

T.C. PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE
OLUŞTURULAN DENEYSEL DİYABETİN
UZAYSAL ÖĞRENME VE HIPPOCAMPUS NÖRON
SAYISINA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. GÖKŞİN NİLÜFER YONGUÇ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ.DR. MEHMET BÜLENT ÖZDEMİR

DENİZLİ-2009

T.C. PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE
OLUŞTURULAN DENEYSEL DİYABETİN
UZAYSAL ÖĞRENME VE HIPPOCAMPUS NÖRON
SAYISINA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. GÖKŞİN NİLÜFER YONGUÇ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ.DR. MEHMET BÜLENT ÖZDEMİR

DENİZLİ-2009

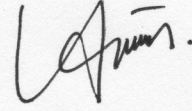
JÜRİ ÜYELERİNİN İMZA VE ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR danışmanlığında Dr. Gökşin Nilüfer Yonguç tarafından yapılan ‘Sıçanlarda Streptozotosin İle Oluşturulan Deneysel Diyabetin Uzaysal Öğrenme Ve Hippocampus Nöron Sayısına Etkisi’ başlıklı çalışma jürimiz tarafından Anatomi Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr. Esat ADIGÜZEL



Üye : Doç.Dr. Ilgaz AKDOĞAN

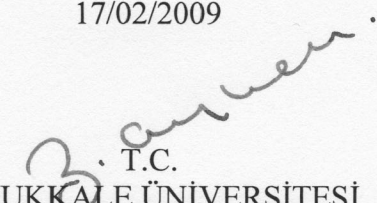


Üye : Doç.Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

17/02/2009


T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANI
Prof. Dr. Zafer AYBEK

TEŐEKKÜR

Başta tez danıŐmanım Sayın Doç.Dr. Mehmet Bülent Özdemir olmak üzere eğitimime sonsuz katkıları bulunan Anatomi Anabilim Dalı BaŐkanı Sayın Doç.Dr. Esat Adıgüzel'e ve Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. Ilgaz Akdoğan'a; tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Melike Şahiner'e; Fizyoloji Anabilimdalı doktora öğrencisi Raziye Kurşunluoğlu'na; Nöroloji Uzmanı Dr. ÇađdaŐ Erdoğan'a, Deneysel Araştırma Biriminde görevli Veteriner Hekimi Barbaros Şahin'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
ÖĞRENME VE BELLEK TANIMI, SINIFLANDIRILMASI	3
Eksplisit bellek	4
Eksplisit belleğin depolanması	6
Eksplisit belleğin süreçleri	6
Eksplisit belleğin zamansal parametrelere göre sınıflandırılması	7
Limbik sistem	8
FORMATIO HIPPOCAMPALIS	9
Gyrus dentatus	10
Subikuler kompleks	10
Entorhinal korteks	10
Hippocampus	11
Hippocampus'un histolojisi	12
Hippocampus'un embriyolojik gelişimi	13
HIPPOCAMPUS VE EKSPLİSİT BELLEK	13
HIPPOCAMPUS'UN UZAYSAL ÖĞRENMEDEKİ ROLÜ	18
DIABETES MELLITUS	19
YÜKSEK GLUKOZUN İNDÜKLEDİĞİ OKSİDATİF VE NİTROSATİF STRES	22
APOPİTOZİS VE YÜKSEK GLUKOZUN YOL AÇTIĞI HÜCRE HASARI İLE İLİŞKİSİ	24
DİYABET OLUŞTURULMASINDA KULLANILAN HAYVAN MODELLERİ	27
STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN DİYABET	28
SU TANKI TESTİ	31

STEREOLOJİ	32
OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNİN PRENSİPLERİ	33
GEREÇ VE YÖNTEM	38
DENEY HAYVANLARI	38
SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMASI	38
SU TANKI TESTİ PROTOKOLÜ	39
BEYİN KESİTLERİNİN ALINMASI VE HAZIRLANMASI	42
OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE HÜCRE SAYIMI	44
İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	50
BULGULAR	51
SIÇANLARDA DİYABET BULGULARI	51
SU TANKI TESTİ BULGULARI	55
SAĞ HIPPOCAMPUS CA1 VE CA2-CA3 ALANLARI STRATUM PYRAMIDALE TABAKASINDA NÖRON SAYIM BULGULARI	64
TARTIŞMA	81
SONUÇLAR	94
ÖZET	95
YABANCI DİL ÖZETİ	97
KAYNAKLAR	98

TABLolar ÇİZELGESİ

		Sayfa no
Tablo 1	Deneysel diyabet oluşturulmasında kullanılan hayvan modelleri	30
Tablo 2	Deney grupları	39
Tablo 3	Su tankı testi protokolünün tablosu	41
Tablo 4	D grubu-1 numaralı sıçanın sağ hippocampus CA2-CA3 stratum pyramidale alanındaki toplam nöron sayısının bulunması sırasında gözlenen Hata Katsayısı hesaplanması	49
Tablo 5	Sıçanların ağırlıkları, kan glukoz düzeyleri ve diyabet semptomları	53
Tablo 6	K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki EL değerleri	56
Tablo 7	K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki PL değerleri	58
Tablo 8	K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerdeki V değerleri	60
Tablo 9	K, S ve D gruplarının EL, PL ve V verilerinin gruplar arasındaki farklılığının değerlendirilmesindeki p değerleri	61
Tablo 10	K, S ve D gruplarının EL ve PL verilerinin ikili karşılaştırmalardaki p değerleri	61
Tablo 11	Su tankı testinin PT uygulamasının verileri	62
Tablo 12	PT uygulamasında GDEL, GDPL, GD frekans ve PLT frekans verilerinin K, S ve D grupları arasındaki farklılığının değerlendirilmesindeki p değerleri.	64
Tablo 13	K grubu sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	65
Tablo 14	S grubu sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	66

