T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTİSÜ

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN SIÇANLARDA SİLİMARİN TAKVİYESİNİN KOGNİTİF FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ

Burcu YÖN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Doç.Dr.Muaz BELVİRANLI

KONYA-2016

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTİSÜ

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN SIÇANLARDA SİLİMARİN TAKVİYESİNİN KOGNİTİF FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ

Burcu YÖN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Doç.Dr.Muaz BELVİRANLI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14202028 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2016

ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitisü Müdürlüğü'ne

Burcu YÖN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof.Dr.Nilsel OKUDAN
Selçuk Üniversitesi

Danışman: Doç.Dr.Muaz BELVİRANLI
Selçuk Üniversitesi

Üye: Prof.Dr. Hüseyin UYSAL
Necmettin ERBAKAN Üniversitesi

ONAY:

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

Prof.Dr.Hasan Hüseyin DÖNMEZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle destek olan değerli danışman hocam Sayın Doç.Dr.Muaz BELVİRANLI'ya; tez çalışmam süresince kıymetli tecrübeleri ve güler yüzüyle desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof.Dr.Nilsel OKUDAN'a; S.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Verilerin istatistiksel analizinin yapılmasında destek olan A.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalından Dr.Can ATEŞ'e ve S.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalından Doç.Dr.Kamil ÜNEY'e

Tez çalışmamın deneysel kısmının gerçekleştirildiği S.Ü. Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Eğitimim süresince gerek mesleki gerekse yaşama dair bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen Sayın Soner MAMUK'a; tez çalışmam süresince desteğiyle yanımda olan arkadaşım Öğr.Gör.Ümit KILIÇ'a ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan sevgili annem Ayşe YÖN ve babam Osman YÖN'e ve tez çalışmam süresince en az benim kadar özveride bulunan, her daim destek olan sevgili ablam Dilek YÖN'e yürekten teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 14202028) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR iv

1.GİRİŞ ve AMAÇ 1

1.1. Diabetes Mellitus 2

1.1.1. Tanımı ve Önemi 2

1.1.2. Diyabet Tipleri 2

1.1.3. Streptozotosin ile Oluşturulan Deneysel Diyabet ve Fizyopatolojisi 3

1.1.4. Diyabetin Merkezi Sinir Sistemine Etkileri 4

1.2. Kognitif Fonksiyonlar 6

1.2.1. Öğrenme ve Bellek 6

1.2.2. Öğrenme ve Limbik Sistem 9

1.2.3. Hipokampusun Bellek Oluşumundaki Rolü 10

1.3. Deney Hayvanlarında Kognitif Fonksiyonları Değerlendirmede Kullanılan Testler 11

1.3.1. Morris Su Labirenti (MWM) Testi 12

1.3.2. Yükseltilmiş (+, T) Labirent (EPM/ETM) Testi 12

1.3.3. Açık Alan (OF) Testi 13

1.4. Silimarin ve Fizyolojik Özellikleri 13

1.5. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör ve Histon Deasetilaz 16

1.5.1. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) 16

1.5.2. Histon Deasetilaz (HDAC) 18

2. GEREÇ ve YÖNTEM 19

2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması 19

2.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması 20

2.3. Silimarin Takviyesi 21

2.4. Sıçanlara Uygulanan Davranış Testleri 21

2.4.1. Açık Alan (OF)Testi 22

2.4.2. Yükseltilmiş Artı Labirent (EPM) Testi 22

2.4.3. Morris Su Labirent (MWM) Testi 23

2.5. Deneyin Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması

2.6. Doku Homojenizasyonu 25
2.7. Biyokimyasal Analizler 26
2.7.1. BDNF Ölçümü 26
2.7.2. HDAC Ölçümü 28
2.8. Verilerin Analizi 27
3. BULGULAR 29
3.1. Silimarin Takviyesi ve Diyabetin Sıçanların Vücut Ağırlığına Etkisi 29
3.2. OF Testinde Değerlendirilen Parametreler 30
3.3. EPM Testinde Değerlendirilen Parametreler 31
3.4. MWM Testi Öğrenme Dönemi Parametrelerinin Değerlendirilmesi 32
3.5. MWM Testi Test Günü Parametrelerinin Değerlendirilmesi 35
3.6. BDNF ve HDAC Seviyeleri 37
4. TARTIŞMA 38
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 42
6. KAYNAKLAR 43
7. EKLER 50
EK: Etik Kurul Kararı 50
8. ÖZGEÇMİŞ 51

SİMGELER VE KISALTMALAR

BDNF:	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
DM:	Diabetes Mellitus
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EPM:	Yükseltilmiş + Labirent
GLUT:	Glikoz Taşıyıcı Proteinler
GPx:	Glutatyon Peroksidaz
HAT:	Histon asetil transferazlar
HDAC:	Histon deasetilaz
IFN-γ:	İnterferon gama
IL:	İnterlökin
LTP:	Uzun Süreli Güçlendirme
MDA:	Malondialdehit
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
MWM:	Morris Su Labirenti
NGF:	Nöron büyüme faktörü
NT:	Nörotrofin
OF:	Açık Alan
RNA:	Ribonükleik asit
SOD:	Süperoksit Dismutaz
STZ:	Streptozotosin
TNF-α:	Tümör nekroz faktör alfa

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Deneysel Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Silimarin Takviyesinin Kognitif Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Burcu YÖN

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2016

Bu çalışmanın amacı, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda silimarin takviyesinin kognitif fonksiyonlar üzerine etkisini incelemekti.

Çalışmada 38 adet 400-450 gr ağırlığında Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele seçilerek kontrol, silimarin, diyabet ve diyabet+silimarin gruplarına ayrıldı. Diyabet ve diyabet+silimarin gruplarına tek doz streptozotosin (50 mg/kg) uygulandı. Uygulamadan 7 gün sonra kan glikoz konsantrasyonları ölçülerek diyabet doğrulandı ve silimarin ve diyabet+silimarin gruplarına 35 gün süreyle 200 mg/kg silimarin oral yolla verildi. Çalışmanın 30-35. günlerinde sıçanlara, Açık Alan (OF) Testi, Yükseltilmiş Artı Labirent (EPM) Testi ve Moris Su Labirenti (MWM) Testi uygulandı. Sıçanlardan 35. günün sonunda anestezi altında kan ve beyin numuneleri alındı. Alınan numunelerde beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve histon deasetilaz (HDAC) seviyeleri ölçüldü.

Sıçanların kan glikoz seviyeleri diyabet gruplarında kontrol ve silimarin gruplarından daha yüksekti. OF testinde defekasyon sayısı, diyabet+silimarin ve silimarin gruplarında diyabet grubuna göre daha düşüktü ($P<0,05$). EPM testinde kapalı kollara giriş sayısı diyabet gruplarında kontrol grubuna göre yüksekti ve açık kollarda geçirilen süre diyabet grubunda kontrol grubuna göre düşüktü ($P<0,05$). MWM testinde platformdan geçiş sayısı ve platform alanında geçirilen süre diyabet grubunda kontrol grubundan düşüktü ($P<0,05$). Plazma ve beyin dokusu BDNF seviyeleri diyabetli grupta diğer tüm gruplardan düşüktü ($P<0,05$), HDAC seviyeleri gruplar arasında farklı değildi ($P>0,05$).

Sonuç olarak bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular, silimarin takviyesinin diyabetli sıçanlarda BDNF seviyelerini artırarak kognitif fonksiyonları iyileştirebileceğini ileri sürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Anksiyete; diyabet; kognitif fonksiyon; öğrenme; silimarin

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effects of Silymarin Supplementation on Cognitive Functions in Experimentally-Induced Diabetic Rats

Burcu YÖN

Physiology (Medicine)

Master Thesis / KONYA – 2016

The aim of this study was to examine the effects of silymarin supplementation on cognitive functions in experimentally-induced diabetic rats.

In this study 38 male Wistar rats, weighing between 400-450 g were used. Rats were randomly divided into the control, silymarin, diabetes and diabetes+silymarin groups. Diabetes and diabetes+silymarin groups were injected single dose streptozotocin (50 mg/kg). After seven days of the injection, diabetes was confirmed by measuring blood glucose concentration and silymarin and Diabetes+silymarin groups were given 200 mg/kg silymarin via orally for 35 days. On the 30^{th}-35^{th} days of the study, Open Field (OF) Test, Elevated Plus Maze (EPM) Test and Moris Water Maze (MWM) Test were performed. At the end of the 35^{th} day, brain and blood samples were taken from the rats under anesthesia. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and histone deacetylase (HDAC) levels were measured in these samples.

Blood glucose levels were higher in diabetic groups than control and silymarin groups. In the OF test, the number of defecation was lower in the silymarin and diabetes+silymarin groups than diabetic group ($P<0.05$). In the EPM test, the number entrance to the closed arms were higher and time spent in open arms was lower in the diabetic group than the control group ($P<0.05$). In MWM test, the number of platform crossing and time spent in the platform area was lower in the diabetic group than control group ($P<0.05$). In the diabetic group, plasma and brain tissue BDNF levels were lower than the other groups ($P<0.05$), in the HDAC levels there was no difference among the groups ($P>0.05$).

In conclusion, the results obtained from this study suggest that, silymarin supplementation could improve cognitive functions in diabetic rats by increasing the BDNF levels.

Key Words: Anxiety; cognitive function; diabetes; learning; silymarin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), toplum ve birey sağlığı açısından oldukça önem arz eden bir hastalıktır. Dünyada erişkin nüfusun yaklaşık % 8,4'ü (~ 382 milyon kişi) diyabet hastasıdır. 2035 yılına kadar bu sayının 592 milyon kişiye ulaşacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise 20-79 yaş aralığında 7 milyon diyabet hastası bulunmaktadır (IDF 2013).

Diyabet, ölümle sonuçlanabilen akut komplikasyonlara neden olabildiği gibi uzun süren metabolik düzensizlikler nedeniyle, çeşitli organların çalışmasında yetersizlik ve fonksiyon kaybı şeklinde ortaya çıkan kronik komplikasyonlara da neden olabilir. Merkezi sinir sistemi (MSS) 'nde oluşturduğu hasar nedeniyle kognitif fonksiyonlarda da bozulmalara yol açar. Diyabetin, demans için bir risk faktörü olduğu, hipokampal sinaptik plastisiteyi etkilediği, öğrenme ve hafızada yetersizliklere yol açtığı bilimsel çalışmalarda gösterilmiştir (Weinger ve ark 2008; Laron 2009; Reijmer ve ark 2010).

Silimarin, karaciğer ve safra kesesi hastalıkları gibi farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan antioksidan, antiinflamatuar, immün düzenleyici özellikleri olan ve MSS üzerine olumlu etkileri bildirilen bir maddedir. Silimarin, kan-beyin bariyerini geçerek beyne ulaşabildiği için MSS'de antioksidan aktiviteye sahiptir (Karimi ve ark 2011).

Son dönemde yapılan çalışmalarda (Kiruthiga ve ark 2007; Govind ve Sahni 2011; Karimi ve ark 2011; Bansal ve ark 2013), silimarinin birçok hastalık üzerine etkisi araştırılmıştır, ancak diyabete bağlı kognitif fonksiyon bozukluklarıyla ilişkisi hakkındaki bilgiler oldukça yetersizdir. Bu çalışmanın amacı, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda silimarin takviyesinin kognitif fonksiyonlar üzerine etkisini çeşitli davranış testleriyle değerlendirmek, aynı zamanda kan ve beyin dokusunda histon deasetilaz ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör düzeylerini ölçmektir.

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. Tanımı ve Önemi

Diabetes mellitus, pankreasın β hücrelerinden salgılanan insülinin eksikliği ya da insülinin etki mekanizmasındaki bozukluk nedeniyle karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının bozulduğu kronik bir hastalıktır (Dinççağ 2011). Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması'nın sonuçlarına göre, 1998 - 2010 yılları arasında 20 yaş üstü bireylerde diyabet prevelansının % 7,7'den % 13,7'ye ulaştığı bildirilmiştir (Satman ve ark 2002). Diyabet, kontrol edilemediğinde akut (diyabetik ketoasidoz, hipoglisemi vb.) ve kronik (koroner arter hastalığı, retinopati, nefropati, nöropati, erektil disfoksiyon v.b.) komplikasyonlara neden olarak mortaliteyi etkiler (Narayan ve ark 2003).

1.1.2. Diyabet Tipleri

Diabetes mellitus, 2003 yılında Amerikan Diyabet Birliği tarafından Tip 1, Tip 2, gestasyonel ve diğer spesifik diyabet olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Günümüzde en çok Tip 1 ve Tip 2 diyabet görülmektedir (Dinççağ 2011). Tip 1 diyabet, pankreasın beta hücrelerinde gerçekleşen otoimmün hasar nedeniyle oluşur ve mutlak insülin eksiliği sonucunda ortaya çıkar, Tip 2 diyabet ise insülin yanıtındaki yetersizliğe bağlı olarak görülmektedir (Lasaridis ve Sarafidis 2003).

Tip 1 diyabetin başlangıcı yaşla ilişkilidir. Çocukluk çağında klinik olarak çok hızlı bir ilerleme gösterirken, ileri yaşlarda daha yavaş ilerler. Genetik yatkınlığı bulunan bireyler, doğumda normal beta hücre yapısına sahipken virüsler, toksinler ve diğer çevresel faktörlerin etkisiyle gelişen otoimmün reaksiyonla oluşan harabiyet sonucunda beta hücrelerini kaybederler. Beta hücrelerinin harabiyeti ne kadar hızlıysa diyabetin ortaya çıkış süresi o kadar kısalır ve bu durum kişiden kişiye değişir. Diyabete geçişi tetikleyen olaylar glikoz intoleransının yanı sıra insülin ihtiyacını artıran durumlarla da ilişkilidir (Büyüköztürk 2007). Tip 1 diyabetli bireylerde en çok gözlenen belirtiler poliüri, polidipsi, kilo kaybı, halsizlik ve yorgunluktur. Diyabet gelişmiş hastalarda, glikozun idrar yoluyla kaybı lipolize

neden olur ve subkutan yağ dokusunun azalması sonucu kilo kaybı görülür (Abacı ve ark 2007).

Tip 2 diyabet, başlıca dört temel metabolik bozuklukla karakterizedir. İnsülin salgısında bozulma ve insülin direnci gelişimi en etkili olan faktörlerdir. İnsülin eksikliği ve insülin direncinin varlığı periferik dokularda insülin duyarlılığını bozarak glikoz kullanımını azaltır (Weyer ve ark 1999). İnsülin direnci gelişiminde, insülinin hücre yüzeyinde bulunan reseptöründeki hasara bağlı olarak kullanılamaması sonucunda glikoz hücre içine alınamaz (WHO 2006).

