. Deney Hayvanlarının Öğrenme Periyodundaki Yüzme Hızları 43
4.5.4. Deney Hayvanlarının Test Periyodunda Platform Bölgesinde Geçirdikleri Süre 43
4.5.5. Deney Hayvanlarının Test Periyodunda Platform Bölgesine Ulaşma Süreleri 44
4.5.6. Deney Hayvanlarının Test Periyodunda Platform Bölgesinden Geçme Sıklığı 45
5. TARTIŞMA 46
KAYNAKLAR 58
ETİK KURUL KARARI 74

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....75
ÖZGEÇMİŞ.....76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Uyaranın ardından sinaptik tepkinin gücünde gerçekleşen artış (Hajipour ve ark. 2016). 4
Şekil 2: NMDA ve AMPA reseptörlerinin modeli, (Malenka ve ark 1999). 5
Şekil 3: Uzun süreli potensiasyonun moleküler mekanizması (Malenka ve ark. 1999). .. 6
Şekil 4: T2DM'li hastalarda kognitif fonksiyon bozukluğu ile ilişkili patofizyolojik faktörlerin şematik gösterimi (DeAguiar ve ark. 2015). 9
Şekil 5: Hipergliseminin aldoz redüktaz yolağının aktivasyonu ile vasküler komplikasyonları arttırdığı mekanizma, (Domingueti ve ark. 2016). 12
Şekil 6: Renin-angiotensin sistemi (Guimond ve Galle-Payet 2012). 14
Şekil 7: Angiotensin IV'ün kimyasal yapısı (Chai ve ark. 2008). 15
Şekil 8: Ang IV ve AT4 ligandlarının etkilerine aracılık ettiği olası mekanizmaların gösterimi. (Vanderheyden 2009). 16
Şekil 9: Çalışmada takip edilen deney protokolü. 21
Şekil 10: Subkutan enjeksiyon uygulaması ve çalışmada kullanılan deney hayvanları. 21
Şekil 11: Pasif sakınma cihazı. 23
Şekil 12: Morris su labirenti ve test kadranları. 24
Şekil 13: Deney gruplarının günlere göre (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) vücut ağırlıklarındaki değişim (**p<0.01, ***p<0.001, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık). 31
Şekil 14: Deney gruplarının günlere göre (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) kan glikoz değerlerindeki değişim (***p<0,001, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık). 32
Şekil 15: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus BDNF düzeyleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık). 33
Şekil 16: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus MDA düzeyleri (**p<0.01, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık). 33
Şekil 17: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus GPx düzeyleri (**p<0.01, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık). 34
Şekil 18: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus SOD düzeyleri (**p<0.01, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık). 35
Şekil 19: Deney gruplarında (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus NMDA reseptörü ekspresyon düzeyleri (***p<0,001, istatistiksel anlamlılık). 36

Şekil 20: Deney gruplarında (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus $GABA_A$ reseptörü ekspresyon düzeyleri (***p<0,001, istatistiksel anlamlılık)..... 36
Şekil 21: Deney gruplarında (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus ACE2 ekspresyon düzeyleri (*p<0.05, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık). 37
Şekil 22: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) pasif sakınma testinde karanlık bölmeye geçiş süreleri *p<0.05, istatistiksel anlamlılık)..... 38
Şekil 23: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodundaki platformu bulma süreleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, istatistiksel anlamlılık). 39
Şekil 24: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodunun 4. ve 5. günlerindeki platformu bulma süreleri (***p<0.001, istatistiksel anlamlılık). 40
Şekil 25: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodundaki katettikleri mesafe (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, istatistiksel anlamlılık). 41
Şekil 26: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodunun 4. ve 5. günlerinde kattetikleri mesafe (***p<0.001, istatistiksel anlamlılık). 42
Şekil 27: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodunun 5. gününde kattetikleri mesafenin iz haritası. 42
Şekil 28: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodundaki hızları (**p<0.01, Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık). 43
Şekil 29: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinde geçirdikleri sürenin tankta toplam geçirdikleri süreye yüzdesi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, istatistiksel anlamlılık). 44
Şekil 30: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesine ulaşma süreleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, istatistiksel anlamlılık). 44
Şekil 31: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinden geçme sıklıkları (*p<0.05, **p<0.01, istatistiksel anlamlılık). 45

Şekil 32: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinden geçme sıklığının iz haritası..... 45

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
ACE	: Angiotensin dönüştürücü enzim
ACE2	: Angiotensin dönüştürücü enzim 2
AGE	: İleri glikasyon son ürünü
Akt	: Protein kinaz B
AMPA	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-iszoksazolepropiyonik asit
Ang I	: Angiotensin I
Ang II	: Angiotensin II
Ang III	: Angiotensin III
Ang IV	: Angiotensin IV
ARB	: Angiotensin II reseptör blokeri
AT1R	: Angiotensin tip I reseptörü
AT2R	: Angiotensin tip II reseptörü
AT4R	: Angiotensin tip IV reseptörü
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain derived neurotrophic factor)
Ca^{++}	: Kalsiyum
CaMK-II	: Ca^{++}/kalmodulin bağımlı protein kinaz
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CA1	: Cornu ammonis 1
CA2	: Cornu ammonis 2
CREB	: cAMP elementi bağlayıcı protein
Dia	: Diyabet grubu
Dia+Ang IV	: Diyabet + Angiotensin IV grubu
DM	: Diabetes mellitus
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPSP	: Eksitatör post sinaptik potansiyel
ERK	: Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
GABA	: Gama-Aminobütrik asit
$GABA_A$	: Gama-Aminobütrik asit A reseptörü
GAPDH	: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
GLUT	: Glikoz taşıyıcısı

GPx : Glutatyon peroksidaz

ICV : İntraserebroventriküler

IRAP : İnsülinle düzenlenen aminopeptidaz (Insulin-regulated aminopeptidase)

IP : İntraperitonel

K : Kontrol grubu

LTP : Uzun süreli potensiyasyon (Long term potentiation)

LTD : Uzun süreli baskılama (Long term depression)

LVV-H7 : LVV-hemorfin 7

Mg^{++} : Magnezyum

Na^{+} : Sodyum

MasR : Mas reseptörü

MDA : Malondialdehit

MSS : Merkezi sinir sistemi

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NGF : Sinir büyüme faktörü

NMDA : N-Metil D-Aspartat

NOx : Nitrojen türevleri

NOS : Nitrik oksit sentaz

PI3K : Fosfotidilinositol-3-kinaz

PKC : Protein kinaz C

RAGE : İleri glikasyon son ürün reseptörü

RAS : Renin-angiotensin sistemi

ROT : Reaktif oksijen türleri

SOD : Süperoksit dismutaz

STZ : Streptozotosin

Sc : Subkutan

T1DM : Tip 1 diabetes mellitus

T2DM : Tip 2 diabetes mellitus

TrkB : Tropomiyozin reseptör kinaz B

Zn^{++} : Çinko

ÖZET

Kılıç, A. (2019). Streptozotosin ile İndüklenen Diyabetik Sıçanlarda Angiotensin IV'ün Kognitif Fonksiyonlar Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Fizyoloji AD. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Angiotensin II'nin metabolize olması sonucu ortaya çıkan angiotensin IV molekülü ve reseptörleri, beyin renin–angiotensin sisteminde önde gelen moleküllerdendir ve kognitif fonksiyonların düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada streptozotosin ile deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda angiotensin IV'ün kognitif fonksiyonlar ve oksidatif stres üzerinde etkisi araştırıldı.

Çalışmada 3 aylık, 250-300 g, 32 adet erkek *Wistar* albino sıçan kullanıldı. Kontrol (K), diyabet (Dia) (60 mg/kg, streptozotosin, ip), yalnızca angiotensin IV (Ang IV) (5 μg/kg, sc, 21 gün) uygulaması yapılan ve diyabet ile birlikte angiotensin IV uygulaması yapılan (Dia+Ang IV) gruplar oluşturuldu. Tüm grupların belirli aralıklarla kan glikoz ve ağırlık ölçümleri yapıldı. 21. günün sonunda sıçanlara öğrenme ve bellek düzeyini belirlemek için Morris su labirenti testi uygulandı. Deney sonunda hipokampuslar biyokimyasal analizler ve western blot çalışmaları için ayrıldı. İstatistiksel analizler Instat İstatistiksel Paket Programı ile $p<0.05$ anlamlılık seviyesinde incelendi. Gruplar arası karşılaştırmalar One-Way ANOVA veya Kruskal Wallis testi ile incelendi. Gruplar arası post-hoc karşılaştırmalar Bonferroni ve Dunn testi ile yapıldı.

Morris su labirenti testinde Dia grubunun K grubuna oranla platform bölgesinde geçirdiği sürenin anlamlı derecede düşük ($p<0,05$), Ang IV grubunun ise Dia grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($p<0,001$) olduğu belirlendi. Dia+Ang IV grubunda ise K grubuna göre anlamlı farklılık gözlenmedi. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve malondialdehit düzeylerinin Dia grubunda, K grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı ($p<0,01$), Ang IV grubunda ise D grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) olarak azaldığı belirlendi. Davranışla paralel olarak beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü düzeylerinin, Dia grubunda K grubuna göre anlamlı derecede ($p<0,01$) düşük, Ang IV ve Dia+Ang IV gruplarında ise D grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış ($p<0,001$, $p<0,05$) olduğu belirlendi.

Angiotensin IV'ün ekzojen uygulanmasının diyabetik sıçanlarda bozulan mekansal öğrenme ve bellek mekanizmasını, BDNF ile NMDA reseptörü ekspresyonunu arttırarak ve hipokampal oksidatif stresi azaltarak olumlu etkilediği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Angiotensin IV, BDNF, diabetes mellitus, hipokampus, kognitif fonksiyonlar, NMDA, oksidatif stres.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33339

ABSTRACT

Kilic, A. (2019). Effects of Ang IV on Learning-Memory and Hippocampal Oxidative Stress in Diabetic Rat. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Physiology. M.Sc. Thesis Istanbul.

The angiotensin IV molecule and its receptors are one of the leading molecules in the brain renin - angiotensin system and have been associated with the regulation of cognitive, sensory and motor functions. In this study, we aimed to investigate whether angiotensin IV has a protective effect on cognitive functions and oxidative stress in streptozotocin - induced diabetic rats.

32 male *Wistar* albino rats, 250-300 g, were used and randomly divided into four groups of control, diabetes (60 mg/kg, streptozotocin, ip), angiotensin IV (5 µg/kg, sc, 21 days) and diabetes+angiotensin IV. Glucose and weight were measured at regular intervals. The Morris water maze test performed to determine the learning and memory levels of rats at 21st day. In addition, hippocampi were taken for biochemical and western blot analysis. Statistical analyzes were performed with Instat Statistical Package Program at $p<0.05$ significance level. Comparisons between groups were analyzed by One-Way ANOVA or Kruskal Wallis test. Post-hoc comparisons between the groups were performed with Bonferroni and Dunn tests.

Time spent in platform area of the diabetes group was significantly lower than the control group ($p <0.05$) and the Ang IV group was significantly higher than the diabetes group ($p <0.001$). The duration was similar to the control group in the Dia+Ang IV group, It was determined that superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde levels increased in diabetic group according to control group ($p <0,01$) and decreased in Ang IV group compared to diabetes group ($p <0.001$). BDNF and NMDA levels were lower in the diabetes group compared to the control group ($p <0.01$), but increased in the Ang IV and Dia + Ang IV groups compared to the diabetes group ($p<0.001$, $p <0,05$).

It has been suggested that exogenous administration of angiotensin IV has a positive effect on impaired spatial learning and memory mechanism via increasing BDNF levels and NMDA receptor expression and decreasing hippocampal oxidative stress in diabetic rats.

Key Words: Angiotensin IV, BDNF, cognitive functions, diabetes mellitus, hippocampus, NMDA, oxidative stress.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 33339

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelinde hızla artış gösteren diabetes mellitus periferal ve merkezi sinir sisteminde yapısal ve fonksiyonel hastalıklar başta olmak üzere vücutta birçok komplikasyona neden olmaktadır. Bilinen birçok komplikasyonunun yanında son zamanlarda diyabetli bireylerde bellek ve yön bulma işlevlerinin gerçekleştiği temporal lobdaki hipokampus bölgesinde nörotransmitter salgılanması ve bunların reseptörlere bağlanması ile ilgili yapı, işlev ve kimyasal düzeydeki bozulmaların nöronlarda apoptoza neden olarak kognitif işlevlerin bozulmasına yol açtığı bildirilmektedir.

Deneysel diyabetin oluşturulmasında kullanılan maddelerden biri olan streptozotosin, membranındaki glukoreseptörlere bağlanarak glikozla uyarılan insülin salınımını bloke eder. Streptozotosin enjeksiyonunu ile gelişen diyabetin öğrenme performansını azalttığı ve öğrenme performansındaki azalmanın zamana bağlı olarak hipokampustaki nöronal ve sinaptik bozulmaya paralel olarak geliştiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Hücre içi glikoz oksidasyonunun artmasından dolayı özellikle nöronlarda direkt glikoz toksisitesi ortaya çıkarır. Bu durum reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırır. İnsanlarda ve deneysel diyabet oluşturulan sıçanlardaki beyin hasarında oksidatif stresin merkezi rol oynadığı bilinmektedir.

Angiotensin II'nin metabolize olması sonucu ortaya çıkan angiotensin IV molekülü ve reseptörleri, beyin renin–angiotensin sisteminde önde gelen moleküllerdendir. Angiotensin IV'ün bağlanma oranının beyinde daha yüksek olduğu gösterilmiş ve daha sonra bu durum kognitif duyusal ve motor fonksiyonların düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Angiotensin 4'ün önemli davranışsal, öğrenme ve belleği de içeren fizyolojik etkileri olduğunun bulunması, bu reseptörün kognitif bozukluklarda bir rolü olup olmadığı sorusunu ve sonuçta bu reseptörün yeni bir tedavi hedefi olabileceğini akıllara getirmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda streptozotosin ile deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda angiotensin IV'ün kognitif fonksiyonlar üzerinde olumlu bir etkisinin olup olmadığı ve gelişen yanıtların oluş mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus (DM) tüm dünyada en sık rastlanan, hiperglisemi ile karakterize edilen kronik endokrin bir bozukluktur. Kronik hiperglisemi, farklı organlarda fonksiyon kaybına neden olmaktadır. DM gelişiminde birçok patojenik süreç vardır. Bunlar, pankreatik beta hücrelerinin otoimmün yıkımından, insülin eksikliğine ve bunun sonucunda insülin etkisine direnç gösteren anormalliklere kadar uzanır. DM'de karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormalliklerin temeli, hedef dokularda insülinin yetersiz etkisidir. İnsülinin bu yetersiz etkisi, yetersiz sekresyonundan ve/veya bir veya daha fazla noktada insüline karşı azalan doku tepkilerinden kaynaklanır. İnsülinin sekresyonunda ve etkisindeki kusurlar sıklıkla aynı hastada bir arada bulunur (Alam ve ark. 2014).

Diabetes mellitus vakalarının büyük çoğunluğu, iki geniş etyopatogenetik kategoriye ayrılmaktadır. Bunlardan ilki, insülin salgılanmasının yetersizliğinden kaynaklanan tip 1 diabetes mellitustur (T1DM). T1DM'de insülin, Langerhans adacığında ve plazmada bulunmaz ve ekzojen insülinle tedavi gerekmektedir. Daha yaygın olan tip 2 diabetes mellitusta (T2DM) ise insülin, genellikle plazmada yaklaşık olarak normal veya normalin-altı düzeylerde bulunur. Ancak insüline duyarlılık normalden düşük seviyededir. Tedavide, insülin veya insülin için hücresel duyarlılığı arttıran ilaçların kombinasyonu kullanılır (Koekkoek ve ark. 2015).

Tip 1 DM genellikle otoimmün patolojik bir süreç ile karakterize edilir. Vücudun kendi beyaz kan hücreleri tarafından, pankreatik beta hücrelerinin tümünün ya da tümüne yakın bir kısmının otoimmün tahribi söz konusudur. Tedavisi, gastrointestinal enzimlerin etkilerinden dolayı oral yol yerine enjeksiyon yolu ile yapılır. İnsülin eksikliğinden dolayı, T1DM'li tedavi edilmemiş hastaların daima kan glikoz konsantrasyonu yüksektir (Koekkoek ve ark. 2015).

Diabetes mellituslu kişiler, ateroskleroz, hipertansiyon, böbrek yetmezliği, damar ve sinir hastalıkları ile enfeksiyona yatkınlık gibi bir takım kronik bozuklukların gelişmesine yatkındırlar. Bu bozuklukların birçoğuna yüksek plazma glikozu ya da zararlı bir takım glikoz metabolitleri sebep olur. Genel olarak metabolik etkileri ile bilinen DM, merkezi ve periferal sinir sisteminde yapısal ve fonksiyonel hastalıklara neden olur

(Selvarajah ve Tesfaye 2006). Hiperglisemi inme riskini arttırır, serebrovasküler komplikasyonlara yol açar, kan beyin bariyerinin bozulmasına ve beyin ödemi gelişimine katkıda bulunur. Bunun yanı sıra DM'nin bir diğer nörolojik komplikasyonu da kognitif fonksiyon bozuklukları olarak kabul edilmektedir (Saedi ve ark. 2016).

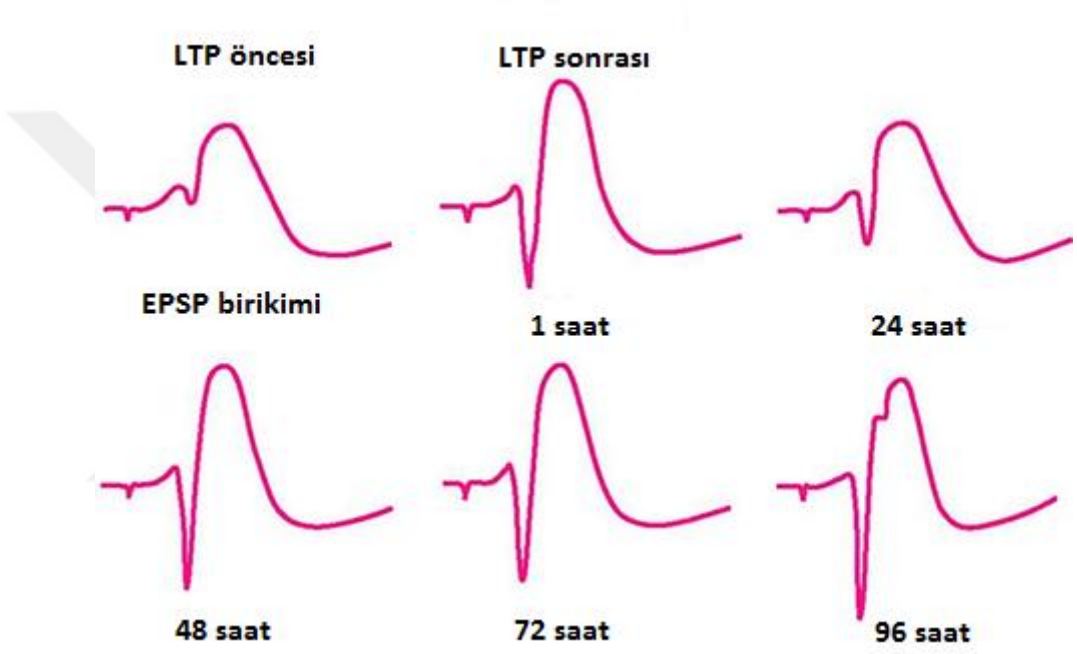
2.2. HİPOKAMPUS, ÖĞRENME VE BELLEK

Öğrenme; uyarılma, dikkat, motivasyon, uyku döngüsü ve önceden bir deneyim öyküsü gibi bazı durumlara bağlı olarak deneyimlerle davranışın değiştirilmesidir. Bellek ise sinir sisteminin, deneyimleri ve öğrenilenleri unutmama kapasitesidir. Öğrenme ve bellek, beyinde korteksin birçok bölümü, talamus, limbik sistem ve beyin sapındaki retiküler yapının eşzamanlı uyarılması sonucu gerçekleşen kompleks bir davranıştır. Limbik sistem, talamus ve retiküler yapının; haz, hoşnutsuzluk, ağrı ve huzur gibi düşüncenin genel doğasını belirleyen nitelemeleri kazandırdığı, duyuların kaba modaliteleri, bedenin kaba konumlanması ve diğer genel özellikleri oluşturduğu düşünülür. Limbik sisteme ait yapılardan amigdala, korku ve korku belleğini kontrol eden merkez olarak tanımlanırken, hipokampusta kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüştürülmesinden sorumlu merkezdir (Widmaier ve ark. 2010 pp. 269-270).

Bellek işlenmesi; bilgiyi kodlama, bilginin sağlamlaştırılması ve bilgiyi geri alma süreci olmak üzere üç süreci kapsar. Kodlama esnasında uyaranla karşılaşmak, yeni bellek izlerinin gelişmesini sağlar. Yeni oluşan bellek yolakları unutulmaya duyarlıdır. Bilgi tekrar edildikçe sağlamlaştırılır ve depolanır. Geri alma sürecinde, depolanan belleğe ulaşılır ve geri çağrılır. Belleğin oluşması ve depolanması LTP (long term potentiation-uzun süreli potensiyasyon) ve LTD (long term depression-uzun süreli baskılanma) mekanizmalarıyla gerçekleşir. LTP; eksitatorik sinapslarda, yüksek frekanslı bir stimülasyona bağlı olarak sinaptik bağlantı gücü ile sayısının uzun süreli artışı olarak tanımlanır (Şekil 1). LTP, hipokampus başta olmak üzere amigdala, korteks ve serebellum gibi beynin bazı bölgelerinde indüklenir. LTD ise presinaptik nöronun kısa süreli ve düşük güçte uyarılmasıyla, inhibitörik sinapslarla sağlanır, eksitatör post sinaptik potansiyeldeki (EPSP) uzun süreli azalma olarak ifade edilir (Ekmekçi 2014 pp. 327-329).

LTP, 1966 yılında sıçan beynindeki hafıza oluşum mekanizmasını açıklayan çalışmasıyla Terje Lømo tarafından tanımlanmıştır (Lomo 1966). Post sinaptik

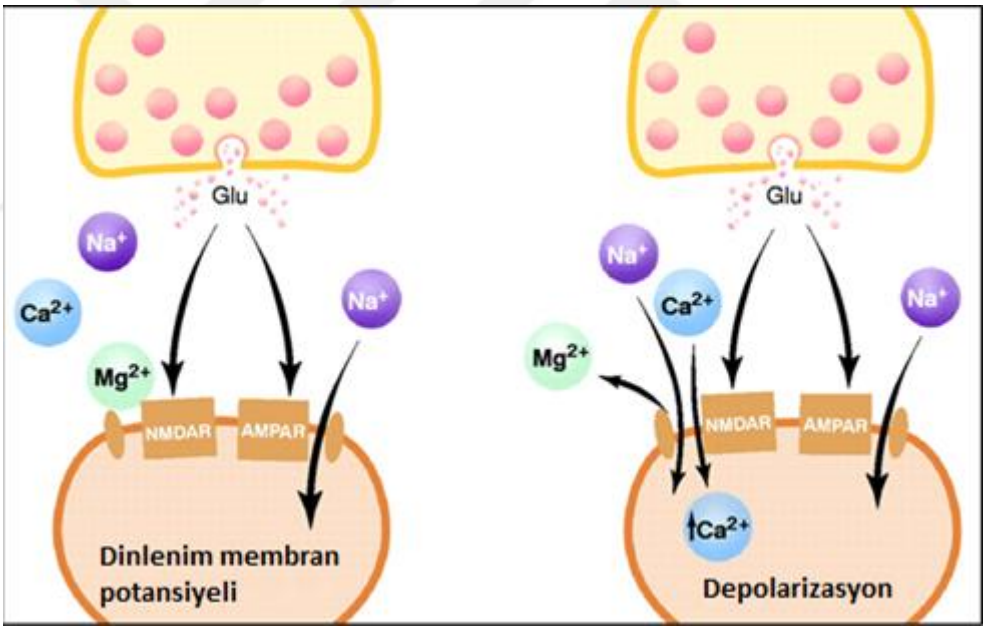
potansiyellerin uzun süreli artışı, dentat girusa giden entorinal korteks projeksiyonlarının yüksek frekanslı nöral ateşleme ile uyarılmasının bir sonucu olarak meydana gelir. Hipokampal formasyon temel girdilerini entorinal korteksten alır. Entorinal korteks, dentat girus içerisinde bulunan Cornu ammonis 1 (CA1) ve Cornu ammonis 2 (CA2) piramidal nöronların uyarılmasından sorumludur (Nicoll 2017). Dentat girusun uyarılması, post sinaptik potansiyellerin oluşumuna neden olur. LTP, öncelikli olarak hipokampusta meydana gelir, fakat aynı zamanda serebral korteksin çeşitli bölgelerinde de ortaya çıkabilir (Cooke ve Bear 2011).



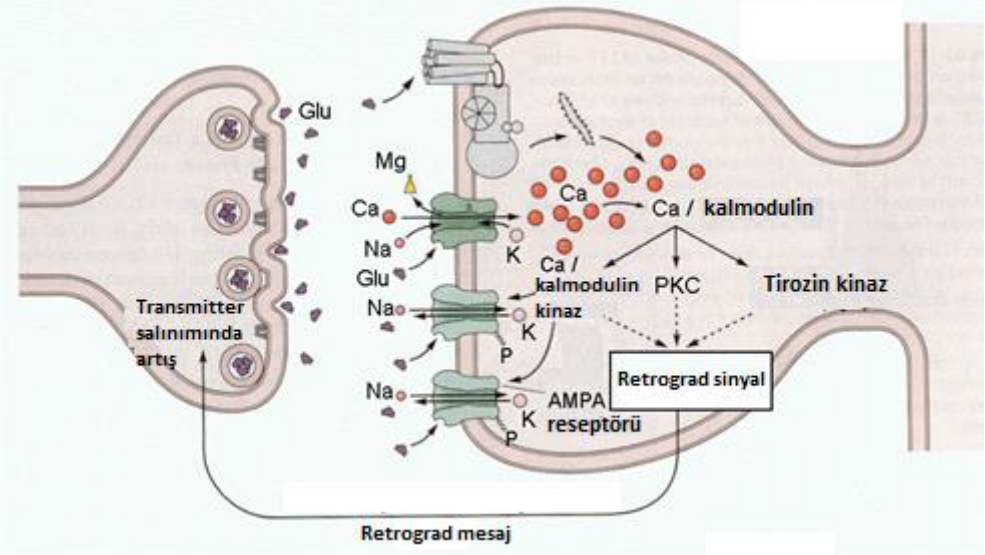
Şekil 1: Uyaranın ardından sinaptik tepkinin gücünde gerçekleşen artış (Hajipour ve ark. 2016).