Tablo 15	D grubu sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	67
Tablo 16	K grubu sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	68
Tablo 17	S grubu sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	69
Tablo 18	D grubu sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	70
Tablo 19:	K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1 alanları stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ortalamaları	71
Tablo 20	K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA2-CA3 alanı stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ortalamaları	73
Tablo 21	K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1-CA2-CA3 alanları stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ortalamaları	74
Tablo 22	K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1, CA2-CA3 ve CA1-CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayılarının, gruplar arasındaki farklılığının değerlendirmesindeki p değerleri	75
Tablo 23	K, S ve D gruplarının, sağ hippocampus CA1, CA2-CA3 ve CA1-CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayılarının ikili karşılaştırmalardaki p değerleri	75

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

		Sayfa no
Şekil 1	Uzun süreli belleğin sınıflandırılması ve ilgili beyin bölümleri	4
Şekil 2	Belleğin depolanmasında görevli olan medial temporal lob yapıları	5
Şekil 3	Formatio Hippocampalis'in organizasyonu	5
Şekil 4	Limbik sistem	9
Şekil 5	İki sinir hücresi arasındaki normal sinaptik geçiş	15
Şekil 6	Sinaptik plastisitenin bir formu olan hipokampal Long Term Potentiation oluşumu	16
Şekil 7	Sinaptik plastisitenin bir formu olan hipokampal Long Term Potentiation'un erken ve geç fazlarının sinaptik modeli	17
Şekil 8	Yüksek glukozun indüklediği oksidatif ve nitrosatif stresin olası yollarını gösteren şematik diyagram	23
Şekil 9	Yüksek glukozun indüklediği apoptozis mekanizması	27
Şekil 10	Tarafsız sayım çerçevesinin şematize edilmiş görünümü	36
Şekil 11	Öğrenme testinde kullanılan su tankının özellikleri	40
Şekil 12	Deney planı	42
Şekil 13	Çalışmada kullanılan tarafsız sayım çerçevesi ve ölçüleri	50
Şekil 14	K, S ve D gruplarının başlangıç ağırlıklarının (0.gün) ve 7. hafta sonundaki ağırlıklarının ortalamalarının grafiği	54
Şekil 15	K, S ve D gruplarının 0. gün, diyabet oluşturulmasından sonraki 3. gün ve 10. gün ölçülen kan glukoz düzeylerinin ortalamalarının grafiği	54
Şekil 16	K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki EL değerlerinin grafiği	56
Şekil 17	K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki PL değerlerinin grafiği	58
Şekil 18	K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki V değerlerinin grafiği	60

Şekil 19	K, S ve D gruplarının PT uygulamasının GDEL verileri	63
Şekil 20	K, S ve D gruplarının PT uygulamasının GDPL verileri	63
Şekil 21	K, S ve D gruplarının PT uygulamasının GD frekans verileri	63
Şekil 22	K, S ve D gruplarının PT uygulamasının PLT frekans verileri	64
Şekil 23	K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1 alanları stratum pyramidale tabakalarının ortalama nöron sayıları	72
Şekil 24	K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA2-CA3 alanları stratum pyramidale tabakalarının ortalama nöron sayıları	73
Şekil 25	K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1-CA2-CA3 alanlarının ortalama nöron sayıları	74
Şekil 26	K, S ve D gruplarından rasgele seçilen birer sıçanın su tankı testinde 1-5. günlerindeki deneme bloklarında ve 6. gündeki PT uygulamasındaki şematik görüntüleri	76
Şekil 27	6. gün yapılan bir PT uygulamasının görüntüleri	77
Şekil 28	Uzaysal öğrenmenin görüldüğü bir denemenin görüntüleri	78
Şekil 29	Hippocampus kesitinde CA1, CA2 ve CA3 alanlarının görünümü	79
Şekil 30	Hippocampus kesitinde CA1, CA2-CA3 geçişinin görünümü	79
Şekil 31	K, S ve D grubundaki sıçanların sağ hippocampus kesitlerinin CA1 ve CA2-CA3 alanların x4, x10, x40, x100 objektif büyütmelemlerindeki görüntüleri	80

KISALTMALAR ÇİZELGESİ

AGEs	Advanced glycation end products
Akt	proteine-serine/threonine kinase
AMP	Adenozin 5'-monofosfat
AMPA	α -amino-3-hidroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
AÖÖ	Alan örnekleme oranı
ASC	Associated speck-like protein
ASK1	Apoptosis signal regulating kinase-1
ATP	Adenozin trifosfat
B	Batı
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BH	Bcl-2 homolog
CA	Cornu ammonis
Camp	Siklik adenozin 5'-monofosfat
Camp kinaz	Camp bağımlı protein kinaz
CO₂	Karbon dioksit
CO₃⁻	Karbonat
D grubu	Diyabet grubu
D	Doğu
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
EL	Escape latency; deneğin platforma ulaşması için geçen zaman
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
IAPs	Apoptosis proteinlerinin inhibitörleri
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
G	Güney
GB	Güney batı
GAPDH	Glyceraldehyde phosphate dehidrogenase
GD	Güney doğu
GDEL	Güney doğu escape latency
GD frekans	Güney doğu frekans

GDPL	Güney doğu path length
GK sıçanlar	Goto Kakizaki sıçanlar
gr	Gram
GTP	Guanozin trifosfat
h	Disektör yüksekliği
H&E	Hematoxylin-Eosin
HK	Hata katsayısı
H₂O₂	Hidrojen peroksid
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenöz
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminal kinaz
K grubu	Kontrol grubu
KB	Kuzey batı
KD	Kuzey doğu
KaÖÖ	Kalınlık örnekleme oranı
KeÖÖ	Kesit örnekleme oranı
KGD	Kan glukoz düzeyleri
LTD	Long Term Depression
LTP	Long Term Potentiation
m	Metre
µm	Mikrometre
MDA	Malondialdehid
MAPK	Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinazlar
N(toplam)	Toplam nöron sayısı
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NIDDM	Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NO₂⁻	Nitrojen dioksit
NOD fare	Non obese diyabetik fare