1.1.3. Streptozotosin ile Oluşturulan Deneysel Diyabet ve Fizyopatolojisi

Diyabetin etiyolojisi, patogenezi ve uzun süreli etkilerinin araştırılmasında diyabetik hayvan modelleri kullanılmaktadır. Kimyasallarla oluşan deneysel diyabet modellerinde sıklıkla alloksan ve streptozotosin (STZ) kullanılır. STZ'nin alloksanla kıyaslandığında beta hücreleri dışındaki dokularda daha az hasar oluşturduğu, ancak yüksek kan glikoz seviyelerine ise alloksanla ulaşıldığı bildirilmiştir. Alloksan ile oluşturulan diyabette ketozis görülme sıklığı ve mortalite oranı yüksektir. Alloksanın bu özellikleriyle birlikte uygulama zorluğunun da olması STZ'nin deneysel diyabet modellerinde daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır (Srinivasan ve Ramarao 2007).

STZ, pankreatik beta hücre karsinomu tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajan olan *Streptomycetes achromogenes* isimli bakteri tarafından sentezlenen bir glikozamin-nitrozoüre bileşiğidir (Graham ve ark 2011). STZ'nin diyabetajonik etkisini ilk olarak Rakieten ve ark (1963) sıçan ve köpeklerde kalıcı diyabet oluşturarak göstermiştir.

STZ'nin toksik etkisini gösterebilmesi için kimyasal alkilleyici bileşiklerin hücre içine alınması gerekir (Lenzen 2008). Glikozamin kısmıyla hücre membranından geçebilme özelliği gösteren STZ, nitrozüre kısmıyla ise pankreasın beta hücrelerinde hasara sebep olur. Nitrozüre kısmı aynı zamanda serbest radikal oluşumunun artması sonucu gelişen DNA kırılmalarından da sorumludur (Srinivasan ve Ramarao 2007). Sıçanlara 50-100 mg/kg dozunda intravenöz (iv) veya

intraperitoneal (ip) uygulanabilir (İrer ve Alper 2004). Tip 1 diyabet oluşturmak için erişkin sıçanlarda iv tek doz 40-60 mg/kg, Tip 2 diyabet oluşturmak içinse yeni doğmuş sıçanlara tek doz iv veya ip 100 mg/kg STZ uygulamasının yeterli olacağı bildirilmiştir (Önturk ve Özbek 2007).

Sıçanlarda STZ uygulamasını takip eden 2. saatte kan glikoz seviyesinde artış ve 6. saatte ise kan insülin düzeyinde oluşan yükselme nedeniyle geçici hipoglisemi gözlenir (Kurçer ve Karaoğlu 2012). Kalıcı hiperglisemi fazı olarak adlandırılan evrede enjeksiyonu takip eden 10-12. saatte plazma insülin düzeyleri düşer ve geri dönüşümsüz hiperglisemi gelişir (Ter Laak ve ark 2000).

1.1.5. Diyabetin Merkezi Sinir Sistemine Etkileri

Diyabet nedeniyle oluşan MSS komplikasyonları kabul gören ve dikkat çekici bir sorundur. Diyabetik hastalar ve diyabetli hayvan modellerinde pek çok MSS değişiklikleri gözlenmiştir (Wrighten ve ark 2009). Yapılan çalışmalar (McCarthy ve ark 2002, Petrak ve ark 2003) diyabetin, MSS fonksiyonlarında bozulmalara neden olduğunu ortaya koymaktadır. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda Tip 1 ve Tip 2 diyabetli bireylerin aynı yaştaki sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında bilişsel fonksiyonlarında bozulmalar tespit edilmiştir (Greenwood ve Winocur 2005) ve bu durumdan tekrarlayan hipoglisemi ve hiperglisemi atakları sorumlu tutulmuştur (Kodl ve Seaquist 2008).

Birden fazla organ ve sistemle birlikte beyin de diyabetin olumsuz etkilerine maruz kalmaktadır (Stranahan ve ark 2008). Diyabetli bireylerde hipokampusta elektrofizyolojik ve bilişsel değişiklikler görülmektedir (Wrighten ve ark 2009). Gispen ve Biessels (2000), kronik hipergliseminin beynin yaşlanma sürecini hızlandırdığını bildirmiştir. Ayrıca diyabet, beyinde demans ve depresyon oluşumunu da tetikler (Greenwood ve Winocur 2005). Li ve Sima (2004), Tip 1 diyabetli hastalarda serebral kortekste bölgesel hasarlar, nöronal kayıplar ve demiyelinizasyon gibi yaygın yapısal değişiklikler tanımlamıştır.

Deneysel diyabet oluşturulan hayvanların MSS'de yapısal ve elektrofizyolojik bozuklukların ortaya çıkmasıyla nörotransmitter düzeylerinde, nöron sayısında,

apoptotik aktivitede ve bilişsel fonksiyonlarda önemli değişimler olduğu bilinmektedir. Deney hayvanlarında MSS hasarları, davranışsal değişikliklere de neden olur. Örneğin, STZ ile diyabet oluşturulan hayvanların, spontan lokomotor aktivitelerinde, saldırganlık, anksiyete ve depresyon şiddetlerinde, öğrenme ve sosyal etkileşim davranışlarında değişiklikler olduğunu rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (Kamei ve ark 2003; Miyata ve ark 2005).

MSS'de diyabete bağlı olarak ortaya çıkan bilişsel bozuklukların nedenleri arasında insülin sinyal iletiminde ve glikoz homeostazında bozulma da etkili olabilmektedir (Reagan ve ark 2007). Diyabetlilerde, kan glikozunun anormal artışıyla meydana gelen kısa ve uzun süreli hiperglisemi tablosu metabolik yollar kanalıyla kan-beyin bariyeri yapısında değişiklilere ve nöronal hasara yol açar (Horani ve Mooradian 2003). Manyetik rezonans görüntüleme ile yapılan bir çalışmada (Starr ve ark 2003), Tip 2 diyabetli hastalarda, kan beyin bariyer bütünlüğünün hasara uğradığı ve geçirgenliğinin arttığı gözlenmiş ve diyabetin MSS bozukluklarının oluşumuna katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür.

Hipokampus, öğrenme ve bellek üzerine kilit rol oynayan bir beyin yapısıdır ve glikoz homeostazındaki değişikliklere son derece duyarlıdır (Reagan 2007). STZ ile oluşturulan Tip 1 diyabet modelinde, glikoz regülasyonundaki fonksiyonel kayıp ya da insülin kullanımındaki yetersizlik hipokampusta nöronal sinaptik düzenlemede bozukluğa neden olur (Magarinos ve Mcewen 2000). Malone ve arkadaşları (2006), STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla hücre dansitelerinde ve nöron sayılarında artış, nöronların protein, yağ asidi, kolesterol ve miyelin içeriklerinde ise azalma olduğunu bildirmişlerdir. Papoviç ve arkadaşları (2001), STZ ile oluşturulan diyabetin öğrenme performansını azalttığını ve beraberinde gelişen hipokampustaki nöronal ve sinaptik bozulmaların insülin uygulamasıyla düzeltilebildiğini bildirmişlerdir.

1.2. Kognitif Fonksiyonlar

1.2.1. Öğrenme ve Bellek

Beyin düşünme, hissetme, sezme, merak ve hareket için temel organdır. Davranışı deneyimlere göre değiştirebilme yeteneği hayvanlara ve özellikle de insanlara özgü bir durumdur. Öğrenme, bunu gerçekleştirebilmek için bilgi edinme olup, bellek ise bu bilgiyi koruma ve gerektiğinde kullanmak için depolama olarak tanımlanmaktadır. Öğrenme ve bellek birbirleriyle yakından ilişkilidir (Barret ve ark 2011).

1.2.1.1. Öğrenme

Öğrenme, deneyim sonucu davranış değişikliği gösterebilme becerisi veya canlının çevresiyle etkileşimi sonucunda davranışında oluşan kalıcı değişiklikler olarak tanımlanabilir (Özten 2003). MSS, içeriden ve dışarıdan gönderilen uyarılara adaptasyon gösterir. İçten ve dıştan gelen bu uyaranlar karşısında nöronlar ve sinapsların yapısal özelliklerinde ve işlevlerinde gözlenen değişikliklere nöroplastisite denir. İç ve dış uyaranlara adaptasyon öğrenme sayesinde gerçekleşir. Bununla birlikte, öğrenmenin oluşabilmesi için uzun dönemli güçlendirmeye de ihtiyaç vardır (Kocabaşoğlu 2005).

Öğrenme üç alt başlıkta değerlendirilir.

I. Nonasosiyatif öğrenme

Nonasosiyatif öğrenme bir uyaran sonucu oluşurken, öğrenilen bilgiler birbiriyleriyle ilişkili olmak zorunda değildir. Uyarının önemini kaybetmesiyle oluşan habitüasyon ve uyaranın önemli olmasıyla birlikte uyaran karşısında hızlı yanıt verilen sensitizasyon olmak üzere iki çeşidi bulunan öğrenme türüdür (Yiğit 2001).

a. **Habitüasyon:** Daha önce uygulanmamış, canlının bilmediği ve tepki oluşturan bir uyaranın sürekli gönderilmesi sonucu zamanla canlının daha az yanıt oluşturmasıyla uyarana alışması ve uyarana tepkisiz kalmasıdır (Barett

ve ark 2011). Öğrenmenin en basit formudur. Canlı aşırı ya da zararlı uyaran karşısında serotonerjik sistemle birlikte kaçınma refleksi oluşturur (Bekar ve ark 2001).

b. **Sensitizasyon:** Tekrarlanan uyaranın hoşa giden veya gitmeyen bir başka uyaranla tek seferde veya birlikte defalarca uyarılmasıyla daha fazla yanıt oluşturmasıdır. Annenin sesli bir odada uyuyor olmasına rağmen bebeği ağlayınca sesinden tanıyıp uyanması sensitizasyona örnek verilebilir (Barett ve ark 2011).

II. Asosiyatif Öğrenme

Organizmanın birbirinden farklı iki uyaranı ilşkilendirdiği asosiyatif öğrenme şartlı refleks ve operant koşullanma olarak ikiye ayrılır.

a. **Şartlı refleks:** Tek başına verildiğinde ya hiç yanıt oluşturamayan ya da çok az yanıt oluşturan bir uyaranın, yanıt oluşturabilen farklı bir uyaranla eş zamanlı ve tekrarlayarak verilmesi sonucunda ilk uyaranın tek başına verildiğinde de tepki göstermesiyle meydana gelen refleks yanıttır (Barett ve ark 2011).

b. **Edinsel Koşullanma (Operant Şartlanma):** Şartlı refleks yoluyla öğrenmenin gerçekleşebilmesi için davranışa neden olan uyarıcının bilinmesi gerekmektedir, ancak uyarıcının bilinmesi her zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenle şartlı refleks pek çok öğrenme durumunu açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu gibi durumlarda öğrenmeyi edinsel koşullanma (operant şartlanma) açıklamaktadır (Elden 2003).

Edinsel koşullanmada birey çevrenin davranışlarına gösterdiği tepkileri değerlendirerek öğrenir. Bireyin uyarıcı faktörlerden bağımsız, içinden gelerek yaptığı davranışları yani edimleri olumluysa ödüllendirilir ve bu ödüllendirme olumlu ya da olumsuz bir pekiştirici olarak bireydeki davranışın tekrarlanmasına ya da bu davranışından vazgeçilmesine yol açar. Edinsel koşullanma, ödüle ulaştıran ve

cezadan kurtaran yanıtın öğrenilmesine ya da bir davranışın pekiştirilerek kuvvetlenmesine denir (Elden 2003).

III. Bellek

Öğrenmenin kalıcı olabilmesi için belleğe ihtiyaç vardır. Bellek ve öğrenme birbirini tamamlamaktadır. Bellek bilgiyi kodlama, kopyalama ve geri çağırma sürecini kapsar (Açıkgöz 2003). Öğrenilen bilginin hatırlanması gerektiğinde bellek taranarak istenilen bilgi bulunur ve hatırlanır (Engin ve ark 2008). Bellekte bilgiyi işleme süreci duysal kayıt, kısa süreli bellek ve uzun süreli bellek olmak üzere üçe ayrılır (Yılmaz 2005).

a. **Duysal Kayıt:** Birey duyu organlarına gelen uyarıları duyu reseptörleri aracılığıyla algılar. Oldukça yüksek kapasiteye sahip olan duysal kayıt bu bilgileri birkaç saniyeliğine kaydedebilir (Keleş ve Çepni 2006). Duysal sinyaller, beyinde kaldıkları bu kısa süre içinde taranarak önemli noktalar çıkarılır. Bu olay belleğin başlangıç aşamasını oluşturur (Senemoğlu 2005).

b. **Kısa Süreli Bellek:** Kısa süreli bellek, düşünmenin büyük kısmının ve bilginin kaydedilmek üzere işlendiği bölümdür. Sınırlı bilgiyi geçici olarak depolar. Kısa süreli bellek, çalışan bellek olarak da ifade edilir (Senemoğlu 2005).

c. **Uzun Süreli Bellek:** Kısa süreli bellekten gelen bilgilerin yıllarca saklanmasında etkili olan uzun süreli bellekte öğrenme sonrasında daha çok sinapslarda yapısal değişiklikler oluşur. Sinapslar güçlenerek etraftaki nöronlarla yeni bağlar oluşturur ve beyinde oluşan bu değişiklikler uzun süreli bellekte bilgilerin kalıcılığını sağlar (Senemoğlu 2005).

Belleğin oluşmasındaki temel faktör uzun süreli güçlendirmedir. Bir nöron art arda kısa süreli ve zayıf elektriksel uyaranlarla uyarıldıktan sonra tek uyarılara daha şiddetli tepkiler oluşturmaya başlar. Bu durum sinirsel iletimin güçlenmesiyle açıklanmaktadır, yani bir bilgi yinelenerek öğrenilmişse sinirsel ağ güçlenerek aynı

bilgiyle ilişkili bir başka uyaran geldiğinde iletim ağı önceden oluşturulduğu için bilgi tümüyle hatırlanmaktadır (Yılmaz 2005).

Kısa süreli belleğe gelen bilgi yalnızca duyu organlarından gelen bilgiyle sınırlıyken, uzun süreli bellekteki bilgiler o ana kadar yaşamış olduğumuz ve edindiğimiz bilgiler bütünüdür (Karabekiroğlu ve ark 2005). Sınırsız kapasiteye sahip bu bellekteki bilgilerin depolanış şekli bilgilerin hatırlanma süresini etkiler. (Yılmaz 2005).

Bellek yukarıdaki sınıflamalar dışında klasik olarak dekleratif (eksplisit) ve refleksif (implisit) bellek olmak üzere ikiye ayrılır.

I. **Deklaratif (Eksplisit) Bellek:** Olayların bilinçli olarak hatırlandığı bu bellek türünden medial temporal lob sorumludur. Bu bellek, devam eden anlık olayların hatırlanması, yakın geçmişte yaşananların kısa süreli hatırlanmasında görev alan çalışan belleği ve uzak geçmişte yaşananların uzun süreli hatırlanmasında görev alan referans belleği içinde barındırır (Yiğit 2001).

II. **Refleksif (İmplisit) Bellek:** Beceri, alışkanlıklar, klasik koşullanma ve nonassosiyatif öğrenmeyi içerir. Hatırlamak için bilince gerek yoktur ve temporal lobdan bağımsızdır. Serebellum, bazal ganglionlar, amigdala ve korteksin bazı alanlarıyla ilişkilidir (Kandel ve ark 2000, Yiğit 2001).