Merkezi sinir sistemindeki en önemli iki nörotransmiter, sırasıyla uyarıcı ve inhibe edici nörotransmisyonu kontrol eden glutamat ve gama-aminobütirik asittir (GABA). Glutamat, hipokampusta postsinaptik membranda α-amino-3-hidroksi-5-metil-4- izoksazolepropiyonik asit (AMPA) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini aktive eder (Henley ve Wilkinson 2016). NMDA reseptörü, GluN1 ve GluN2 alt birimlerinden oluşur ve glisin, glutamat, poliaminler, magnezyum (Mg^{++}) ve çinko (Zn^{++}) için farklı tipte bağlanma yerine sahiptir. NMDA reseptörü, hem presinaptik hem de postsinaptik hücrelerde eksprese olur. İstirahat potansiyelinde, NMDA reseptörü Mg^{++} ile bloke edilmiştir. Glutamat, NMDA reseptöründeki yerine bağlandığında, Mg^{++} ile Na^{+} yer değiştirir ve konformasyonel değişiklik meydana gelir. AMPA reseptörünün

aktivasyonuyla nörona sodyum (Na^+) girer ve depolarizasyon meydana gelir. NMDA reseptörü kalsiyum iyonuna (Ca^{++}) geçirgen bir iyon kanalı haline gelir. Postsinaptik nörona hem Ca^{++} hem de Na^+ girişi olur (Şekil 2). Net kalsiyum geçişi hücre içinedir. Glisin, NMDA reseptörünün ko-agonistidir ve kalsiyum akışının arttırılmasından sorumludur. Kalsiyumun hücreye akışı, Ca^{++}/kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMK-II) ve diğer kalsiyum bağımlı protein kinazları aktive eder (Zalcman ve ark. 2018). Protein kinazların aktivasyonu ile adenilat siklaz aktivasyonu gerçekleşir ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) artışına yol açar. Presinaptik nöronda cAMP'ın artması, NMDA ile ilişkili protein sentezini indükler. Presinaptik ve postsinaptik nöronlardaki ilave NMDA reseptörleri LTP'nin kolayca oluşmasına neden olur (Şekil 3). LTD ise bir diğer glutamat reseptörü olan AMPA reseptörü ile yakın ilişkilidir. Ancak LTP'nin aksine, presinaptik ve postsinaptik membrandaki AMPA reseptör yoğunluğunun azalması durumu LTD ile ilişkilidir (Chater ve Goda 2014).



Şekil 2: NMDA ve AMPA reseptörlerinin modeli, (Malenka ve ark 1999).



Şekil 3: Uzun süreli potensiasyonun moleküler mekanizması (Malenka ve ark. 1999).

Nörotrofinler nöral plastisite açısından önem taşıyan hücre içi faktörlerdir. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ilk defa Barde ve ark. (1982) tarafından memeli beyninden saflaştırılmıştır ve sinir büyüme faktöründen sonra (NGF) nörotrofin ailesinin ikinci üyesi olarak kabul edilmiştir. Nörotrofinler, omurgalıların sinir sisteminin gelişimi için gereklidir. Nörotrofinler arasında, BDNF ve ana reseptörü tropomiyozin reseptör kinaz B (TrkB), gelişen ve yetişkin memeli beyninde en fazla ve yaygın ekspresyona sahiptir (Murer ve ark. 2001). BDNF presinaptik ve postsinaptik bölgelerdeki sinaptik iletimi etkiler. Sinapsın TrkB ve ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) aracılı fosforilasyonu yoluyla presinaptik glutamat ve GABA salınımını indükleyebilir (Jovanovic ve ark. 2004). Ayrıca glutamaterjik NMDA reseptörleri ve inhibe edici GABA reseptörlerinin aktivasyon kinetiğini değiştirerek uyarıcı ve inhibe edici postainaptik iletimi hızlı bir şekilde modüle eder. Yapılan bazı çalışmalarda BDNF'nin öğrenme ve hafızada, nörogenez, sinaptik plastisite, ve sinaptik morfogenezde kilit bir düzenleyici olduğu gösterilmiştir (Autry ve Monteggia 2012). Beyin korteksi ve hipokampus gelişim sürecinde nöral kök hücrelerin nöronlara farklılaşmasını uyararak yeni nesil nöronların canlılığını teşvik eder. LTP üzerindeki etkisi cAMP elementi bağlayıcı protein (CREB) tarafından düzenlenir ve CREB ise LTP ve hafıza oluşumunda yer alan genlerin ekspresyonunu düzenler. Ayrıca gelişim süresince nöron ölümlerinin önlenmesinde de önemli rol oynar ve erişkin beyninde iskemi ve travma gibi stresli olaylar süresince nöron sağ kalımını destekler (Karpova 2014).

BDNF'nin öğrenme ve hafızadaki rolü in vivo kemirgen modellerinde yapılan araştırmalarla belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, sıçan hipokampusunda BDNF mRNA ekspresyonunun, Morris su labirenti testi ve pasif sakınma testinden sonra arttığı bulunmuştur (Schaaf ve ark. 1999). Bu nedenle sürekli olarak BDNF aktivitesinin düzenlenmesinin *in vivo* hipokampal öğrenmenin bir korelasyonu olduğunu gösterir. İlginç bir şekilde, BDNF proteininin ekspresyonu, bilişsel fonksiyonlardan sorumlu tüm anahtar beyin alanları olan hipokampus, neokorteks, serebellum, striatum ve amigdalada oldukça yüksektir (Kawamoto ve ark. 1996). Ayrıca, Cirulli ve ark. (2004) yapmış oldukları bir çalışmada hipokampusa BDNF uygulanması, Morris su labirenti testinde performans artışına neden olurken, yapılan bir diğer çalışmada anti-BDNF antikorlarının uygulanması Morris su labirenti ve pasif sakınma testlerinde zayıflamaya neden olmuştur (Alonso ve ark. 2002). Kafitz ve ark. (1999) düşük BDNF konsantrasyonlarının hipokampal, kortikal ve serebellar nöronların birkaç milisaniye içinde membran depolarizasyonuna neden olduğunu ve bir aksiyon potansiyelinin ortaya çıkmasına neden olduğunu göstermiştir.

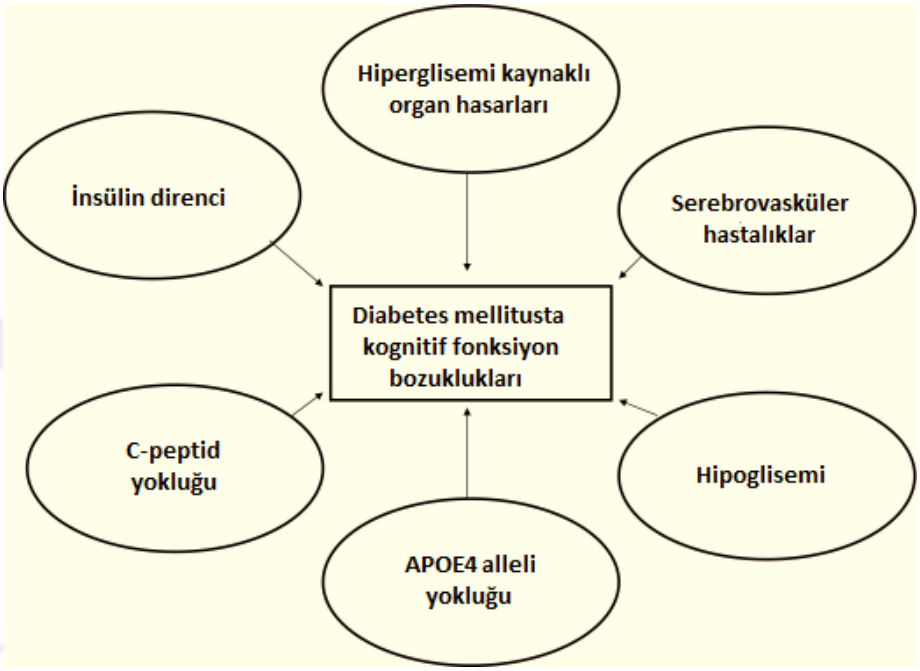
2.3. DİABETES MELLİTUS VE KOGNİTİF FONKSİYON BOZUKLUKLARI

Bilinen birçok komplikasyonunun yanı sıra hiperglisemi ve kontrol altına alınamayan hipoglisemi ataklarının DM'li bireylerde kognitif fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir. Diabetes mellituslu hastalarda kognitif fonksiyon bozukluğu ilk olarak 1922'de tanımlanmıştır (Miles ve Root 1922). O zamandan beri, diyabette bilişsel işlev bozukluğunun kapsamını ve büyüklüğünü daha iyi tanımlamak için tasarlanmış birçok çalışma yapılmıştır. T1DM'li hastalarda tanımlanan en yaygın kognitif bozukluklar, bilgi işlem hızının yavaşlaması ve psikomotor verimliliğin kötüleşmesidir (Brands ve ark. 2005). Ancak, motor beceri, kelime bilgisi, genel zekâ, problem çözme becerisi, dikkat, somatosensoriyal güçlük, hafıza ve yürütme işlevi gibi bir takım bozukluklar da kaydedilmiştir (Weinger ve ark. 2008). Glisemik kontrolün, T1DM'li hastalarda kognitif fonksiyonlarda rol oynadığı bilinmektedir. Daha iyi bir glisemik kontrol ile psikomotor verimlilik, motor beceri, dikkat, sözel IQ skorları, hafıza ve akademik başarı gibi işlevler geliştirilebilmektedir (Perantie ve ark. 2008). T1DM ve T2DM'li hastalarda, hiperglisemi esnasında bilişsel işlevlerin yavaşlaması, engelleme ve odak kaybı, bilgi işlem hızının düşmesi, dikkatin azalması ve çalışma belleği bozukluğu gibi komplikasyonlar görülmektedir (Sommerfield ve ark. 2004).

Brands ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, T1DM'li bireylerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında genel kognisyon, kristalize ve akışkan zeka, bilgi işlem hızı, psikomotor etkinlik, görsel ve sürekli dikkat, zihinsel esneklik ve görsel algı gibi becerilerde önemli ölçüde azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Kognitif fonksiyonların ileri düzeyde bozulmasının, diyabet komplikasyonlarının artması ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Dahası, diğer diyabet komplikasyonları da olan T1DM'li hastalarda bilişsel işlevin daha kötü olabileceğini ileri sürmüştür. Bununla birlikte, diğer çalışmalarda bozulmuş kognitif fonksiyonlar ve diyabetik komplikasyonlar arasındaki ilişki saptanamamıştır. Çocuklarla yapılan kapsamlı bir çalışmada, T1DM'li çocuklardaki kognitif fonksiyon bozuklukları DM tanısıdan 2 yıl sonra saptanmış ve bu hastalarda genel zekâ, kelime bilgisi, blok tasarımı, işlem hızı ve öğrenmede kontrollere kıyasla daha az gelişim görülmüştür. Tanıdan altı yıl sonra, aynı deneklerde IQ, dikkat, işlem hızı, uzun süreli bellek ve yürütme işlevi gibi becerilerin kontrollere kıyasla daha fazla bozulduğu tespit edilmiştir (Northam ve ark. 2001). Buna ek olarak bir takım çalışmalarda, T1DM'li hastalarda hasta cinsiyetinin nörobilişsel işlevi etkilediğini göstermiştir. Skenazy ve Bigler (1984), T1DM'li erkeklerde, dişilere kıyasla kuvvet kavraması, somatosensör testi ile salınım testinde düşük performans sergilediğini ileri sürmüştür.

Diyabetli hastalarda kognitif fonksiyon bozukluğunun altında yatan patofizyoloji tam olarak aydınlatılamamış olsa da, kognisyon bozukluğunda serebrovasküler ve nörodejeneratif değişikliklerin birlikte rolü olduğu düşünülmektedir. DM'li bireylerde, hafıza ve bellekten sorumlu olan hipokampus bölgesinden nörotransmitter salınımı ve nörotransmitterlerin uygun reseptörlerine bağlanması ile ilgili bir takım bozuklukların nöronlarda apoptoza yol açarak kognisyonu bozduğu, çeşitli çalışmalarda ileri sürülmüştür (Skenazy ve Bigler 1984; Anders ve ark. 2005; Sadeghi ve ark. 2016). Diyabetli hayvanların beyinlerinde azalmış asetilkolin, serotonin, dopamin ve norepinefrin gibi bir takım nörokimyasal değişiklikler gözlenmiştir. İlginç bir şekilde, bu değişikliklerin hepsi insülin ile tersine dönmüştür. Dahası, kontrol altında tutlamayan DM'li hastalarda görülen yüksek ve düşük glikoz düzeylerinin nörotransmitter fonksiyonunu kötüleştirdiği ileri sürülmüştür (Yamato ve ark. 2004). Buna ek olarak yapılan bazı çalışmalarda, bozulan glikoz metabolizması sebebi ile glikoz metabolitlerinin beyinde toksik bir etkiye sebep olabileceği ve serebrovasküler lezyonlara yol açarak kognitif fonksiyon bozukluğuna neden olabileceği, aynı zamanda sinaptik

plastisitede patolojilere neden olduğu ileri sürülmüştür (Kawamura ve ark. 2012). Ayrıca beyin kanlanması, insülin uyarılarının beyinde dağılımı, insülin direnci, glikoz toksistesi, oksidatif stres, protein glikasyon metabolizması ürünlerinin birikimi, hipoglisemik ataklar ve amiloid metabolizması değişikliklerinin etkisi olduğu da bazı kaynaklarca ileri sürülmektedir (Kodl ve Seaquist 2008) (Şekil 4).



Şekil 4: T2DM'li hastalarda kognitif fonksiyon bozukluğu ile ilişkili patofizyolojik faktörlerin şematik gösterimi (DeAguiar ve ark. 2015).

Hem T1DM'li hem de T2DM'li hastalarda hipergliseminin bilişsel işlevlerdeki anormalliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, hipergliseminin bu etkiyi gerçekleştirebileceği mekanizmalar azdır. Diğer organlarda hiperglisemi, poliol yolağı aktivasyonu, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) artmış oluşumu, protein kinaz C'nin (PKC) diaçilgliserol aktivasyonu ve heksozamin yolunda artmış glikoz şantı dahil çeşitli mekanizmaları değiştirdiği ileri sürülmüştür (Muriach ve ark. 2014). Aynı mekanizmalar beyinde aktif olabilir ve diyabetli hastalarda tespit edilen bilişsel işlevlerdeki değişiklikleri tetikleyebilir. Ramakrishnan ve ark. (2004), diyabette bilişsel işlev bozukluğunun gelişiminde artmış glikoz şantının ve PKC ile diaçilgliserol aktivasyonunun rolünü araştırmışlardır. Çalışmada, beyindeki PKC ekspresyonunun, tedavi edilmemiş diyabetik sıçan modelinde, tedavi edilen diyabetik sıçan ve kontrol sıçanlara oranla önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Diyabet kaynaklı hipergliseminin,

glikozu kitin üretimine doğru hareket ettirdiği ve bu molekülün birikmesinin, kognitif fonksiyonlarda gelişen bozukluklara katkıda bulunmuş olabileceği ileri sürülmüştür.

Streptozotosin (STZ) deneysel diyabet oluşturmak için en sık kullanılan ajanlardan biridir. 2-Deoksi-2-(3-Metil-3-Nitrozoüreido)-D-Glukopiranoz yapısındadır. Streptomyces griseus'un metaboliti olan STZ'nin yapısı glikoza çok benzediği için glikoz taşıyıcısı 2 (GLUT2) aracılıklı olarak pankreas beta adasına alınır ve deoksiribonükleik asitte alkillenme oluşturarak hücre ölümüne yol açar (Furman 2015). Bunun yanı sıra, STZ yalnızca pankreas beta hücrelerinde değil aynı zamanda, hipotalamik ve hipokampal nöronlarda da sitotoksiktir. Hipokampal ve hipotalamik nöronlardaki sitotoksisitesini oksidatif stresi indükleyerek gerçekleştirmektedir (Bathina ve ark. 2017). Sıçanlarda STZ ile oluşturulan diyabet modelinde periferal ve merkezi sinir sistemi liflerinde bir takım anormalliklerin meydana geldiği ve kognitif fonksiyon bozukluğuna yol açtığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Moheet ve ark. 2016; Palleria ve ark. 2017). Mayer ve ark. (1990), STZ ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda pasif sakınma testinde gecikme sürelerinin aşamalı olarak arttığını, ancak pasif sakınma yanıtının tümüyle engellenmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca Morris su labirenti gibi daha kompleks öğrenme modellerinde ise, diyabetik sıçanların sürekli olarak performans kaybı sergilediği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Popoviç ve ark. 2001; McCrimmon ve ark. 2012, Lin ve ark. 2018).

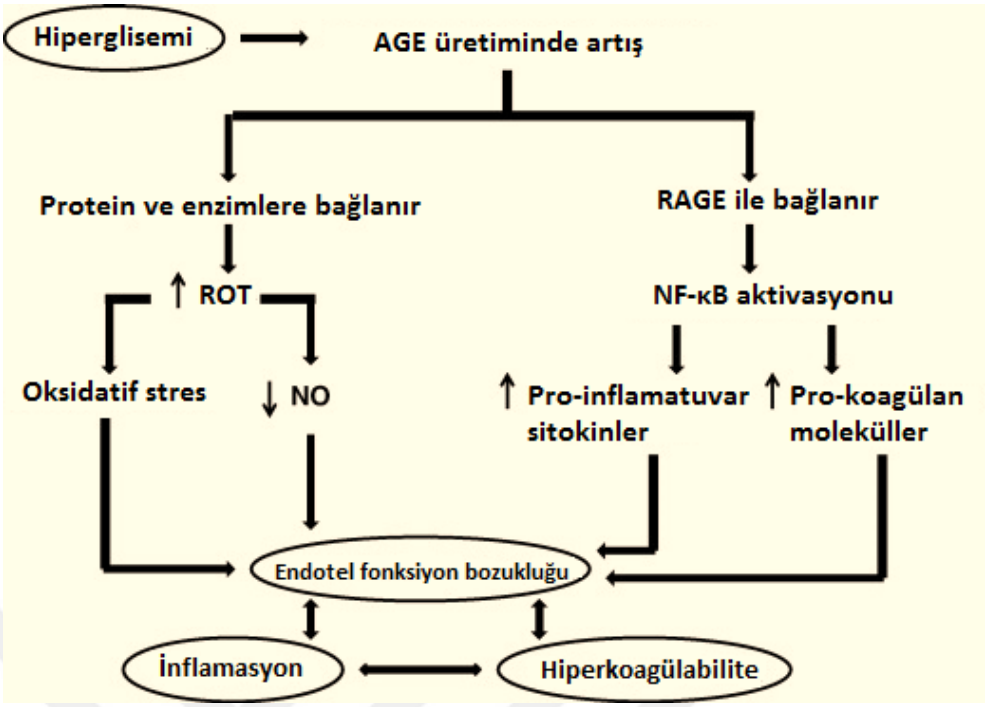
2.4. DİABETES MELLİTUS VE OKSİDATİF STRES

Diabetes mellitus, kronik metabolik bozukluk olarak tanımlandığı gibi aynı zamanda artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabete bağlı komplikasyonların gelişiminde oksidatif stresin katkısı çok büyüktür. Diyabetli hastalarda hiperglisemi, serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma sisteminin yeterliliği arasındaki dengeyi bozarak reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimini uyararak oksidatif strese, hücre fonksiyon kaybına ve sonuç olarak apoptoz ya da nekroza neden olur (Ugochukwu ve Cobourne 2003). Serbest radikaller; lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere ve gen mutasyonlarına yol açar. Diabetes mellitusta yüksek glikoz metabolizması süperoksit radikalinin mitokondrideki üretimini artırır ve hidroksil radikali ile hidrojen peroksite dönüşmesine neden olur (West 2000). Ayrıca mitokondri iç membranını bozan proteinlerin salınım ve aktivitesindeki artış, süperoksit oluşumunun artışına da sebep olur.

Diabetes mellitusta serbest radikal oluşumunun başlıca kaynağı nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazdır. NADPH oksidaz bağımlı serbest radikallerin fazla üretimi hiperglisemi aracılı oksidatif stresi artırır. Bunun da ratlarda diyabetik nefropatiye neden olduğu görülmüştür (Zhang ve ark. 2017).

Serbest radikallerin oluşumu ile hücreden uzaklaştırılması arasındaki denge çok önemlidir. Organizma serbest radikalleri uzaklaştırmak için enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemini devreye sokar (Cherubini ve ark. 2005). Sağlıklı bireylerde serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki denge, diabetes melitusta serbest radikaller lehine bozulmuştur. Bu da diyabetin komplikasyonlarının oluşumuna sebep olur. Yapılan çalışmalarda hem T1DM hem de T2DM'de reaktif oksijen türlerinde artış olduğu gösterilmiştir (Volpe ve ark. 2018).

Diabetes mellitusta oksidatif stres gelişimi glikoz otooksidaysonu, redükte glutatyon ve hücresel endojen antioksidan savunma enzimlerinin yetersiz aktivite göstermesi ile doğrudan ilişkilidir (Haskins ve ark. 2003). Glikoz toksisitesi ile oksidatif stres ve glikolizasyon son ürünleri birikimine bağlı vasküler hasar gelişimi ile beyinde nörodejenerasyon gözlemlenir (Chrissobolis ve ark. 2011). Hipergliseminin reaktif oksijen türleri oluşumunda etkili olduğu, özellikle de süperoksitin artmasıyla artmış organ hasarına neden olduğu ileri sürülmüştür. Bu da daha sonra poliol yolağı aktivasyonunun artmasına, AGE'lerin oluşumunun artmasına, PKC'nin aktivasyonuna ve heksozamin yolunda artmış glikoz şantına neden olarak kognitif fonksiyonlarda hasara neden olabilir (Şekil 5). Aragno ve ark. (2005), STZ ile diyabet modeli oluşturduğu sıçanların beyinlerinde ileri glikasyon son ürün reseptörlerinin (RAGE), galektin-3'ün (proatrojenik bir molekül) ve poliol yolağı aktivasyonunun arttığını, süperoksit seviyelerinin ise glikolitik enzim gliserasit-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır.



Şekil 5: Hipergliseminin aldoz redüktaz yolağının aktivasyonu ile vasküler komplikasyonları arttırdığı mekanizma, (Domingueti ve ark. 2016).

2.5. RENİN–ANGİOTENSİN SİSTEMİ VE BEYİN

Renin angiotensin sistemi (RAS) araştırmaları, 1898'de renin keşfine dayanan uzun bir geçmişe sahiptir (Tigerstedt ve Bergman 1898). Geçtiğimiz 120 yılda, bu güçlü sistemin angiotensinojen, angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) izoformları, angiotensin peptidleri ve bunların reseptörleri dahil diğer bileşenleri keşfedilmiş ve bu sistemi birçok seviyede modüle eden farmakolojik ajanlar geliştirilmiştir (Igić ve Škrbić 2014). Bu karmaşık sistem su ve elektrolit dengesi, sistemik vasküler direnç, kan basıncı ve kardiyovasküler homeostazın düzenlenmesinde önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bununla birlikte RAS'ın kronik aktivasyonu, hipertansiyon, böbrek hastalığı ve kalp yetmezliği arasında değişen birçok patolojik duruma yol açan oksidatif strese, endotel fonksiyon bozukluğuna ve inflamasyona neden olabilir (Mentz ve ark. 2013). Burdan yola çıkarak, ACE inhibitörleri ve angiotensin II tip 1 reseptör blokerleri (ARB'ler) birçok klinik araştırmada kullanılmıştır. Elde edilen son verilere göre bu sistemin inhibe edilmesinin yaşlanma, Alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı, vasküler bilişsel bozukluk ve inme onrası bilişsel bozukluk sırasında gözlenen kognitif bozuklukları azaltmada faydalı olabileceğini göstermektedir (Fouda ve ark. 2016; Hamel ve ark. 2016).

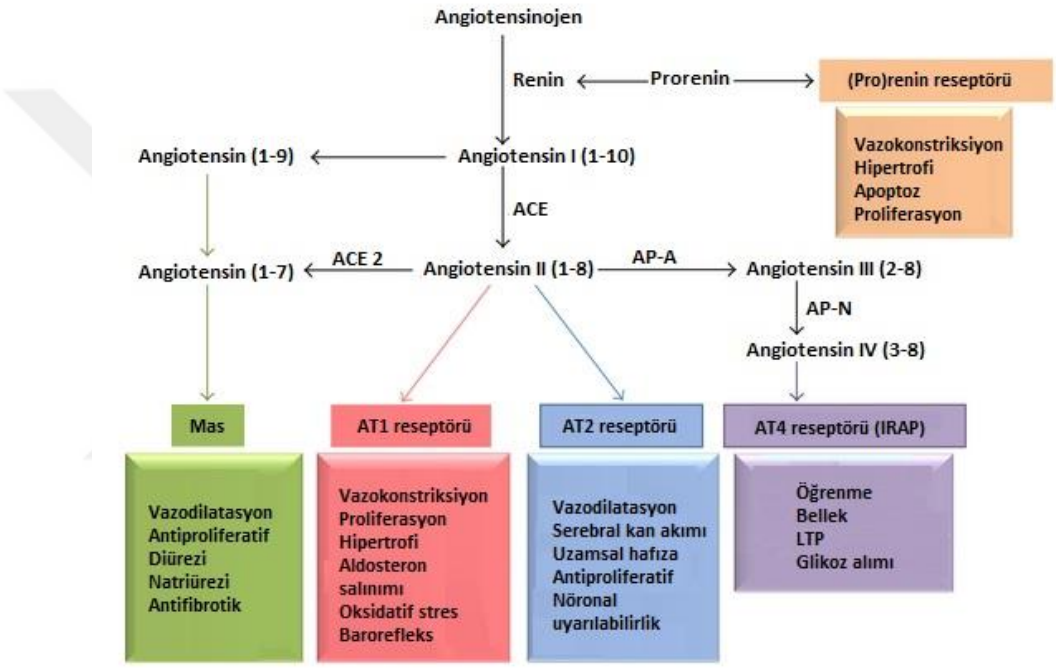
RAS, başlangıçta endokrin bir sistem olarak kabul edilirken, sonraki araştırmalar "klasik" sistemik RAS'a ek olarak, beyin de dahil olmak üzere birçok dokuda "yerel" bir RAS olduğunu ortaya çıkardı. Bu sistemde angiotensin II (Ang II) en çok üzerinde durulan vazoaktif madde olmaya devam etmektedir. Vasküler ve böbrek hareketlerine ek olarak, Ang II hücresel düzeyde hücre sağkalımını, farklılaşmasını ve hatta inflamasyonunu etkileyen doğrudan etkilere sahiptir (Jackson ve ark. 2018).