OGTT	Oral glukoz tolerans testi
OLETF	Otsuka Long-Evans Tolushima Fatty
ONOO⁻	Peroksinitrit
ONOCOO⁻	Nitroperoksikarbonat
ORT	Ortalama
PKC	Protein kinaz C
PL	Path length; deneğin platforma ulaşmak için kullandığı yol uzunluğu
PARP	Poly(ADP)-ribose polymerase
PI-3-kinase	Phosphatidylinositide 3-kinase
PKC	Protein kinaz C
PLT	Platform frekans
PT	Probe trial
Q⁻	Disektör partikül sayısı
ΣQ⁻	Toplam disektör partikül sayısı
RNA	Ribonükleik asid
S grubu	Sham grubu
SD	Standart sapma
SH	Standart hata
sn	Saniye
SOR	Serbest oksijen radikalleri
t_{ort}	Ortalama kesit kalınlığı
tPA	Doku plazminojen aktivatörü
V	Velocity; deneğin hızı
XO	Ksantin oksidaz

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM) yüksek kan şekeri veya hiperglisemi ile karakterize bir grup metabolik bozuklukları kapsayan sistemik bir hastalıktır. Genel olarak günümüzde tip 1 DM ve tip 2 DM olarak iki alt sınıfa ayrılmıştır. Bundan başka diğer spesifik DM tipleri bu sınıflamaya eklenebilir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2000 yılı verilerine göre, dünya genelinde en az yüz yetmiş bir milyon DM hastası bulunmaktadır. DM insidansı hızla artmakta ve bu rakamın 2030 yılında iki katına ulaşacağı tahmin edilmektedir (1). 1997 yılında yapılan araştırma sonuçlarına göre Türkiye'de yaklaşık üç milyon altı yüz bin DM hastası bulunduğu, fakat bunların 1 milyon 200 bininin teşhisinin henüz yapılmadığı bildirilmektedir (2).

Dünya nüfusunun önemli bir bölümünü etkileyen bu sistemik hastalık, özellikle meydana getirdiği yaygın komplikasyonlar nedeni ile hastaların yaşamını olumsuz etkilemektedir. Nöropati, nefropati, retinopati diyabetin iyi bilinen komplikasyonlarıdır. Son yıllarda diyabetin santral sinir sisteminde yol açtığı nörolojik komplikasyonlar üzerine çalışmalar artmıştır. DM' un, demans için bir risk faktörü oluşturduğu, hippocampal sinaptik plastisiteyi etkilediği, öğrenme ve hafızada yetersizliklere yol açtığı bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir (3-8).

Hippocampus'un öğrenme ve bellek oluşumunda rol aldığı bilinmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda hippocampus lezyonları, bilgilerin kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe aktarılmasında çeşitli sorunlara yol açar ve böylece yeni bilgilerin depolanması engellenmiş olur (9).

DM'un hippocampus, öğrenme ve belleğe etkileri ile ilgili deneysel çalışmalar yayınlamış olmasına rağmen hippocampus pyramidal nöron sayısı üzerine etkisi ve nöron sayısının öğrenme ile olan ilişkisine dair henüz bir çalışma yayınlanmamıştır.

Bu alışma, deneysel olarak diyabet oluşturulmuş sıçanlarda su tankı testi ile uzaysal öğrenme-belleği değerlendirmek ve hippocampus pyramidal nöron sayısındaki değişiklikleri stereolojik yöntemlerden Optik Parçalama Yöntemi ile ortaya koymak üzere planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

ÖĞRENME VE BELLEK TANIMI, SINIFLANDIRILMASI

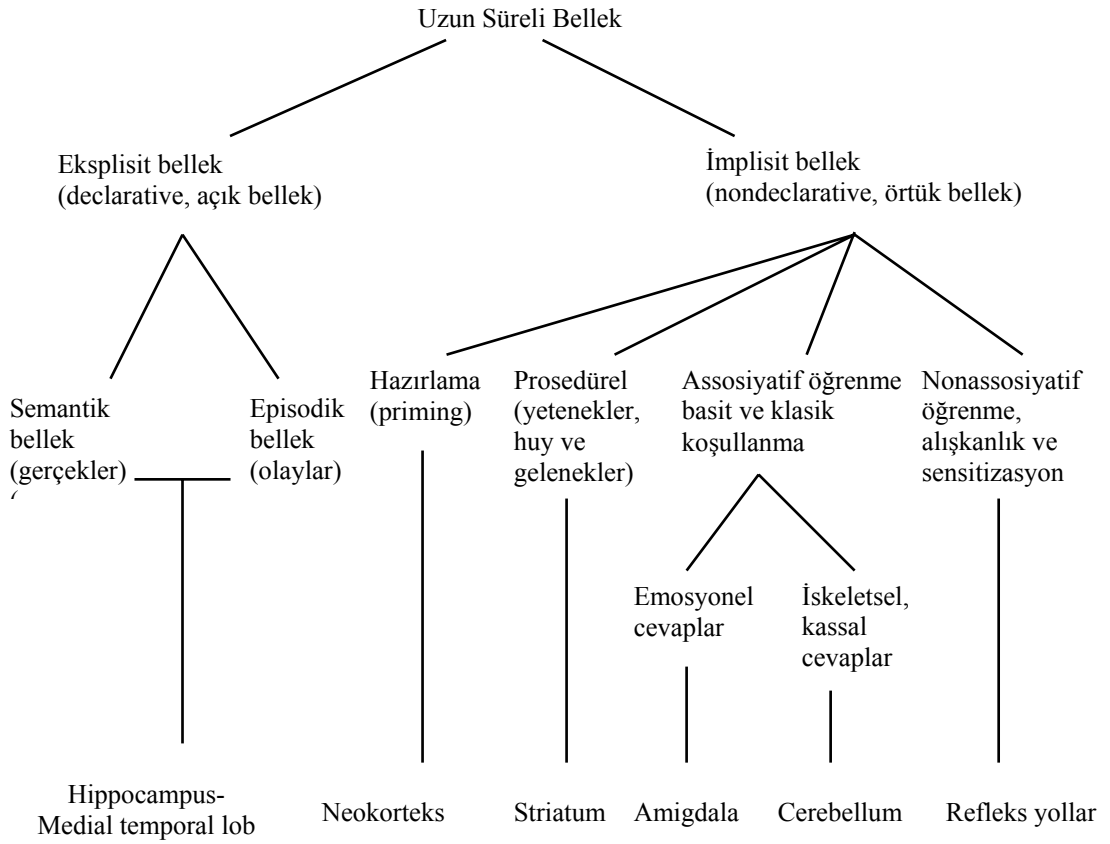
Canlı davranışı genler ve çevre arasındaki etkileşimin bir sonucudur. Canlılarda çevre, öğrenme ve bellek mekanizmalarını etkileyerek davranışı değiştirebilir. Öğrenme, çevre hakkında bilgi edinmeye verilen isim iken; bellek bu bilginin kayıt edildiği, saklandığı ve geri çağırıldığı bir mekanizmadır. Canlılarda yaşamsal olan pek çok davranış öğrenilmiş davranışlardır.