1.2.2. Öğrenme ve Limbik Sistem

Limbik sistem; kişilik özellikleri, bellek, açlık, susama, kan basıncı, hormon salgılama ve koklama gibi faaliyetlerin düzenlenmesinde görev alan yardımcı bir sistemdir. Limbik sistem hipokampal girus, forniks, mamiller cisim, mamillo-talamik yol, amigdala ve singulat girustan oluşmaktadır. Limbik yapılar temporal lobda yer almaktadır. Bilgilerin ve öğrenilen davranışların depolanmasında, değerlendirilmesinde ve bellek oluşumunda limbik sistem oldukça önemlidir (Özpoyraz 2002).

Bellek ve beyin yapıları ilişkisinin incelendiği çalışmalar (Phelps 2004, Benfenati 2007) çeşitli duyu organlarından gelen impulsların son olarak değerlendirildiği beyin yapılarının, temporal lobda bulunan hipokampus ve amigdala olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hipokampusun ön kısmında bulunan amigdala, duysal uyaranlarla bellek arasındaki bağlantıları sağlayarak uzun süreli belleğin güçlenmesinde etkili olduğundan duysal hafıza merkezi olarak kabul edilmektedir. Duysal uyaranlarla ilişkilendirilen bilgiler daha uzun süre depolanmaktadır (Şenel 2012).

1.2.3. Hipokampusun Bellek Oluşumundaki Rolü

Hipokampus; serebral korteksin, lateral ventrikülün ventral yüzeyini oluşturmak üzere yukarı ve içeri kıvrılıp uzamasıyla oluşan, yaklaşık 5-8 cm uzunluğunda bir gri cevher tabakasıdır. Görünümü itibariyle denizatına benzetildiğinden hipokampus adı verilmiştir (Arıncı ve Elhan 1995).

Algı ve bellek yapıları arasında bilgi ve uyaran aktarımı sağlayan hipokampus, beynin pekçok bölgesinden duysal uyarılar alır ve bu uyarıları forniks yoluyla hipotalamus ve talamusa iletir. Ayrıca, subkortikal alanlarla olan ilişkisi nedeniyle hipokampus diğer beyin yapılarıyla iletişim halindedir. Hipokampusun komşu beyin yapılarıyla olan bu iletişimi Papez halkasını meydana getiren yapılar sayesinde gerçekleşir. Papez halkası; limbik sistem korteksi, hipotalamus ve talamus ilişkisinden oluşmaktadır. Papez halkasında uyarıların ard arda birbirlerini takip etmeleri, düşüncenin duyguya dönüşmesine ve duygunun artarak kalıcı hale gelmesine sebep olur (Songur ve ark 2001).

Öğrenme ve hafızada etkili olan hipokampus, öğrenilmiş yeni bilginin saklanması ve anıların kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe aktarılmasında görev alır. Bu nedenle sağ ve sol hipokampus olmadan uzun süreli anılar saklanamaz. Diğer yandan, sağ hipokampus görsel, sol hipokampus ise sözel hafızayla ilgilidir (Songur ve ark 2001).

Öğrenmenin gerçekleşebilmesi için uzun süreli güçlendirmeye (LTP) ihtiyaç vardır. Presinaptik nöronların sık ve şiddetli uyarılması postsinaptik nöronda aksiyon potansiyelini oluşturur. Zamanla bu sinapslar daha duyarlı olur ve uyarı postsinaptik

bölgeye artarak iletilir. Hipokampus başta olmak üzere MSS'nin pekçok yerinde LTP oluştuğu gösterilmiştir (Gürpınar ve ark 2007).

Hipokampus ayrıca stresin etkilerine en duyarlı beyin bölgelerinden birisidir (Gürpınar ve ark 2007). Her türlü zihinsel faaliyette hipokampal hacimde ve nörogenezde artma, kronik stres durumlarında hipokampal hacimde ve hipokampal nörogenezde azalma gözlenmiştir (Kotan ve ark 2009).

1.3. Deney Hayvanlarında Kognitif Fonksiyonları Değerlendirmede Kullanılan Testler

Davranış testleri genellikle hayvanların sensorimotor ve lokomotor aktivitelerinin ölçülmesinde ve anksiyete ya da bilişsel fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılır (Semenderoğlu ve ark 2013). Öğrenme deneylerinde en çok tercih edilen davranış testi Morris Su Labirenti (MWM) testidir. Öğrenme anksiyete ile ilişkili olup, öğrenme bozukluğu anksiyetenin belirtilerindendir. İki farklı fare türünde davranış ve öğrenme ilişkisinin değerlendirildiği bir çalışmada (Ohl 2003), anksiyete seviyesindeki fazlalığın öğrenmeyi inhibe ettiği raporlanmıştır. Anksiyetenin değerlendirilmesinde sıklıkla Yükseltilmiş (+,T) Labirent (EPM) ve Açık Alan (OF) testleri uygulanmaktadır.

1.3.1. Morris Su Labirenti Testi

İlk kez Richard Morris tarafından 1980' li yıllarda tanımlanan bu test, deney hayvanlarında öğrenme ve bellek mekanizmalarının incelenmesinde kullanılır (www.watermaze.org). MWM, kemirgenlerde bilişsel hasarın tespitinde kullanılan geçerli bir yöntemdir (Rudi ve Peter 2001). MWM, referans bellek ve çalışan belleğin değerlendirilebilmesini sağlar. Referans bellek tekrarlanan yüzdürme deneyleri sonunda bellekte oluşan bilgilerdir. Çalışan bellek ise tekrar gerektirmez. Hayvanın belirli bir alanda sabit duran platformu bulması referans belleği, platformun yerinin her gün değiştirilerek deneyin tekrarlanması ise çalışan belleği test eder (Groen ve ark 2002).

1.3.2. Yükseltilmiş (+,T) Labirent Testi

Bu test ilk kez, Pellow ve ark (1985) tarafından uygulanmıştır. Yükseltilmiş labirent testinin artı, T ve O harfi şeklinde kullanılabilen çeşitleri bulunmaktadır. Artı labirent iki açık ve iki kapalı kolu olan ve bu kolların birleştiği, yerden belirli yüksekliği bulunan bir materyaldir. Bu düzenekte kol boyutları ve yerden yükseklik fare ve sıçanda farklılık göstermektedir. Sıçanlarda kol boyu genellikle 50 x 12 cm (boy x en) ve yerden yükseklik 50 cm'dir.

Fare/sıçanlar doğuştan açıklık ve yüksekten korkar. Test yerden yüksekte bulunma, ışık ve açık kol gibi faktörlerin hayvanlarda anksiyete oluşturması ilkesine dayanır. Hayvan düzeneğin birleşim noktasına açık koldan bırakılır ve beş dakika süresince gözlemlenir. Bu süre boyunca gözlenen açık kolda geçirilen süre, açık kola giriş sayısı, açık ve kapalı kolda sergilenen ayağa kalkma davranış sıklığı, temizlenme ve donma davranışı, defakasyon sayısı gibi faktörler artmış anksiyete varlığını ifade eder. Hayvan eğer tekrarlayan deneylerde sürekli kapalı koldan bırakılırsa açık kola girmeme (inhibitör kaçınma) davranışını öğrenecektir ya da açık koldan, ancak düzeneğin birleşim noktasına yakın yerden bırakılırsa kapalı kola kaçma tepkisi gösterecektir. Yükseltilmiş (+,T) Labirent Testi hayvanlarda emosyonel aktivite ve anksiyeteyi ölçmede çok tercih edilen bir davranış testidir (Dolu ve Özesmi 2004).

1.3.3. Açık Alan Testi

İlk kez Hall tarafından 1936 yılında kullanılan açık alan testi, fare/sıçanların emosyonel durumlarının, anksiyetelerinin ve lokomotor akvitelerinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Ohl 2003).

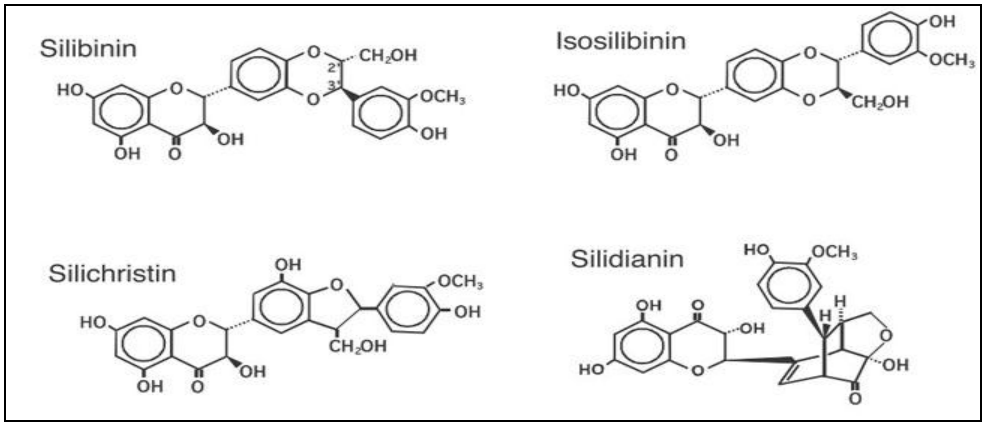
Bu test, genellikle bir farenin/sıçanın, kaçması duvarla önlenmiş yuvarlak, dikdörtgen ve kare gibi değişik formlardan oluşabilen üstü açık, bir alana bırakılarak davranışlarının gözlenmesi ilkesine dayanır (Prut ve Belzung 2003). Açık alan korkusu bulunan ve yaşamını sürdürdüğü ortamdan uzaklaştırılıp, düzeneğe alınan deney hayvanında çeşitli anksiyete davranışları gözlenir. Açık alandaki takip süresi

2-20 dk arasında değişiklik göstersede sıklıkla 5 dakikadır. Bu sürede gözlenen her hareket, hayvanın emosyonel durumu hakkında bilgi verir (Dolu ve Özesmi 2004).

Fare/sıçan kendini düzeneğin duvara yakın kenarlarında daha güvende hisseder ve düzeneğin merkezi anksiyetenin tetiklendiği kısımdır. Merkezde geçirdiği süre, merkeze geliş sıklığı ve düzenekte kat edilen mesafe lokomotor aktivite olarak değerlendirilir. Lokomotor aktivitenin yanı sıra arka ayaklar üzerine kalkma, kaşınma ve defekasyon düzenekteki hayvanda gözlenebilen davranışlardandır. Bu davranışlar da artmış anksiyete düzeyiyle orantılıdır. Lokomotor aktivite ve arka ayakları üzerine kalkış sayısının artışı anksiyete düzeyi hakkında doğrudan fikir verirken, kaşınma hareketinin gözlenmesi dolaylı olarak bilgi sağlar (Dolu ve Özesmi 2004). Açık alan korkusunun en önemli göstergesi defekasyon sayısıdır. Hayvan anksiyete düzeyi artıkça kendi ortamını oluşturmak için daha sık defekasyon yapar (Prut ve Belzung 2003).

1.4. Silimarin ve Fizyolojik Özellikleri

Cardus marianum ailesinin bir üyesi olan deve dikeni, karaciğer ve safra kesesi hastalıkları gibi farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan yılan ısırması, böcek sokması, mantar zehirlenmesi ve aşırı alkol alımına bağlı karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisi yüzyıllardır bilinen tıbbi bir bitkidir (Karimi ve ark 2011).



Şekil 1.1. Silimarinin aktif bileşenleri (Abenavoli ve Bellentani 2013).

Silimarin; izosilibin, silikristin ve silidianinle beraber, ağırlıklı olarak silibininin aktif bileşenlerini içerir. Bunlar, bir koniferil alkol ile flavonolün

enzimatik kombinasyonu sonucu bitki içinde üretilen flavonol (flavonolignanlar) türevleridir (Kidd ve ark 2002).

Düşük biyoyararlanımı sebebiyle silimarinin plazma seviyesinin tedavi edici düzeye ulaşması için yüksek dozlarda verilmesine ihtiyaç vardır. Blumenthal ve arkadaşları (2000), silimarin emiliminin genellikle % 20-50 arasında olduğunu rapor etmişlerdir.

Hem insanlarda hem de hayvanlarda pik plazma silimarin konsantrasyonuna 4-6 saatte ulaşılır ve yarı ömrü 6-8 saattir (Pepping 1999). Silibinin ve silimarinin diğer bileşenleri karaciğerde glukronik asit ve sülfata hızlıca konjuge olur. Konjugatlar toplam dozunun % 80' inin bulunduğu plazma ve safraya geçer. Düşük bir miktar ise idrarla elimine edilir (Karimi ve ark 2011).

Steroid hormon yapısına benzerlik gösteren silimarin (Govind ve Sahni 2011), DNA ve RNA sentezini artırıp, karaciğer hücrelerinin yenilenebilme yeteneğini geliştirerek hepatosit dış membranın yapısını değiştirir. Bu durum hücrelere ksenobiyotiklerin girişini önler. Ayrıca lipit peroksidasyonunun önlenmesine sebep olan hücresel glutatyon miktarını artırır ve serbest radikalleri temizler (Saller ve ark 2007, Karimi ve ark 2011). Farmakolojik çalışmalarda (Toklu ve ark 2007, Ramakrishnan ve ark 2009, Wen ve ark 2008) silimarininin 240-800 mg/gün aralığında kullanılmasının toksik etki oluşturmadığı için güvenle kullanılabileceği raporlanmıştır.

Silimarinin antioksidan, immün düzenleyici, antifibrotik, antiproliferatif ve antiviral etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Shaker ve ark 2010). Bir antioksidan olarak silimarin, membranlarda lipit peroksidasyonuyla ilişkili radikallerin oluşumlarını önler, bazı radikal türlerini bağlar, böylece membran permeabilitesini düzenler ve bağlayıcıların hücre içi miktarını artırır (Trouillas ve ark 2008). Kiruthiga ve arkadaşları (2007) silimarin takviyesinin hidrojen peroksite maruz kalmış eritrositlerde lipit peroksidasyonunun belirteci olan malondialdehit (MDA) düzeylerinde azalmayla birlikte süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığını göstermişlerdir. Silimarinin antioksidan etkisi

sayesinde yaşlı sıçanlarda hipokampus ve kortekste protein oksidasyonunun azaldığı bildirilmiştir (Nencini ve ark 2007). Silimarinin etkileri sıçanlarda bir diğer deneysel diyabet ajanı olan alloksanla oluşturulan diyabet modellerinde de test edilmiştir (Szkudelski 2001, Soto ve ark 2004, Sha ve ark 2007). Soto ve arkadaşları (2010), alloksan uygulandıktan 20 gün sonra verilen silimarinin böbrek doku hasarı üzerine etkili olduğunu göstermişlerdir. Çalışmanın sonucunda silimarinin SOD, GPx ve katalazı aktive edebilme özelliğinin olduğu bildirilmiştir. Böylece, silimarinin diyabetik nefropati tedavisinde kullanılması önerilmiştir (Varzi ve ark 2007).