Beyin içinde, periferik ve merkezi angiotensinerjik yollar vardır. Ana periferik yol, üçüncü ve dördüncü ventrikülleri çevreleyen ve RAS bileşenlerinin periferik erişimine izin vermek için delikli kapillerlerden oluşan çevresel organları birleştiren ön beyin yoludur (Wright ve Harding 2013). Ön beyin yolu üzerindeki yapılar periferik RAS bileşenlerine erişime sahip olsa da, beyin bölgelerinin çoğunun erişimi yoktur. Diğer organlardaki yerel RAS üretiminden farklı olarak, kan-beyin bariyeri (KBB), periferik RAS bileşenlerinin beyin bölgelerinin çoğuna erişmesini kısıtlayarak beyin RAS'ının yerel sentezini zorunlu kılar. Merkezi angiotensinerjik yolak hipotalamus ve medulla ile bağlantılıdır ve lokal sentezlenen angiotensinin temel kaynağıdır. Ayrıca RAS bileşenleri diğer çeşitli beyin bölgelerinde de sentezlenir. Hem periferik hem de merkezi RAS üretimi, kardiyovasküler homeostaza önemli derecede katkıda bulunur (Bodiga ve Bodiga 2013).

Merkezi sinir sisteminde (MSS), angiotensinojenin % 90'ından fazlası astrositler içinde üretilir ve çeşitli nöroaktif peptitlere dönüşüm için yapıcı şekilde salgılanır. Nöroaktif peptitler, reseptör sinyal mekanizmasını indüklemek için çeşitli hücre tiplerinde konik reseptörlerine bağlanabilir. Dört ana nöroaktif angiotensin peptidi vardır: Ang II, Angiotensin IV (Ang IV), Angiotensin-(1-7) (Ang (1-7)) ve Alamandin (Jackson ve ark. 2018).

Angiotensinojen, angiotensin için öncü peptittir. Angiotensinojen, Ang II üretmek için renin ile angiotensin I'e (Ang I) bölünür, daha sonra Ang I ACE ile Ang II'ye dönüştürülür. Ang II ana angiotensin efektör peptididir ve iki ana reseptörü olan angiotensin tip 1 (AT1R) ve angiotensin tip 2 (AT2R) reseptörlerine bağlanır. Ang II daha sonra aminopeptidazlar ile angiotensin III (Ang III) ve Ang IV'e dönüştürülebilir. Ang III, AT1R'leri Ang II'den daha düşük bir afinitede ve AT2R'leri Ang II'den daha yüksek bir afinitede bağlar. Ang IV, Angiotensin tip 4 reseptörlerini (AT4R) bağlar ve yüksek konsantrasyonlarda AT1R'leri de bağlayabilir (Fountain ve Lappin 2019). AT1R'ler

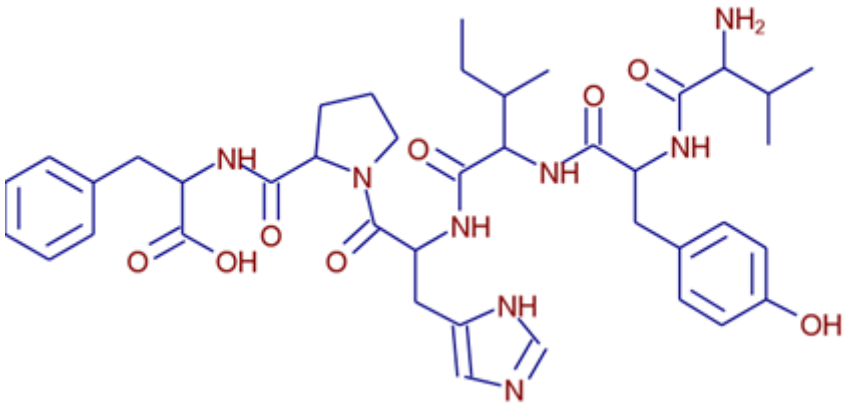
nöronlar, astrositler, oligodendrositler ve korteks, hipokampus ve bazal ganglionların mikrogliaları üzerinde bulunan G-proteini ile ilişkili reseptörlerdir. Buna ek olarak AT2R'ler ve Mas reseptörleri (MasR) de korteksin, hipokampusun ve bazal ganglionların nöronları, astrositleri ve mikrogliaları üzerinde bulunan G-proteini ile ilişkili reseptörlerdir (Kaschina ve Unger 2003). AT4R'ler ise diğer reseptör tiplerinden farklı olarak G proteini ile ilişkili olmayıp, insülinle düzenlenmiş aminopeptidaz (IRAP) özelliği gösterirler. Diğer reseptörlerin aksine, AT4R'ler nöronlarla sınırlandırılır (Chai ve ark. 2004) (Şekil 6).



Şekil 6: Renin-angiotensin sistemi (Guimond ve Galle-Payet 2012).

2.6. ANGİOTENSIN IV

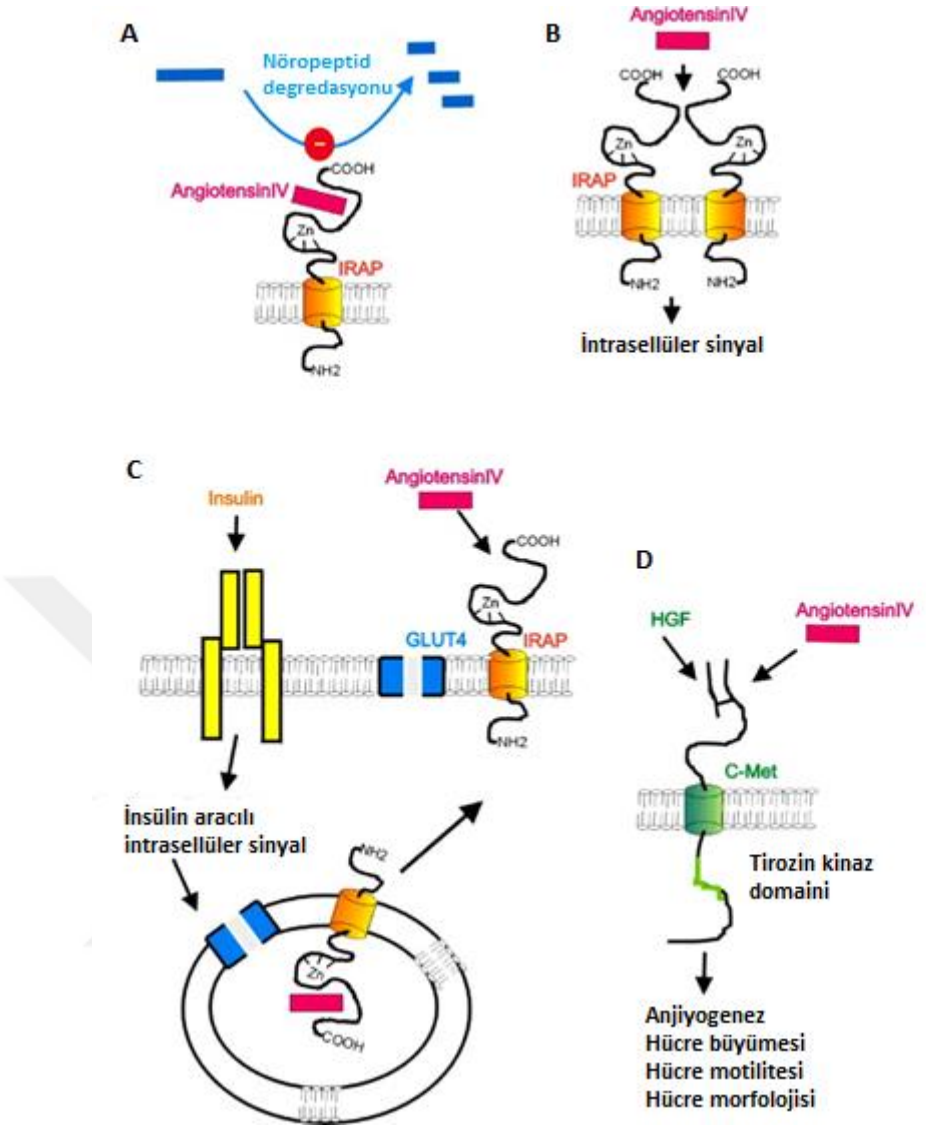
Ang IV, Ang II'nin parçalanmasından oluşan endojen bir peptittir (Şekil 7). Ana peptidinin aksine, Ang IV ve analoglarının etkilerine Ang II reseptörlerinden herhangi biri, tip 1 veya tip 2 reseptörü aracılık etmez. Biyolojik etkileri klasik AT1R ve AT2R antagonistleri losartan ve PD123177 tarafından engellenmez. Bu bulgular, Ang IV'ün faydalı etkilerinin AT4R olarak adlandırılan farklı bir reseptör tarafından yönetildiğini göstermektedir (De Gasparo ve ark. 2000).



Şekil 7: Angiotensin IV'ün kimyasal yapısı (Chai ve ark. 2008).

Angiotensin AT4 reseptörü ilk olarak heksoepeptit Ang IV için spesifik, yüksek afiniteli bağlanma bölgesi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, peptid LVV-hemorfin 7'nin (LVV-H7) (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Glu-Arg-Phe) de AT4 reseptörünün biyoaktif bir ligandı olduğu gösterilmiştir. Ang IV, analogları veya LVV-hemorfin 7'nin merkezi sinir sistemine uygulanması, normal kemirgenlerde öğrenme ve belleği belirgin bir şekilde arttırır ve amnezi modellerinde gözlenen bellek bozukluklarını tersine çevirir (Jackson ve ark. 2018).

AT4 reseptörü vücutta geniş bir dağılıma sahiptir ve ağırlıklı olarak beyin, kalp, böbrek, adrenal bez ve kan damarlarındaki farklı alanlarda yoğunlaşmışlardır. Ang IV bağlanma alanı üzerinde yapılan histo-otoradyografik haritalama çalışmaları, beyindeki bağlanma oranının daha yüksek olduğunu göstermiş ve daha sonra bu durum kognitif duyusal ve motor fonksiyonların düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Royea ve ark. 2017). AT4R aktivasyonu kognisyon, hücre sinyal iletimi ile sinaptik iletiyi arttırır, ayrıca antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. AT4R yakın zamanda GLUT4 ile birlikte nörosekretuvar veziküllerde bulunan IRAP olarak tanımlanmıştır. IRAP, çoğunlukla insüline cevap veren hücrelerde GLUT4 keseciklerinde bulunur (Albiston ve ark. 2003) (Şekil 8).



Şekil 8: Ang IV ve AT4 ligandlarının etkilerine aracılık ettiği olası mekanizmaların gösterimi. (Vanderheyden 2009).

AT4 ligandlarının normal kemirgenlerde belleği güçlendirmeye yönelik çarpıcı etkileri göz önüne alındığında, amnezi hayvan modellerinde bellek bozukluklarının tersine çevrilmesinde AT4 ligandlarının glikoz alımını etkileyip etkilemediğinin belirlenmesi önemlidir. Kognitif fonksiyonlar, özellikle hipokampuste artmış glikoz kullanımı ile ilişkilidir. Beyinde bulunan baskın glikoz taşıyıcısı formları;

1) Endotelyal ve glial hücrelerde bulunan ve kan dolaşımından beyine glikoz alımının kolaylaştırılmasından sorumlu olduğu düşünülen GLUT1,

2) Nöronların plazma membranında yapısal olarak ifade edilen GLUT3 ve

3) Mikroglialarda bulunan GLUT5'tir.

Bunların yanı sıra insüline yanıt veren bir glikoz taşıyıcısı olan GLUT4 de beyindeki nöronlarda saptanmıştır. AT4R aktivasyonu sonucu, reseptör ve GLUT4 hücre yüzeyine yer değiştirir. AT4R sinyali dört mekanizmadan biriyle çalışır. İlk olarak, AT4R'ye Ang IV bağlanması, nöronal glikoz alımını arttırır ve öğrenme ve hafızaya dahil olan Ang III, oksitosin, vasopressin, me-ensefalin gibi diğer nöroaktif peptitlerin metabolizmasını önlemek için IRAP'ı rekabetçi bir şekilde inhibe eder (El Messari ve ark. 2002). Ang III, AT4R sinyal mekanizmasının etkinleşmesi için negatif feed back mekanizması başlatan, Ang IV'ün öncü molekülüdür. Bu denge bozulduğunda ve Ang IV aşırı ifade edildiğinde AT1R'leri bağlar ve aktive eder. IRAP'ın tek başına bloke edilmesinin, öğrenme ve bellek üzerinde AT4R sinyalleriyle aynı etkileri sağlayamaması gerçeği, IRAP inhibisyonu dışında, ek mekanizmaların bulunduğuna işaret eder. İkincisi, Ang IV, AT2R ve MasR'lere benzer bir şekilde süperoksit üretimini modüle etmek için hücre içi Ca^{++} miktarını arttırarak nitrik oksit sentazı (NOS) arttırır. Üçüncüsü, Ang IV, voltaj bağımlı L tipi kalsiyum kanalı aktivasyonu ile hücre içi Ca^{++} seviyesini arttırır, bu da sinaptik transmisyonun ve LTP'nin artışına neden olarak postsinaptik modülasyonlara yol açar. Son olarak Ang IV, glikozun etkilerine benzer şekilde, asetilkolin sentezini ve salınımını arttırır (Davis ve ark 2006).

AT4R'ler ve kolinerjik nöronlar korteks ve hipokampusta birbirleriyle yakın ilişkilidir ve kognitif fonksiyonlar üzerinde temel bir role sahiptirler. Kemirgenlerde, hipokampustaki AT4R sinyal mekanizması asetilkolin ve glutamat salınımını aktive eder. AT4R sinyali ayrıca spinogenezi, LTP'yi ve bazal ganglionlarda dopamin salınımını uyarır. Disfonksiyonel AT4R sinyalizasyonu, potansiyel olarak 2 mekanizma vasıtasıyla AT1R aracılı nitrojen türevleri (NOx) aktivasyonuna ve ROT üretimine neden olabilir: İlk mekanzima, Ang IV aşırı eksprese edildiğinde gelişmiş AT1R stimülasyonu yoluyla ROT üretimi; ikinci mekanizma ise Ang IV/AT4R sinyalleri azaltıldığında azalmış nitrik oksit sentaz yoluyla ROT üretimidir. Dengeli Ang IV, NOS aracılı faydalarını daha da arttırmak için en yüksek afiniteye sahip AT2R'lere bağlanan Ang III'ün artmasına yol açabilir. Düzensiz AT4R sinyalleri azalmış Ang III/AT2R sinyallerine ve biliş için faydalı olan diğer nöroaktif maddelere neden olabilir. Son olarak, işlevsiz AT4R sinyalizasyonu, bozulmuş bilişe yol açabilen, bozulmuş nörotransmiter salınımına ve sinaptik işlev bozukluğuna yol açabilir (Jackson ve ark 2018).

Chai ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada beyinde, özellikle hipokampusta, GLUT4'ün IRAP'ı ifade eden nöronlarda bulunduğunu göstermişlerdir. Bu nöronlarda aynı hücre içi kompartmanlarda IRAP ve GLUT4 dağılımı arasında yüksek bir örtüşme derecesi vardır. Analog bir GLUT4 vezikül popülasyonunun varlığı, hücre içinde bazal durumun geri dönüşümünde ve nöronlara glikoz alımını kolaylaştırmak için plazma membranına translokasyonu uyardığında ortaya çıkarır.

Angiotensin IV ve diğer AT4 reseptör ligandlarının en önemli ve tekrarlanabilir etkisi, bir dizi davranışsal paradigmada ortaya konan öğrenme ve belleğin kolaylaştırılmasıdır. Ang IV'ün aktivasyonu, beyin hasarı hayvan modellerinde gözlenen nöroprotektif etkilerle bağlantılı olmuştur. Örneğin, hekzapeptid Ang IV ve bunun çeşitli analoglarının, epileptik hayvan modellerinde antikonvülzan etki gösterdiği (Stragier ve ark. 2006), beyin iskemisine karşı koruduğu (Faure ve ark. 2006), aterosklerotik hayvan modellerinde endotel fonksiyonunu geliştirdiği (Vinh ve ark. 2007) ve *in vitro* ve *in vivo* LTP'yi arttırdığı bulunmuştur (Kramár ve ark. 2001; Wayner ve ark. 2001). Fidalgo ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada prenatal alkole maruz bırakılan anne karnındaki sıçanları 5 μg/kg subkutan (sc) Ang IV uygulaması ile tedavi etmişlerdir. Uygulama sonucunda alkolün ekzojen Ang IV etkinliğini bozduğu, bunun sonucunda yavru sıçanların öğrenme mekanizmasında bozukluklara yol açtığı sonucuna varmışlardır. Uzamsal öğrenmeyi test eden Morris su labirentinde, 0,1 veya 0,5 nmol/s'lik bir dozda, daha kararlı olan Ang IV analogu, Nle1-Ang IV'ün kronik infüzyonu ile ölçümlerin ilk 2 gününde, hayvanların batık platformu bulmak için geçirdikleri latans süresi ve yüzülen yol mesafesi azalmış olarak bulunmuştur. İlginç bir şekilde, AT4 reseptörü 'antagonisti', divalinal Ang IV'ün (0,5 veya 5 nmol/h) infüzyonunun, performansı önemli ölçüde azalttığı ileri sürülmüştür (Wright ve ark. 1999). AT4 ligandları, normal kemirgenlerde öğrenme ve belleği geliştirmede etkili olmakla kalmaz, bu bileşikler skopolamin tedavisinin veya bilateral perforant yol lezyonlarının yol açtığı bellek bozukluklarını giderebilir (Wright ve ark. 1999). Beyindeki AT4 reseptörlerinin kolinerjik nöronlarla dağılımı arasında ve özellikle de septum, hipokampus ve serebral kortekste projeksiyonları arasında çarpıcı bir pozitif korelasyon vardır. Bu, kolinerjik nörotransmisyonun kuvvetlendirilmesi, kısmen AT4 ligandlarının belleği geliştirdiği mekanizmayı içerebileceğini düşündürmektedir. Alzheimer modeli farelerde yapılan bir başka çalışmada, yaygın kullanılan bir ARB olan losartanın kognitif fonksiyonları geliştirdiği ve serebrovasküler iyileşmeye aracılık ettiği tespit edilmiştir. Çalışmada, AT4R'nin losartanın anti-inflamatuvar etkilerine aracılık

ettiği ve bu etkilerin kan basıncı, amiloidoz ve oksidatif stresdeki değişikliklerden bağımsız olduğu ileri sürülmüştür (Royea ve ark. 2017). De Bundel ve ark. (2010), çalışmalarında AT1 reseptörlerinin Ang IV'ün nöro-kimyasal ve kognitif etkilerine karıştığını, LVV-H7'nin ise IRAP yoluyla etkilerine aracılık ettiğini öne sürmüşlerdir. Paris ve ark. (2013) ise, Ang IV'ün merkezi uygulanmasının, lokomotor etkilerden bağımsız ancak verilen doza bağımlı olarak öğrenme ve bellek performansını artırdığını tespit etmişlerdir.

Bu bilgilerden yola çıkarak, angiotensin IV'ün önemli davranışsal, öğrenme ve belleği de içeren fizyolojik etkileri olduğunun bulunması, DM ile gelişen kognitif bozukluklarda bir rolü olup olmadığı sorusunu ve sonuçta bu molekülün yeni bir tedavi hedefi olabileceğini akıllara getirmiştir. Bu nedenle deneysel diyabet modelinde ekzojen uygulanan Ang IV'ün sistemik etkilerinin yanında diyabet fizyopatolojisine, oksidatif hasara ve zayıflayan kognitif fonksiyonlara olumlu bir etkisinin olup olmadığı araştırılarak, altta yatan mekanizma aydınlatılmaya çalışılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışmada deney hayvanı olarak yetişkin 3 aylık, ağırlıkları 350-400 gr arasında değişen 32 adet erkek *Wistar* albino sıçan kullanıldı. Sıçanların her biri deney öncesinde ve deney süresince, kontrollü çevresel koşullar altında (7:00-19:00 aydınlık/karanlık döngüsü ve 22-24°C), plastik kafeslerde tutularak, su ve yem kısıtlaması olmaksızın beslendi. Çalışma için, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Tarih: 05.09.2018, Sayı: 2018/150).

3.2. DENEYSEL UYGULAMALAR

Çalışmada kullanılan deney hayvanı sayısının power analizi sonucunda; %80 power ve %95 güven düzeyinde bakıldığında her grup için minimum 8 olduğu belirlendi. Deneye başlamadan önce tüm gruplara ait sıçanların ağırlıkları ölçülerek ağırlıkları birbiri ile paralel olacak şekilde gruplandırıldı Çalışmada kullanılan hayvanlar 4 gruba ayrılarak, kontrol ve diyabet oluşturulan gruplara ilaveten yalnızca angiotensin IV uygulaması yapılan ve diyabet ile birlikte angiotensin IV uygulaması yapılan gruplar oluşturuldu.

Diyabet, sitrat tamponu (pH:4,5) içerisinde çözündürülen streptozotosin'in (STZ) (60 mg/kg) (Sigma-Aldric, S0130) intraperitonal (ip) olarak uygulanması ile oluşturuldu. Kontrol gruplarına ise sadece eşit hacimde sitrat tamponu enjekte edildi. Enjeksiyondan önce tüm hayvanların başlangıç kan glikoz değerleri kuyruk veninden glukometre ile ölçülerek kontrol değerler olarak kaydedildi. STZ enjeksiyonundan 3 gün sonra kan glikoz düzeyleri tekrar ölçülerek, kan glikoz değerleri 180 mg/dl ve üzeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi ve madde uygulamalarına başlandı. Angiotensin IV (Sigma-Aldrich, A0230) 21 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik içerisinde 5 µg/kg subkutan olarak uygulandı (Fidalgo ve ark. 2017). Kontrol gruplarına ise sadece eşit hacimde serum fizyolojik verildi. Tüm gruplardaki sıçanların 1. gün, 3. gün, 14. gün, 21. gün ve 30. gün olmak üzere toplam 5 defa ağırlık ve kan şekerleri ölçümü yapılarak istatistiksel analizler için kullanıldı. Deneyin 21. ve 22. günlerinde sıçanlara, korku koşullanmasını değerlendirmek için pasif sakınma testi uygulandı. Deneyin 24. günü ile 30. günü arasında ise sıçanların mekansal hafızasını ölçmek için Morris su labirenti testi uygulandı. 30. günün sonunda 10 mg/kg ksilazin ve 100 mg/kg ketamin ile genel anestezi altında sıçanlar dekapite edilerek beyinleri çıkarıldı, hipokampus bölgesi ayrılarak biyokimyasal analizler için -80°C'de muhafaza edildi (Şekil 9,10).



Şekil 9: Çalışmada takip edilen deney protokolü.



Şekil 10: Subkutan enjeksiyon uygulaması ve çalışmada kullanılan deney hayvanları.

Deney gruplarına uygulanan yöntem, aşağıda ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

1.Kontrol Grubu (n=8): 1 ml sitrat tamponu (çözücü) enjeksiyonundan 3 gün sonra başlanarak 21 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik (sc) uygulanan grup.

2.Angiotensin IV Grubu (n=8): 1 ml sitrat tamponu (çözücü) enjeksiyonundan 3 gün sonra başlanarak 21 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik içersinde 5 µg/kg Ang IV (sc) uygulanan grup.

3.Diyabet Grubu (n=8): 1 ml sitrat tamponu (çözücü) içerisinde 60 mg/kg STZ enjeksiyonundan (ip) 3 gün sonra başlanarak 21 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik (sc) uygulanan grup.

4.Diyabet + Angiotensin IV Grubu (n=8): 1 ml sitrat tamponu (çözücü) içerisinde 60 mg/kg STZ enjeksiyonundan (ip) 3 gün sonra başlanarak 21 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik içersinde 5 µg/kg Ang IV (sc) uygulanan grup.

3.3. PASİF SAKINMA TESTİ

Pasif sakınma testi, belleği incelemek için kullanılan negatif güçlendirici temeline dayanmaktadır. Cihaz, (MAY-PA 1014-7 Passive Avoidance System) küçük bir geçiş kapısıyla (8 x 4,5 cm) ayrılmış iki bölmeden (paslanmaz çelik ızgara zeminli açık ve koyu bir bölme) oluşmaktadır. Bölmelerden biri (20 x 30 x 26 cm) karanlık ve hayvana elektrik şoku uygulanmasına uygun şekilde tasarlanmış, diğeri ise aynı boyutlarda, aydınlık (2550 lümen aydınlatmalı) ve hayvanın elektrik şoku almadığı bölmedir (Şekil 11). Test, öğrenme ve deneme periyodu olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Öğrenme periyodunda, sıçanlar aydınlık bölmeye konularak test başlatıldı. Hayvanın bulunduğu bölmeye alışması için 20 saniyelik bir alışma periyodunu takiben kapı otomatik olarak açıldı. Aydınlık bölmeden karanlık bölmeye geçtikten sonra, karanlık bölme zemininde yer alan ızgaralardan 2 saniye boyunca, 1 mA elektrik şoku verildi. Hayvanlar karanlık bölmeden tekrar aydınlık bölmeye geçtiklerinde test bilgisayar yazılımı tarafından otomatik olarak sonlandırıldı ve sıçanların aydınlık bölmeden karanlık bölmeye geçtikleri süre kaydedildi. Deneme periyodunda, aynı test 24 saat sonra tekrarlanarak hayvanların karanlık bölmeye geçip geçmediklerine bakıldı. Testin sonlandırılma süresi 300 sn olarak belirlendi. Bu süre içinde karanlık bölmeye geçmeyen hayvanlarda öğrenme ile ilgili bir bozukluk olmadığı kabul edildi.