Epileptik nöbetlerin tedavisi için yapılan cerrahi operasyonlarda, formatio hippocampalis, amygdala ve temporal korteksin multimodal asosiyasyon alanları bilateral olarak çıkartıldıktan sonra hastaların nöbetlerinin sıklığının azaldığı ve ilaçla kontrolü sağlandığı, fakat hastaların yeni kalıcı bellek parçaları oluşturma yeteneğini kaybettiği saptanmıştır. Bu tür hastaların şartlanma, alışkanlık ya da sensitizasyon gibi öğrenmenin refleksif olarak gerçekleştirildiği durumlarda bilgiyi edinebildikleri ve saklayabildikleri gösterilmiştir (10,11). Yine cerrahi veya hastalık nedeniyle limbik asosiyasyon alanlarında şiddetli hasarları olan hastalar da benzer bellek defektlerini göstermektedirler.

Bu verilere dayanarak iki tip belleğin olduğu ileri sürülmüştür (Şekil 1). Bunlardan birisi implisit (nondekleratif, örtük, ifade edilemeyen) bellektir. Refleksif motor ve algısal becerileri içerir. Bilinçsiz olarak geri çağırılabilir. Diğer bellek tipi ise eksplisit (dekleratif, açık, ifade edilebilir) bellektir. İmplicit bellek rijittir ve bilginin kazanıldığı orjinal uyarımın varlığı geri çağırma için gereklidir. Eksplisit bellek oldukça esnektir ve pek çok parçanın asosiyasyonunu gerektirir (10,11).

Eksplisit bellek

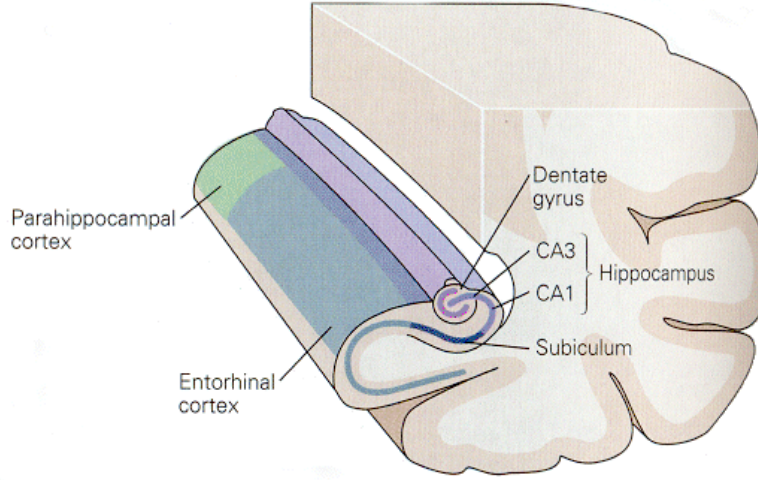
Eksplisit bellek *episodik* (olaylar ve kişisel tecrübelerle ilgili bellek) ve *semantik* (gerçekler ile ilgili bellek) bellek olarak sınıflandırılabilir. Bununla birlikte iki tip eksplisit bellek te bilinçli olarak ve açık bir şekilde ifade edilebilir. Örneğin; ‘geçen yaz anneannemi yazlık evinde ziyaret ettim’ (episodik bellek) veya ‘metal sudan daha ağırdır’ (semantik bellek).