Silimarin ayrıca karaciğer koruyucu, ksenobiyotiklere maruziyette membran stabilitesinin artışı, nükleer ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla steroid benzeri özellikleri ve yıldız hepatositlerin miyofibroblastlara dönüşümünün baskılanması gibi etkilere de sahiptir. Ek olarak, silimarin /silibin, RNA polimeraz I uyarımıyla protein sentezini artırır (Saller ve ark 2007). Silimarin belirgin bir şekilde, artmış interlökin 2 ve 4 (IL-2, IL-4), interferon gama (IFN-γ) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) düzeylerini baskılar. Ayrıca, alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferaz düzeylerini azaltır ve hepatositlerde apoptozu baskılar (Saller ve ark 2007, Morishima ve ark 2010).

Bunlara ek olarak silibin, GLUT 4' ün blokajıyla adipositlerde glikoz alımını düzenler. Sıçan hepatositlerinde, 25-100 μmol/L konsantrasyon aralıklarında silibinin, piruvat kinaz aktivitesi üzerine baskılayıcı etkileriyle farklı glikoneojenik maddelerden glikoz oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Nomura ve ark 2008). Kültür edilmiş hepatositlerde silibinin düşük dozları mitokondride reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltır; bu azalma glikolizden artan karbonların oksidasyonunda azalmaya neden olur (Detaille ve ark 2008). Tip 1ve Tip 2 diyabetli hayvan modellerinde ve alkolik karaciğer hastalıklı bireylerde yapılan randomize çalışmalarda ve Tip 2 diyabetli hastalarda silibin, kan glikoz ve trigliserit seviyelerini etkileyerek hemoglobin A1c düzeylerini azaltmıştır (Maghrani ve ark 2004, Huseini ve ark 2006).

Yüksek oksijen kullanımı, yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri, artmış serbest demir iyonu ve düşük antioksidan savunma hep birlikte beyin dokusunu reaktif oksijen türlerinin hasarına karşı duyarlı hale getirir (Galhardi ve ark

2009). Silimarin, kan-beyin bariyerini geçerek MSS'ne girebildiği için MSS'de antioksidan aktivite gösterebilir (Karimi ve ark 2011). Silimarinin 200 mg/kg dozda verildiğinde substantia nigranın pars kompakta nöronlarını toksisiteye karşı koruduğu bildirilmiştir (Baluchnejadmojarad ve ark 2010). Silimarinin ayrıca beyinde dopamin, norepinefrin ve serotonin gibi bazı nörotransmitterlerin konsantrasyonlarını artırdığı da gösterilmiştir (Bansal ve ark 2013). Silimarin 14 gün süresince 200 mg/kg dozunda verildiğinde, yaşlı sıçanlarda hipokampus ve kortekste protein oksidasyonunu azaltmıştır (Galhardi ve ark 2009).

1.5. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör ve Histon Deasetilaz

1.5.1. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör

Nörotrofinler; nöronların büyümesini, canlılığını, çoğalmasını ve fonksiyonlarını etkileyen sinaptik fonksiyonu, plastisiteyi kontrol eden ve düzenleyen dimerik yapılı proteinlerdir (Kazak ve Yarım 2014). En iyi tanımlanmış nörotrofinler beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nöron büyüme faktörü (NGF), nörotrofin 3 (NT-3) ve nörotrofin 4 (NT-4)' dür (Skaper 2012). Nörotrofik faktörler, MSS'de nörotransmitter olarak görev yapmazlar, ancak nörotransmitterlerin etkili oldukları sinir yolaklarının canlılığını sağlayarak fonksiyonlarını sürdürebilmelerine yardımcı olurlar. Spesifik nöronlarda, bazı nörotrofik faktörlerin eksikliği o nöron ya da nöron grubunun canlılığını yitirmesine neden olur (Tongiorgi 2008).

Öğrenme ve egzersiz, hipokampusta BDNF salınımını artıran önemli faktörlerdir. Sinaptik canlılığı ve hücresel uyarılabilirliği etkileyerek nöronal plastisitite ve öğrenmenin oluşabilmesi için gerekli olan LTP'nin oluşumunu sağlar. Sinaptik aktivite, BDNF gen transkripsiyonunu, BDNF mRNA'nın dendritlere taşınmasını ve sinaptik yarığa BDNF salınmasını uyarır (Schmit ve Duman 2007). Korteks, hipokampus, serebellum, amigdala, bazı hipotalamik çekirdekler ve adrenerjik beyin sapı çekirdekleri BDNF ekspresyonunun en fazla olduğu yapılardır. BDNF ayrıca lenfositler, trombositler ve lökositlerden de sentezlenir ve kanda trombositlerde depolanır (Kazak ve Yarım 2014).

BDNF, beyin gelişimi sürecince olgunlaşmamış nöronların büyümesine ve farklılaşmasına katkı sağlar, nöronları toksik hasara karşı korur (Gürpınar ve ark 2007). Sıçanlarla yapılan bir çalışmada (Palizvan ve Sohya 2004) korteksten alınan nöronlara BDNF uygulandığında dendrit ve sinapsların gelişiminde artış gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada (Frecilla ve Insausti 2000) ise fare striatumunda bir grup hücreye BDNF geni yerleştirdikten sonra bütün hücrelere nörotoksin uygulanmış, BDNF geni yerleştirilen hücrelerde diğer hücrelerde görülen serotonin ve dopamin kaybının gerçekleşmediği bildirilmiştir. Bu bulgular BDNF'nin nöroplastisite ile ilişkisini ve nöronları koruyucu etkisi olduğunu destekler niteliktedir (Gürpınar ve ark 2007).

BDNF'nin diyabetli hayvanlarda insülin direncini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Öztekin ve ark 2011). Suwa ve arkadaşları (2006) yağ ve karbonhidratla zenginleştirilmiş diyetle beslenen hayvanlarda hipokampusta BDNF seviyelerinin azaldığını göstermişlerdir. Delahanty ve arkadaşları (2012) tedavi edilmemiş hiperglisemide BDNF sentezinde artış tespit etmişler ve bu durumun kompansatuar bir yanıt olduğunu ileri sürmüşlerdir. İnsülin direncini iyileştirdiği bilinen düzenli egzersizin insülin duyarlılığındaki az miktarda iyileşmeyle birlikte plazma ve iskelet kasındaki BDNF konsantrasyonunu artırdığı raporlanmıştır (Zoladz ve ark 2008, Pedersen ve ark 2009).

1.5.2. Histon Deasetilaz

Histon proteinleri kromatinlerdeki nükleozomların yapısında bulunur. Histonlar, metilasyon ve asetilasyon gibi genetik modifikasyonlarla kromatin yapıyı ve fonksiyonlarını değiştirerek gen transkripsiyonunun aktifleşmesini veya baskılanmasını sağlayan yapılardır. Ayrıca histonlar hücresel sinyal iletiminde de önemli rol oynar (Bora ve Yurter 2007). Histon asetilasyonu, histon asetil transferazlar (HAT) ve histondeasetilaz (HDAC) tarafından düzenlenir (Lu ve ark 2006).

Genlerin okunmasından sorumlu en önemli modifikasyon histon asetilasyonudur. Negatif yüklü asetil grubunun, histon proteininin amino bölgesindeki pozitif yüklü lizin amino asidine bağlanması, pozitif yükü nötrolize

ederken kromatinde gevşeme meydana gelir. Kromatin yapısında görülen bu değişiklik transkripsiyon faktörlerinin hedef genlere ulaşabilmelerini sağlar. Asetil grubunun ayrılması ise deasetilasyon olarak ifade edilir ve kromatinin tekrar sıkı bağlanmasına ve gen ifadesinin baskılanmasına yol açar (Peterson ve Laniel 2004). HDAC ve HAT aktivitesi hücre bölünmesi, apoptoz ve farklılaşma gibi hücresel olaylarda da ilişkilidir (Vahid ve ark 2015).

HDAC, hem pozitif hem de negatif transkripsiyon değişikliklerine aracılık edebilir (Vahid ve ark 2015). HDAC, memelilerde 4 sınıfa ayrılır. Sınıf 1: Çinko bağımlı HDAC1, 2, 3 ve 8, Sınıf 2: HDAC4, 5, 6, 7, 9, 10, Sınıf 3: HDAC7 ve Sınıf 4 ise HDAC11'den oluşur (Vahid ve ark 2015). Sınıf 1 HDAC'ler transkripsiyon baskılayıcı proteinlerden oluşmaktadır ve HDAC aktivitesini etkileyerek kromatin yoğunluğunu artırırken transkripsiyonun baskılanmasını sağlarlar (Millard ve ark 2013).

Histon asetilasyonu, glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir görev üstlenen ve glikoz homeostasisini kontrol eden HDAC inhibitörleri tarafından gerçekleştirilir (Feng ve ark 2011). HDAC inhibitörleri yapısal özelliklerine göre hidroksamatlar, siklik tetrapeptitler, benzamidler, elektrofilik ketonlar ve kısa zincirli yağ asitleri olmak üzere beş gruptur (Dokmanovic ve Marks 2005).

HDAC3, çekirdek hormon reseptörleri aracılığıyla transkripsiyonu destekleyen enzimatik bir bileşen olmakla birlikte yağ asidi ve glikoz metabolizmasının düzenlemesinde etkin rol alır. Genetik ve farmokolojik çalışmalarda HDAC3'ün karaciğerde lipid depolanmasını ve glikoz tüketimini etkileyerek metabolik faaliyetlerin düzenlenmesine katkı sağladığı bildirilmiştir (Feng ve ark 2011).

Kan glikoz seviyesinin yüksekliği pankreasın beta hücreleri için toksiktir. İnsülin salınımının düzenlenmesinde pankreatik duedonal transkripsiyon faktörü 1 (PDx1) oldukça önemlidir (Mıcılı ve Özoğul 2007). İnsülin gen ekspresyonundan HDAC ve PDx1 sorumludur. Obez farelerle yapılan bir çalışmada, HDAC3 inhibisyonunun iskelet kası ve kalp hücrelerinde mitokondri oluşumunda eksikliğe neden olduğu raporlanmıştır (Knutson ve ark 2008).

HDAC2, diyabetli farelerde diyabetin düzenlenmesinde anahtar bir rol oynarken, HDAC3 ise Tip 2 DM prevelansının azalmasına katkı sağlar (Zeng ve ark 2014). HDAC3, HDAC4 ile birlikte öğrenme ve hafıza mekanizmasında da önemli role sahiptir. Ek olarak, HDAC3 ve HDAC4 gen mutasyonlarının şizofreni hastalığının fizyopatolojisi ile de ilişkili olabileceği savunulmuştur (Wang ve ark 2014).

Bu tez çalışmasının amacı, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda silimarin takviyesinin kognitif fonksiyonlar üzerine etkisini çeşitli davranış testleriyle değerlendirmek ve aynı zamanda kan ve beyin dokusunda HDAC3 ve BDNF düzeylerini ölçmektir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (SÜDAM) Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 12.11.2014 tarih ve 2014/9 karar no'lu izniyle aynı merkezde gerçekleştirildi.

Çalışmada yaklaşık 400-450 gr ağırlığında 38 adet 4 aylık erkek Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar 21 ± 2˚ C sıcaklıkta, % 50 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünün sağlandığı odalarda, polikarbonat kafeslerde ve her kafeste en fazla 5 hayvan olacak şekilde tutuldu ve sıçanlara standart sıçan yemi ve çeşme suyu *ad libitum* olarak verildi.

2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Gruplar oluşturulmadan önce tüm hayvanlar tartıldı ve homojen ağırlıklı 4 grup oluşturuldu. Grupların dağılımı şu şekilde belirlendi:

1. **Kontrol Grubu (n: 6):** 35 gün boyunca taşıyıcı madde olan mısır yağı oral olarak verildi. 31. günden itibaren sıçanlara beş gün süren davranış testleri uygulandı. Davranış testlerinin bitiminde kan ve doku numuneleri alındı.

2. **Diyabet Grubu (n: 12):** STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra başlanarak 35 gün boyunca taşıyıcı madde olan mısır yağı oral olarak verildi. 31. günden itibaren sıçanlara beş gün süren davranış testleri uygulandı. Davranış testlerinin bitiminde kan ve doku numuneleri alındı.

3. **Silimarin Grubu (n: 8):** 35 gün boyunca 200 mg/kg silimarin mısır yağında çözülerek oral gavaj yoluyla verildi ve son 5 gün davranış testleri uygulandı. Çalışmanın 35. gününde kan ve doku numuneleri alındı.

4. **Diyabet+Silimarin Grubu (n: 10):** Sıçanlara STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra başlanarak 35 gün boyunca 200 mg/kg silimarin mısır yağında çözülerek oral gavaj yoluyla verildi ve son 5 gün davranış testleri uygulandı. Çalışmanın 35. gününde kan ve doku numuneleri alındı.

2.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması

Sıçanlarda deneysel diyabet oluşturmak için STZ kullanıldı (S0130 Sigma, ABD). STZ enjeksiyonundan önce 24 hayvan 5 saat aç bırakıldı. Bu sürenin sonunda, pH'sı 4,5 olan 0,1 M sodyum sitrat tamponu içinde taze olarak hazırlanan STZ, 50 mg/kg dozunda ip olarak tek doz uygulandı. Ardından STZ uygulanan hayvanlara hipoglisemiyi önlemek için çeşme suyu yerine 3 gün boyunca % 5' lik dekstroz verildi. STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra 24 hayvanın kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glikoz düzeyleri bir glikometreyle (eBsensor, Tayvan) ölçülerek, kan glikoz düzeyi 250 mg/dl'yi geçen 22 sıçan diyabet grubuna dahil edildi. Çalışma süresince diyabetli sıçanlarda polifaji, polidipsi gibi diyabet belirtileri gözlemlendi.

2.3. Silimarin Takviyesi

Çalışmada silimarin takviyesi yapılacak gruplara 35 gün süresince, 200 mg/kg silimarin (S0292, Sigma ABD) mısır yağı içerisinde çözülerek oral gavaj yoluyla verildi. Silimarin çözülmeden önce - 20 ºC' de, çözüldükten sonra ise + 4 ºC'de ışıktan korunarak saklandı. Silimarin ve mısır yağı takviyesi her gün aynı saatlerde (10:00- 10:30) ve aynı kişi tarafından uygulandı.

2.4. Sıçanlara Uygulanan Davranış Testleri

Çalışmanın 31. gününden itibaren beş gün boyunca sıçanlara OF, EPM ve MWM testleri uygulandı. Tüm gruplara 31. gün MWM, 32. ve 33. günlerde önce MWM, ardından OF testi, 34. ve 35. günlerde ise MWM'den sonra EPM testi uygulandı. Tüm davranış testleri ses ve ışık izolasyonu yapılmış bir odada, aynı kişi tarafından ve hayvanın emosyonel durumunu değiştirecek faktörlere dikkat edilerek (koku ve gürültü gibi farklı uyaranlar elimine ederek, her uygulamada aynı kıyafeti giyerek) uygulandı. Kullanılan test odasının havalandırılması sağlandı. EPM ve OF düzenekleri, her sıçanın davranış testi sonrasında, hayvana ait ipuçlarını (koku, tüy, idrar gibi) ortamdan uzaklaştırmak için %70'lik alkol ile temizlendi ve kurulandı. Tüm davranış testleri günün aynı saatinde gerçekleştirildi (09:00-12:00).