Şekil 11: Pasif sakınma cihazı.

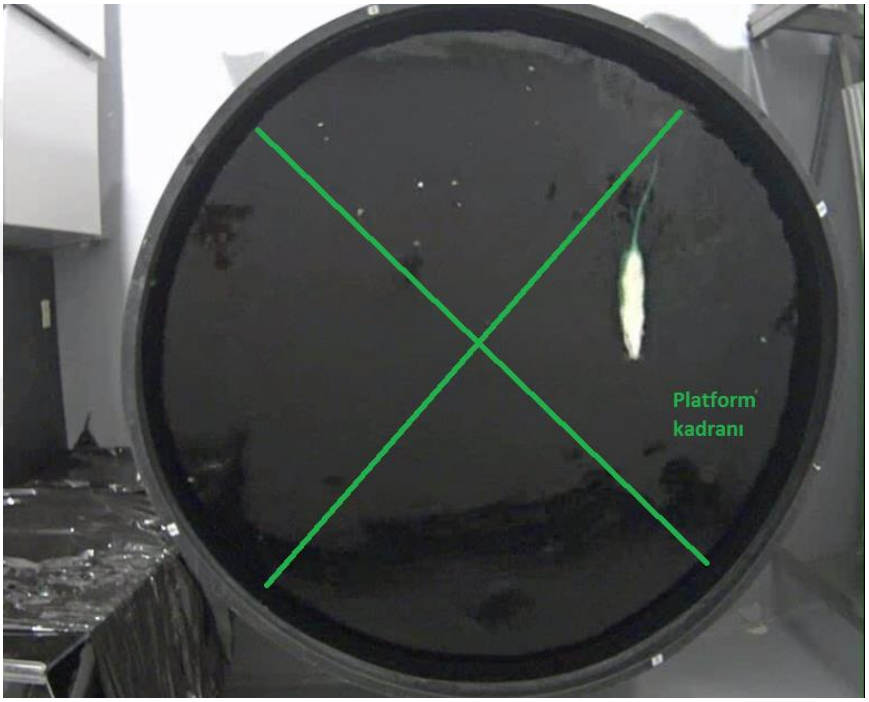
3.4. MORRIS SU LABİRENTİ TESTİ

Morris su labirenti, sıçan ve fare gibi küçük kemirgenlerde hipokampusa bağlı mekansal öğrenme ve bellek araştırmaları için günümüzde çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Morris, 1984). Morris su labirenti, dairesel (150 cm çapında, 60 cm derinliğinde) siyah bir havuzdur. Testi uygulamak için havuz su ile (23° C ± 1) 45 cm derinliğe kadar dolduruldu. Suyu opak yapmak için, toksik olmayan yeşil renkli bir gıda boyası kullanılarak havuz yüzeyinin sıçan tarafından görülmesi önlendi. Bilgisayarlı video izleme sistemi (Noldus Bilgi Teknolojisi, EthoVision Sistemi, Hollanda) havuzdaki hayvanı izlemek ve verileri kaydetmek için kuruldu. Havuz, havuzun ortasından geçen iki dikey çizgi ile dört çeyreğe (doğu, batı, kuzey, güney kadranları) ayrıldı. Şeffaf pleksiglastan yapılmış ve böylece hayvanlara görünmeyen bir platform (10 cm X 28 cm), güney kadranının merkezine denk gelecek şekilde yerleştirildi. Platformun üst kısmı, hayvanın onu göremediği ancak sudan kaçmak için üzerine tırmanabileceği şekilde su yüzeyinin 2 cm altında tutuldu. Su tankının etrafı, tüm deney süresi boyunca hareketsiz birkaç adet şekilli ipucu (şerit, üçgen, kare, yuvarlak) ile döşendi.

Öğrenme periyodunda, sıçanlar 5 gün boyunca 4'er deneme gerçekleştirdi. Her denemede sıçanlar rastgele dört konumdan (doğu, batı, kuzey, güney) birinden havuza bırakıldı. Hayvanın platformu bulana kadar 60 saniye boyunca yüzmesine izin verildi. İlk

gün 60 sn içinde platforma ulaşamayan sıçanlar, platforma yüzdürülerek konumu tanıması sağlandı. Sıçanların platform üzerinde 10 saniye boyunca beklemesi için süre tanındı. Platforma ulaşmak için geçen süre, yüzme yolunun uzunluğu ve yüzme hızı, bir video izleme sistemi tarafından sürekli olarak kaydedildi.

Test periyodunda (altıncı gün), platform kaldırıldı ve sıçanlar su tankının herhangi bir kutbundan, tüm hayvanlar aynı konumdan olacak şekilde suya bırakılarak yüzmeleri için 60 saniye süre tanındı. Harcanan zaman ve hedef çeyrekte geçen mesafe, gruplar arasında karşılaştırılmak üzere kaydedildi.



Şekil 12: Morris su labirenti ve test kadranları.

3.5. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Dekapitasyondan hemen sonra beyin dokusu çıkarılarak, ince disseksiyon ile bilateral hipokampuslar çıkarıldı. Doku örnekleri PBS (Phosphate Buffer Saline, pH:7.4) çözeltisi içerisinde homojenizatör (MP Fast-Trap 24, MPBio Inc, ABD) yardımıyla homojenize edildi. Daha sonra elde edilen homojenatlar mikrotüplere alındı ve +4 °C'de, 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek pelet ve süpernatant olmak üzere 2 farklı fraksiyon elde edildi. Tüm doku örneklerinde Bradford metodu ile total protein miktarı fotometrik olarak ölçüldü (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, A.B.D.). Elde edilen süpernatantlar yeni mikrotüplere aktarıldı. Doku homojenatı örneklerinde Malondialdehit (MDA), Superoksid Dismutaz (SOD), Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör

(BDNF) ve Glutatyon peroksidaz (GPX) parametrelerinin değerleri ELISA yöntemi ile mikroplak okuyucusunda (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) ölçüldü.

3.5.1. Gereçler

- Santrifüj (Nüve NF1200, Nüve NF1200R, TR)
- Distile Su Cihazı (Nüve Water Distiller-ND112, TR)
- Vorteks (BioCote Voortex Mixer SA8, bibby scientific, UK)
- Orbital Karıştırıcı (Biosan, OS-20, EU)
- Etüv (Nüve Cooled Incubator, ES120)
- Manyetik Karıştırıcı (Stuart heat stir, CB162, bibby scientific, UK)
- -80°C Derin Dondurucu(New Brunswick Scientific. C54285 model)
- ELISA Okuyucusu (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, ABD)
- ELISA Yıkayıcısı (Thermo Scientific WellWash microplate washer, 2011-08,ABD)
- Homojenizatör (MP Fast-Trap 24, MPBio Inc, A.B.D)
- Pipet (1000, 500, 200,100,10 uL'lik; Gilson)
- 8'li Multipipet (Thermo Fischer, ABD)
- Pipet Uçları (1000, 200,100,10 uL'lik)

3.5.2. ELISA Kitleri

- Rat Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), ELISA kiti (SinoGeneClon Biotech Co., Ltd , Kat no: SG-20200)
- Rat Malondialdehyde (MDA), ELISA kiti (SinoGeneClon Biotech Co., Ltd , Kat no: SG-20889)
- Rat Glutathione Peroxidase (GPX) ELISA kiti (SinoGeneClon Biotech Co., Ltd , Kat no: SG-20976)
- Rat Superoxide Dismutase (SOD) ELISA kiti (YL Biotech Co., Ltd, Kat no:YLC1112Ra)

3.5.3. Total Protein Tayini

Doku örneklerine ait homojenatlarda Bradford yöntemi temeline dayanan prosedür ile total protein miktarları ölçüldü. Bu yöntem dahilinde 1 mg/ml olacak şekilde

hazırlanan Bovin serum albümin (BSA) çözeltisinin seri dilüsyonları standart olarak kullanıldı.

- Hazırlanan standartlar ve örnekler 96 kuyucuklu mikroplağa 10 µl pipetlendi.
- Tüm kuyucuklara 300 µl Coomassie Reaktifinden eklendikten sonra 30 saniye boyunca plak karıştırıldı.
- Oda ısısında 10 dakika inkübasyonun ardından 595 nm plak okuyucusunda (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) ölçüldü.

Hesaplama: Standartların absorbansı belirlenerek x ekseninde absorbans, y ekseninde konsantrasyon olacak şekilde lin-lin grafik elde edilip sonuçlar mg/ml şeklinde ifade edildi.

3.5.4. Glutatyon Peroksidaz (GPx) ELISA Test Protokolü

- Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kit oda ısısına getirildi.
- 6 adet standart; kitin içerisinden çıkan 180 IU/ml'lik stok standardın seri dilüsyonu ile elde edildi. Ardından 50 µl olacak şekilde her bir standart pipetlendi.
- Antikor ile kaplı mikroplaktaki örnek kuyucuklarına 40 µl 'sample dilüent' pipetlendikten sonra üzerlerine 10'ar µl homojenat örnekleri sırasıyla konuldu.
- Mikroplak üzeri kapatılarak, 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından kit içerinde bulunan 30X lik yıkama solüsyonu distile su ile hazırlandıktan sonra, mikroplak 5 kez (350 µl) otomatik plak yıkayıcıda yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından tüm kuyucuklara (blank hariç) 50 µl 'HRP-Conjugate Reagent' pipetlendi.
- Mikroplak üzeri kapatılarak, 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından mikroplak 5 kez (350 µl) otomatik plak yıkayıcıda yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 50 ' şer µl sırasıyla 'Choromogen Solution A' ve 'Choromogen Solution B' pipetlendi. Ardından mikroplak 37 C°'de 15 dakika ışık almayacak şekilde inkübe edildi.

- Tüm kuyucuklara 50 µl ‘Stop Solution’ pipetlendi.
- Mikroplak bekletilmeden 450 nm absorbansda plak okuyucuda okundu. Absorbansların konsantrasyon değerleri, lineer olarak elde edilen standart grafiği ile hesaplandı.

3.5.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) ELISA Test Protokolü

- Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kit oda ısısına getirildi.
- 6 adet standart, kitin içerisinden çıkan 400 ng/ml’lik stok standardın seri dilüsyonu ile elde edildi.
- Antikor ile kaplı mikroplaktaki kuyucuklara standart ve homojenat örneklerinden sırasıyla 100 µl pipetlendikten sonra mikroplağın üzeri kapatılarak 2 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki tüm sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüm kuyucuklara 100 µl ‘Detection Reagent A’ pipetlendi ve 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından kit içerinde bulunan 30X lik yıkama solüsyonu distile su ile hazırlandıktan sonra, mikroplak 3 kez (350 µl) otomatik plak yıkayıcıda yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 100 µl ‘Detection Reagent B’ pipetlendi ve 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından mikroplak 5 kez (350 µl) otomatik plak yıkayıcıda yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 90 µl ‘Substrate solution’ pipetlendikten sonra mikroplak 15-25 dakika 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- Tüm kuyucuklara 50 µl ‘Stop Solution’ pipetlendi.
- Mikroplak bekletilmeden 450 nm absorbansda plak okuyucuda okundu. Absorbansların konsantrasyon değerleri, lineer olarak elde edilen standart grafiği ile hesaplandı.

3.5.6. Malondialdehit (MDA) ELISA Test Protokolü

- Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kit oda ısısına getirildi.
- 6 adet standart; kitin içerisinden çıkan 9 mmol/L'lik stok standardın seri dilüsyonu ile elde edildi. Ardından 50 µl olacak şekilde her bir standart pipetlendi.
- Antikor ile kaplı mikroplaktaki örnek kuyucuklarına 40 µl 'sample dilüent' pipetlendikten sonra üzerlerine 10'ar µl homojenat örnekleri sırasıyla konuldu.
- Mikroplak üzeri kapatılarak, 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından kit içerinde bulunan 30X lik yıkama solüsyonu distile su ile hazırlandıktan sonra, mikroplak 5 kez (350 µl) otomatik plak yıkayıcıda yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından tüm kuyucuklara (blank hariç) 50 µl 'HRP-Conjugate Reagent' pipetlendi.
- Mikroplak üzeri kapatılarak, 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından mikroplak 5 kez (350 µl) otomatik plak yıkayıcıda yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 50 'şer µl sırasıyla 'Choromogen Solution A' ve 'Choromogen Solution B' pipetlendi. Ardından mikroplak 37 C°'de 15 dakika ışık almayacak şekilde inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklara 50 µl 'Stop Solution' pipetlendi.
- Mikroplak bekletilmeden 450 nm absorbansda plak okuyucuda okundu. Absorbansların konsantrasyon değerleri, lineer olarak elde edilen standart grafiği ile hesaplandı.

3.5.7. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) ELISA Test Protokolü

- Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kit oda ısısına getirildi.
- 6 adet standart; kitin içerisinden çıkan 135 ng/L'lik stok standardın seri dilüsyonu ile elde edildi. Ardından 50 µl olacak şekilde her bir standart pipetlendi.
- Antikor ile kaplı mikroplaktaki örnek kuyucuklarına 40 µl 'sample dilüent' pipetlendikten sonra üzerlerine 10'ar µl homojenat örnekleri sırasıyla konuldu.
- Mikroplak üzeri kapatılarak, 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyonun ardından kit içerinde bulunan 30X lik yıkama solüsyonu distile su ile hazırlandıktan sonra, mikroplak 5 kez (350 µl) otomatik plak yıkayıcıda yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından tüm kuyucuklara (blank hariç) 50 µl 'HRP-Conjugate Reagent' pipetlendi.
- Mikroplak üzeri kapatılarak, 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından mikroplak 5 kez (350 µl) otomatik plak yıkayıcıda yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 50 'şer µl sırasıyla 'Choromogen Solution A' ve 'Choromogen Solution B' pipetlendi. Ardından mikroplak 37 C°'de 15 dakika ışık almayacak şekilde inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklara 50 µl 'Stop Solution' pipetlendi.
- Mikroplak bekletilmeden 450 nm absorbansda plak okuyucuda okundu. Absorbansların konsantrasyon değerleri, lineer olarak elde edilen standart grafiği ile hesaplandı.

3.6. WESTERN BLOT ÇALIŞMALARI

3.6.1. Doku Analizi

Sıçanlardan alınan beyin doku örnekleri, kuru tüplere konularak çalışılacak zaman kadar -80 °C'de saklandı. Deneylerin yapılacağı gün, örnekler çözülmeden üzerine 10 ml RIPA tamponu eklendi. Homojenizasyon cihazında 30 m/s ile 5 dakika boyunca homojenizasyon yapıldı. Örnekler daha sonra 10 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantları alınan örneklerde Bradford yöntemi ile total protein miktar tayinleri 595 nm dalga boyunda plak okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) yapıldı.

3.6.2. Western blot analizi

Sıçanlardan alınıp homojenizasyonu yapılan doku örneklerinde, Bradford yöntemi ile 1 mg/ml Bovine serum albümin (BSA) standart olarak kullanılarak, total protein miktar tayini 595 nm dalga boyunda Plak okuyucu (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA)'da ölçüldü. Her bir örnek için yaklaşık 20 µg total protein SDS-PAGE'e yüklendi. 1 saat 120 mv'da yürütüldü. Yürütme işlemi sonrası jeldeki protein örneklerinin transfer işlemi PVDF membranlara aktarılarak 110 mv'da 10 dakika inikübasyon ile transfer cihazı (Biorad, USA) ile yapıldı. Transfer işleminden sonra

membranlar bloklama işlemine tabi tutuldu. Bloklama işlemi için, membranlar %5'lik skim milk (süt tozu)'de oda ısısında orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bloklama işlemi bittikten sonra membranlar TBS-T ile 5 defa 5'er dakika boyunca yıkandı. GAPDH (Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz) (Cell signaling, 14C10, ABD), ACE-2 (GeneTex, Katolog No: GTX15348) NMDA (Novusbio, Katolog No: NBP2-19551) ve $GABA_A$ (Novusbio, Katolog No: NBP2-16565) primer antikorları sırasıyla 1/1000, 1/500, 1/200 ve 1/200 oranlarında %2.5 'lik skim milk içerisinde hazırlandı. Membranlar primer antikorlar ile işaretlendikten sonra +4 ºC'de çalkalayıcıda 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün membranlar TBS-T ile 5 defa 5'er dakika boyunca yıkandıktan sonra 1/1000 oranında hazırlanan sekonder antikor (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz Ca USA) ile işaretlenerek 1 saat oda ısısında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Antikorlara ait oluşan bantlar, Vilbert Laurmart Fusion Fx5 cihazında görüntülendi ve değerlendirildi.

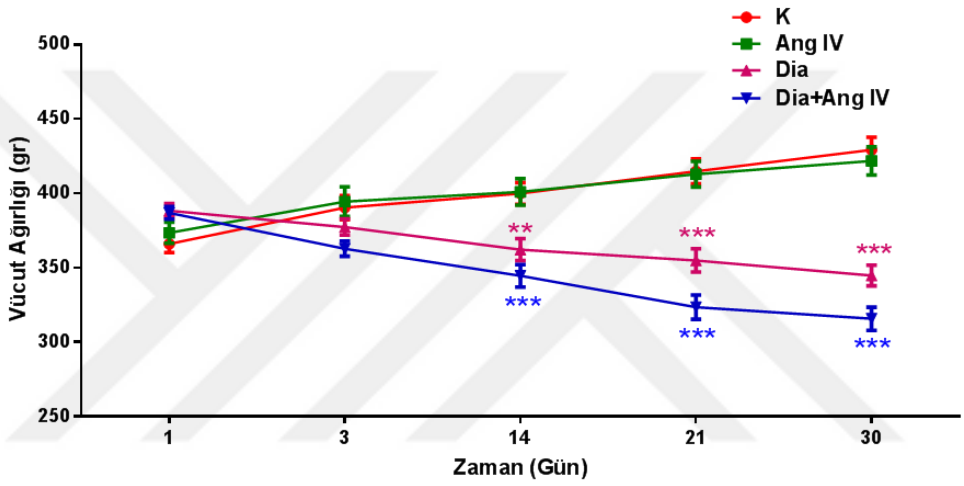
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin dağılımı Shapiro Wilk testi ile incelendi. Normal dağılıma sahip üç bağımsız grup karşılaştırmasında One-Way ANOVA testi, normal dağılıma sahip olmayan üç bağımsız grup karşılaştırması Kruskal Wallis testi ile incelendi. Anlamlı çıkan değişkenlerin post-hoc karşılaştırmaları Bonferroni ve Dunn testi ile yapılmıştır. Bağımlı grup karşılaştırmalarında Friedman testi kullanıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama±standart sapma, median(min-max) ile verildi. Tüm istatistiksel analizler Instat İstatistiksel Paket Programı (Instat Graphad Software, San Diago, CA, USA) ile α=0.05 anlamlılık seviyesinde incelendi.

4. BULGULAR

4.1. AĞIRLIK BULGULARI

Tüm deney hayvanlarının deney süresince 1., 3., 14., 21. ve 30. günlerde ağırlık ölçümleri yapıldı. Deneyin 1. ve 3. günlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi. Deneyin 14. gününden itibaren her iki diyabetik grupta da (Dia ve Dia+Ang IV) kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$) bir düşüş olduğu tespit edildi. Diyabetik gruplar arasında ve Ang IV grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 13).

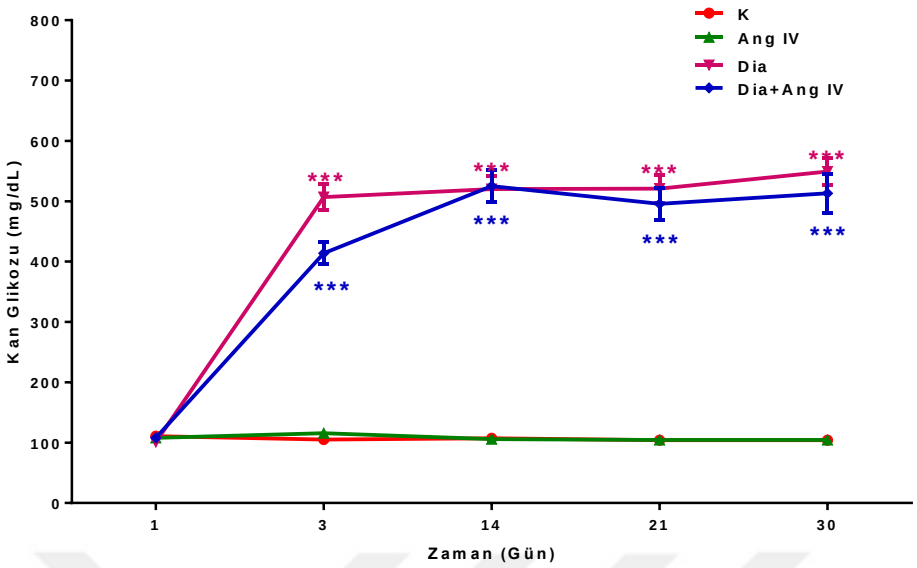


Şekil 13: Deney gruplarının günlere göre (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) vücut ağırlıklarındaki değişim (p<0.01, ***p<0.001, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık).**

4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1. Kan Glikoz Bulguları

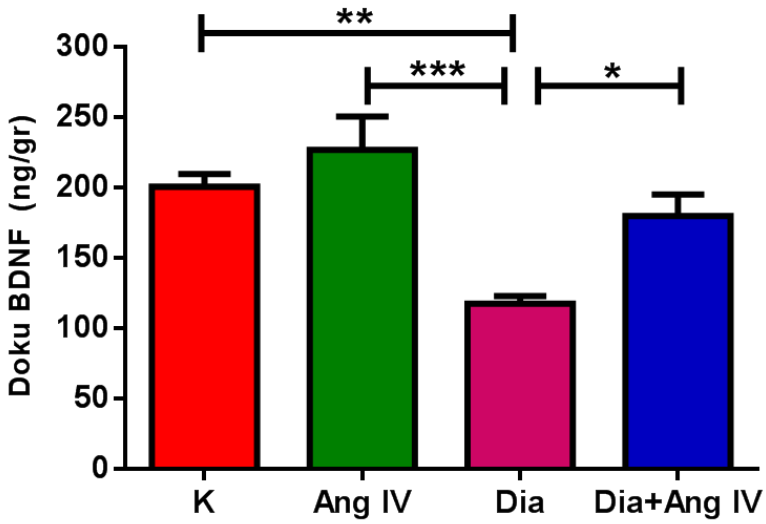
Deney hayvanlarına ait glikoz değerleri belirtilen günlerde (1., 3., 14., 21. ve 30. günler) ölçüldü. Tüm gruplarda başlangıç glikoz değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Diyabet oluşturulmasının 3. gününden itibaren her iki diyabet grubu da (Dia, Dia+Ang IV) kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) derecede yüksek kan glikoz değerlerine sahipti. Ang IV grubu kan glikoz değerleri deney süresince kontrol grubuna paralel olarak devam etti ve aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi. Dia ve Dia+Ang IV grupları arasında yine anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 14).



Şekil 14: Deney gruplarının günlere göre (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) kan glikoz değerlerindeki değişim (*p<0,001, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık).**

4.2.2. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Seviyesi

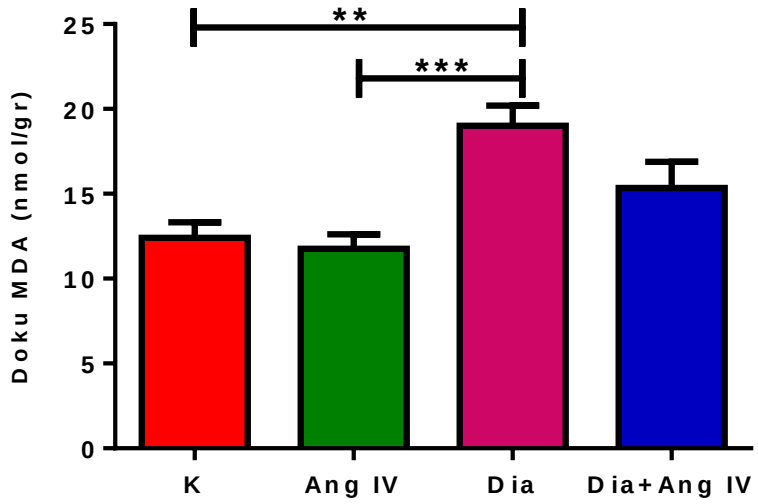
Hipokampus dokusundan elde edilen süpernatantlarda BDNF seviyesi ölçüldü. BDNF seviyesi Ang IV uygulanan grupta kontrol grubuna göre bir miktar arttı, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Dia ve Dia+Ang IV gruplarında kontrol grubuna kıyasla azalma tespit edildi. Bu azalma yalnızca Dia grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.01$). BDNF seviyeleri diyabet gurubuna göre kıyaslandığında ise hem Ang IV ($p<0.001$) hem de Dia+Ang IV ($p<0.05$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 15).



Şekil 15: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus BDNF düzeyleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık).