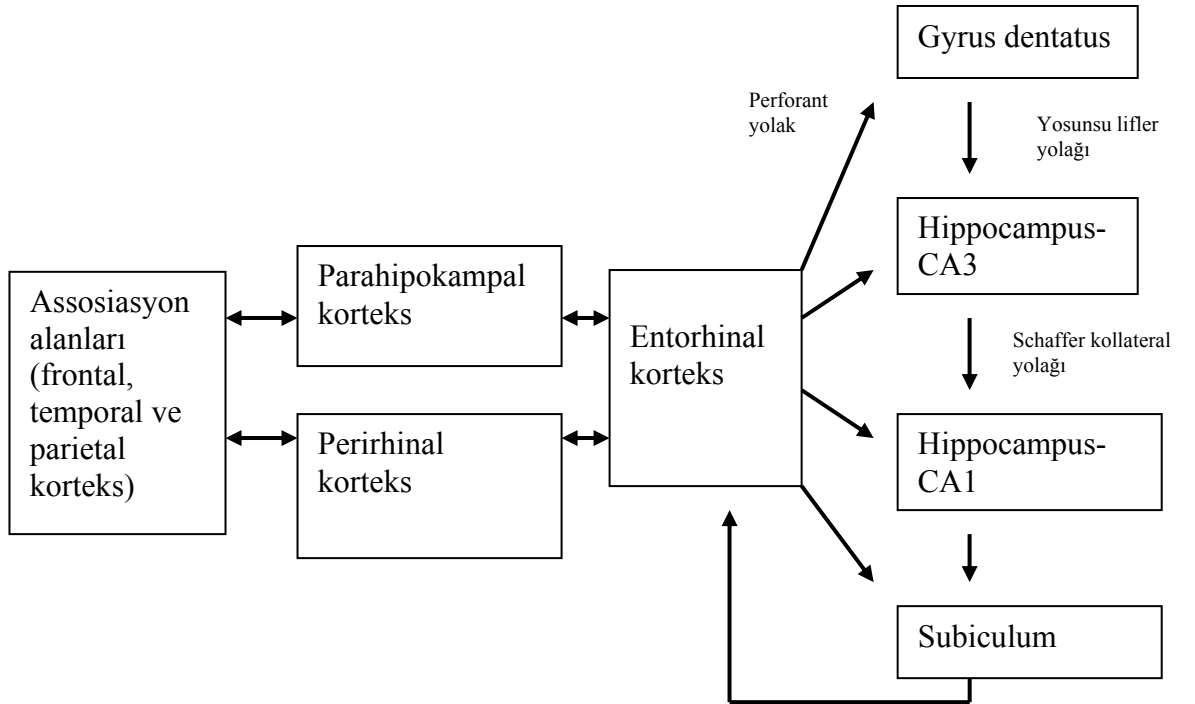
Şekil 1: Uzun süreli belleğin sınıflandırılması ve ilgili beyin bölümleri (11)

Eksplisit bellek görsel, işitsel ve somatik bilgilerin sentez edildiği pek çok assosiyasyon korteksinin (prefrontal, limbik ve parieto-occipital-temporal korteksler) bir veya daha fazlasında işleyen süreçler ile kazanılır. Bilgi buralardan parahipokampal ve perirhinal kortekslere ve sonra entorhinal kortekse, gyrus dentatus'a, hippocampus'a, subiculum'a ve tekrar entorhinal kortekse aktarılır. Bilgi

entorhinal korteksten tekrar parahipokampal ve perirhinal kortekslere ve son olarak neokorteksin assosiasyon alanlarına döner (Şekil 2 ve Şekil 3) (11).



Şekil 2: Belleğin depolanmasında görevli olan medial temporal lob yapıları (11. kaynaktan değiştirilmeden alınmıştır)



Şekil 3: Formatio Hippocampalis'in organizasyonu (11)

Eksplisit belleğin depolanması

Episodik ve semantik belleğin uzun süreli depolanması, başlangıçta duyuşal bilginin işleme tutulduğu korteksin bir veya daha fazla assosiasyon alanlarında meydana gelir. Hippocampus uzun süreli bellek için geçici bir istasyondur. Yüzü görülen bir insanla ilgili bilgilerin depolanmasını sağlayan görsel assosiasyon alanındaki yüzler ile ilgili olan hücreler diğer alanlarla bağlantılar yaparlar. Böylece hippocampus aynı zamanda bir kişi hakkında geniş olarak işlenmiş belleğin çeşitli komponentlerini de bir arada tutmaya yarar.

Hippocampus uzun süreli belleğin ilk basamağıdır da denilebilir. Daha sonra bilgiyi neokorteks'in depolama sistemlerine transfer eder. Assosiasyon alanlarında lezyonu olan hastalar yüzleri, yerleri, nesnelere tanımada güçlük çekerler. Farklı assosiasyon alanlarında lezyonları olan hastalar hem semantic hem de episodic bellekte spesifik bozulmalar gösterirler (11).

Eksplisit belleğin süreçleri

Eksplisit bellek birbiriyle ilişkili fakat birbirinden ayrı dört sürecin sonucu meydana gelir; kodlama, pekiştirme, depolama, geri çağırma.

- 1) Kodlama; Yeni edinilen bilginin farkına varıldığı (duyuş organları aracılığı ile algılanması) ve işlendiği bir süreçtir. Kodlamanın süresi ve doğası yeni öğrenilen bilginin daha sonra ne kadar iyi hatırlanabileceğini belirler. Belleğin kalıcı olması ve iyi hatırlanabilmesi için bilgi düzgün olarak kodlanmalıdır. Bunu gerçekleştirebilmek için bilgiye dikkatin verilmesi, daha önceden edinilmiş bellek ile sistematik ve anlamlı olarak ilişkilendirilmesi gerekir.
- 2) Pekiştirme; Yeni edinilmiş ve hala labil olan bilginin uzun süreli saklanması için daha stabil hale gelmesine neden olan bir süreçtir. Belleği uzun süre saklamak için gen ekspresyonunu, yeni proteinlerin sentezini içeren yapısal değişikliklerin meydana geldiği bir süreçtir (11).

Kısa süre önce edinilmiş bilgi, assosiasyon korteksi'nde kodlanır ve anlamlılık açısından değerlendirildiği daha ileri assosiasyonlara maruz bırakıldığı, daha önce oluşmuş bilgi ile entegre edildiği ve pekiştirilmesine yol açacak uyarılarla işlendiği limbik sisteme aktarılır (10).

3) Depolama; Belleğin uzun süre bekletildiği mekanizmaları ve yerleri içeren bir süreçtir. Uzun süreli belleğin önemli bir özelliği sınırsız bir kapasiteye sahip olmasıdır. Buna karşın kısa süreli belleğin kapasitesi çok sınırlıdır (11).