Deneklerin uygulanan davranış testleri sırasında sergiledikleri davranışlar video kamera kullanılarak kaydedildi. Davranış testlerinin analizi bir yazılım kullanılarak gerçekleştirildi (Ethovision XT 9.0, Noldus Information Tech.Wageningen, Hollanda).

2.4.1. Açık Alan Testi

Sıçanların spontan lokomotor aktivitesi 80 cm x 80 cm boyutlarında 40 cm yüksekliğinde kenarları olan, kare şeklinde siyah ahşap bir kutu olan OF düzeneği ile değerlendirildi. Düzeneğin duvara yakın bölgeleri perifer, orta kısmı ise merkez olarak belirlendi. Her bir sıçan merkezden düzeneğe bırakıldı ve 5 dakika süresince kutu içinde serbest hareket etmelerine izin verildi. Test sırasında aşağıdaki parametreler kaydedildi: a) toplam kat edilen mesafe (cm), b) merkezde ve c) kenarlarda geçirilen süre (s), d) arka ekstremiteleri üzerinde yükselme, e) defekasyon ve f) kaşınma sayıları, g) test sırasındaki ortalama hızı (cm/s), h) hareketli olarak geçirilen süreler (s), ı) merkeze geçiş sayısı ve j) duvar kenarına geçiş sayısı.

2.4.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi için yerden 50 cm yüksekliğinde iki kapalı ve iki açık kolu olan bir düzenek kullanıldı. Siyah pleksiglastan yapılmış düzeneğin kapalı ve açık kolları 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde idi. Kapalı kolların 40 cm yüksekliğinde ahşap duvarları vardı. Sıçanlar yüzleri açık kollardan birisine bakacak şekilde tek tek platformun ortasına yerleştirildi ve 5 dakikalık test süresi boyunca düzenekte serbestçe hareket etmelerine izin verildi (Resim 1). Test sırasında aşağıdaki parametreler kaydedildi: a) toplam kat edilen mesafe (cm), b) merkeze, c) açık ve d) kapalı kollara giriş sayıları ve e) merkezde, f) açık ve g) kapalı kollarda geçirilen süreler (s).



Şekil 2.1. EPM testi sırasında açık koldaki sıçan.

2.4.3. Morris Su Labirenti Testi

Spasyal öğrenme ve hafıza 150 cm çapında ve 60 cm derinliğinde daire şeklinde bir su tankı olan MWM ile analiz edildi. Suyun sıcaklığı 25 ± 2 ºC olarak ayarlandı. Su toksik olmayan yeşil boya ile renklendirildi. Tank kuzeydoğu (NE), güneydoğu (SE), kuzeybatı (NW) ve güneybatı (SW) olmak üzere hayali dört bölüme ayrıldı. 10 cm x 10 cm boyutlarındaki kare platform (kaçış platformu) suyun 2 cm altına kenarlardan uzak, NW kadranına yerleştirildi ve test süresince sabit tutuldu. Tankın çevresine hayvanın yer-yön tayini yapabilmesi için görebileceği şekilde renkli geometrik şekilli ipuçları yerleştirildi ve tankın çevresi perde ile kapatılarak çevre izolasyonu sağlandı.

MWM, sıçanlara birbirini izleyen 4 gün boyunca uygulandı ve son uygulamadan 24 saat sonra (5. gün) analiz testi yapıldı. Uygulama esnasında sıçan her defasında farklı bir bölümden suya bırakıldı ve 60 s'de platformu bulması beklendi (Resim 2). Belirlenen sürede platformu bulamayan hayvanlar 30 s süreyle platformun üzerine bırakıldılar (Resim 3). Böylece çevreyi tanımaları ve platformun yerini öğrenmeleri hedeflendi. Test sırasında aşağıdaki parametreler kaydedildi;

a) platformu bulma süresi (s), b) toplam kat edilen mesafe (cm), c) ortalama yüzme hızı (cm/s) ve d) thigmotaksis davranış süresi (s).

Dört günlük uygulamanın ardından (5. gün), kaçış platformu kaldırıldıktan sonra 90 s'lik analiz testi yapıldı. Analiz testi sırasında aşağıdaki parametreler kaydedildi; a) toplam kat edilen mesafe (cm), b) ortalama yüzme hızı (cm/s), c) platform üzerinden geçiş sayısı ve d) platform alanında geçirilen süre (s).



Şekil 2.2. MWM testi.



Şekil 2.3. Platformda bekletilen sıçan.

2.5. Deneyin Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması

Tüm gruplar beş gün süren davranış testlerinin ardından, intramüsküler (i.m.) 50 mg/kg ketamin, 10 mg/kg ksilazin enjeksiyonu ile anestezi altına alındı. Anestezi uygulanan sıçanlardan intrakardiyak kan alımı gerçekleştirildi. Antikoagülan içermeyen kuru ve EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri, santrifüj cihazında (Nüve NF 1200R, Türkiye), 4100 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek sırasıyla serum ve plazmalarına ayrıldı. Kan alımının ardından servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilen sıçanlardan beyin dokuları alındı. Beyin örnekleri soğuk serum fizyolojik ile kan ve doku artıklarından arındırıldıktan sonra kurutma kağıdından geçirilerek plastik tüplere konuldu ve sıvı azot tankına atılarak hızlı bir şekilde donduruldu. Serum, plazma ve beyin numuneleri ölçümler yapılıncaya kadar - 80 º C'de saklandı.

2.6. Doku Homejenizasyonu

-80 ºC'de bekletilen beyin dokularının, homojenizasyondan önce sırasıyla -20 ºC ve + 4 ºC'de çözülmeleri sağlandı. Dokular hassas terazide tartılarak darası alınmış tüplere aktarıldı ve her bir tüpe numune ağırlıklarının 10 katı kadar Tris – HCl tamponu (50 mmol, pH: 7,5) eklendi. Daha sonra tüpler buz dolu bir kap içinde homojenizatör (Daihan HS, Seul, Güney Kore) yardımıyla homojenize edildi.

Homojenatlar 4100 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant oluşturuldu. Süpernatant'tan 1 ml alınarak 3/5 oranında hazırlanan etanol/kloroform solüsyonundan aynı miktarda üzerine eklendi. Elde edilen homejenatlar 4100 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerin üzerinde oluşan süpernatant protein ölçümü için ayrıldı.

2.7. Biyokimyasal Analizler

2.7.1. BDNF Ölçümü

BDNF seviyelerinin ölçümü, BDNF ELISA Kiti (Cusabio, Katalog No: CSB-E04504r, İspanya) kullanılarak ELISA yöntemiyle yapıldı. Testin prensibi, mikro plaka üzerine BDNF antikorları bağlanmıştır. Standartlar ve örnekler kuyucuklara pipetlenir. Kuyucuklara enzim bağlı monoklonal BDNF antikorlar eklenir. Yıkama ile bağlanmamış antikor-antijen kompleksi uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu eklenir ve renklenme meydana gelir. Durdurma solüsyonu ile renklenme durdurulur ve oluşan renk ELISA spektofotometresinde ölçülür.

BDNF analiz basamakları sırasıyla şöyledir:

1. Reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlanarak oda sıcaklığına getirildi.
2. Her bir kuyucuğa 100 µl standart ve örnek eklendi ve 37 ºC' de 2 saat inkübe edildi.
3. Her bir kuyucuğa 100 µl biotin antikoru eklendi ve 37 ºC'de 1 saat inkübe edildi.
4. Her kuyucuk aspire edildi ve 200 µl yıkama tamponu kullanılarak yıkandı. İşlem toplamda üç yıkama olacak şekilde tekrarlandı.
5. 100 µl BDNF konjugat eklenip 37 ºC'de 1 saat inkübe edildi. Ardından aspirasyon ve yıkama işlemleri tekrarlandı.
6. Her kuyucuğa 90 µl substrat solüsyonu pipetlendi ve ışıktan korunarak 37 ºC' de 30 dakika inkübe edildi.
7. 50 ML durdurma solüsyonu kuyucuklara eklenerek renk reaksiyonu durduruldu.

8. Örneklerin optik dansitesi 450 nm'de ELISA okuyucusu kullanılarak (Powervave XS, Biotek, USA) ölçüldü.
9. BDNF seviyeleri kanda ng/ml beyin dokusunda ise ng/mg protein olarak ifade edildi.

2.7.2. HDAC3 Ölçümü

HDAC3 seviyeleri, Rat Histone Deasetylase 3 ELISA Kiti (Bioassay Technology Laboratory, Katalog No: E1215Ra, Çin Halk Cumhuriyeti) kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü.

Testin prensibi, HDAC3 monoklonal antikorlarıyla kaplanmış mikroplakaya standart ve örnekler pipetlenir. Kuyucuklara enzim bağlı monoklonal HDAC3 antikorları eklenir ve inkübasyon için beklenir. Ardından yıkama ile bağlanmamış antikor-antijen kompleksi uzaklaştırılır. Substrat solüsyonunun eklenmesiyle renk değişikliği oluşur.

HDAC3 analiz basamakları sırasıyla şöyledir:

1. Reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlanarak oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart kuyucuklarına 50 µl standart ve 50 µl HRP-streptavidin eklendi. Örnek kuyucuklarına 40 µl örnek, 10 µl HDAC3 antikoru ve 50 µl HRP streptavidin pipetlenerek 37 ºC' de 1 saat inkübe edildi.
3. Her kuyucuk yıkama tamponu kullanılarak yıkandı. İşlem beş kez tekrarlandı.
4. Yıkama işlemi bittikten sonra 50 µl renklendirici eklenerek, renk değişimi için 37 ºC'de 10 dakika inkübe edildi.
5. 50 µl durdurma solüsyonu kuyucuklara pipetlenerek renk reaksiyonu durduruldu.
6. Örneklerin optik dansitesi 450 nm'de ELISA okuyucusu kullanılarak (Powervave XS, Biotek, USA) ölçüldü.
7. HDAC3 seviyeleri kanda ng/ml, beyin dokusunda ng/mg protein olarak ifade edildi.

Beyin dokusunda protein miktarının tayini Lowry ve ark (1951) metoduna göre yapıldı.

2.8. Verilerin Analizi

Verilerin analizi SPSS 20.0 programı (Chicago, ABD) kullanılarak yapıldı. Sayısal nitelikteki değişkenlerin tanımlayıcı değerleri ortalama (ort) ve standart hata (SH) olarak ifade edildi. Öğrenme ve anksiyete parametrelerinin diyabet ve silimarin ile ilişkisini değerlendirmek, grup ortalamaları ve gruplar arasındaki farkın önemini tespit etmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Farklılık çıkan grupların karşılaştırılmasında ise Tukey testinden yararlanıldı. Farklı zamanlarda ölçülen sayısal nitelikteki değişkenlerin ortalamalarının karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanıldı. Gruplar arası farkın önemli olduğu durumlarda farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için Bonferroni düzeltmeli Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Silimarin Takviyesi ve Diyabetin Vücut Ağırlığına Etkisi

Çalışma gruplarının, çalışma süresince haftalık ölçülen vücut ağırlıklarına ilişkin ort ± SH değerleri Çizelge 3.1.'de sunulmuştur. Gruplar zamana göre vücut ağırlıkları değişimleri bakımından farklılık göstermiştir ($P < 0,05$). Kontrol ve silimarin gruplarının vücut ağırlıklarında bir artış izlenirken, diyabet ve DM+Silimarin gruplarının başlangıçta yüksek vücut ağırlıklarına sahip oldukları zamanla vücut ağırlıklarını kaybettikleri ve diyabet grubunun çalışmanın sonunda en düşük vücut ağırlığına sahip olduğu görüldü.

Çizelge 3.1. Silimarin takviyesi ve diyabetin vücut ağırlığına etkisi (ort ± SH).

	Kontrol	**Diyabet**	**Silimarin**	**DM+Silimarin**
VA0 (g)	383,16 ± 12,86	418,50 ± 9,09[a]	366,50 ± 11,13[b]	431,60 ± 9,96[ac]
VA1 (g)	387,50 ± 12,02[*]	370,66 ± 8,50[*]	370,25 ± 10,41[*]	387,10 ± 9,31[*]
VA2 (g)	405,33 ± 14,56	367,00 ± 10,30[a]	382,25 ± 12,61	394,10 ± 11,28
VA3 (g)	410,33 ± 13,62[*]	360,50 ± 9,63[*a]	387,00 ± 11,79[*]	379,50 ± 10,55[*]
VA4 (g)	414,33 ± 14,49	363,75 ± 10,24[a]	399,37 ± 12,55[b]	377,50 ± 11,26
VA5 (g)	420,66 ± 15,05	343,25 ± 10,64[a]	406,00 ± 13,03[b]	368,80 ± 11,66[ac]
VA6 (g)	420,50 ± 15,32	339,83 ± 10,83[a]	407,50 ± 13,26[b]	369,70 ± 11,86[ac]

VA: Vücut ağırlığı
*VA0'a göre, [a]Kontrole göre, [b]Diyabete göre, [c]Silimarine göre $P < 0,05$.

3.2. OF Testinde Değerlendirilen Parametreler

Çizelge 3.2. OF testi sırasında ölçülen parametreler (ort ± SH).

	Kontrol	**Diyabet**	**Silimarin**	**DM+Silimarin**
Defekasyon sayısı	2,83 ± 1,16	4,50 ± 1,16[a]	2,50 ± 2,07[b]	2,67 ± 0,866[b]
Toplam kat edilen mesafe (cm)	570,17 ± 250,78	719,76 ± 339,52	572,35 ± 241,72	570,82 ± 209,19
Kaşınma sayısı	3,17 ± 1,94	2,50 ± 2,46	3,25 ± 1,83	1,90 ± 2,07
Hareketli olarak geçirilen süre (s)	14,96 ± 8,45	26,8 ± 12,41	20,77 ± 5,23	15,72 ± 9,66
Arka ekstremiteleri üzerine yükselme sayısı	7,00 ± 1,89	11,00 ± 4,70	9,88 ± 6,10	7,40 ± 3,13
Test sırasındaki ortalama hız (cm/s)	1,90 ± 0,83	2,39 ± 1,13	2,44 ± 1,88	1,90 ± 0,69
Kenarlarda geçirilen süre (s)	116,10 ± 72,66	150,03 ± 55,06	185,15 ± 52,45	162,84 ± 85,22
Merkezde geçirilen süre (s)	192,43 ± 47,65	141,83 ± 53,86	152,55 ± 23,12	137,36 ± 85,22
Merkeze geçiş sayısı	18,00 ± 11,45	15,67 ± 6,44	22,88 ± 12,10	17,40 ± 13,45
Duvar kenarına geçiş sayısı	15,83 ± 10,02	13,33 ± 5,63	19,13 ± 8,70	15,80 ± 12,57

[a]Kontrole göre, [b]Diyabete göre $P < 0,05$.

OF testinde değerlendirilen parametreler Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir. Gruplar arasında defekasyon sayısı bakımından fark bulunurken ($P < 0,05$), diğer değişkenler için gruplar arasında fark bulunmamıştır ($P > 0,05$). Defekasyon sayısı diyabet grubunda diğer gruplardan yüksekti ($P < 0,05$).