4.2.3. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Malondialdehit (MDA) Seviyesi

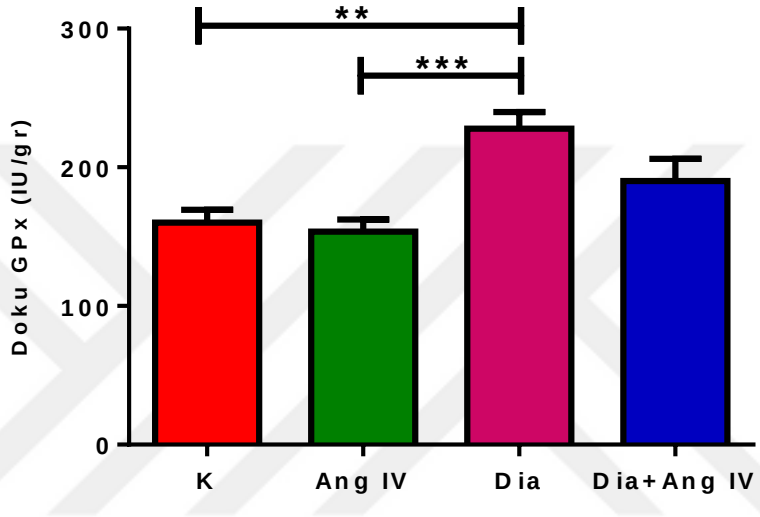
Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerine bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla yalnızca Dia grubunda ($p<0.01$) anlamlı bir artış gözlendi. Ang IV grubunda ise Dia grubuna göre anlamlı bir azalma ($p<0.001$) tespit edildi. Dia+Ang IV grubu da Dia grubuna göre azalma gösterse de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 16).



Şekil 16: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus MDA düzeyleri (p<0.01, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık).**

4.2.4. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Glutatyon Peroksidaz (GPx) Seviyeleri

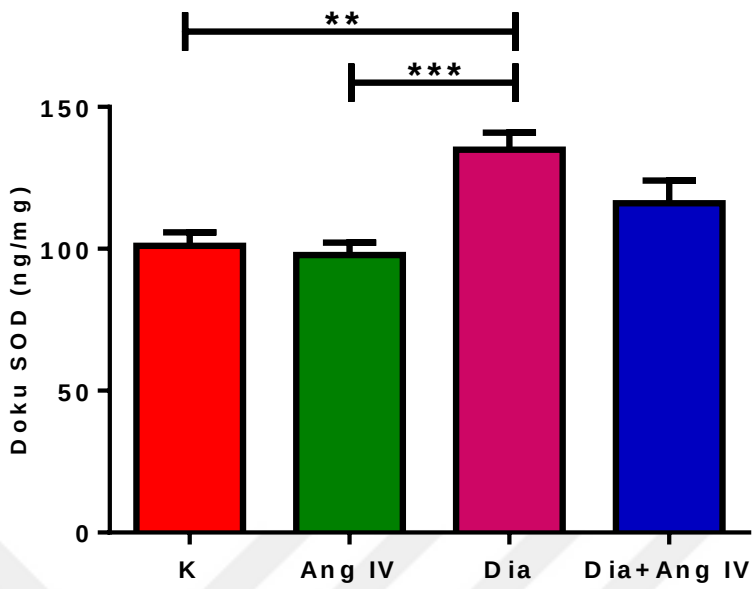
Hipokampus dokusundan elde edilen süpernatantlarda, hücresel endojen antioksidan düzeylerinin tespit edilmesi için glutatyon peroksidaz (GPx) düzeyleri ölçüldü. GPx, kontrol grubuna göre kıyaslandığında yalnızca Dia grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0.01$) gösterdi. Ang IV grubu ise Dia grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.001$) azaldı (Şekil 17).



Şekil 17: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus GPx düzeyleri (p<0.01, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık).**

4.2.5. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyeleri

Hipokampus dokusundan elde edilen süpernatantlarda, hücresel endojen antioksidan düzeylerinin tespit edilmesi için GPx'e ek olarak süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri de ölçüldü. SOD düzeyleri kontrol grubuna göre kıyaslandığında, GPx ile paralel olarak yalnızca Dia grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0.01$) gösterdi. Ang IV grubunda ise Dia grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.001$) azalış gösterdi (Şekil 18).

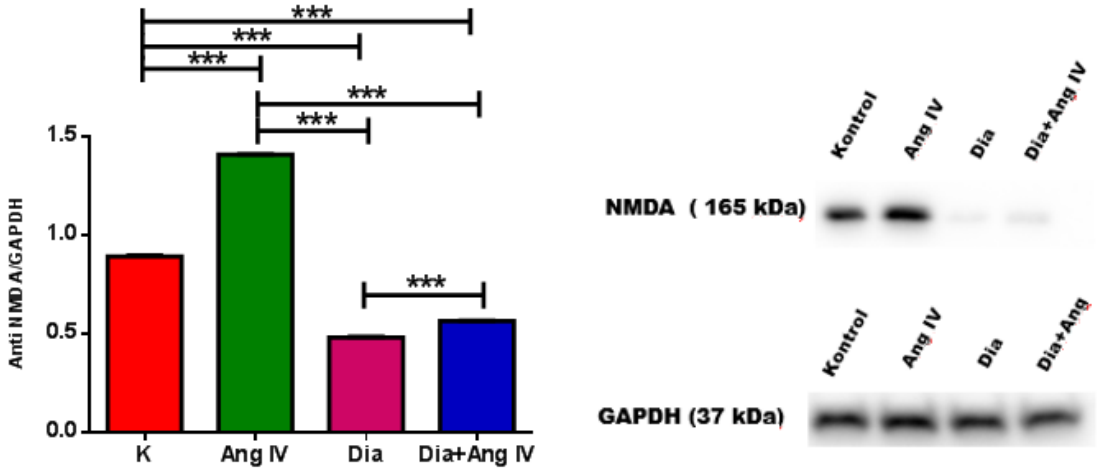


Şekil 18: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus SOD düzeyleri (p<0.01, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık).**

4.3. WESTERN BLOT BULGULARI

4.3.1. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda N-metil-D-aspartik asit (NMDA) Seviyeleri

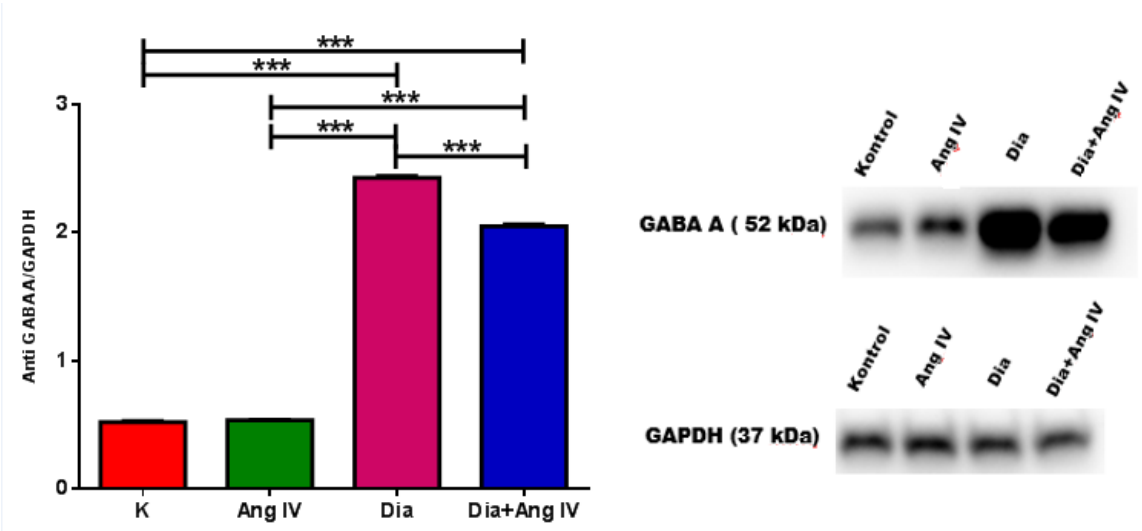
Hipokampus dokusundan elde edilen edilen süpernatantlarda NMDA reseptörü seviyeleri ölçüldü. En yüksek NMDA seviyesi Ang IV grubunda tespit edildi ve bu yükseklik kontrol, Dia ve Dia+Ang IV gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$). Diyabet ve Dia+Ang IV grupları, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0.001$). Dia+Ang IV grubu ise Dia grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştı ($p<0.001$) (Şekil 19).



Şekil 19: Deney gruplarında (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus NMDA reseptörü ekspresyon düzeyleri (*p<0,001, istatistiksel anlamlılık).**

4.3.2. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Gama-Aminobütrik Asit A Reseptörü ($GABA_A$) Seviyeleri

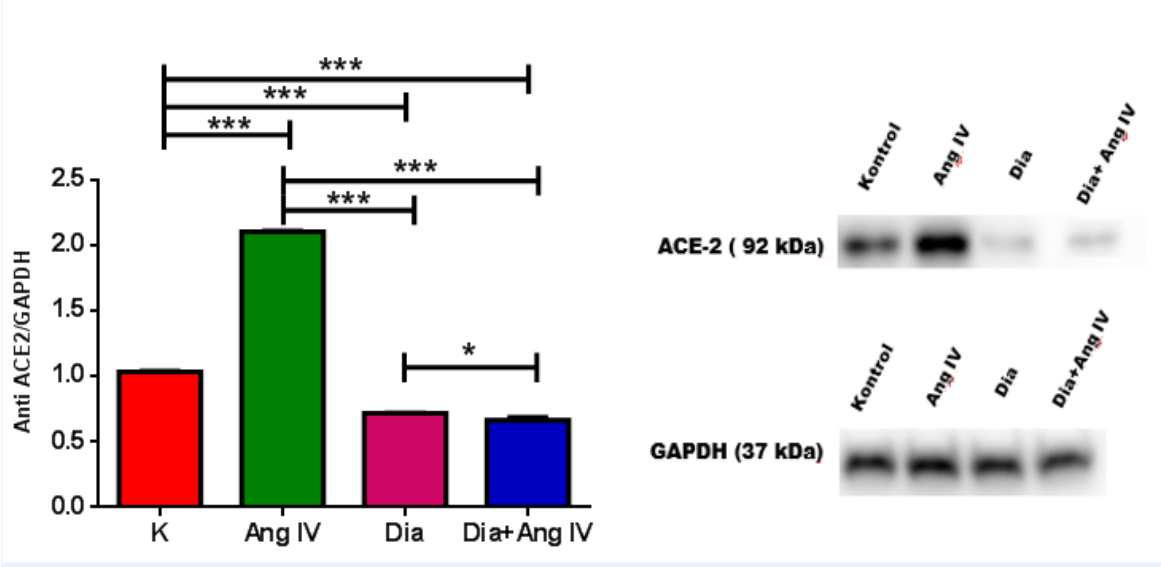
Hipokampus dokusundan elde edilen edilen süpernatantlarda $GABA_A$ reseptörü seviyelerine bakıldığında en yüksek seviyenin diyabet grubunda olduğu; kontrol, Ang IV ve Dia+Ang IV gruplarının ise diyabet grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$) tespit edildi. Kontrol ve Ang IV gruplarının $GABA_A$ seviyeleri ise Dia+Ang IV grubuna kıyasla anlamlı ($p<0.001$) olarak azaldı (Şekil 20).



Şekil 20: Deney gruplarında (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus $GABA_A$ reseptörü ekspresyon düzeyleri (*p<0,001, istatistiksel anlamlılık).**

4.3.3. Hipokampus Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Angiotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE2) Seviyeleri

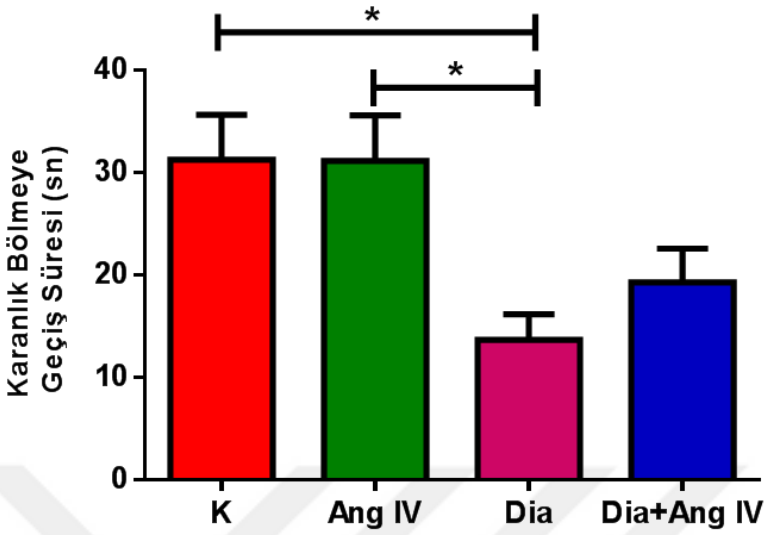
Hipokampus dokusundan elde edilen süpernatantlarda ölçülen ACE2 seviyesi en yüksek Ang IV grubundaydı. Kontrol, Dia ve Dia+Ang IV grupları ise Ang IV grubuna göre anlamlı ($p<0.001$) bir azalış gösterdi. Dia ve Dia+Ang IV grupları kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p<0.001$) gösterdi. ACE2 seviyesi en düşük Dia+Ang IV grubundaydı ve azalış diyabet grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Şekil 21).



Şekil 21: Deney gruplarında (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) hipokampus ACE2 ekspresyon düzeyleri (*p<0.05, ***p<0,001, istatistiksel anlamlılık).

4.4. PASİF SAKINMA TESTİ BULGULARI

Pasif sakınma testinin öğrenme periyodunda tüm gruplardaki hayvanlara elektrik şoku ile aydınlık bölgeden karanlık bölgeye geçmemeleri gerektiği öğretildi. Deneme periyodunda ise aynı test 24 saat sonra, uzun süreli hafızayı değerlendirmek amacı ile deney gruplarına uygulandı ve deney hayvanlarının karanlık bölmeye geçiş süreleri hesaplandı. Buna göre K ve Ang IV grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Diyabet grubu hem kontrol hem de Ang IV grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir azalma gösterdi. Dia+Ang IV grubu ise Dia grubuna göre bir miktar artış gösterse de, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 22).

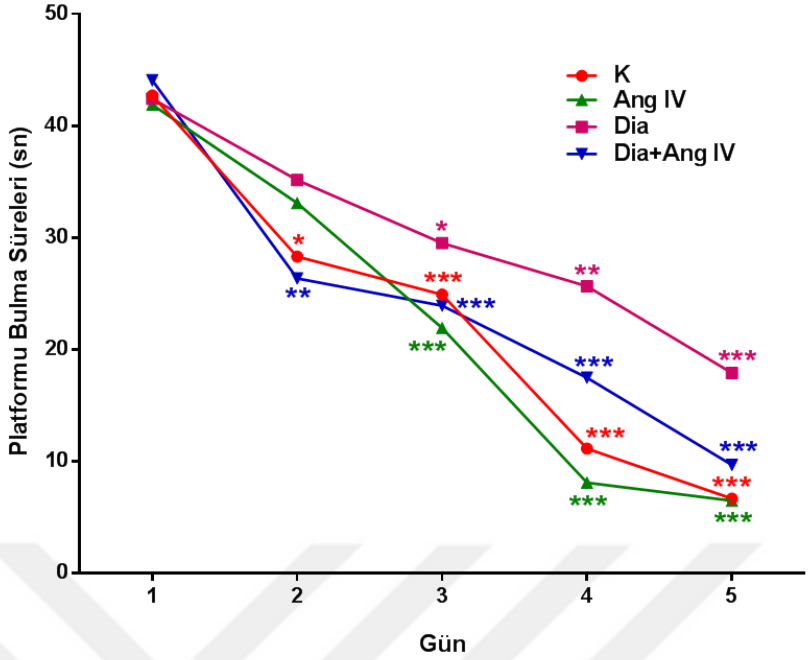


Şekil 22: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) pasif sakınma testinde karanlık bölmeye geçiş süreleri *p<0.05, istatistiksel anlamlılık).

4.5. MORRIS SU LABİRENTİ TESTİ BULGULARI

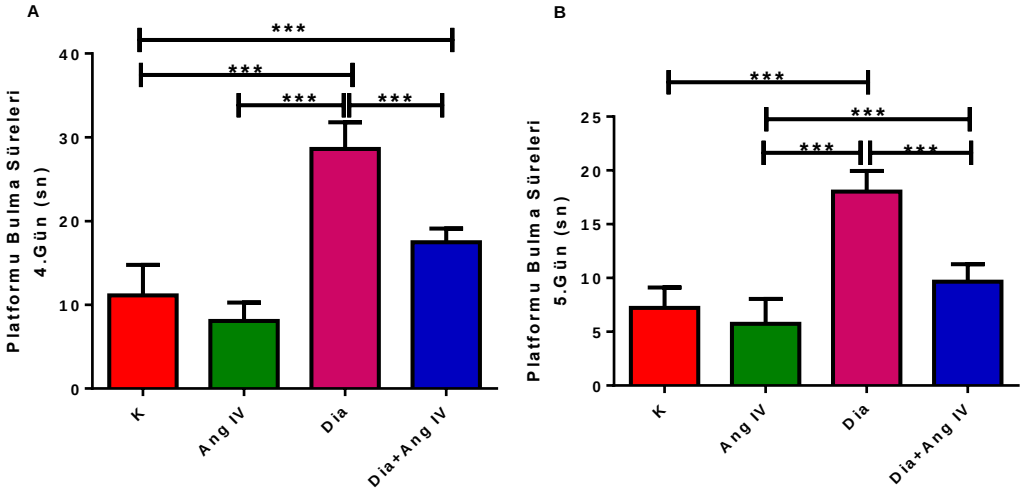
4.5.1. Deney Hayvanlarının Öğrenme Periyodunda Platformu Bulma Süreleri

Morris su labirenti testinin öğrenme periyodunda sıçanların 5 gün boyunca, tankın içindeki gizli platformu bulma süreleri kaydedildi. Diyabet grubunda 1. güne kıyasla ortalama platformu bulma süresi 3. ($p<0,05$), 4. ($p<0,01$) ve 5. ($p<0,001$) günlerde anlamlı olarak azaldı. Ang IV grubu da Dia grubuna benzer şekilde, 1. güne kıyasla 3., 4. ve 5. günlerde anlamlı ($p<0,001$) bir azalma gösterdi. Kontrol ve Dia+Ang IV grupları deney başlangıcı ile kıyaslandığında diğer iki gruptan (Dia, Ang IV) farklı olarak 2. günde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$) gösterirken, bu grupların 3., 4., ve 5. günlerinde diğer gruplara paralel olarak anlamlı ($p<0,001$) bir azalma belirlendi (Şekil 23).



Şekil 23: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodundaki platformu bulma süreleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, istatistiksel anlamlılık).

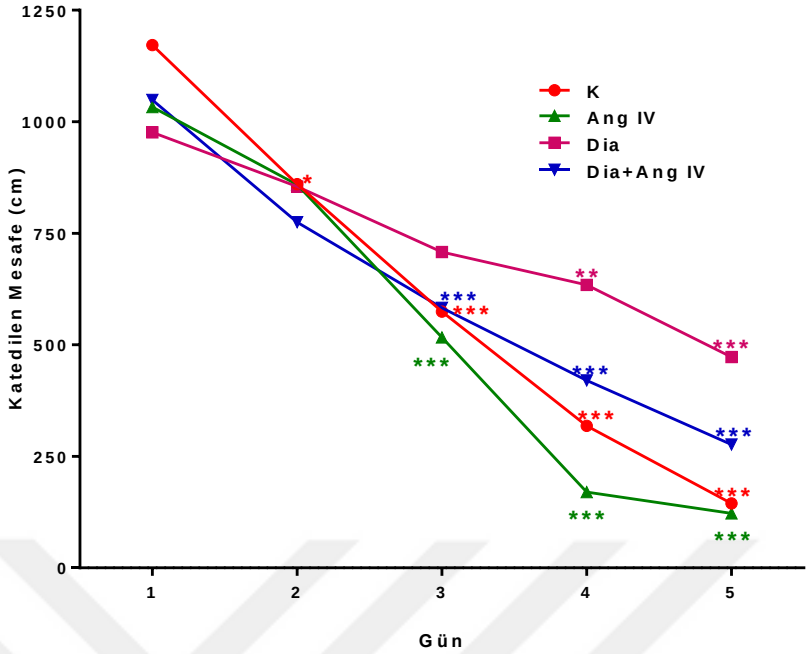
Deney hayvanlarının platformu bulma sürelerinin gruplar arası karşılaştırmalarına bakıldığında, 1., 2., ve 3. günlerde anlamlı bir fark tespit edilemedi. Deneyin 4. gününde Dia ve Dia+Ang IV gruplarının platformu bulma süreleri kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) olarak yüksekti. Ang IV grubu ve Dia+Ang IV grupları ise Dia grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) derecede düşüktü. Deneyin 5. gününde 4. güne benzer şekilde kontrol ve Dia grupları arasında anlamlı ($p<0,001$) bir fark varken, K ve Dia+Ang IV grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Ang IV grubu ve Dia+Ang IV grupları, Dia gurubuyla kıyaslandığında 4. güne paralel olarak istatistiksel olarak anlamlı düşüktü. Buna ek olarak Ang IV grubunda, Dia+ Ang IV grubuna oranla anlamlı ($p<0,001$) bir azalma tespit edildi (Şekil 24).



Şekil 24: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodunun 4. ve 5. günlerindeki platformu bulma süreleri (*p<0.001, istatistiksel anlamlılık).**

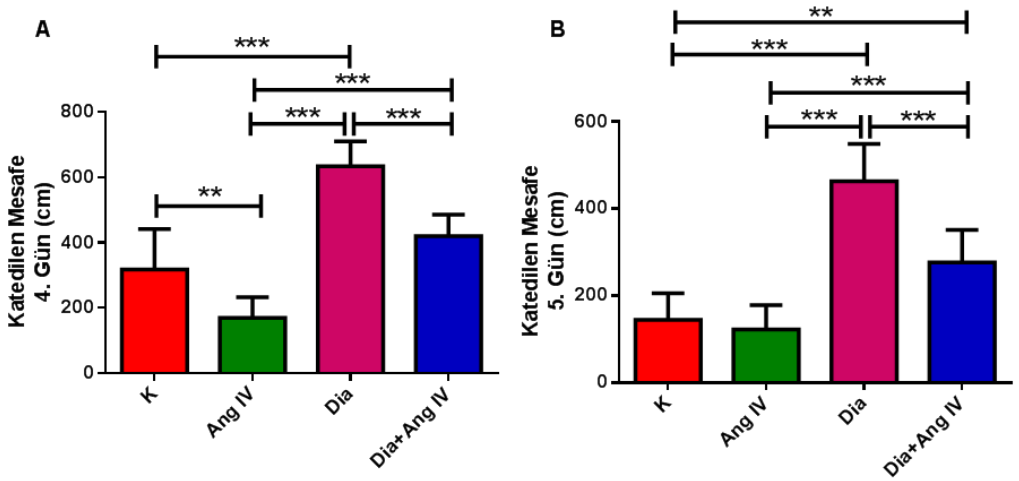
4.5.2. Deney Hayvanlarının Öğrenme Periyodunda Katettikleri Mesafe

Öğrenme periyodunda deney hayvanlarının su tankında katettikleri mesafe kaydedildi. Buna göre deneyin 1. günü ile kıyaslandığında Ang IV ve Dia+Ang IV grupları deneyin 3., 4. ve 5. günlerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) azalma gösterdi. Diyabet grubu deney başlangıcıyla kıyaslandığında yalnızca 4. ($p<0,01$) ve 5. ($p<0,001$) günlerde anlamlı azalma gösterirken, kontrol grubu 2. ($p<0,05$), 3.,4. ve 5. günlerde ($p<0,001$) anlamlı azalma gösterdi (Şekil 25).

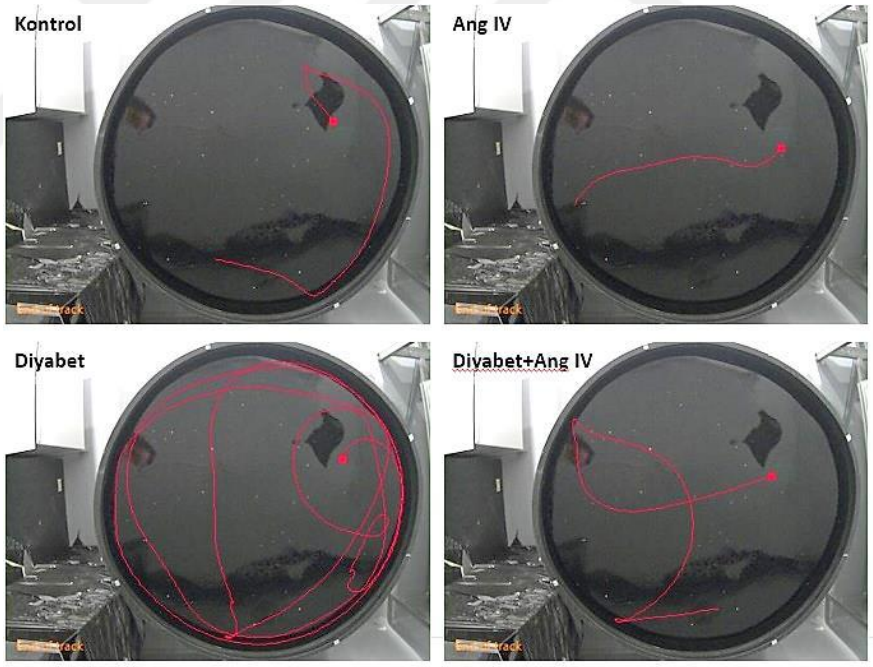


Şekil 25: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodundaki katettikleri mesafe (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, istatistiksel anlamlılık).

Deney hayvanlarının su tankında kattettikleri mesafenin gruplar arası karşılaştırmalarına bakıldığında, 1., 2., ve 3. günlerde anlamlı bir fark tespit edilemedi. 4. gün Ang IV grubunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0,01$) azaldığı, Dia grubunun ise anlamlı olarak arttığı ($p<0,001$) tespit edildi. Diyabet grubuyla kıyaslama yapıldığında, Ang IV uygulanan her iki grupta da anlamlı ($p<0,001$) bir azalma belirlendi. Dia Ang IV grubunun katettiği mesafe ise, Ang IV grubuna oranla anlamlı olarak artmıştı ($p<0,001$). Deneyin 5. gününde katedilen mesafe, 4. güne paralel olarak kontrol, Ang IV ve Dia+Ang IV gruplarında, Dia grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) olarak azaldı. Dia+Ang IV grubunda ise Ang IV grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) bir artış tespit edildi. Buna ek olarak Dia+Ang IV grubu, kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,01$) bir artış gösterdi (Şekil 26, 27).