Bilgi assosiasyon korteksi boyunca depolanır. Limbik sistemin bileşenleri (hippocampus ve entorhinal korteks gibi) depolama ve belki de geri çağırma sırasında bu bilgiyi birleştirme (bağlama) için gereklidir. Sol hemisferin temel olarak sözel ve genel bilgiyi (semantik bellek), sağ hemisferin ise temel olarak sözel olmayan veya otobiyografik bilgiyi (episodik bellek) depolaması şeklinde bir hemisferik asimetrinin bulunduğundan söz edilmektedir (10).

4) Geri çağırma; Depolanmış bilginin geri çağırılmasına ve kullanılmasını sağlayan bir süreçtir. Geri çağırma farklı yerlerde depolanmış birbirinden farklı tür bilgileri bir araya getirebilmeyi içerir.

Bilgi en etkin olarak edinildiği ortam ile aynı ortamda ve aynı işaretlerin varlığında geri çağırılabilir. Bilgi depolandıktan sonra geri çağırılan bilgi orijinal olarak saklanmış bilginin tam bir kopyası değildir. Geçmiş tecrübeler beyinin geçmişteki durumu tekrar oluşturabilmesi için kullanılır (11).

Bilginin geri çağırılmasının prefrontal ve temporal korteksin anterior bölümlerinden kaynaklanan bazı tetikleyici mekanizmalara bağlı olduğu düşünülmektedir (10).

Eksplisit belleğin zamansal parametrelere göre sınıflandırılması

Hering ve Ebbinghaus kısa süreli bellek ve uzun süreli belleği birbirinden ayırmıştır. Atkinson ve Shiffrin'in daha ileri bölümlenmesi ise şöyledir:

1. Çok kısa süreli bellek (ikonik bellek)
2. Kısa süreli bellek (çalışma belleği)
3. Uzun süreli bellek

Çok kısa süreli bellek, milisaniyeleri kapsayan bir süreçtir (örn; retinanın koni ve çubuklarında bir fotopigmentin kaybolması).

Kısa süreli bellek (çalışma belleği) özellikle Bradley'in 'çalışma belleği' kavramını ortaya atmasından sonra, bilim dünyasının daha fazla ilgisini çekmiştir. Çalışma belleği bilginin aktif biçimde çevrim içi tutulması ve manüplasyonuna karşılık gelir ve depolanmış bilginin geri çağırım için hazırlanmasını da içerir. Bilgi birçok kortikal alana dağılmıştır. Ancak bilgiyi güncel tutan yapıların daha çok pariyetal ve dorsolateral prefrontal korteks'te yer aldığı düşünülmektedir.

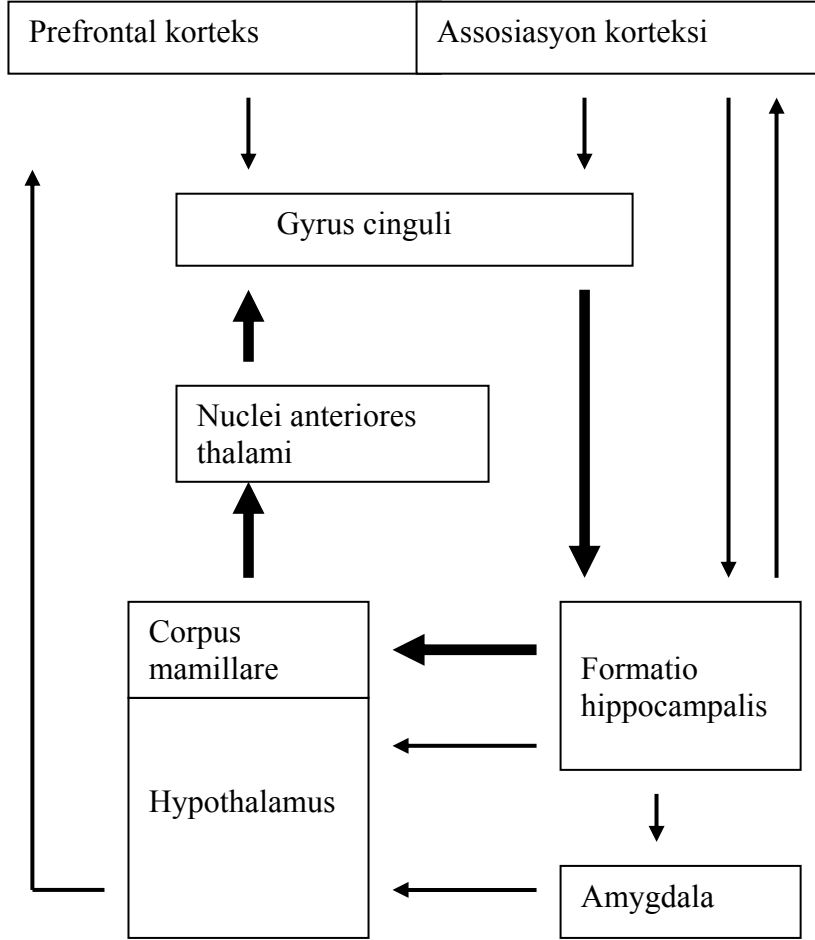
Uzun süreli bellek ise bilginin dakikalar ile on yıllar arasındaki süreyi kapsayacak şekilde çevrim dışı tutulmasına karşılık gelir (10).

Limbik sistem

Öğrenme ve bellek limbik sistem de dahil olmak üzere santral sinir sisteminin pek çok bölgesini ilgilendirilen kompleks yapılardır. Limbik sistem ilk olarak 1937 yılında Papez tarafından tanımlanmıştır ve Papez Döngüsü olarak adlandırılmıştır (12). Papez tarif ettiği döngünün daha çok emosyonların analizinde rol aldığını düşünüyordu. Daha sonra yapılan araştırmalar bu yapının bilginin uzun süreli belleğe aktarılmasında önemli rol oynadığını göstermiştir (10). Bu döngüye göre, bilgi cingulum aracılığı ile gyrus cinguli'den formatio hippocampalis'e buradan fornix aracılığı ile corpus mamillare'ye (hypothalamus'un bir bölümü), corpus mamillare'den tractus mamillothalamicus aracılığı ile nuclei anteriores thalami'ye, nuclei anteriores thalami'den gyrus cinguli'ye, gyrus cinguli'den cingulum aracılığı ile tekrar formatio hippocampalis'e aktarılır (13).