3.3. EPM Testinde Değerlendirilen Parametreler

Çizelge 3.3. EPM testi sırasında ölçülen parametreler (ort ± SH).

	Kontrol	**Diyabet**	**Silimarin**	**DM+Silimarin**
Toplam kat edilen mesafe (cm)	343,47 ± 170,89	435,57 ± 272,29	1466,55 ± 698,92[ab]	559,24 ± 412,40[c]
Kapalı kollara giriş sayısı	0,67 ± 0,51	2,36 ± 1,12 [a]	1,63 ± 0,91	2,10 ± 0,99 [a]
Açık kollara giriş sayısı	1,67 ± 0,51	0,36 ± 0,67	2,00 ± 2,77	0,60 ± 0,69
Merkeze giriş sayıları	1,17 ± 1,94	3,09 ± 6,70	6,50 ± 7,83	0,40 ± 0,69
Açık kollarda geçirilen süre (s)	62,73 ± 35,11	4,09 ± 4,26[a]	36,40 ± 33,6	27,98 ± 33,21
Kapalı kollarda geçirilen süre (s)	221,36 ± 119,37	291,23 ± 8,73	263,85 ± 40,91	256,88 ± 92,77
Merkezde geçirilen süre (s)	3,10 ± 5,71	3,41 ± 6,06	9,95 ± 10,48	8,34 ± 12,68

[a]Kontrole göre, [b]Diyabete göre, [c]Silimarine göre $P < 0,05$.

EPM testinde değerlendirilen parametreler Çizelge 3.3.'te verilmiştir. EPM testinde; toplam kat edilen mesafe, kapalı kollara giriş sayısı ve açık kollarda geçirilen sürelerde gruplar arasında fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Toplam kat edilen mesafe silimarin grubunda diğer gruplardan yüksekti ($P < 0,05$). Kapalı kollara giriş sayısı diyabet ve DM+Silimarin gruplarında kontrol grubuna göre yüksekti ($P < 0,05$). Açık kollarda geçirilen süre diyabet grubunda kontrol grubundan düşüktü ($P < 0,05$).

3.4. MWM Testi Öğrenme Dönemi Parametrelerinin Değerlendirilmesi

MWM testi sırasında sıçanların tekrarlayan günlerde kat ettiği mesafeler Çizelge 3.4.'de verilmiştir. MWM testi sırasında gruplar arasında tekrarlayan günlerde platformu bulmak için kat edilen toplam mesafe değerlendirildiğinde gruplar arasında fark yoktu ($P > 0,05$), fakat zamana bağlı değişimde fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Her bir grubun testin 2. gününde kat ettiği toplam mesafe, testin 1. gününde kat edilen mesafeden düşüktü ($P < 0,05$). Ayrıca testin 3. ve 4. gününde kat edilen mesafeler 1. ve 2. günden daha düşüktü ($P < 0,05$).

Çizelge 3.4. Tekrarlayan günlerde platformu bulmak için kat edilen toplam mesafe (cm) (ort ± SH).

	Kontrol	**Diyabet**	**Silimarin**	**DM+Silimarin**
1.gün	649,40 ± 76,62	703,20 ± 54,17	656,65 ± 66,35	773,97 ± 59,35
2.gün	380,00 ± 102,81[a]	466,25 ± 72,70[a]	360,47 ± 89,04[a]	527,84 ± 79,64[a]
3.gün	344,68 ± 90,61[ab]	294,49 ± 64,07[ab]	303,17 ± 78,47[ab]	270,12 ± 70,19[ab]
4.gün	266,15 ± 72,19[ab]	249,93 ± 51,04[ab]	345,08 ± 62,52[ab]	246,59 ± 55,92[ab]

[a]1. güne göre, [b]2. güne göre $P < 0,05$.

Çizelge 3.5.'te MWM testi sırasında tekrarlanan günlerde sıçanların platformu bulma süreleri verilmiştir. Sıçanların platformu bulma sürelerine

bakıldığında gruplar arasında fark bulunmazken (P > 0,05) grup içinde zamana bağlı değişimde fark bulunmuştur (P < 0,05). Her bir grupta, platformu bulmak için geçen süreler 1. günde en yüksekken, takip eden günlerde bu süre giderek azalmıştır (P < 0,05).

Çizelge 3.5. Tekrarlanan günlerde sıçanların platformu bulma süreleri (s) (ort ± SH).

	Kontrol	**Diyabet**	**Silimarin**	**DM+Silimarin**
1.gün	35,11 ± 4,53	39,28 ± 3,20	39,23 ± 3,92	42,06 ± 3,51
2.gün	20,22 ± 4,57[a]	23,22 ± 3,23[a]	22,61 ± 3,96[a]	26,34 ± 3,54[a]
3.gün	18,36 ± 4,04[a]	18,12 ± 2,85[a]	20,46 ± 3,50[a]	16,59 ± 3,13[a]
4.gün	15,49 ± 3,01[ab]	15,6 ± 2,13[ab]	19,41 ± 2,60[ab]	14,63 ± 2,33[ab]

[a]1. güne göre, [b]2. güne göre P < 0,05.

MWM testi sırasında sıçanların tekrarlayan günlerde thigmotaksis davranış süreleri Çizelge 3.6.'da verilmiştir. MWM testinde thigmotaksis davranış süresi bakımından gruplar arasında fark bulunmazken (P > 0,05) grup içinde zamana bağlı değişim görülmüştür (P < 0,05). Sıçanlarda thigmotaksis davranış süresi testin 1. gününde en yüksek iken 2., 3. ve 4. günlerinde 1. güne göre azalmıştır (P < 0,05).

Çizelge 3.6. Tekrarlayan günlerde Thigmotaksis davranış süresi (s) (ort ± SH).

	Kontrol	**Diyabet**	**Silimarin**	**DM+Silimarin**
1.gün	10,94 ± 2,84	13,18 ± 2,09	8,82 ± 2,46	18,11 ± 2,20
2.gün	3,21 ± 1,64[a]	3,64 ± 1,16[a]	0,88 ± 1,42[a]	6,11 ± 1,27[a]
3.gün	1,07 ± 1,28[a]	2,50 ± 0,91[a]	1,07 ± 1,11[a]	1,00 ± 0,98[a]
4.gün	0,88 ± 1,22[a]	1,72 ± 0,86[a]	3,12 ± 1,06[a]	0,93 ± 0,94[a]

[a]1. güne göre $P < 0,05$.

MWM testi sırasında sıçanların tekrarlayan günlerdeki hızları Çizelge 3.7.'de verilmiştir. Bu parametrede gruplar arasında fark yokken ($P > 0,05$), zamana karşı fark vardı ($P < 0,05$). Testin 3. günü ölçülen ortalama hız, 1. ve 2. günlere göre daha düşüktü ($P < 0,05$). Ayrıca 4. günde ölçülen hız, 1. günden daha düşüktü ($P < 0,05$).

Çizelge 3.7. Tekrarlayan günlerde hız (cm/s) (ort ± SH).

	Kontrol	**Diyabet**	**Silimarin**	**DM+Silimarin**
1.gün	16,78 ± 0,73	16,41 ± 0,51	16,01 ± 0,63	17,71 ± 0,56
2.gün	16,27 ± 1,15	18,46 ± 0,81	13,17 ± 0,99	16,90 ± 79,64
3.gün	15,85 ± 1,46[ab]	14,49 ± 1,03[ab]	12,24 ± 1,26[ab]	14,21 ± 1,13[ab]
4.gün	15,50 ± 1,39[a]	14,28 ± 0,98[a]	14,12 ± 1,21[a]	15,06 ± 1,08[a]

[a]1. güne göre, [b]2. güne göre $P < 0,05$.

3.5. MWM Testi, Test Günü Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Ardışık dört gün süresince yapılan MWM alıştırma denemeleri sonrasında 5. gün yapılan test günü değerlendirmesinin sonuçları Çizelge 3.8.'de verilmiştir. Her bir kadranda geçirilen sürede gruplar arasında fark görülmezken, hız değişkeninde gruplar arası fark bulunmuştur ($P < 0,05$). DM+Silimarin grubu, diyabet grubuna göre daha yavaştı. Platform üzerinden geçiş sayısı, platform alanında geçirilen süre ve platform alanından geçiş sayısı değişkenlerinde gruplar arası farklılık bulunmuştur ($P < 0,05$). Platform üzerinden geçiş sayısı ve platform alanında geçirilen süre diyabet grubunda diğer gruplara göre düşüktü ($P < 0,05$). Platform alanından geçiş sayısı diyabet grubunda kontrol grubuna göre düşüktü, silimarin grubunda diyabet grubundan yüksekti ve DM+Silimarin grubunda ise silimarin grubundan düşüktü ($P < 0,05$). MWM uygulanan sıçanlarda toplam kat edilen mesafede gruplar arası fark vardı ve DM+Silimarin grubunda diyabet grubundan düşüktü ($P < 0,05$).

Çizelge 3.8. MWM test günü değerlendirilen parametreler (ort ± SH).

	Kontrol	**Diyabet**	**Silimarin**	**DM+Silimarin**
Test günü hız (cm/s)	26,87 ± 3,65	32,01 ± 5,87	27,86 ± 3,59	25,5 ± 3,81[b]
Kuzeybatı kadranında geçirilen süre (s)	44,33 ± 10,49	40,60 ± 4,90	42,65 ± 10,00	44,14 ± 8,39
Kuzeydoğu kadranında geçirilen süre (s)	14,36 ± 4,60	15,68 ± 5,50	17,37 ± 10,43	17,56 ± 2,66
Güneybatı kadranında geçirilen süre (s)	20,36 ± 4,69	22,55 ± 7,35	18,97 ± 6,88	18,12 ± 5,12
Güneydoğu kadranında geçirilen süre (s)	11,13 ± 3,48	11,37 ± 3,63	11,20 ± 4,81	10,36 ± 4,66
Platform alanından geçiş sayısı	7,67 ± 1,63	4,17 ± 1,80[a]	7,75 ± 1,58[b]	5,40 ± 1,83[c]
Platform üzerinden geçiş sayısı	5,17 ± 0,98	1,75 ± 0,86[a]	5,50 ± 0,75[b]	4,10 ± 1,79[b]
Platform alanında geçirilen süre(s)	2,33 ± 0,32	0,96 ± 0,44[a]	2,20 ± 0,56[b]	2,20 ± 1,12[b]
Toplam kat edilen mesafe (cm)	2383,94 ± 323,25	2794,24 ±0,86	2249,43 ± 344,78	2502,23 ± 435,24[b]

[a]Kontrole göre, [b]Diyabete göre, [c]Silimarine göre $P < 0,05$.

3.6. BDNF ve HDAC Seviyeleri

Plazma ve beyin dokusu BDNF seviyeleri Çizelge 3.9.'da gösterilmiştir. Plazma BDNF seviyeleri diyabet grubunda, diğer gruplardan düşüktü. Beyin dokusu BDNF seviyeleri, diyabet grubunda kontrol grubuna göre düşüktü ($P < 0,05$).

Çizelge 3.9. Plazma ve beyin dokusu BDNF seviyeleri (ort± SH).

BDNF	Kontrol	Diyabet	Silimarin	DM+Silimarin
Plazma (ng/ml)	0,89 ± 0,16	0,46 ± 0,10 [a]	0,79 ± 0,22[b]	0,80 ± 0,26[b]
Beyin (ng/mg protein)	0,18 ± 0,05	0,10 ± 0,05 [a]	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,03

[a]Kontrole göre, [b]Diyabete göre $P < 0,05$.

Plazma ve beyin dokusu HDAC3 seviyeleri Çizelge 3.10.'da verilmiştir. Plazma ve beyin dokusu HDAC3 seviyelerinde gruplar arasında fark yoktu ($P > 0,05$).

Çizelge 3.10. Plazma ve beyin dokusu HDAC3 seviyeleri (ort ± SH).

HDAC3	Kontrol	Diyabet	Silimarin	DM+Silimarin
Plazma (ng/ml)	4,80 ± 0,62	4,34 ± 0,99	4,74 ± 1,32	5,05 ± 0,85
Beyin (ng/mg protein)	0,40 ± 0,12	0,46 ± 0,12	0,47 ± 0,09	0,39 ± 0,08

4.TARTIŞMA

Diyabet, insülin sekresyonunda azalma veya insülinin yapısal bozukluğu nedeniyle ortaya çıkan polidipsi, poliüri, polifaji, kilo kaybı ve halsizlik gibi semptomlarla karakterize bir hastalıktır. Ayrıca diyabet birçok organ ve sistemi olumsuz etkiler (Kuzuya ve ark 2002). Diyabet varlığında, enerji kaynağı olan glikozun idrar ile kaybı lipolize neden olur ve subkutan yağ dokusu azalarak kilo kaybı gelişir (Abacı ve ark 2007). Çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturulan gruplarda kilo kaybı gözlenirken, kontrol ve silimarin gruplarının vücut ağırlıklarında azalma olmadı. En fazla kilo kaybı diyabet grubunda görülmüştür.

Alvarez ve ark (2009), davranışsal değişikliklerde hipokampus ve diyabet arasında dikkat çekici bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. OF testi sıçanların çevrede sergiledikleri davranış değişikliklerini ve lokomotor aktivitelerini değerlendirmede kullanılır. OF testinde değerlendirilen parametrelerden olan defekasyon sayısı, sıçanın emosyonel durumu hakkında bilgi verir ve OF testinde anksiyete düzeyinin en önemli beliryecisidir (Prut ve Belzung 2003). Çalışmamızda, hayvanın kendisine daha güvenli bir alan oluşturmak için gerçekleştirdiği defekasyonun diyabet grubunda, DM+Silimarin ve silimarin gruplarına kıyasla fazla olması, diyabetli sıçanlarda davranış değişikliği olduğunu ve diyabetin anksiyete düzeyini artırdığını göstermiştir. Silimarin uygulamasının diyabetli sıçanlarda anksiyete düzeyini azalttığı görülmektedir.

Anksiyete ve öğrenme ilişkisinin değerlendirdiğimiz testlerden bir tanesi olan EPM testi, açık ve kapalı kollarda hayvanların sergilediği davranışlar ve bu kollarda bulunma süreleri, sıçanların anksiyete ve korku seviyeleri hakkında bilgi verir (Dolu ve Özesmi 2004). EPM testinde toplam kat edilen mesafe, kapalı kollara giriş sayısı ve açık kollarda geçirilen sürelerde gruplar arasında fark bulundu. Silimarin grubu platformda en fazla mesafe kat eden grup olurken, diğer gruplarda anlamlı fark yoktu. Diyabet grubunun kapalı kollara giriş sayısı kontrol grubundan yüksekti, ancak diğer gruplar arasında fark yoktu. Açık kollarda geçirilen süre diyabet grubunda kontrol grubundan oldukça düşüktü ve diğer gruplar arasında fark bulunamadı. Landgraft (2003), farelerde anksiyete ve depresyon üzerine yaptığı çalışmasında anksiyetenin öğrenmeyi güçleştirici etki gösterdiğini ifade etmiştir.

Diyabetli grupların kontrol grubuna göre kapalı kollara giriş sayısının yüksek ve açık kollarda geçirilen sürenin kısa olması, diyabetli hayvanlarda anksiyete varlığını göstermektedir.