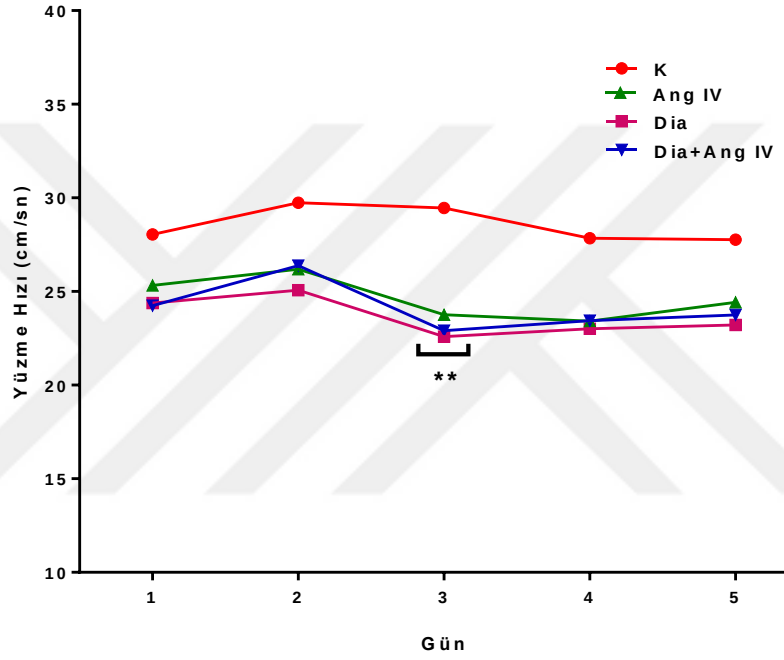
Şekil 26: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodunun 4. ve 5. günlerinde kattetikleri mesafe (*p<0.001, istatistiksel anlamlılık).**



Şekil 27: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodunun 5. gününde kattetikleri mesafenin iz haritası.

4.5.3. Deney Hayvanlarının Öğrenme Periyodundaki Yüzme Hızları

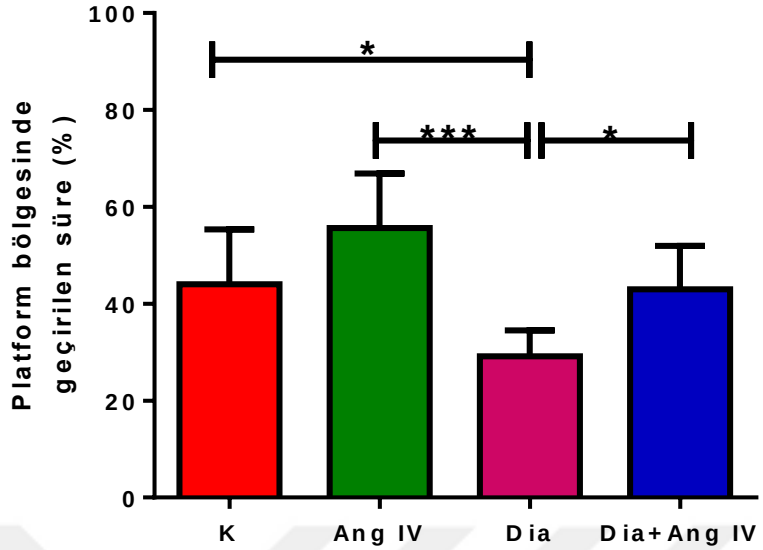
Morris su tankı testinin öğrenme periyodunda deney hayvanlarının yüzme hızları kaydedildi. Grup içi karşılaştırmalara bakıldığında, grupların hız verilerinin deneyin ilk gününe göre istatistiksel anlamlılık göstermediği belirlendi. Gruplar arası karşılaştırmaya bakıldığında ise, yalnızca deneyin 3. gününde Ang IV, Dia ve Dia+Ang IV gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,01$) olarak azaldığı belirlendi (Şekil 28).



Şekil 28: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin öğrenme periyodundaki hızları (p<0.01, Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık).**

4.5.4. Deney Hayvanlarının Test Periyodunda Platform Bölgesinde Geçirdikleri Süre

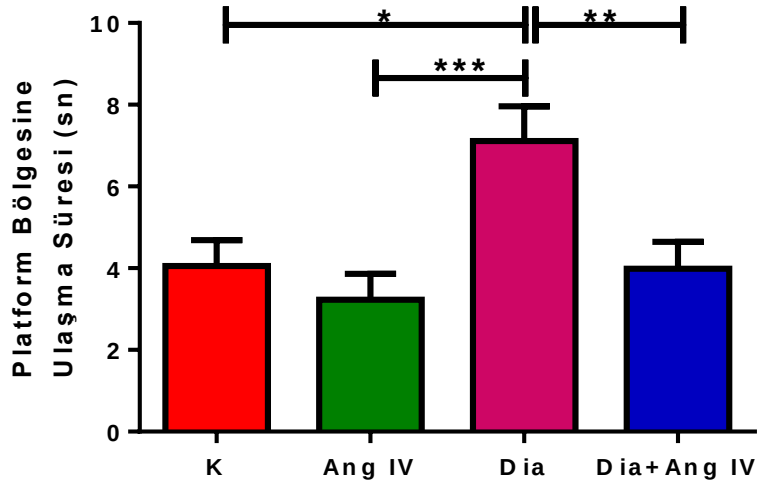
Moris su labirenti testinin 6. gününde (test periyodu) tankta bulunan gizli platform kaldırıldı ve deney hayvanlarının platform bölgesinde geçirdiği süre ölçülerek tankta geçirdiği toplam süreye olan yüzdesi hesaplandı. Buna göre, platform bölgesinde geçirilen sürenin en düşük diyabet grubunda olduğu gözlendi. Buna ek olarak kontrol ($p<0,05$), Ang IV ($p<0,001$) ve Dia+Ang IV ($p<0,05$) grupları diyabet grubuna göre anlamlı olarak arttı (Şekil 29).



Şekil 29: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinde geçirdikleri sürenin tankta toplam geçirdikleri süreye yüzdesi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, istatistiksel anlamlılık).

4.5.5. Deney Hayvanlarının Test Periyodunda Platform Bölgesine Ulaşma Süreleri

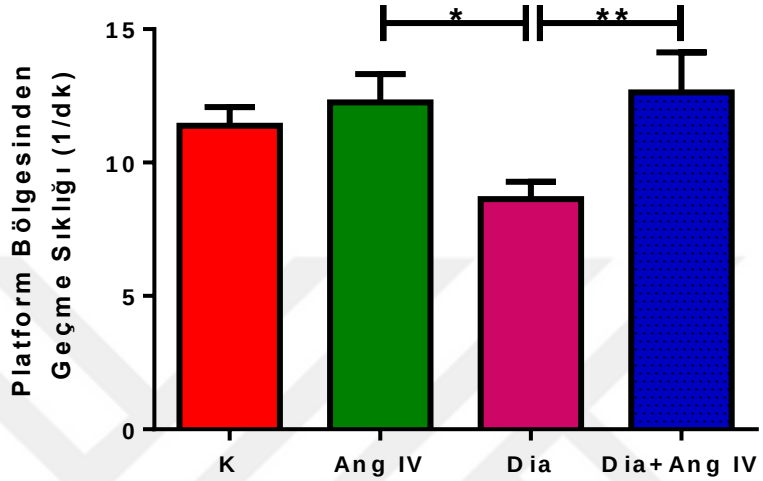
Test periyodunda deney hayvanlarının kaldırılan platformun bulunduğu bölgeye ulaşma süreleri kaydedildi. Buna göre platform bölgesine ulaşma süresi en yüksek diyabet grubundaydı. Kontrol (p<0,05), Ang IV (p<0,001) ve Dia+Ang IV (p<0,01) gruplarında Dia grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı (Şekil 30).



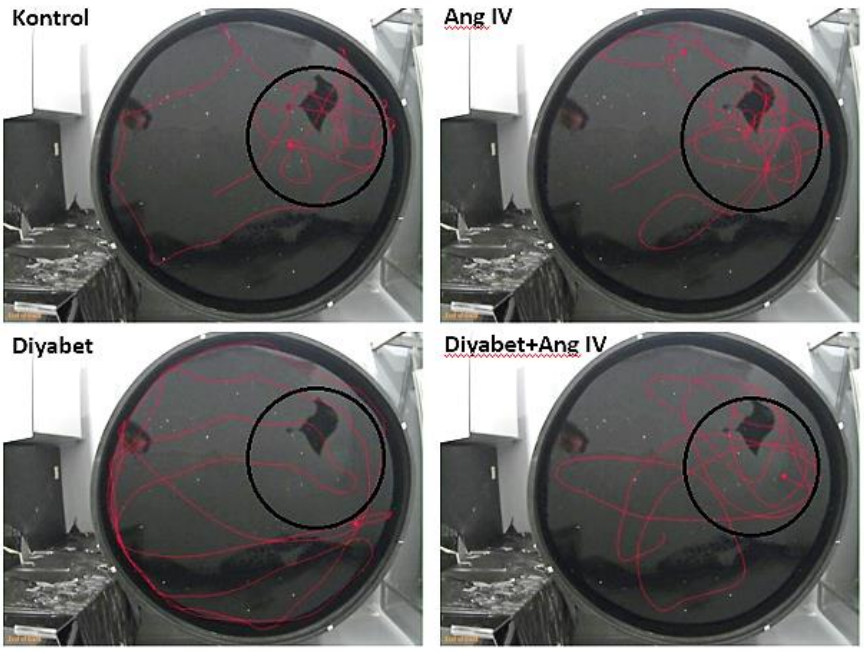
Şekil 30: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesine ulaşma süreleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, istatistiksel anlamlılık).

4.5.6. Deney Hayvanlarının Test Periyodunda Platform Bölgesinden Geçme Sıklığı

Test periyodunda deney hayvanlarının platform bölgesinden geçme sıklıkları karşılaştırıldığında en düşük frekansa sahip olan grup diyabet grubu olarak belirlendi. Bu düşüş kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi, ancak Ang IV ($p<0,05$) ve Dia+Ang IV ($p<0,01$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 31, 32).



Şekil 31: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinden geçme sıklıkları (*p<0.05, **p<0.01, istatistiksel anlamlılık).



Şekil 32: Deney gruplarının (K, Ang IV, Dia, Dia+Ang IV) Morris su labirenti testinin test periyodunda platform bölgesinden geçme sıklığının iz haritası.

5. TARTIŞMA

Yaygın bir kronik ve progresif metabolik bozukluk olan DM, yüksek kan glikoz seviyeleri (hiperglisemi) ile karakterizedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2019 yılında yayınladığı rapora göre, diyabetik hastaların sayısının 2030 yılında 366 milyon veya daha fazla olması beklenmektedir. Diabetes mellitus hemen hemen her organ ve vücut sistemini etkiler. Hiperglisemi diyabetik ketoasidozu tetikleyerek akut komplikasyonlarda hayati tehlike yaratabilir. Zamanla hiperglisemi kalbe, kan damarlarına, gözlere, böbreklere ve sinirlere zarar verebilir. Bu nedenle, DM; kalp krizi ve inme (kardiyopatoloji), böbrek yetmezliği (renopatoloji), bacak amputasyonu (periferik mikrovasküler patoloji ve nöropatoloji), görme kaybı (retinopatoloji) ve sinir hasarı (beyin nöropatolojisi) gibi birçok kronik komplikasyonlara yol açabilir (Papatheodorou ve ark. 2018).

Streptozotosin, deneysel diyabet oluşturmak için en sık kullanılan ajanlardan biridir. STZ'nin intraperitoneal enjeksiyonu ile deney hayvanlarında diyabet modeli oluşturulabilir. Pankreasta Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerini tahrip eder, yetersiz insülin üretiminin gelişmesine neden olur ve sonuç olarak kan glikoz seviyesinde artış meydana gelir. Yapısında bir glikoz molekülü bulunduğundan dolayı plazma membranındaki glukoreseptörlere bağlanarak glikozla uyarılan insülin salınımını bloke eder. Sıçanlarda diyabet modeli oluşturmak için önerilen doz intraperitonel olarak 60-80 mg/kg'dır (Patel ve ark. 2006). STZ verildikten üç gün sonra kuyruk veninden ölçülen kan glikoz seviyesi 180 mg/dL'den büyükse bu sıçanlar diyabetik kabul edilir. Biz de çalışmamızda diyabet modeli oluşturmak için 60 mg/kg tek doz intraperitonel STZ enjeksiyonu yaptık ve enjeksiyondan üç gün sonra kan glikoz değeri 180 mg/dl ve üzeri olan sıçanları diyabetik olarak kabul ettik.

STZ enjeksiyonu sonucu vücut ağırlığında azalma, hiperglisemi, nöroendokrin bozukluklar gibi bir takım diyabete özgü belirtiler ortaya çıkmaktadır (Crawford, 2017). Serum glikoz seviyelerindeki artış, diyabetik hastaların hedef organlarında yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olabilir. Çalışmamızda, STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların kan glikoz seviyelerinin çalışma boyunca anlamlı derecede yüksek olduğu gözlendi.

Angiotensin IV uygulaması yapılan diyabet grubunun kan glikoz düzeyleri de, diyabet grubundaki gibi yüksek olarak seyrederken, kontrol ve yalnızca Ang IV

uygulanan grupların kan glikoz düzeyleri normal sınırlarda seyretti. Diyabetik sıçanların vücut ağırlıkları ise, yapılan diğer çalışmalarda da gösterildiği gibi (Pournaghi ve ark. 2014) deney boyunca anlamlı olarak azaldı. Kontrol ve Ang IV gruplarının vücut ağırlıkları ise deney süresince bir miktar artış gösterdi. Bu sonuçlar, Ang IV'ün STZ ile oluşturulan diyabet modelinde kan glikoz düzeyine ve vücut ağırlığına herhangi bir etkisinin olmadığını gösterdi.

Diyabetin beyindeki uzun vadeli etkileri, işlev bozukluğu, ve hücre ölümü, antioksidan savunmaların azaltılması, serbest radikallerde eşzamanlı bir artış, doku hasarı, bilişsel bozulma, beyin atrofisi ve beyin yaşlanması olarak tanımlanabilir (Manschot ve ark. 2006). T1 ve T2 DM'de hücreye glikoz alımı, özellikle kas ve yağ hücrelerinde bozulmakta ve sonuçta hiperglisemi oluşumuna neden olmaktadır. Nöronlar, glikozu insüline ihtiyaç duymadan alır, bu nedenle, hiperglisemik DM'de, hiperglisemi, nöronal glikoz alımında 4 kat artışa neden olur. Yüksek hücre içi glikoz metabolizması nöronal hasara yol açar (Tomlinson ve Gardiner 2008). İnsan ve hayvan modellerinde, DM'nin merkezi sinir sistemindeki patolojik değişikliklerle bilişsel bozukluklara ve beyindeki vasküler komplikasyon riski ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Biessels ve Gispen 2005). Artmış hipokampal astrositik reaktivite, bozulmuş sinaptik plastisite, vasküler değişiklikler, azalmış dendritik karmaşıklık ve bozulmuş nörotransmisyon gibi bir takım değişiklikler ileri sürülmüştür (Magariños ve McEwen 2000). Bu patolojik değişiklikler sırasında, hasarlı mitokondri, hatalı bir şekilde bağlanmış elektron taşıma sistemleri geliştirir ve hücrede reaktif oksijen türlerinin ana kaynağı haline gelir.

Oksidatif stres genellikle serbest radikallerle antioksidanlar arasındaki dengesizlik süreci olarak tanımlanır (Asmat ve ark. 2016). Bu nedenle, oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve bozulmuş antioksidan korumaların artmasından dolayı, diyabetik komplikasyonların gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir aracı işlem olarak kabul edilir (Ceriello 2003). Oksidatif stres ayrıca, ROT'nin aşırı üretimi veya ROT için tamponlama veya süpürme sistemlerinde eksiklik nedeniyle hücresel redoks homeostazındaki değişikliklerden kaynaklanan patofizyolojik yanıtların da bir işaretidir. Bu bağlamda, beynin, yüksek oksijen tüketim oranı, yüksek lipid içeriği ve diğer dokularla karşılaştırıldığında göreceli bir antioksidan enzim azlığı nedeniyle oksidatif hasara karşı özellikle savunmasız olduğu kabul edilmektedir (Muriach ve ark. 2014). Sonuç olarak, antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalması, lipidlere ve proteinlere

peroksidatif hasar, değişmiş redoks metabolizması, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, değişmiş hücre sinyalleşmesi ve zarar görmüş enerji metabolizması dahil olmak üzere reaktif oksijen ve azot türleri ve hücresel antioksidan mekanizma seviyeleri arasında bir dengesizlik gelişir (Raza ve ark. 2015).

Oksidatif stres, genellikle lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ve SOD, GPx gibi antioksidan enzimlerim ölçümü ile belirlenir. STZ ile indüklenen DM'nin dokulardaki SOD ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerindeki etkileriyle ilgili önceki çalışmalardaki bulgular tutarsızdır (Huang ve ark. 1999). Bu tutarsızlığın diyabetik hayvan modeli oluşturulmasında kullanılan tekniklerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada DM'li sıçan beyinlerindeki SOD ve GPx seviyelerinin STZ enjeksiyonunu takiben erken evrelerde (8. haftada) arttığı, ancak DM oluşumunu takip eden sonraki evrelerde, beyin dokusunda dislipideminin ciddiyeti ile azaldığı ileri sürülmüştür (Yang ve ark. 2013). Patel ve Lau-Cam (2017) STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlar ile yaptıkları çalışmada MDA, SOD ve GPx konsantrasyonlarının beyin ve omurilikteki düzeylerini incelemişlerdir. Çalışmaya göre STZ'nin MDA düzeyini hem beyin hem de omurilikte belirgin bir şekilde arttırdığı, SOD ve GPx düzeylerini ise azalttığını göstermişlerdir. Buna ek olarak yapılan bir diğer çalışmada, beyin dokusundaki oksidatif stres belirteçlerinin ve SOD ve GPx gibi antioksidan enzimlerin STZ enjeksiyonuyla arttığı bildirilmiştir (Bathina ve ark. 2017). Çalışmamızda da bu bilgilerle benzer bir şekilde, STZ ile oluşturulan diyabetin hipokampus dokusundaki MDA, SOD ve GPx düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Angiotensin IV'ün oksidatif stres üzerine olan etkileri ile ilgili literatürdeki bilgiler henüz kısıtlı olsa da, bir angiotensin reseptör blokeri olan losartan ile yapılan bir çalışmada, losartanın AT1 reseptörünü bloke etmesi ile aktifleşen Ang IV/AT4R kaskadının Alzheimerlı sıçanlarda oksidatif hasara iyi geldiği ve kognitif fonksiyonlarda iyileştirici etkisinin olduğu ileri sürülmüştür (Royea ve ark. 2017). Çalışmamızda, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiş olsa dahi, Ang IV'ün ekzojen bir antioksidan olarak işlev gördüğü, bu nedenle oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Bu görüş endojen antioksidanlar olan SOD ve GPx ile lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyelerindeki bir miktar azalma ile de desteklenmektedir.

Diyabet, periferik ve merkezi sinir sisteminde fonksiyonel ve yapısal değişikliklere neden olur (Malone, 2016). Diyabetik polinöropati, duyusal, motor ve/veya otonomik fonksiyon bozukluğuna neden olan diyabetli hastaların % 50'sinde ortaya çıkan en yaygın nöropati şeklidir. Diabetes mellitus ayrıca, beyin atrofisi ve bilişsel gerileme dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi nörodejeneratif süreçlerine katkıda bulunur. Hem T1 hem de T2 diyabet hastalarında orta düzeyde öğrenme, hafıza ve karmaşık bilişsel işlev bozuklukları tespit edilirken, dikkat ve kısa süreli hafıza gibi temel bilişsel işlevlerin etkilenmediği bildirilmiştir (Saedi ve ark. 2016). STZ ile indüklenen diyabet modelinde kognitif fonksiyonları ölçmek için bir takım yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda STZ ile indüklenen diyabetin, sıçanlarda yiyecek ödülü için edimsel koşullanmayı bozmadığı ve pasif sakınma testini kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür (Flood ve ark. 1990; Klaeeswari ve ark. 1986). Aksine, Mayer ve ark. (1990) diyabetik sıçanlarda pasif sakınma testindeki latans sürelerinin arttığını göstermiştir. Diyabetik sıçanlarla yapılan çalışmalarda aktif sakınma, T-labirenti ve Morris su labirenti gibi daha karmaşık öğrenme testlerinde sıçanların performans kaybı gösterdiği ileri sürülmüştür (Tian ve ark. 2017; Grzeda ve ark. 2007). Elde edilen farklı sonuçlar, öğrenme deneyinin karmaşıklığı, kullanılan hayvan modeli ve diyabet süresindeki farklılıklarla açıklanabilir. Bunlara ek olarak, STZ ile indüklenen diyabet modelinde stresli uyaranlara verilen fizyolojik yanıtların, diyabetik olmayan sıçanlara göre daha fazla olduğuna dair çalışmalar vardır. Örneğin diyabetik sıçanlarda basit pasif sakınma yanıtının artması, ayak şokuna karşı artan hassasiyet ile ilişkilendirilmiştir (Flood ve ark. 1990). Lin ve ark. (2018) STZ ile oluşturdukları diyabetik sıçan modelinde Morris su labirenti testi uygulamış ve diyabetin mekansal öğrenme ile kognitif fonksiyon bozukluğuna neden olduğunu ileri sürmüştür. Buna ek olarak başka bir çalışmada da diyabetik sıçanların öğrenme testlerindeki performans bozuklukları hem uzun süreli bellek hem de çalışma belleğindeki bozulmalarla ilişkililendirilmiştir (Popoviç ve ark. 2001). Biz de çalışmamızda öğrenme ve bellek değerlendirmesi için pasif sakınma ve Morris su labirenti testlerini uyguladık. Pasif sakınma testinin sonuçlarına bakıldığında, diyabet grubunun karanlık bölmeye geçiş süresinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Buna ek olarak Morris su labirenti testinin öğrenme periyodundaki verilerine bakıldığında, diyabet grubundaki sıçanların platformu bulma süreleri diğer gruplara göre artarken, tank içindeki katettikleri mesafede buna paralel olarak artış gösterdi. Test periyodunda ise diyabet grubundaki sıçanların platformu bulma süreleri uzarken, platformun bulunduğu bölgede geçirdikleri

süre azaldı. Ayrıca yol haritalarına bakıldığında diyabetli sıçanların, kontrol gruplarına göre platforma ulaşmak için katettikleri mesafe daha karmaşık ve daha uzun bulundu. Bu bulgular, diyabet modelinin kognitif fonksiyon bozukluğuna yol açtığını gösteren diğer çalışmalarla uyumludur.

Renin-angiotensin sistemi, kardiyovasküler fonksiyonlar ile vücut sıvı homeostazının korunmasında önemli rol oynamaktadır. Her ne kadar RAS'nin başlangıçta sadece periferde olduğu düşünülse de, bu sistemin gerekli bileşenlerinin memeli beyninde de bulunduğu gösterilmiştir (De Bundel ve ark. 2008; Speth ve Karamyan 2008). Beyindeki RAS'ın yalnızca sıvı homeostazında rol oynamakla kalmayıp; öğrenme, hafıza, nöronal farklılaşma, sinir rejenerasyonu ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oyanadığı ileri sürülmüştür (Llorens-Cortes ve Mendelsohn 2002).

Angiotensin-(1-7) ve angiotensin IV gibi yakın zamanda keşfedilen çeşitli RAS bileşenlerinin aktivasyonunun beyin hasarı hayvan modellerinde nöroprotektif etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Angiotensin IV ve bunun çeşitli analoglarının, epilepsili hayvan modellerinde antikonvülsan etki gösterdiği (Stragier ve ark. 2007), beyin iskemisine karşı koruma sağladığı (Faure ve ark. 2006), aterosklerozlu hayvan modellerinde endotel fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Wayner ve ark. 2001). Bu sonuçlarla bağlantılı olarak yapılan otoradyografi çalışmaları ile, hipokampus, neokorteks ve Meynert'in bazal çekirdeği dahil olmak üzere, bilişsel süreçler için çok önemli olan alanlarda Ang IV'ün lokal bağlanma bölgeleri olduğu tespit edilmiştir (Chai ve ark. 2000; Wright ve Harding, 2008). Ang IV, angiotensin II'nin (Ang II) parçalanmasıyla oluşan endojen bir peptittir. Ana peptidinin aksine, Ang IV ve analoglarının etkilerine AT1R veya AT2R aracılık etmez. Biyolojik etkileri klasik AT1R ve AT2R antagonistleri losartan ve PD123177 tarafından engellenmez (Demaegdt ve ark. 2006). Bu bulgular, Ang IV'ün etkilerini AT4R olarak adlandırılan farklı bir reseptör aracılığıyla gerçekleştirdiğini göstermektedir (De Gasparo ve ark. 2000).