Limbik sistem konsepti daha sonra Paul Mac Lean tarafından hypothalamus'un bölümlerini, area septalis'i, nucleus accumbens'i (striatum'un bir parçası) ve orbitofrontal korteks gibi neokortikal alanları ve özellikle amygdala'yı da içerecek şekilde daha da genişletilmiştir (Şekil 4) (13).

Limbik sistemde özellikle de Papez Dögüsü'nde yer alan yapıların iki taraflı olarak hasarı ağır bellek bozukluğu ile sonuçlanır (10).



Şekil 4: Limbik sistem (13)

Papez tarafından tanımlanan döngü kalın oklarla gösterilmiş, ince oklar ise daha sonra tanımlanan bağlantıları göstermektedir. Amygdala'yı limbik yapılarla bağlayan yolak gösterilmiştir. Formatio hippocampalis ve assosiasyon korteksi arasındaki karşılıklı bağlantılar gösterilmektedir (13).

FORMATIO HIPPOCAMPALIS

Formatio hippocampalis hippocampus, gyrus dentatus, subiculer complex (subiculum, presubiculum ve parasubiculum) ve entorhinal korteks'ten oluşur (14).

Gyrus dentatus

Formatio Hippocampalis'i oluşturan yapılarından birisi olan gyrus dentatus insanda alt tarafında subiculum, üst tarafında ise medialde fimbria ve fornix ile daha lateralde ise hippocampus ile ilişkilidir. Dıştan içe doğru polimorfik tabaka, granüler hücre tabakası ve moleküler tabaka'dan oluşan üç tabakalı bir korteks yapısıdır. Esas hücre tipi granüler hücrelerdir ve gyrus dentatus'un afferent projeksiyonunun büyük bir bölümünü alırlar (temel olarak entorhinal korteks'ten) ve unipolar dendritleri moleküler tabakaya kadar uzanır (14).

Gyrus dentatus'un hilus'u atnalı şeklindeki granüler hücre tabakasının kolları arasında uzanan geniş ve dağınık şekilde yayılmış polimorfik hücrelerden oluşan hilal biçimli alandır. Hilus, Lorente de No tarafından tanımlanan hippocampus CA4 alanına uyar (15,16).

Subikuler kompleks

Subiculer kompleks'in subiculum, presubiculum ve parasubiculum olmak üzere üç bölümü vardır (13). Subiculum'un bir ucu hippocampus ile komşudur (17). Diğer ucu ise presubiculum ile devamlıdır. Subiculum komşu hippocampus bölümü (CA1) ile hemen hemen aynı boyutta pyramidal hücreler içerir. Bu hücreler dağınık olarak bulunurlar bu nedenle CA1'dekilere göre yoğunlukları daha az olacak şekilde paketlenmişlerdir (15). CA1/subiculum sınırı temel olarak pyramidal hücre tabakasının birden genişlemesi ile ayırt edilir (17).

Entorhinal korteks

Entorhinal korteks (Broadman'ın 28. alanı) rostralde amygdala'nın ön sınırına kadar uzanır. Kaudalde hippocampal alanların bir kısmı ile örtüşür. Entorhinal korteks'in daha primitif düzeyleri (amygdala'nın alt kısmı) bulbus olfactorius'tan afferent lifler alırken daha kaudaldeki alanları genel olarak primer olfaktor impulslar almaz. Amygdala'dan, prepiriform korteks'ten, temporal ve frontal lobun assosiasyon

alanlarından afferent lifler alır. Altı tabakalıdır fakat diğer neokortikal alanlardan tamamen farklıdır (14, 18).

Hippocampus

Hippocampus subiculum ve gyrus parahippocampalis'in medialinde, ventriculus lateralis'in cornu inferius'u boyunca kıvrılmış bir kabarıklık oluşturacak şekilde uzanır. Deniz atına benzemesi nedeniyle hippocampus (deniz atı) denilmiştir (14). Hippocampus koç boynuzuna benzediği için cornu ammonis (CA)'de denilmektedir (18).

Hippocampus insanda yaklaşık beş santimetre uzunluğundadır. Ön ucu geniştir ve burada kenarında bir veya üç yüzeysel oluk bulunabilir. Bu oluklar pençe benzeri görünüme neden olduğu için ön ucuna pes hippocampi denilir. Hippocampus'un kesiti C harfi şeklindedir. Ventrikül boşluğuna bakan yüzü konvektir ve ependim hücreleri ile kaplıdır. Altında hippocampus'da bulunan sinir hücrelerinin aksonları alveus'u oluşturur. Bu lifler hippocampus'un medial kenarına doğru uzanarak, bir kenar şeklinde olan fimbria hippocampi'yi oluştururlar. Gyrus dentatus ve hippocampus arasında bulunan fimbria hippocampi arkada crus fornicis olarak uzanır (14, 19)

Hippocampus'un yoğun olarak paketlenmiş ince pyramidal hücre tabakası belirgin olarak iki alana ayrılabilir; geniş hücreli proksimal alan ve küçük hücreli distal alan. Cajal bu iki alanı sırasıyla regio superior (üst bölge) ve regio inferior (alt bölge) olarak tanımlamıştır. En sık kullanılan ve kabul gören ise Lorento de No'nun hippocampus'u üç alana ayırarak (CA1, CA2 ve CA3) yaptığı isimlendirmedir. Bu isimlendirmeye göre hippocampus'un CA3 ve CA2 alanı Cajal'ın geniş hücreli regio inferior'unun karşılığı iken; CA1 alanı küçük hücreli regio superior'unun karşılığıdır (15,17).