Bu çalışmada, MWM testi alıştırma dönemi parametrelerinde ilk dört günde gruplar arasında fark bulunmasada toplam kat edilen mesafe, platforma ulaşma süreleri ve thigmotaksis davranış süresi her grupta 1. günden 4. güne giderek azaldı ve sonuç olarak MWM testi alıştırma döneminde tüm gruplarda öğrenme gerçekleşti. STZ uygulamasının, beyine doğrudan toksik etkisi olduğu düşünülse de, kan beyin bariyerinde kan glikozunun düzenlenmesinde rol oynayan GLUT 2 bulunmadığından STZ beyni doğrudan etkileyememektedir (Biessels ve Gispen 2005). Biessels ve Gispen'ın çalışmalarında (2005), STZ uygulanan sıçanlarda kognitif ve sinaptik plastisitede oluşan değişiklerin haftalar sonra bile, insülin tedavisiyle giderildiğini raporlamaları bu bilgiyi doğrular niteliktedir.

Diyabetin hipokampustaki nöronal yapılarda nörotransmitter salgılanması ve nörotransmitterlerin reseptörlere bağlanmasında kimyasal, yapısal ve fonksiyonel bozukluklara ve nöronal apoptoza neden olarak kognitif fonksiyonları bozduğu bildirilmiştir (Magarinos ve McEwen 2000). Hipokampusta LTP, öğrenme ve bellek işlevlerinin gerçekleştirilmesi için gerekli olan bir sinaptik plastisite olayıdır. Kamal ve arkadaşları (2000), diyabet oluşturdukları sıçanların hipokampal kesitlerinde sinaptik plastisitede farklılık tespit etmişlerdir. Altı – sekiz haftalık diyabetlilerde görülen LTP değişikleri hipokampusun CA1 bölgesinde gözlemlenmiş ve 12 haftalık diyabetli sıçanlarda LTP oluşumundaki hataların en yüksek seviyeye ulaşarak kalıcı hale geldiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, Papoviç ve arkadaşları (2001) STZ uygulayarak diyabet oluşturdukları sıçanların hipokampus kesitlerinde LTP oluşumunda aksama ve eksiklikler tespit etmişlerdir. LTP'de görülen bu bozukluk hipergliseminin süresi ve şiddetiyle orantılı bulunmuştur. Ayrıca STZ enjeksiyonu sonrası 1., 8. ve 14. günlerde hipokampusta gerçekleşen nöronal ve sinaptik dejenerasyona bağlı olarak diyabetin öğrenme performansını azalttığını raporlamışlardır. Yonguç ve arkadaşları (2014), diyabetin öğrenme ve hipokampus piramidal nöronlarına etkisini araştırdıkları çalışmalarında 60 mg/kg STZ uygulayarak diyabet oluşturdukları sıçanlara, 6 hafta sonra MWM testi uygulamış ve diyabetli sıçanlarda öğrenmenin çok daha zor gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızın MWM test gününde hız, platform üzerinden geçiş sayısı, platform alanında geçirilen süre, platform alanından geçiş sayıları ve toplam kat edilen mesafe parametrelerinde gruplar arası fark anlamlı bulundu. Diyabet grubunun hızı DM+Silimarin grubundan yüksekti, ancak diğer gruplar arasında fark yoktu. Toplam kat edilen mesafe diyabet grubunda DM+Silimarin grubundan yüksekti. Platformdan geçiş sayısı ve platform alanında geçirilen süre diyabet grubunda kontrol ve silimarin gruplarından düşüktü ve diyabet ve DM+Silimarin grupları arasında fark yoktu. Platformdan geçiş sayısının ve platform alanında geçirilen sürenin diyabet grubunda kontrol grubundan düşük olması nedeniyle, bu grupta öğrenmede bozulma olduğunu tespit ettik ve DM+Silimarin grubunda bu parametrelerin daha yüksek olması 200 mg/kg silimarin uygulamasının diyabete bağlı kognitif fonksiyon bozukluklarını düzeltebileceğini gösterdi.

Tuzcu ve Baydaş (2006), melatonin ve E vitaminin diyabetli sıçanlarda öğrenmeye etkisini araştırdıkları çalışmalarında 60 mg/kg STZ ile diyabet oluşturdukları sıçanlara 6 hafta sonra MWM testi uygulamışlardır. Beş gün süresince gizli platform havuzda iken, günde dört kez öğrenme denemeleri yapmışlar ve sekizinci günde platform kaldırılarak öğrenme analiz testi uygulamışlardır. Beş günlük öğrenme denemeleri sonunda diyabetli sıçanların platformu bulma süresinin diğer gruplardan fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Öğrenme analiz testinde ise diyabetli grubun, platform alanında daha az süre geçirdiğini raporlamışlardır. Bu çalışmada STZ uygulaması sonrası MWM testine başlama süresi çalışmamıza benzer olup deney protokolü farklılık göstermektedir. Biz MWM testinin 5. gününde öğrenme test analizini uyguladık, ancak öğrenme analiz test günü ortaya çıkan bulgular çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile uyumludur.

Nörotrofinler sinir siteminin canlılığını ve gelişimi sağlayan, glikoz ve kolestrol metabolizmasında etkili ve daha pek çok fizyolojik olayda görev alan polipeptit yapılardır (Yano ve Chao 2000). Nörotrofik faktörlerin en önemlilerinden birisi olan BDNF nöronların korunmasını, büyümesini ve sinaptik plastisitenin devamlılığını sağlar. BDNF, noradrenerjik ve serotonerjik nöronları toksik hasardan koruyarak gelişmini destekler (Cevher 2009). Palizvan ve Sohya (2004), fare korteksinden elde ettikleri nöron kültürüne BDNF uygulamış ve sonuçta dendrit ve sinapslarda gelişimin arttığını raporlamışlardır.

Yapılan çalışmalarda (Wu ve ark 2004; Kapczinsnki ve ark 2008) oksidatif hasarın BDNF düzeylerini azalttığı ve kognitif fonksiyonlarda azalma oluşturduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda plazma BDNF seviyesi diyabet grubunda diğer gruplardan düşüktü. Ayrıca beyin dokusu BDNF seviyesi de diyabet grubunda kontrol grubuna göre düşüktü. DM+Silimarin grubunun BDNF düzeylerinin diyabet grubundan yüksek olması silimarinin antioksidan etkisiyle (Detaille ve ark 2008, Ligeret ve ark 2008, Tsai ve ark 2010, Grattagliano ve ark 2013, Zhu ve ark 2014) ilişkili olabilir.

Histon modifikasyonları gen ifadesinde değişiklik görülmesini sağlayan önemli epigenetik mekanizmalardan bir tanesidir (Jiang ve ark 2004). Wang ve arkadaşları (2014) diyabet ve sinaps ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, diyabetli sıçan beyinlerinde HDAC1 sınıfı histonlarda değişiklik görülmediğini ancak; HDAC2 sınıfı histon seviyelerinde artışla birlikte gen ekspresyonunda hatalar görüldüğü ifade etmişlerdir. Çalışmamızda ise plazmada ve beyinde HDAC3 seviyelerinde gruplar arası anlamlı fark bulunmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıçanlara uyguladığımız davranış testlerinde diyabet grubu ve DM+Silimarin grupları arasında öğrenmede fark olması, 200 mg/kg silimarinin diyabete bağlı görülen kognitif fonksiyon bozuklukları üzerine iyileştirici etkisinin olduğunu gösterdi.

Çalışmamızda diyabetli grupta gözlemlediğimiz düşük plazma ve beyin dokusu BDNF seviyeleri, silimarin takviyesi alan diyabetik sıçanlarda (DM+Silimarin) yükselmişti. Silimarin antioksidan özelliğinden dolayı diyabetin yol açtığı oksidatif stresi azaltarak BDNF seviyelerini etkileyebilir.

Çalışmamız bu alanda yapılan ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz verilerin yanı sıra silimarinin diyabet ve kognitif fonksiyonlar üzerine etkisinin daha detaylı ortaya konulabilmesi için farklı doz ve farklı biyobelirteçlerle yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

Abacı A, Bober E, Buyukgebiz A, 2007. Tip 1 diyabet. Güncel Pediatri, 5, 1–10.

Abenavoli L, Bellentani S, 2013. Milk thistle to treat non-alcoholic fatty liver disease: dream or reality? Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 7, 677-9.

Açıkgöz KÜ, 2003. Etkili öğrenme ve öğretme. 4. Baskı. İzmir.

Alvarez EO, Beauquis J, Revsin Y, Banzan AM, Roig P, De Nicola AF, Saravia F, 2009. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. Behav Brain Res, 198, 224–30.

Arıncı K, Elhan A, 1995. Anatomi, 2. Cilt, Ankara, Güneş Kitabevi s. 403-4.

Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Mafakheri M, 2010. Neuroprotective effect of silymarin in 6 hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. Neurosci Lett, 480, 206-10.

Bansal N, Gill R, Das Gupta G, 2013. Silymarin: a flavolignan with antidepressant activity. IJPI. Volume 3, Issue 5, p 95-8.

Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL, 2011. Learning, memory, language and speech, In: Ganong's medical physiology, Eds: Gökbel H, Nobel Tıp Kitabevi, 23th ed; 289- 93.

Bekar D, Keçeci H, Akyüz A, 2001. Migrende elektrofizyoloji ve nörotransmitterler. C. Ü. Tıp Fakültesi Derg 23 : 209-13.

Benfenati F, 2007. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. In: Acta bio-medica, 78, p. 58-66.

Biessels GJ, Gispen WH, 2005. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? Neurobiol Aging,1: 36-41.

Blumenthal M, Goldberg A, Brinkmann J, 2000. Herbal medicine. Integ Med Commun: Newton. 62-4.

Bora G, Yurter EH, 2007. Epigenetik hastalılar ve tedavi yaklaşımları. Hacettepe Tıp Derg, 38, 48-54.

Büyüköztürk K, Ökten A, Atamer T, 2007. Tip1 diyabetes mellitus: İç Hastalıkları, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, s. 489-90.

Cevher N, 2009. Bipolar tip 1 bozukluğu olan ergenlerde serumda beyinden köken alan nörotrofik faktör düzeylerinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Delahanty LM, Pan Q, Jablonski KA, Watson KE, McCaffery JM, Shuldiner A, et al, 2012. Genetic predictors of weight loss and weight regain after intensive lifestyle modification, metformin treatment, or standard care in the Diabetes Prevention Program. Diabetes Care, 35, 363-6.

Detaille D, Sanchez C, Sanz N, Lopez-Novoa JM, Leverve X, El-Mir MY, 2008. Interrelation between the inhibition of glycolytic flux by silibinin and the lowering of mitochondrial ROS production in perifused rat hepatocytes. Life Sci, 82, 1070–6.

Dinççağ N, 2011. Diabetes mellitus tanı ve tedavisinde güncel durum. İç Hast Derg, 18, 181- 223.

Dokmanovic M, Marks AP, 2005. Prospects: histon deacetylase inhibitors. J Cell Biochem, 96: 293- 304.

Dolu N, Özesmi Ç, 2004. Anksiyetenin değerlendirilmesinde güncel olarak kullanılan bazı deneysel hayvan modelleri. Klin Psikofarmakoloji Bül, 14, 216-25.

Elden M, 2003. Hedef kitle davranışlarını etkileyen psikolojik bir faktör olarak öğrenme: Öğrenme ve reklam ilişkisi. Gazi Üni İletişim Fak Derg. Sayı 18.

Engin AO, Calaboğlu M, Gürbüzoğlu S, 2008. Uzun süreli bellek ve öğrenme. Sosyal Bilimler Enstitüsü Derg, 251-62.

Feng D, Liu T, Sun Z, 2011. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. Science, 331, 1315–9.

Frechilla D, Insausti R, 2000. Implanted BDNF-producing fibroblasts prevent neurotoxin-induced serotonergic denervation in the rat striatum. Brain Res Mol Brain Res, 76, 306-14.

Galhardi F, Mesquita K, Monserrat JM, Barros DM, 2009. Effect of silymarin on biochemical parameters of oxidative stress in aged and young rat brain. Food Chem Toxicol, 47, 2655-60.

Gispen WH, Biessels GJ, 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabates mellitus. Trends Neurosci, 23, 542-9.

Govind P and Sahni YP, 2011. A review on hepatoprotective activity of silymarin. Int. J. Res. Ayur. Pharm. 2: 75-9.

Graham ML, Janecek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Schuurman HJ, 2011. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. Comp Med, 61, 356-60.

Grattagliano I, Diogo CV, Mastrodonato M, Bari O, Persichella M, Wang DQ, Liquori A, Ferri, D, Carratu MR, Oliveira PJ, 2013. A silybin-phospholipids complex counteracts rat fatty liver degeneration and mitochondrial oxidative changes. World J. Gastroenterol, 3007–17.

Greenwood CE, Winocur G, 2005. High–fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. Neurobiol. Aging, 42–45.

Groen T, Kadish I, Wyss JM, 2002. Old rats remember old tricks; memories of the watermaze persist for 12 months. Behavioural Brain Research, 136, 247-55.

Gürpınar D, Erol A, Mete L, 2007. Depresyon ve nöroplastisite. Klinik Psikofarmakoloji Bült, 17, 100–10.

Horani MH, Mooradian, AD, 2003. Effect of diabetes on the blood brain barrier. Curr Pharmaceut Design, 9, 833-40.

Huseini HF, Larijani B, Heshmat R, Fakhrzadeh H, Radjabipour B, Toliat T, Raza M, 2006. The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. Phytother Res, 20, 1036-9.

International Diabetes Federation, 2013. IDF Diabetes Atlas, 6th ed, p.14, Belgium.

İrer SV, Alper G, 2004. Deneysel diyabet modelleri. Türk Klinik Biyokimya Derg, 2,127-36.

Jiang Y, Bressler J, Beaudet LA, 2004. Epigenetics and human disease. Annu Rev Genet, 5, 479-510.

Kamal A, Biessels GJ, Duis SEJ, Gispen WH, 2000. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. Diyabetologia, 43, 500- 6.

Kamei J, Miyata S, Morita K, Saitoh A, Takeda H, 2003. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on immobility time in the tail suspension test in streptozotocin-induced diabetic mice, Pharmacol. Biochem. Behav, 75, 247– 54.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, 2000. Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality. In: Principles of Neural Science, 4th ed, McGraw-Hill Companies, 1247-77.

Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM, 2008. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. Rev Bras Psiquiatr, 30: 243-5.

Karabekiroğlu K, Gımzal A, Berkem M, 2005. Psikiyatrik bozukluklarda bellek sorunları. Anadolu Psikiyatri Derg, 6:188-96.

Karimi G, Vahapzadeh M, Lari P, Rashedinia M, Moshiri M, 2011. "Silymarin", a promising pharma cological agent for treatment of diseases. Iran J Basic Med Sci, 14 (4) ,308-17.

Kazak F, Yarım FG, 2014. Nörotrofinler. Kocatepe Vet J, 7, 47-57.

Keles E, Çepni S, 2006. Beyin ve öğrenme. Türk Fen Eğitimi Derg, 3, 66–82.