Ang IV'ün yanı sıra Ang IV'e yapısal benzerlik gösteren endojen LVV-hemorphin-7 gibi analogların da kognitif fonksiyonlar üzerine etkileri incelenmiştir. LVV-hemorphin-7, sıçanlarda hafızanın arttırılmasının güçlü bir destekleyicisidir. Yapılan bir çalışmada, Ang IV ve homoloğu LVV-H7'nin sıçanlara intraserebroventriküler (icv) enjeksiyonunun yükseltilmiş artı labirentinde kontrol

grubuna kıyasla performansı arttırdığı gösterilmiştir (De Bundel ve ark. 2009). Benzer bir çalışmada, Nle1-Ang IV ve LVV-H7'nin icv enjeksiyonunun kaçış tüneline ulaşma süresini ve katedilen mesafeyi kısalttığı ileri sürülmüştür. Nle1-Ang IV'ün faydalı etkileri, AT4 reseptörü antagonisti divalinal-Ang IV'ün birlikte uygulanmasıyla hafiflemiştir (Lee ve ark. 2004). Başka bir çalışmada, doğrudan nukleus basalis magnocellularis'e verilen divalinal-Ang IV ile tedavi edilen sıçanların, Morris su labirenti testinde gizli platformu bulma sürelerinin kontrole kıyasla önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Wilson ve ark. 2009). Wright ve ark.'nın (1999) yaptığı çalışmada Nle1-Ang IV tedavisinin Morris su labirenti testinde kontrol ve düşük afiniteli de olsa, AT4R'ye de bağlanan bir pentapeptid olan Angiotensin-(4-8) ile tedavi edilen sıçanlara kıyasla platform bölgesinden geçiş sıklığını artırdığını, platformu bulma süresini kısalttığını ve katedilen mesafeyi azalttığını tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışmada, divalinal-Ang IV ile tedavi edilen grupların, platformu bulma sürelerinin arttığı ve katettikleri mesafenin daha uzun olduğu gösterilmiştir (Wilson ve ark. 2009).

Bonini ve ark. (2006) aktif sakınma testini kullanarak yaptıkları çalışmada Ang IV, Ang- (1-7) ve Ang II'yi intrahipokampal olarak uygulamıştır. Çalışmanın sonucunda Ang IV ve Ang- (1-7)'nin aktif sakınma testinde herhangi bir etkisinin olmadığı, Ang II'nin ise doza bağımlı ve geri dönüşlü bir amnezi oluşturduğu kaydedilmiştir. Benzer şekilde, Kerr ve ark. (2005) Ang IV'ün intrahipokampal enjeksiyonunun fareler üzerinde pasif sakınma testinde bir fark yaratmadığı, Ang II'nin ise doza bağımlı olarak amnezik etki yarattığını bulmuştur. Bu bulguların aksine, Braszko ve ark. (2006) farelere icv enjeksiyonla Ang II uyguladıkları çalışmalarında, farelerin pasif sakınma ve obje tanıma testlerindeki performanslarının artması için Ang II'nin Ang IV'e dönüşmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Testten 5 veya 10 dakika önce enjekte edilen Ang II etkisiz kalırken, testten 15 dakika önce yapılan enjeksiyonun performansı arttırmada etkili olduğu bulunmuştur. Bu yazarlar, Ang II'nin Ang IV'e dönüşümünün bilişsel kolaylaştırma için gerekli olduğu ve dönüşümün 10 dakikadan daha uzun sürdüğü sonucuna varmıştır. Angiotensin IV'ün 1 nmol olarak verildiği benzer bir çalışma Golding ve ark. (2010) tarafından yapılmış olup Ang IV'ün icv enjeksiyonunun obje tanıma testinde performansı anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir. Bir başka çalışma grubu, Ang IV'ün 1 nmol icv enjeksiyonunun pasif sakınma testinde kaçış latansını arttırdığını ve Morris su labirenti testinde mekansal hafızanın artışına sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir (Wright ve Harding, 2009).

Çalışmamızın Morris su labirenti sonuçları incelendiğinde öğrenme periyodunda, Ang IV uygulanan grubun platformu bulma süresi ve katettiği mesafe kontrol grubuna göre daha kısaydı. Ang IV uygulanan diyabet grubunun platformu bulma süresi ve katettiği mesafeye bakıldığında ise diyabet grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edildi. Test periyodunda, platform bölgesinde geçirilen süre ve platform bölgesinden geçme sıklığı yine en yüksek Ang IV uygulanan grupta kaydedilirken, Ang IV uygulanan diyabet grubunun platform bölgesinde geçirdiği süre ve geçme sıklığı kontrol grubuna yaklaşmıştı. Grupların test periyodunda platform bölgesine ulaşma süreleri değerlendirildiğinde en yüksek sonuç diyabet grubuna aitken, Ang IV uygulamasının bu süreyi oldukça kısalttığı tespit edildi. Tüm grupların yüzme hızı değerlendirildiğinde ise gruplar arası herhangi bir fark tespit edilemedi. Bu sonuçlar diğer çalışmalarla paralel olarak Ang IV'ün mekânsal bellek üzerindeki olumlu etkilerini desteklemektedir.

Pasif sakınma testinin sonuçlarına bakıldığında, Ang IV uygulanan diyabet grubunun karanlık bölmeye geçiş latansının diyabet grubuna göre bir miktar yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak sıçanların öğrenme performansları, Morris su labirenti testindeki kadar başarılı olmamıştır. Bu sonuç Kerr ve ark. (2005)'nın yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir. Pasif sakınma testinde sıçanların daha düşük performans göstermelerinin nedeni, Ang IV'ün korku koşullanması üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmaması olabilir. Bu etki belki verilen dozun arttırılması ile belirginleşebilir.

Şimdiye kadar yapılan bir dizi öğrenme- bellek çalışması ile çalışmamızın Morris su labirenti ve pasif sakınma testi bulguları, öğrenme ve bellek sürecinde beyindeki Ang IV/AT4 kaskadının önemli bir rol oynadığını göstermektedir. AT4R'ler ve kolinerjik nöronlar korteks ve hipokampusta yakından ilişkilidir ve bu ilişki öğrenme ve hafızada temel bir rol oynar. Kemirgenlerde, hipokampustaki AT4R sinyali, glutamat ve asetilkolin salınımıyla aktifleşir (Lee ve ark. 2001).

Glutamat, memelilerin ve insanların merkezi sinir sistemindeki kritik uyarıcı, GABA ise temel baskılayıcı nörotransmiterdir. Glutamat öğrenme ve bellek oluşmasında, nöronlar arasındaki bağlantıyı kuvvetlendirerek etkin bir rol oynar. NMDA reseptörü, bir iyonotropik glutamat reseptörüdür ve pozitif yüklü iyonların hücre zarı boyunca akmasına izin vererek sinaptik plastisite ve hafıza fonksiyonunu kontrol etmek için büyük öneme sahiptir. $GABA_A$ reseptörü ise, GABA nörotransmitterinin bağlandığı iki temel reseptör

proteinden biridir. Nörotransmitter olarak GABA kullanan sinapsların büyük kısmında mevcut olup, klorür kanalı olarak işlev görmektedir. GABA reseptörlerinin uyarılması, hiperpolarizasyona neden olarak bu reseptörün bulunduğu hücrelerin aksiyon potansiyeli oluşturma olasılıklarını düşürür (Spitzer, 2010).

NMDA reseptörlerinin aktivasyonu, LTP ve LTD şeklinde hipokampal sinaptik plastisitenin indüklenmesi ve ekspresyonu için oldukça önemlidir (Al Marshad ve ark. 2018). Bu sinaptik plastisite formlarının her ikisi de hücresel seviyelerde hafıza ve öğrenme mekanizmaları olarak kabul edilir. NMDA reseptörlerinin bozulmuş sinaptik plastisitesinin veya azalmış aktivasyonunun sonuç olarak mekansal hafıza ve öğrenme bozukluklarına neden olacağı yaygın olarak kabul edilmektedir.

STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarla yapılan bir takım çalışmalarda, NMDA reseptörü alt tiplerinin DM'de önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Bean ve ark. 2006). Buna karşın GABA ile yapılan STZ çalışmalarında, yüksek GABA ve $GABA_A$ reseptörü konsantrasyonlarının bozulan uzamsal hafıza ve öğrenme ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (van Bussel ve ark. 2016; Datusalia ve Sharama 2016). Ayrıca, Kamal ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada sıçanlarda STZ ile indüklenen DM'nin LTP ve LTD indüksiyonunda kusurlara yol açtığını ve bunun öğrenme ve hafıza işlevlerinde bozulma ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda da bu sonuçlarla paralel olarak diyabet grubuna ait sıçanlarda, NMDA reseptörü seviyeleri oldukça azalırken, $GABA_A$ reseptörü seviyeleri ise artış göstermiştir. Diğer yandan, hem Ang IV, hem de Dia+Ang IV gruplarında NMDA reseptörü seviyeleri anlamlı olarak artarken, $GABA_A$ reseptörü seviyeleri azalmıştır. Bu da Ang IV/AT4R kaskadının NMDA reseptör ekspresyonunu arttırıp, $GABA_A$ ekspresyonunu baskılayarak kognitif fonksiyonları arttırdığını düşündürmektedir.

Tüm bunlara ek olarak, yapılan bazı çalışmalarda NMDA reseptörünün BDNF modülasyonunda da etkin rol oynadığı gösterilmiştir (Xu ve ark. 2006). BDNF, ilk olarak beyinde tanımlanmış olup daha sonra vücutta birçok dokuda ve özellikle bağırsakta bulunduğu keşfedilen, nöronlar arasında iletişimi arttırarak sinaptik plastisitenin arttırılmasında rol oynayan nörotrofin ailesinin bir üyesidir (Bathina ve Das 2015). Beyin esas olarak glikoza bağlı bir organ olduğundan, disfonksiyonu, hiperglisemide nöronal glikoz taşınması ve metabolizmasının bozulması, serbest radikal üretiminin artması ve BDNF'nin azalması nedeniyle oluşabilir (Binder ve Scharfman 2004).

BDNF nöronların hayatta kalmasında, büyümelerinde (aksonlar ve dendritler), sinaps oluşumunda, fonksiyonunda ve hiperglisemiyi azaltmada önemli bir rol oynar. Bu nedenle, düşük BDNF konsantrasyonları, diyabette bilişsel bozulmaya katkıda bulunabilir (Zhong ve ark. 2019). Bathina ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda beyin BDNF üretimininin baskılandığını ve buna bağlı olarak diabetes mellitusta görülen bozulmuş hafıza, öğrenme ve bilişsel işlev bozukluğunun BDNF eksikliğine bağlı olabileceğini ileri sürmüştür. Yapmış olduğumuz çalışmada, STZ grubunun hipokampusundaki azalan BDNF seviyesi ve öğrenme testlerindeki performans kaybı bu görüşü desteklemektedir.

Angiotensin sistem modülasyonunun, BDNF üretimini artırıp, antioksidan ve anti-inflamatuar etki göstererek kognitif fonksiyonları düzeltici etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (Schaich ve ark. 2016). Angiotensin reseptör blokeri olan candesartan ile yapılan bir çalışmada, BDNF'in doğrudan candesartan aracılı fonksiyonel iyileşme, anjiyogenez ve sinaptogenezde rol oynadığı ileri sürülmüştür (Fouda ve ark. 2017). Çalışmamızda diyabet grubunda anlamlı olarak azalan BDNF düzeyinin, Ang IV uygulanan gruplarda belirgin olarak arttığı belirlenmiştir.

AT4R etkileri, Ang IV ve analogları dışındaki ligandların bağlanmasıyla başlatılabilir; yapısal olarak farklı ligandlara LVV-H7'nin bağlanması, normal sıçanlarda kontrollere göre daha gelişmiş uzamsal hafıza ve pasif sakınma davranışına neden olmuştur (De Bundel ve ark. 2009). AT4R ligandı etkilerini, IRAP'ın kolinerjik hücre gövdeleri ve terminalleri ile beyindeki GLUT4 ile gerçekleştirir (Chai ve ark. 2000). LTP deneyleri, angiotensinlerin sinaptik iletimi modüle ettiğini göstermiştir. Ang II'nin disinhibisyon ile hipokampal CA1 nöronlarının uyarılabilirliğini arttırdığı öne sürülmüştür. Ayrıca Ang IV, CA1 nöronlarının ateşlenmesini de kolaylaştırır (Kramar ve ark. 2001). CA1 piramidal nöronlarında LTP indüksiyonu, hem NMDA reseptörü hem de voltaja bağlı kalsiyum kanallarının aracılık ettiği, post-sinaptik membrana Ca^{+2} girişine gereksinim duyar. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, Ang II ve Nle1-Ang IV'ün hipokampusa enjeksiyonu ile dentat granül hücrelerinde LTP'yi kolaylaştırdıkları ileri sürülmüştür (Wayner ve ark. 2001). Kramar ve ark. (2001) AT4 reseptörü agonisti Nle1-Ang IV uygulamasının, sinaptik iletim ve LTP'yi arttırdığını, AT4 reseptörü antagonisti Nle1-Leual3-Ang IV'in infüzyonunun ise LTP'nin stabilizasyonunu bozduğunu

göstermişlerdir. Bu çalışmalara göre Ang IV yoluyla AT4 reseptörü uyarımının LTP'yi kolaylaştırarak öğrenmeyi arttırdığı düşünülebilir.

Son on yılda, ACE, Ang II ve AT1R'yi içeren klasik RAS ekseninin aktivasyonunun, diyabetik kardiyomiyopati ve diyabetik nefropati gibi diyabetle ilgili çoklu komplikasyonların patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Gagliardini ve ark. 2013). Periferik dokulardaki bulgulara benzer şekilde, diyabetik sıçanların beyinlerinde, kognitif fonksiyon bozukluğuna ve demansa yol açan, nöropatolojiyi ağırlaştırabilen artmış Ang II seviyeleri gözlenmiştir (Tian ve ark. 2012). RAS'ın yeni bir heptapeptiti olan ve Ang II'nin etkilerinin çoğunun dengelenmesine etki eden angiotensin- (1-7) son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Ang- (1-7), Ang II'den angiotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE2) tarafından oluşturulan, esas olarak MAS reseptörü (MasR) olarak adlandırılan bir G-protein-bağlı reseptöre bağlanma yoluyla etkileyen, endojen bir peptittir. Yeni tanımlanan ACE2/Ang- (1-7) / Mas ekseni, klasik RAS ekseninin etkilerine karşı nöroprotektif etkilere sahiptir. Mas reseptörüne bağlanmasından sonra, Ang- (1-7), uzun süreli hafıza ve bellekte çok önemli hücreler arası haberciler olan prostanoidlerin ve nitrik oksidin salınmasını sağlar (Santos ve ark. 2000). Fokal serebral iskemi yapılan bir çalışmada, sıçanlara Ang-(1-7) icv infüzyonunun, beyin kılcal damarlarının yoğunluğunu anlamlı bir şekilde artırdığı, bölgesel serebral kan akımını artırdığı ve kalıcı serebral arter tıkanıklığının ardından enfarktüs hacmini ve nörolojik defisitleri azalttığı bulunmuştur. Çalışmada, Ang- (1-7) reseptörünün antagonisti olan A-779, nöroprotektif etkileri ortadan kaldırmıştır veya hafifletmiştir. Bu da Ang-(1-7)-Mas ekseninin önemini vurgulamaktadır (Jiang ve ark. 2014).

Normal insan böbreklerinde düşük miktarda ACE, yüksek miktarda ACE2 düzeyleri mevcutken, diyabetin ACE ekspresyonunu belirgin şekilde arttırdığı ve ACE2 ekspresyonunu azaldığı bildirilmiştir. RAS blokajının ACE2 aktivitesini ve idrar Ang-(1-7) atılımını önemli ölçüde arttırdığı, buna bağlı olarak da ACE/Ang II/AT1R ekseninin aşağı yönde düzenlenmesiyle ACE2 ve MasR ekspresyonunun artabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, ACE2 ekspresyonu diyabetle anlamlı olarak azaldı. Elde ettiğimiz sonuçlarla tutarlı olarak, Chen ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada diyabetik sıçanların beyinlerindeki ACE2 seviyelerini anlamlı olarak azaldığını bulmuşlardır. Çalışmada, diyabetik sıçanlarda Ang- (1-7) takviyesinin ACE2 ve MasR

ekspresyonunu anlamlı şekilde artırdığını ve kognitif fonksiyonları belirgin ölçüde düzelttiğini belirtmişlerdir. Ancak bizim çalışmamızda, ACE2 ekspresyonu, Ang IV enjeksiyonu yapılan grupta anlamlı olarak artarken, Ang IV enjeksiyonu yapılan diyabetik sıçanlarda ise anlamlı şekilde azaldı. Ang II'nin, ACE2 tarafından Ang (1-7)'ye dönüştürülerek MasR/PI3K/Akt (Mas reseptörü/fosfotidilinositol-3-kinaz/protein kinaz B) yolağı üzerinden BDNF ekspresyonunun artışına neden olduğu gösterilmiştir (Kamel ve ark. 2018). Ayrıca, ACE2 geni susturulmuş farelerle yapılan başka bir çalışmada, ACE2 eksikliğinin kognitif fonksiyonları bozduğu, bunun da artan oksidatif stres ve buna bağlı olarak azalan BDNF seviyesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Wang ve ark. 2016). Çalışmamızda, Ang IV normal sıçanlarda ACE2 ekspresyonunu arttırırken, diyabetik sıçanlarda artış gözlenmemiştir. Bu bulgunun ışığında diyabetin Ang IV'ün ACE2 ekspresyonunun artmasına neden olan muhtemel yolakların herhangi bir noktasında baskılanmaya neden olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle ACE2 ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak Kamel ve ark. (2018) tarafından ileri sürülen muhtemel yolağın baskılandığı ve nihayetinde BDNF seviyesinin azaldığı görüşünü teyit etmekteyiz. Bulgularımıza dayanarak BDNF seviyesinin azalmasına neden olan olası mekanizmanın diyabetle artan oksidatif hasara bağlı ACE2 yolağının baskılanması olduğunu düşünmekteyiz.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, Ang IV'ün farklı uygulama yöntemleriyle, kognitif fonksiyonlar üzerine etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışmaya karşın, STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda kognitif fonksiyonlar ve oksidatif stres üzerindeki etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma olması nedeniyle çalışmamız bu alandaki eksikliğe bir katkı sağlamıştır. Çalışmamızda Ang IV'ün gerek hücresel gerek fonksiyonel düzeyde kognisyon üzerine olumlu etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, Ang IV'ün ACE2/Ang-(1-7)/MasR yolağı ile de bağlantısının olabileceği, ancak öğrenme ve bellekteki rollerinin ve bağlantılarının farklı yöntemlerle araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda subkutan olarak verilen Ang IV'ün dolaşımda bol miktarda bulunan peptidazlar tarafından hızlı bir şekilde bozunması ve kortekse girme şansının az olması gibi sebeplerle öğrenme üzerinde bir etkisinin olamayacağı öne sürülse de, çalışmamız, periferik olarak uygulanan angiotensin IV'ün sıçanlarda öğrenme performansını belirgin biçimde artırabileceğini, aynı zamanda diyabetle gelişen okdisatif

hasarı iyileştirici etkisi olduğunu da göstermektedir. Bu farklı bulgular, angiotensin IV'ün öğrenme ve hafıza üzerindeki geniş kapsamlı etkilerini göstermektedir ve periferik uygulama olasılığının terapötik potansiyelini öne çıkarmaktadır.

Çalışmamızın sonuçları özetlenecek olursa Ang IV'ün;

- Hiperglisemiye ve diyabetle kaybedilen vücut ağırlığına herhangi bir etkisinin olmadığı,

- Diyabetle gelişen hipokampal oksidatif strese karşı olumlu etkisinin olduğu,

- Diyabetik sıçanlarda bozulan mekânsal öğrenme ve bellek üzerinde olumlu etkisi olduğu,

-Öğrenme-bellek mekanizmasına katkısını BDNF ve NMDA reseptörü seviyelerini arttırıp, $GABA_A$ reseptörü seviyesini azaltarak gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Al Marshad, R., Al Khatib, R., Amer, H., Al Shammari, M., Al Otaibi, A., Al Otaibi, F.,Behbehani, N., Al Sayed, A., Al Hoty, N., Hassan, Z., Kamal, A. (2018). Streptozotocin-induced diabetes mellitus affects the NMDA receptors: Role of caffeine administration in enhancing learning, memory and locomotor deficits. *International journal of health sciences*, *12 (3),* 10.

Alam, U., Asghar, O., Azmi, S., & Malik, R. A. (2014). General aspects of diabetes mellitus. *In Handbook of clinical neurology*, *126*, 211-222.

Albiston, A. L., Mustafa, T., McDowall, S. G., Mendelsohn, F. A., Lee, J., & Chai, S. Y. (2003). AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *14(2),* 72-77.

Alonso, M., Vianna, M. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2002). Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cellular and molecular neurobiology*, *22(5-6),* 663-674.

Aragno, M., Mastrocola, R., Medana, C., Restivo, F., Catalano, M. G., Pons, N., ... & Boccuzzi, G. (2005). Up-regulation of advanced glycated products receptors in the brain of diabetic rats is prevented by antioxidant treatment. *Endocrinology*, *146(12),* 5561-5567.

Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *24(5),* 547-553.

Autry, A. E., & Monteggia, L. M. (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological reviews*, *64(2),* 238-258.

Barde, Y. A., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal*, *1(5),* 549-553.

Bathina, S., Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of medical science*: *AMS, 11(6),* 1164.

Bathina, S., Srinivas, N., & Das, U. N. (2017). Streptozotocin produces oxidative stress, inflammation and decreases BDNF concentrations to induce apoptosis of RIN5F cells and type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. *Biochemical and biophysical research communications, 486(2),* 406-413.

Bean, L., Zheng, H., Patel, K. P., & Monaghan, D. T. (2006). Regional variations in NMDA receptor downregulation in streptozotocin-diabetic rat brain. *Brain research, 1115(1),* 217-222.

Belfort-DeAguiar, R., Constable, R. T., & Sherwin, R. S. (2014). Functional MRI signal fluctuations: a preclinical biomarker for cognitive impairment in type 2 diabetes? *Diabetes, 63(2),* 396-398.

Biessels, G. J., & Gispen, W. H. (2005). The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiology of aging, 26(1),* 36-41.

Binder, D. K., Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors (Chur, Switzerland), 22(3),* 123.

Bodiga, V. L., & Bodiga, S. (2013). Renin angiotensin system in cognitive function and dementia. *Asian journal of Neuroscience, 2013,* 2013.

Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R., Zinn, C. G., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Hormones and behavior, 50(2),* 308-313.

Brands, A. M., Biessels, G. J., de Haan, E. H., et al. (2005) The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care. (28)* 726–735.

Braszko, J. J., Walesiuk, A., & Wielgat, P. (2006). Cognitive effects attributed to angiotensin II may result from its conversion to angiotensin IV. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 7(3),* 168-174.

Cefalu, W. T., Rood, J., Pinsonat, P., Qin, J., Sereda, O., Levitan, L., & Wang, Z. Q. (2010). Characterization of the metabolic and physiologic response to chromium supplementation in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism, 59(5),* 755-762.

Ceriello, A. (2003). New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes care, 26(5),* 1589-1596.

Chai, S. Y., Bastias, M. A., Clune, E. F., Matsacos, D. J., Mustafa, T., Lee, J. H., ... & Paxinos, G. (2000). Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. *Journal of chemical neuroanatomy, 20(3-4),* 339-348.

Chai, S. Y., Bastias, M. A., Clune, E. F., Matsacos, D. J., Mustafa, T., Lee, J. H., ... & Paxinos, G. (2000). Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. *Journal of chemical neuroanatomy, 20(3-4),* 339-348.

Chai, S. Y., Fernando, R., Peck, G., Ye, S. Y., Mendelsohn, F. A., Jenkins, T. A., & Albiston, A. L. (2004). The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cellular and molecular life sciences: CMLS, 61(21),* 2728-2737.

Chai, S. Y., Yeatman, H. R., Parker, M. W., Ascher, D. B., Thompson, P. E., Mulvey, H. T., & Albiston, A. L. (2008). Development of cognitive enhancers based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase. *BMC neuroscience, 9(2),* S14.

Chater, T. E., & Goda, Y. (2014). The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience, 8,* 401.

Chen, J. L., Zhang, D. L., Sun, Y., Zhao, Y. X., Zhao, K. X., Pu, D., & Xiao, Q. (2017). Angiotensin-(1–7) administration attenuates Alzheimer’s disease-like neuropathology in rats with streptozotocin-induced diabetes via Mas receptor activation. *Neuroscience, 346,* 267-277.

Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., & Mecocci, P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine, 39(7),* 841-852.

Chrissobolis, S., Miller, A. A., Drummond, G. R., Kemp-Harper, B. K., & Sobey, C. G. (2011). Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition), 16,* 1733-1745.

Cirulli, F., Berry, A., Chiarotti, F., & Alleva, E. (2004). Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus, 14(7),* 802-807.

Cooke, S. F., & Bear, M. F. (2010). Visual experience induces long-term potentiation in the primary visual cortex. *Journal of Neuroscience, 30(48),* 16304-16313.

Crawford K. (2017) Diabetes standards of care. *Nursing Clinics of North America; 52*:621-663.

Davis, C. J., Kramar, E. A., De, A., Meighan, P. C., Simasko, S. M., Wright, J. W., & Harding, J. W. (2006). AT4 receptor activation increases intracellular calcium influx and induces a non-N-methyl-D-aspartate dependent form of long-term potentiation. *Neuroscience, 137(4),* 1369-1379.

De Bundel, D., Demaegdt, H., Lahoutte, T., Caveliers, V., Kersemans, K., Ceulemans, A. G., & Smolders, I. (2010). Involvement of the AT1 receptor subtype in the effects of angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 on hippocampal neurotransmitter levels and spatial working memory. *Journal of neurochemistry, 112(5),* 1223-1234.

De Bundel, D., Smolders, I., Vanderheyden, P., & Michotte, Y. (2008). Ang II and Ang IV: unraveling the mechanism of action on synaptic plasticity, memory, and epilepsy. *CNS neuroscience & therapeutics, 14(4),* 315-339.

De Bundel, D., Smolders, I., Yang, R., Albiston, A. L., Michotte, Y., & Chai, S. Y. (2009). Angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 enhance spatial working memory in rats: effects on hippocampal glucose levels and blood flow. *Neurobiology of learning and memory, 92(1),* 19-26.

De Bundel, D., Smolders, I., Yang, R., Albiston, A. L., Michotte, Y., & Chai, S. Y. (2009). Angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 enhance spatial working memory in rats: effects on hippocampal glucose levels and blood flow. *Neurobiology of learning and memory, 92(1),* 19-26.

De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., & Unger, T. H. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews, 52(3),* 415-472.

Demaegdt, H., Lenaerts, P. J., Swales, J., De Backer, J. P., Laeremans, H., Le, M. T., ... & Vauquelin, G. (2006). Angiotensin AT4 receptor ligand interaction with cystinyl aminopeptidase and aminopeptidase N:[125I] Angiotensin IV only binds to the cystinyl aminopeptidase apo-enzyme. *European journal of pharmacology, 546(1-3),* 19-27.

Domingueti, C. P., Dusse, L. M. S. A., das Graças Carvalho, M., de Sousa, L. P., Gomes, K. B., & Fernandes, A. P. (2016). Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. Journal of *Diabetes and its Complications, 30(4),* 738-745.

Ekmekçi, A. (2014). Tıbbi Biyoloji ve Genetik. Ankara

El Messari, S., Aït-Ikhlef, A., Ambroise, D. H., Penicaud, L., & Arluison, M. (2002). Expression of insulin-responsive glucose transporter GLUT4 mRNA in the rat brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *Journal of chemical neuroanatomy, 24(4),* 225-242.

Faure, S., Chapot, R., Tallet, D., Javellaud, J., Achard, J. M., & Oudart, N. (2006). Cerebroprotective effect of angiotensin ıv in experimental ischemic stroke in the rat mediated by at 4 receptors. *Journal of Physiology and Pharmacology. Sep;57(3):*329-42

Fidalgo, S., Skipper, C., Takyi, A., McIver, A., Tsiligkaridis, T., Quadir, A., & Gard, P. R. (2017). Low-dose chronic prenatal alcohol exposure abolishes the pro-cognitive effects of angiotensin IV. *Behavioural brain research, 329,* 140-147.

Flood, J. F., Mooradian, A. D., & Morley, J. E. (1990). Characteristics of learning and memory in streptozocin-induced diabetic mice. *Diabetes, 39(11*), 1391-1398.

Fouda, A. Y., Alhusban, A., Ishrat, T., Pillai, B., Eldahshan, W., Waller, J. L., ... & Fagan, S. C. (2017). Brain-derived neurotrophic factor knockdown blocks the angiogenic and

protective effects of angiotensin modulation after experimental stroke. *Molecular neurobiology, 54(1),* 661-670.

Fouda, A. Y., Artham, S., El-Remessy, A. B., & Fagan, S. C. (2016). Renin–angiotensin system as a potential therapeutic target in stroke and retinopathy: experimental and clinical evidence. *Clinical science, 130(4*), 221-238.

Fountain, J. H., & Lappin, S. L. (2019). Physiology, Renin Angiotensin System. *StatPearls Publishing.*

Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology, 70(1),* 5-47.

Gagliardini, E., Perico, N., Rizzo, P., Buelli, S., Longaretti, L., Perico, L., ... & Remuzzi, G. (2013). Angiotensin II contributes to diabetic renal dysfunction in rodents and humans via Notch1/Snail pathway. *The American journal of pathology, 183(1),* 119-130.

Gard, P. R., Daw, P., Sayyad Mashhour, Z., & Tran, P. (2007). Interactions of angiotensin IV and oxytocin on behaviour in mice. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 8(3),* 133-138.

Golding, B. J., Overall, A. D., Brown, G., & Gard, P. R. (2010). Strain differences in the effects of angiotensin IV on mouse cognition. *European journal of pharmacology, 641(2-3),* 154-159.

Grzeda, E., Wiśniewska, R. J., & Wiśniewski, K. (2007). Effect of an NMDA receptor agonist on T-maze and passive avoidance test in 12-week streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological reports: PR, 59(6),* 656-663.

Guimond, M. O., & Gallo-Payet, N. (2012). The angiotensin II type 2 receptor in brain functions: an update. *International journal of hypertension.* 2012: 351758.

Hajipour, S., Sarkaki, A., Farbood, Y., Eidi, A., Mortazavi, P., & Valizadeh, Z. (2016). Effect of gallic acid on dementia type of Alzheimer disease in rats: electrophysiological and histological studies. *Basic and clinical neuroscience, 7(2),* 97.

Hamel, E., Royea, J., Ongali, B., & Tong, X. K. (2016). Neurovascular and cognitive failure in Alzheimer's disease: benefits of cardiovascular therapy. *Cellular and molecular neurobiology, 36(2),* 219-232.

Haskıns, K., Bradley, B., powers, K., fadok, V., flores, S., lıng, X., ... & kench, J. (2003). Oxidative stress in type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1005(1),* 43-54.

Henley, J. M., & Wilkinson, K. A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience, 17(6),* 337.

Huang, W. C., Juang, S. W., Liu, I. M., Chi, T. C., & Cheng, J. T. (1999). Changes of superoxide dismutase gene expression and activity in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience letters, 275(1),* 25-28.

Igić, R., & Škrbić, R. (2014). The renin-angiotensin system and its blockers. *Serbian Archives of Medicine, 142(11-12*), 756-763.

Jackson, L., Eldahshan, W., Fagan, S., & Ergul, A. (2018). Within the brain: the renin angiotensin system. *International journal of molecular sciences, 19(3*), 876.

Jiang, T., Yu, J. T., Zhu, X. C., Zhang, Q. Q., Tan, M. S., Cao, L., ... & Tan, L. (2014). Angiotensin-(1–7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. *British journal of pharmacology, 171(18),* 4222-4232.

Jovanovic, J. N., Thomas, P., Kittler, J. T., Smart, T. G., & Moss, S. J. (2004). Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABAA receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *Journal of Neuroscience, 24(2),* 522-530.

Kafitz, K. W., Rose, C. R., Thoenen, H., & Konnerth, A. (1999). Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature, 401(6756),* 918.

Kaleeswari, R., Thombre, D. P., & Chakrabarty, A. S. (1986). Acute effect of streptozotocin induced diabetes on bar pressing for food reward in albino rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology, 30,* 319-321.

Kamal, A., Biessels, G. J., Duis, S. E. J., & Gispen, W. H. (2000). Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia, 43(4),* 500-506.

Kamel, A. S., Abdelkader, N. F., El-Rahman, S. S. A., Emara, M., Zaki, H. F., & Khattab, M. M. (2018). Stimulation of ACE2/ANG (1–7)/Mas axis by diminazene ameliorates Alzheimer's disease in the D-galactose-ovariectomized rat model: Role of PI3K/Akt pathway. *Molecular neurobiology, 55(10),* 8188-8202.

Karpova, N. N. (2014). Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. *Neuropharmacology, 76,* 709-718.

Kaschina, E., & Unger, T. (2003). Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood pressure, 12(2),* 70-88.

Kawamoto, Y., Nakamura, S., Nakano, S., Oka, N., Akiguchi, I., & Kimura, J. (1996). Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience, 74(4),* 1209-1226.

Kawamura, T., Umemura, T., & Hotta, N. (2012). Cognitive impairment in diabetic patients: can diabetic control prevent cognitive decline? *Journal of Diabetes Investigation, 3(5*), 413-423.

Kerr, D. S., Bevilaqua, L. R., Bonini, J. S., Rossato, J. I., Köhler, C. A., Medina, J. H., ... & Cammarota, M. (2005). Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT 2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology, 179(3),* 529-535.

Kodl, C. T., & Seaquist, E. R. (2008). Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocrine reviews, 29(4),* 494-511.

Koekkoek, P. S., Kappelle, L. J., van den Berg, E., Rutten, G. E., & Biessels, G. J. (2015). Cognitive function in patients with diabetes mellitus: guidance for daily care. The *Lancet Neurology, 14(3),* 329-340.

Kramár, E. A., Armstrong, D. L., Ikeda, S., Wayner, M. J., Harding, J. W., & Wright, J. W. (2001). The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus in vitro. *Brain research, 897(1-2),* 114-121.

Kumar Datusalia, A., Sunder Sharma, S. (2016). NF-κB inhibition resolves cognitive deficits in experimental type 2 diabetes mellitus through CREB and glutamate/GABA neurotransmitters pathway. *Current neurovascular research, 13(1),* 22-32.

Lee, J., Albiston, A. L., Allen, A. M., Mendelsohn, F. A. O., Ping, S. E., Barrett, G. L., ... & Chai, S. Y. (2004). Effect of ICV injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats. *Neuroscience, 124(2),* 341-349.

Lee, J., Chai, S. Y., Mendelsohn, F. A., Morris, M. J., & Allen, A. M. (2001). Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7. *Neuropharmacology, 40(4),* 618-623.

Lin, L. W., Tsai, F. S., Yang, W. T., Lai, S. C., Shih, C. C., Lee, S. C., & Wu, C. R. (2018). Differential change in cortical and hippocampal monoamines, and behavioral patterns in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Iranian journal of basic medical sciences, 21(10),* 1026.

Llorens-Cortes, C., & Mendelsohn, F. A. (2002). Organisation and functional role of the brain angiotensin system. *Journal Of The Renin Angiotensin Aldosterone System, 3,* S39-S48.

Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (2000). Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(20),* 11056-11061.

Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science, 285(5435),* 1870-1874.

Malone, J. I. (2016). Diabetic central neuropathy: CNS damage related to hyperglycemia. *Diabetes, 65(2),* 355-357.

Manschot, S. M., Brands, A. M., van der Grond, J., Kessels, R. P., Algra, A., Kappelle, L. J., & Biessels, G. J. (2006). Brain magnetic resonance imaging correlates of impaired cognition in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, 55(4),* 1106-1113.

Mayer, G., Nitsch, R., & Hoyer, S. (1990). Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain research, 532(1-2),* 95-100.

McCrimmon, R. J., Ryan, C. M., & Frier, B. M. (2012). Diabetes and cognitive dysfunction. *The Lancet, 379(9833),* 2291-2299.

Mentz, R. J., Bakris, G. L., Waeber, B., McMurray, J. J., Gheorghiade, M., Ruilope, L. M. & O'Connor, C. M. (2013). The past, present and future of renin–angiotensin aldosterone system inhibition. *International journal of cardiology, 167(5),* 1677-1687.

Miles, W. R., & Root, H. F. (1922). Psychologic tests applied to diabetic patients. *Archives of Internal Medicine, 30(6),* 767-777.

Moheet, A., Mangia, S., & Seaquist, E. R. (2015). Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1353,* 60.

Murer, M. G., Yan, Q., & Raisman-Vozari, R. (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in neurobiology, 63(1),* 71-124.

Muriach, M., Flores-Bellver, M., Romero, F. J., & Barcia, J. M. (2014). Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxidative medicine and cellular longevity, 2014,* 102158

Nicoll, R. A. (2017). A brief history of long-term potentiation. *Neuron, 93(2),* 281-290.

Northam, E. A., Anderson, P. J., Jacobs, R., Hughes, M., Warne, G. L., & Werther, G. A. (2001). Neuropsychological profiles of children with type 1 diabetes 6 years after disease onset. *Diabetes care, 24(9),* 1541-1546.

Palleria, C., Leo, A., Andreozzi, F., Citraro, R., Iannone, M., Spiga, R., & Russo, E. (2017). Liraglutide prevents cognitive decline in a rat model of streptozotocin-induced diabetes independently from its peripheral metabolic effects. *Behavioural brain research, 321,* 157-169.

Papatheodorou, K., Banach, M., Bekiari, E., Rizzo, M., & Edmonds, M. (2018). Complications of diabetes. *Journal of diabetes research, 2018,* 3086167

Paris, J. J., Eans, S. O., Mizrachi, E., Reilley, K. J., Ganno, M. L., & McLaughlin, J. P. (2013). Central administration of angiotensin IV rapidly enhances novel object recognition among mice. *Neuropharmacology*, *70*, 247-253.

Patel, R., Shervington, A., Pariente, J. A., MARTINEZ-BURGOS, M. A., Salido, G. M., Adeghate, E., & Singh, J. (2006). Mechanism of exocrine pancreatic insufficiency in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1084(1)*, 71-88.

Patel, S. N., & Lau-Cam, C. A. (2017). The effect of taurine and its immediate homologs on diabetes-induced oxidative stress in the brain and spinal cord of rats. *In Taurine 10 (pp. 337-351).* Springer, Dordrecht.

Perantie, D. C., Lim, A., Wu, J., Weaver, P., Warren, S. L., Sadler, M., ... & Hershey, T. (2008). Effects of prior hypoglycemia and hyperglycemia on cognition in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric diabetes*, *9(2)*, 87-95.

Popoviç, M., Biessels, G. J., Isaacson, R. L., & Gispen, W. H. (2001). Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task. *Behavioural brain research*, *122(2),* 201-207.

Pournaghi, P., Sadrkhanlou, R. A., Hasanzadeh, S., & Foroughi, A. (2012). An investigation on body weights, blood glucose levels and pituitary-gonadal axis hormones in diabetic and metformin-treated diabetic female rats. *In Veterinary research forum* (Vol. 3, No. 2, p. 79). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Ramakrishnan, R., Sheeladevi, R., & Suthanthirarajan, N. (2004). PKC-α mediated alterations of indoleamine contents in diabetic rat brain. *Brain research bulletin, 64(2),* 189-194.

Raza, H., John, A., & Howarth, F. C. (2015). Increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction in zucker diabetic rat liver and brain. *Cellular Physiology and Biochemistry, 35(3),* 1241-1251.

Royea, J., Zhang, L., Tong, X. K., & Hamel, E. (2017). Angiotensin IV receptors mediate the cognitive and cerebrovascular benefits of losartan in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience, 37(22),* 5562-5573.

Sadeghi, A., Hami, J., Razavi, S., Esfandiary, E., & Hejazi, Z. (2016). The effect of diabetes mellitus on apoptosis in hippocampus: cellular and molecular aspects. *International journal of preventive medicine*, 7.

Saedi, E., Gheini, M. R., Faiz, F., & Arami, M. A. (2016). Diabetes mellitus and cognitive impairments. *World journal of diabetes, 7(17),* 412.

Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., & Andrade, S. P. (2000). Angiotensin-(1–7): an update. *Regulatory peptides, 91(1-3),* 45-62.

Schaaf, M. J. M., Sibug, R. M., Duurland, R., Fluttert, M. F., Oitzl, M. S., De Kloet, E. R., & Vreugdenhil, E. (1999). Corticosterone effects on BDNF mRNA expression in the rat hippocampus during morris water maze training. *Stress, 3(2),* 173-183.

Schaich, C. L., Wellman, T. L., Koi, B., & Erdos, B. (2016). BDNF acting in the hypothalamus induces acute pressor responses under permissive control of angiotensin II. *Autonomic Neuroscience, 197*, 1-8.

Selvarajah, D., & Tesfaye, S. (2006). Central nervous system involvement in diabetes mellitus. *Current diabetes reports, 6(6),* 431-438.

Sima, A. A., & Li, Z. G. (2005). The effect of C-peptide on cognitive dysfunction and hippocampal apoptosis in type 1 diabetic rats. *Diabetes, 54(5),* 1497-1505.

Skenazy, J. A., & Bigler, E. D. (1984). Neuropsychological findings in diabetes mellitus. *Journal of Clinical Psychology, 40(1),* 246-258.

Sommerfield, A. J., Deary, I. J., & Frier, B. M. (2004). Acute hyperglycemia alters mood state and impairs cognitive performance in people with type 2 diabetes. *Diabetes care, 27(10)*, 2335-2340.

Speth, R. C., & Karamyan, V. T. (2008). The significance of brain aminopeptidases in the regulation of the actions of angiotensin peptides in the brain. *Heart failure reviews, 13(3)*, 299-309.

Spitzer, N. C. (2010). How GABA generates depolarization. *The Journal of physiology, 588(Pt 5)*, 757.

Stragier, B., Clinckers, R., Meurs, A., De Bundel, D., Sarre, S., Ebinger, G., & Smolders, I. (2006). Involvement of the somatostatin-2 receptor in the anti-convulsant effect of angiotensin IV against pilocarpine-induced limbic seizures in rats. *Journal of neurochemistry, 98(4)*, 1100-1113.

Stragier, B., Demaegdt, H., De Bundel, D., Smolders, I., Sarre, S., Vauquelin, G.,& Vanderheyden, P. (2007). Involvement of insulin-regulated aminopeptidase and/or aminopeptidase N in the angiotensin IV-induced effect on dopamine release in the striatum of the rat. *Brain research, 1131*, 97-105.

Tian, M., Zhu, D., Xie, W., & Shi, J. (2012). Central angiotensin II-induced Alzheimer-like tau phosphorylation in normal rat brains. *FEBS letters, 586(20)*, 3737-3745.

Tian, Z., Wang, J., Wang, Y., Zhang, M., & Zhou, Y. (2017). Effects of butylphthalide on cognitive decline in diabetic rats. *Molecular medicine reports, 16(6*), 9131-9136.

Tigerstedt, R., & Bergman, P. Q. (1898). *Niere und Kreislauf 1. Skandinavisches Archiv für Physiologie, 8(1)*, 223-271.

Tomlinson, D. R., & Gardiner, N. J. (2008). Glucose neurotoxicity. Nature Reviews *Neuroscience, 9(1)*, 36.

Ugochukwu, N. H., & Cobourne, M. K. (2003). Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from Gongronema latifolium leaves. *Clinica Chimica Acta, 336(1-2)*, 73-81.

Van Bussel, F. C., Backes, W. H., Hofman, P. A., Puts, N. A., Edden, R. A., Van Boxtel, M. P., ... & Jansen, J. F. (2016). Increased GABA concentrations in type 2 diabetes mellitus are related to lower cognitive functioning. *Medicine, 95(36).*

Vanderheyden, P. M. (2009). From angiotensin IV binding site to AT4 receptor. *Molecular and cellular endocrinology, 302(2),* 159-166.

Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., dos Anjos, P. M. F., & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell death & disease, 9(2),* 119.

Wang, X. L., Iwanami, J., Min, L. J., Tsukuda, K., Nakaoka, H., Bai, H. Y., ... & Yamauchi, T. (2016). Deficiency of angiotensin-converting enzyme 2 causes deterioration of cognitive function. *NPJ aging and mechanisms of disease, 2, 16024.*

Wayner, M. J., Armstrong, D. L., Phelix, C. F., Wright, J. W., & Harding, J. W. (2001). Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo. *Peptides, 22(9),* 1403-1414.

Weinger, K., Jacobson, A. M., Musen, G., Lyoo, I. K., Ryan, C. M., Jimerson, D. C., & Renshaw, P. F. (2008). The effects of type 1 diabetes on cerebral white matter. *Diabetologia, 51(3),* 417-425.

West, I. C. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine, 17(3),* 171-180.

Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. T., & Vander, A. J. (2008). *Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function.* Boston: McGraw-Hill Higher Education, pp. 269-270.

Wilson, W. L., Munn, C., Ross, R. C., Harding, J. W., & Wright, J. W. (2009). The role of the AT4 and cholinergic systems in the Nucleus Basalis Magnocellularis (NBM): effects on spatial memory. *Brain research, 1272*, 25-31.

World Health Organization. (2019). *Classification of diabetes mellitus.* World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/325182. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wright, J. W., & Harding, J. W. (2008). The angiotensin AT4 receptor subtype as a target for the treatment of memory dysfunction associated with Alzheimer's disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 9(4)*, 226-237.

Wright, J. W., & Harding, J. W. (2009). The brain angiotensin IV/AT4 receptor system as a new target for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Development Research, 70(7)*, 472-480.

Wright, J. W., & Harding, J. W. (2013). The brain renin–angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 465(1)*, 133-151.

Wright, J. W., Stubley, L., Pederson, E. S., Kramár, E. A., Hanesworth, J. M., & Harding, J. W. (1999). Contributions of the brain angiotensin IV–AT4 receptor subtype system to spatial learning. *Journal of Neuroscience, 19(10)*, 3952-3961.

Xu, F., Plummer, M. R., Len, G. W., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Black, I. B., & Wu, K. (2006). Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases NMDA receptor channel activity through Fyn-mediated phosphorylation. *Brain research, 1121(1)*, 22-34.

Yamato, T., Misumi, Y., Yamasaki, S., Kino, M., & Aomine, M. (2004). Diabetes mellitus decreases hippocampal release of neurotransmitters: an in vivo microdialysis study of awake, freely moving rats. *Diabetes, nutrition & metabolism, 17(3)*, 128-136.

Yang, H., Fan, S., Song, D., Wang, Z., Ma, S., Li, S., Li, X., Xu, M., Xu, M, Wang, X. (2013). Long-term streptozotocin-induced diabetes in rats leads to severe damage of brain blood vessels and neurons via enhanced oxidative stress. *Molecular medicine reports, 7(2)*, 431-440.

Zalcman, G., Federman, N., & Romano, A. (2018). CaMKII Isoforms in Learning and Memory: Localization and Function. *Frontiers in molecular neuroscience, 11*.

Zhang, S., Xu, H., Yu, X., Wu, Y., & Sui, D. (2017). Metformin ameliorates diabetic nephropathy in a rat model of low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Experimental and therapeutic medicine, 14(1)*, 383-390.

Zhong, Y., Zhu, Y., He, T., Li, W., Li, Q., & Miao, Y. (2019). Brain-derived neurotrophic factor inhibits hyperglycemia-induced apoptosis and downregulation of synaptic plasticity-related proteins in hippocampal neurons via the PI3K/Akt pathway. *International journal of molecular medicine, 43(1),* 294-304.

ETİK KURUL KARARI

BEZMİÂLEM

T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2018/150 05.09.2018
KONU: Sn. Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN

Sayın, Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN

"Streptozotosin ile İndüklenen Diyabetik Sıçanlarda Angiotensin IV'ün Kognitif Fonksiyonlar Üzerine Etkisi" başlıklı projenize ait başvurunuz 05.09.2018 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye
KATILMADI

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ömer UYSAL
Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Harun SARIKAMIŞ
Üye

Serife GÖNCÜ
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİYABETİK SIÇANLARDA ANGİOTENSİN IV'ÜN KOGNİTİF FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ

ORIJINALLIK RAPORU

%15	%7	%4	%13
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul Medeniyet Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%3
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	%1
4	Submitted to Anadolu University Öğrenci Ödevi	<%1
5	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Eastern Mediterranean University Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.tkd-online.org İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aysu	**Soyadı**	KILIÇ
Doğ.Yeri	Çorlu	**Doğ.Tar.**	13.10.1991
Uyruğu	TC	**TC Kim No**	18670867700
Email	aysukilic91@gmail.com	**Tel**	+90 531 833 27 99

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zooloji Programı	2016
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji	2013
Lise	Üsküdar Ahmet Keleşoğlu Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	(2017-Devam ediyor)
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi		YÖKDİL 83,75
Almanca	İyi	Orta	Orta		Deutsches Sprach Diplom (85)

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	72,93		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Kilic A, Ustunova S, Usta C, Bulut H, Meral I, Demirci Tansel C, Gurel Gurevin E., Angiotensin II type 2 receptor blocker PD123319 has more beneficial effects than losartan on ischemia/reperfusion injury and oxidative damage in isolated rat heart, *Can J Physiol Pharmacol.* 2019 Jul 30. doi: 10.1139/cjpp-2019-0076.

Kılıç A. , ÜSTÜNOVA S. , Usta C., BULUT H. , ÜYÜKLÜ M. , Demirci-Tansel C., et al., Role of Angiotensin Type I and II receptor Blockade in Ischemia/Reperfusion Injury of Isolated Rat Heart, 19th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul, Türkiye, 02 May 2017, ss.1005.

Sevban Bayırlı, Faruk Özçelik, Sadret Mert Çınar, Sinem Güler, Esra Aydınlı, Savaş Üstünova, Aysu Kılıç, Huri Bulut, Mehmet Üyüklü, Protective Effect of Potassium Channel Blockade and Nitric Oxide in Erythrocytes Exposed to Mechanical Trauma in Hyperlipidemic Rats, *Bezmialem Science 2019; 7 (Suppl.-1):* S1-S98.

Sinem Güler, Esra Aydınlı, Sadret Mert Çınar, Faruk Özçelik, Sevban Bayırlı, Savaş Üstünova, Aysu Kılıç, Huri Bulut, Mehmet Üyüklü, The Effect of Theobroma Cacao on Hyperlipidemic Rats, *Bezmialem Science 2019; 7 (Suppl.-1):* S1-S98.

Esra Aydınlı, Sevban Bayırlı, Faruk Özçelik, Sadret Mert Çınar, Sinem Güler, Savaş Üstünova, Aysu Kılıç, Huri Bulut, Mehmet Üyüklü, Protective Effect of Potassium Channel Blockade and Nitric Oxide in Erythrocytes Exposed to Mechanical Trauma in Diabetic Rats, *Bezmialem Science 2019; 7 (Suppl.-1):* S1-S98.

Faruk Özçelik, Sadret Mert Çınar, Sinem Güler, Esra Aydınlı, Sevban Bayırlı, Savaş Üstünova, Aysu Kılıç, Huri Bulut, Mehmet Üyüklü, The Effect of S-Allylcysteine on Gastric Injury Induced by Cold Restraint Stress, *Bezmialem Science 2019; 7 (Suppl.-1):* S1-S98.

Sadret Mert Çınar, Faruk Özçelik, Sevban Bayırlı, Esra Aydınlı, Sinem Güler, Savaş Üstünova, Aysu Kılıç, Huri Bulut, Mehmet Üyüklü, The Protective Effect of Cinnamomum Zeylanicum in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, Bezmialem Science 2019; 7 (Suppl.-1): S1-S98.

Kübra Babacan, Aysu Kılıç, Öykü Zeybek, Mehmet Üyüklü, The Effects of Cellular and Extracellular Factors on Erythrocyte Aggregation and Viscosity, *Bezmialem Science 2019; 7 (Suppl.-1):* S1-S98.

Tahacan Demir, Sadret Mert Çınar, Faruk Özçelik, Sevban Bayırlı, Esra Aydınlı, Sinem Güler, Savaş Üstünova, Aysu Kılıç, Huri Bulut, Mehmet Üyüklü, Effect of Sodium Nitroprusside and L-arginine in Streptozotocin-induced Diabetic Rats, *Bezmialem Science 2019; 7 (Suppl.-1):* S1-S98.

KANDİL A., Kılıç A. , GUREVIN E. G. , SOGUT I., ÜSTÜNOVA S. , Eren Ş., et al., The Effects of an Herbal Hemorrhoid Cream on Liver in Carbontetrachloride Treated Animals, III. INTERNATIONAL ZOOLOGY AND TECHNOLOGY CONGRESS, Afyon, Türkiye, 12 July 2017, ss.100.