Kidd PM, Czap K, Miller AL, Head KA, 2002. Glutathione. In: Alternative medicine review monographs volume one. Thorne Research, 184-92.

Kiruthiga PV, Shafreen RB, Pandian SK, Devi KP, 2007. Silymarin protection against major reactive oxygen species released by environmental toxins: exogenous H_2O_2 exposure in erythrocytes. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 100, 414–9.

Knutson SK, Chyla BJ, Amann JM, Bhaskara S, Huppert SS, Hiebert SW, 2008. Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. EMBO J, 27, 1017–28.

Kocabaşoğlu N, 2005. Medikal açıdan stres ve çareleri; Stres ve anksiyete, 181-98.

Kodl C, Seaquist E, 2008. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. Endocr Rev, 29, 494–511.

Kotan Z, Sarandöl A, Eker SS, 2009. Depresyon, nöroplastisite ve nörötrofik faktörler. Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar, 1, 22-35.

Kurçer Z, Karaoğlu D, 2012. Deneysel diyabet modellerinde alloksan ve streptozotosin kullanımı. Türkiye Endo ve Metab Der Bült, 16, 34-40.

Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, 2002. Report of committee on clasification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract, 55: 65-85.

Landgraf R, 2003. HAB/LAB rats: an animal model of extremes in trait anxiety and depression. Clin Neurosci, 3, 239-44.

Laron Z, 2009. Insulin and the brain. Arch Physiol Biochem, 115:112-6.

Lasaridis AN, Sarafidis PA, 2003. Diabetic nephropaty and antihypertensive treatmen: what are the lessons from clinical trials. Am J Hypertens, 16, 689-97.

Lenzen S, 2008. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia, 51, 216–26.

Li ZG, Sima AA, 2004. C-peptide and central nervous system complications in diabetes, Exp. Diabesity Res, 5, 79-90.

Ligeret H, Brault A, Vallerand D, Haddad Y, Haddad PS, 2008. Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation-warm reperfusion liver injury. J Ethnopharmacol, 115, 507–14.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem, 193, 265-75.

Lu Q, Qiu X, Hu N, Wen H, Su Y, Richardson BC, 2006. Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. Ageing Res Rev, 5, 449-67.

Magarinos AM, Mcewen BS, 2000. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. Proc Natl Acad Sci, 11056– 61.

Maghrani M, Zeggwagh NA, Lemhadri A, El Amraoui M, Michel JB, Eddouks M, 2004. Study of the hypoglycaemic activity of Fraxinus excelsior and Silybum marianum in an animal model of type 1 diabetes mellitus. J Ethnopharmacol, 91, 309-16.

Malone JI, Hanna SK, Saporta S, 2006. Hyperglycemic brain injury in the rat. Brain Res, 1076, 9-15.

McCarthy AM, Lindgren S, Mengeling MA, Tsalikian E, Engvall JC, 2002. Effects of diabetes on learning in children, Pediatrics, 109, 9.

Mıcıllı S, Özoğul C, 2007. Diyabette kök hücreler. DEÜ Tıp Fak Derg, 21, 2, 109–17.

Millard CJ, Watson PJ, Celardo Y, Gordiyenko SM, Cowley CV, Robinson L, Fairall and JWR, 2013. Schwabe. Class I HDACs share a common mechanism of regulation by inositol phosphates. Molecular Cell, 51, 57-67.

Miyata S, Hirano S, Kamei J, 2005. Abnormal benzodiazepine receptor function in the depressive-like behavior of diabetic mice, Pharmacol Biochem Behav, 82: 615-20.

Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Paschal DM, Apodaca MC, Liu Y, et al, 2010. Silymarin inhibits in vitro t-cell proliferation and cytokine production in hepatitis c virus infection. Gastroenterology, 138, 671-81.

Narayan KM, Boyle JP, Thompson TJ, Sorensen SW, Williamson DF, 2003. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. JAMA, 8; 290: 1884-90.

Nencini C, Giorgi G, Micheli L, 2007. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. Phytomedicine, 14,129- 35.

Nomura M, Takahashi T, Nagata N, Tsutsumi K, Kobayashi S, Akiba T, Yokogawa K, Moritani S, Miyamoto K, 2008. Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. Biol Pharm Bull, 31, 1403-9.

Ohl F, 2003. Testing for anxiety. Clin Neurosci, 3: 233-8.

Önturk H, Özbek H, 2007. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. Genel Tıp Derg,17**,** 231–6.

Özpoyraz N, 2002. Depresyonda nöroanatomik bağlantılar. Klinik Psikiyatri, Ek; 4,68-72.

Öztekin S, Karakurt O, Yazıhan N, Unal I, 2011. Relationship of brain natriuretic peptide with metabolic syndrome parameters: An observational study. Anadolu Kardiyol Derg, 11: 678-84.

Özten N, 2003. Öğrenme ve hafızda hücresel-moleküler mekanizmalar. Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Y.O. Yıllığı, cilt 4 sayı: 1, s 21-4.

Palizvan MR, Sohya K, 2004. Brain-derived neurotrophic factor increases inhibitör synapses, revealed in solitary neurons cultured from rat visual cortex. Neuroscience, 126, 955-66.

Papoviç M, Biessels GJ, Isacson RL, Gispen WH, 2001. Learning and memory in streptozotocin induced diabetic rats in a novel spatial object descerimination task. Behav Brain Res, 122, 201-7.

Pedersen BK, Pedersen M, Krabbe KS, Bruunsgaard H, Matthews VB, Febbraio MA, 2009. Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. Exp Physiol, 94, 1153-60.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M, 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Meth 149-67

Pepping J, 1999. Milk thistle: Silybum marianum. Am J Health Syst Pharm, 56,1195-7.

Peterson LC, Laniel M, 2004. Histones and histone modifications. Curr Biol, 14, 546-51.

Petrak F, Hardt J, Wittchen HU, Kulzer B, Hirsch A, Hentzelt F, Borck K, Jacobi F, Egle UT, Hoffmann SO, 2003. Prevalence of psychiatric disorders in an onset cohort of adults with type 1 diabetes, Diabetes, Metab. Res. Rev, 19, 216–22

Phelps EA, 2004. Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. Curr Opin Cell Biol, 14, p. 198-202.

Prut I, Belzung C, 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. Eur J Pharmacol, 463,3-33.

Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV, 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. Cancer Chemother Rep, 29, 91-8.

Ramakrishnan G, Lo Muzio L, Elinos-Baez CM, Jagan S, Augustine TA, Kamaraj S, 2009. Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. Cell Prolif, 42,229-40.

Reagan LP, 2007. Insulin signaling effects on memory and mood. Curr Opin Pharmacol, **7**, 633–7.

Reijmer YD, Berg E, Ruis C, Kappelle LJ, Biessels GJ, 2010. Cognitive dysfunction in patients with type 2 diabetes, Diabetes Metab Res Rev, 507-19.

Rudi DH, Peter PD, 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain, 36,60-90.

Saller R, Melzer J, Reichling J, Brignoli R, Meier R, 2007. An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. Forsch Komp Klas Nat, 14,70-80.

Satman I, Yılmaz T, Şengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, Bastar I, Tütüncü Y, Sargın M, Dinççağ N, Karşidağ K, Kalaça S, Özcan C, King H, 2002. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). Diabetes Care, 25, 1551-6.

Schmidt HD, Duman RS, 2007.The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive like behavior. Behav Pharmacol, 18, 391–418.

Semenderoğlu F, Yılmaz C, Hatipoğlu C, Sönmez G, Gökmen N, Yılmaz O, 2013.Anneden ayrılma ve tek tek barındırılma stresinin sıçanların fiziksel ve mental gelişimleri üzerine etkileri. Academic Social Science Studies February, Volume 6 Issue 2, 1187-205.

Senemoğlu N, 2005. Gelişim öğrenme ve öğretim. 12. Baskı. Ankara, Gazi Kitapevi.

Sha S, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca V, 2007. Oxidants in chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol,18,16-28.

Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S, 2010. Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. Food Chem Toxicol, 48, 803-6.

Skaper D, 2012. Neurotrophic factors: methods and protocols. Methods Mol Biol, 846:1-12.

Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M, 2001. Hipocampus. J Med Sci, 21, 427-31.

Soto C, Perez J, García V, Uria E, Vadillo M, Raya L, 2010. Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan-induced diabetes mellitus. Phytomedicine,17,1090-4.

Srinivasan K, Ramarao P, 2007. Animal models in type 2 diyabetes research: an overview. Indian J Med Res, 125, 451-72.

Starr JM, Leaper SA, Murray AD, Lemmon HA, Staff RT, Deary IJ, 2003. Brain white matter lesions detected by magnetic resonance imaging are associated with balance and gait speed. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 74,94–8.

Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP, 2008. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. Nat Neurosci, 11, 309-17.

Suwa M, Kishimoto H, Nofuji Y, Nakano H, Sasaki H, Radak Z, 2006. Serum brain-derived neurotrophic factor level is increased and associated with obesity in newly diagnosed female patients with type 2 diabetes mellitus. Metabolism, 55, 852-7.

Szkudelski T, 2001. The mechanism of alloxan and streptozocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res, 50, 536-46.

Şenel F, 2012. Hafıza ve öğrenme. Bilim ve Teknik Derg, 84-8.

Ter Laak M, Lankhorst A, Schrama L, Gispen W, 2000. Neuropathies. Neurosci Res, 26, 227- 39.

Toklu HZ, Tunali-Akbay T, Erkanli G, Yuksel M, Ercan F, Sener G, 2007. Silymarin, the antioxidant component of silybum marianum, protects against burn-induced oxidative skin injury. Burns, 33, 908–16.

Tongiorgi E, 2008. Activity-Dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. Neuroscience Res, 61, 335–46.

Trouillas P, Marsal P, Svobodova A, Vostalova J, Gazak R, Hrbac J, Sedmera P, Kren V, Lazzaroni R, Duroux JL, Walterova D, 2008. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. J Phys Chem A, 112, 1054-63.

Tsai MJ, Liao JF, Lin DY, Huang MC, Liou DY, Yang HC, Lee HJ, Chen YT, Chi CW, Huang, WC, 2010. Silymarin protects spinal cord and cortical cells against oxidative stress and lipopolysaccharide stimulation. Neurochem. Int, 57, 867–75.

Tuzcu M, Baydas G, 2006. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. Eur J Pharmacol, 537:106-10.

Vahid F, Zand H, Nosrat–Mirshekarlou E, Najafi R, Ghasemlou M, Hekmatdoost A, 2015. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: A Review, Gene, 8-15.

Varzi HN, Esmailzadeh S, Morovvati H, Avizeh R, Shahriari A, Givi ME, 2007. Effect of silymarin and vitamin E on gentamicin-induced nephrotoxicity in dogs. J Vet Pharmacol Ther, 30,477-81.

Wang J, Gong B Weinger K, Jacobson AM, Musen G, Lyoo IK, Ryan CM, Jimerson DC, et al, 2008. The effects of type 1 diabetes on cerebral white matter. Diabetologia,51 : 417-25.

Wen Z, Dumas TE, Schrieber SJ, 2008. Pharmacokinetics and metabolic proles of free, conjugated and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract. Drug Metab Dispos, 36, 65-72.

Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE, 1999.The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. J Clin Invest, 104, 787-94.

World Health Organization, 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermedia hyperglisemia. Switzerland. Report of WHO/ IDF Consultation, p. 3.

Wrighten SA, Piroli GG, Grillo CA, Reagan LP, 2009. A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. Biochimicaet Biophysica Acta, 1792, 444–53.

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F, 2004. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. Eur J Neurosci,19, 1699–707.

www.watermaze.org. Morris water maze Erişim tarihi: Şubat 2015.

Yano H, Chao MV, 2000**.** Neurotrophin receptor structure and interactions. Pharm Acta Helv; 74: 253-60.

Yılmaz S, 2005. Bilgi işleme modeline dayalı bir dersin fen bilgisi öğretmen adaylarının manyetizma konusundaki başarılarına etkisi. Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Derg, 28, 236-43.

Yiğit R, 2001. Kontrol sistemleri, sindirim ve boşaltım fizyolojisi. In: Öğrenme ve bellek. Ziya Ziylan, Nobel Tıp Kitabevleri, s. 293-8.

Yonguç N, Özdemir BM, Küçüktay V, Şahiner M, Akıcılar R, Adıgüzel E, Akdoğan I, 2014. Memory function and total pyramidal neuron number of hippocampus in STZ induced diabetic rats, J Neurol Sci 31, 20-5.

Zeng Z, Liao R, Yao Z, Zhou W, Ye, P, Zheng X, Li X, Huang Y, Chen S, Chen Q, 2014.Three single nucleotide variants of the HDAC gene are associated with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population: A community-based case-control study. Gene. 533, 427–33.

Zhao W,Thank C, Varghese M, Nguyen T, Bi W, Bilski A, Begum S, Vempati P, Knable L, Ho L,Pasinetti G, 2014. Epigenetic mechanisms linking diabetes and synaptic impairments. Diabetes; 63: 645–54.

Zhu SY, Dong Y, Tu J, Zhou Y, Zhou XH, Xu B, 2014. Silybum marianum oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose. Pharmacogn. Mag,10, 92–9.

Zoladz JA, Pilc A, Majerczak J, Grandys M, Zapart-Bukowska J, Duda K, 2008. Endurance training increases plasma brain-derived neurotrophic factor concentration in young healthy men. J Physiol Pharmacol, 59 Suppl 7, 119-32.

7. EKLER

EK: Etik Kurul Kararı



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 2014/1	Toplantı Tarihi: 12.11.2014

Karar Sayısı 2014/9. S.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Muaz Belviranlı'nın, "Deneysel Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Silimarin Takviyesinin Kognitif Fonksiyonlar Üzerine Etkisi" 05.11.2014 tarihli Yüksek Lisans Tez Proje başvurusu görüşüldü.

Karar: Araştırmanın oy çokluğu ile uygun olduğuna karar verildi.

Prof. Dr. Nilsel OKUDAN
Başkan (Katıldı)

Prof. Dr. Zekeriya TOSUN
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. Yasemin ÖZNURLU
Başkan v. (Katıldı)

Prof. Dr. Ercan DURMUŞ
Üye (Katıldı)

Prof. Dr. Banu BOZKURT
Üye (Katılmadı)

Doç. Dr. Muaz BELVİRANLI
Üye (Katılamadı)

Doç. Dr. Kamil ÜNEY
Üye (Katıldı)

Yrd. Doç. Dr. Güler YAVAŞ
Üye (Katıldı)

Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA
Üye (Katıldı)

Yrd. Doç. Dr. Zafer SAYIN
Üye (Katıldı)

Vet. Hekim S. Metin GÖKYAPRAK
Üye (Katıldı)

Burhan YILMAZ
Üye (Katıldı)

Murat SABAN
Üye (Katıldı)

T.C.
ASLI GİBİDİR
Selahattin SEN
Rektörlüğü
Personel Daire Başkanlığı
Şube Müdürü

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Mersin'de doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Konya'da tamamladı. Lisans eğitimini Marmara Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu'nda bitirerek 2010 yılında mezun oldu. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Düzce Üniversitesi'nde öğretim görevlisi olarak başladığı görevini sürdürmektedir.