CA3, gyrus dentatus'un hilus'una komşudur. CA1, subiculum ile komşudur. CA2, Lorento de No' nun tanımladığı gibi CA3 ve CA1 arasında bulunan sınırlı bir hücresel alandır. CA1 ile CA2-CA3 arasındaki sınır hücre organizasyondaki ve

boyutundaki keskin değişim ile tanımlanır (14-16). CA2 alanı genellikle CA3'e ait olarak kabul edilmektedir çünkü klasik boyama yöntemleri ile boyanmış kesitlerde bu iki alan arasındaki sınır belirgin değildir (20).

Hippocampus'un histolojisi

Hippocampus üç tabakalı bir archicortex yapısıdır. Bir pyramidal hücre tabakası ile bu tabakanın üstünde ve altındaki pleksiform tabakalardan oluşur (14).

Hippocampus'un tabakaları içinde laminer bir organizasyon tanımlanmıştır ve bu tanımlama sık olarak kullanılmaktadır (14). Genel olarak hippocampus'un bütün alanlarında laminer organizasyon benzerdir (17). Bu tanımlamaya göre ventriküler yüzeyden başlayarak şu yapılar bulunur (14).

1. Alveus; Subicular ve hippocampal pyramidal hücre aksonlarını içerir. Bu aksonlar fornix'in fimbria'sı üzerinde bir araya gelirler.

2. Stratum oriens; Temel olarak pyramidal hücrelerin bazal dendritlerini ve birkaç internöron içerir.

3. Stratum pyramidalis; Hippocampus'un temel hücre tipi olan pyramidal hücre tabakası olarak adlandırılır.

4. Stratum lucidum; Gyrus dentatus'tan gelen ve CA3'te bulunan pyramidal hücrelerin proximal dendritleri ile sinaps yapan yosunsu liflerin aksonlarını içerir. CA1 ve CA2'de bulunmaz. Hüresiz bir tabakadır. Stratum lucidum'un distal ucunda yosunsu liflerin temporale doğru kıvrıldığı yerde bir miktar kalınlaşma olur. Bu 'end bulb' CA3 ile CA2 arasındaki sınırı belirler

5. Stratum radiatum; CA3'te stratum lucidum'un, CA1 ve CA2'de stratum pyramidalis'in hemen altında bulunur. Stratum radiatum, CA3'teki pyramidal hücreler ile yine CA3'te bulunan pyramidal hücreler arasındaki assosiyonel bağlantıların ve CA3'teki pyramidal hücreler ile CA1'deki pyramidal hücreler arasındaki bağlantılar olan Schaffer kollateralleri'nin bulunduğu yerdir.

6. Stratum lacunosum moleculare; Bu tabakada entorhinal korteks'ten gelen perforant yolağın lifleri hem ilerler hem de sonlanırlar. Ayrıca diğer bölgelerden (thalamus'un nucleus reuniens'i gibi) gelen afferent lifler de bu tabakada sonlanır (14,17).

Hippocampus'un embriyolojik gelişimi

Limbik lob korteks'in ilk olarak farklılaşan bölümüdür. Başlangıçta hemisferin medial ve inferior'unda hemen hemen sirküler bir bant görünümündedir. Aşağıda ve önde, tractus olfactorius'un sapının bağlandığı yerde piriform alanın bir bölümünü oluşturur. Fissura choroidea'nın kavisinin dış tarafındaki parça formatio hippocampalis'i oluşturur. Bu alana korteksin nöral progenitörleri göç ederler ve prolifer olurlar. Böylece hemisferin duvarı kalınlaşır ve ventrikülün medial tarafına projekte olan bir kabarıklık oluşur. Bu kabarıklığın adı hippocampus'tur. İlk başta hemisferin medial duvarı üzerinde görülür yavaş yavaş geriye doğru gider ve piriform alanla yan yana olduğu polus temporalis bölgesine doğru kıvrılır. Hemisferin medial yüzünde yüzeysel bir oluk formatio hippocampalis'i baştan başa geçer. Bu oluğun adı sulcus hippocampalis'tir.

Hippocampus'taki hücrelerin efferent lifleri medial kenarı boyunca bir araya gelirler ve fissura choroidea'nın hemen üzerinde ileri doğru yönelirler. Bu efferent hipokampal lifler fimbria'yı ve fornix'i oluştururlar. Daha sonra iki hippocampus lamina terminalis'in üst bölümünde fornix'ten fornix'e geçen lifler aracılığıyla birbirleriyle bağlantı kurarlar. Bu lifler commissura hippocampi'yi oluştururlar (21).

HIPPOCAMPUS VE EKSPLİSİT BELLEK

Öğrenmenin hücrel modelleri yeni bellek oluşumları için nöron'larda bazı değişiklikler olduğunu var saymaktadır. Nöron'un uyarılara karşı oluşturduğu cevabını değiştirebilmesine 'nöronal plastisite' denir. Başka bir deyişle sinir sisteminin gelişimsel ve çevresel durumlara olduğu kadar diğer faktörlerin de değişmesiyle ortaya çıkan yeni durumlara yapısal organizasyonunu adapte etmesidir. Aynı olayın nöronlar arasındaki sinapslarda meydana gelen formuna ise 'sinaptik plastisite' denir.

Medial temporal lob sisteminin önemli bir komponenti olan hippocampus eksplisit bellek oluşumunda görevlidir. Hücrel düzeyde öğrenme ve bellek mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda sinaptik plastisitenin iki formu olan

hippocampal Long Term Potentiation (LTP) ve Long Term Depression (LTD) çok dikkat çekmektedir (5).

Hippocampus'un 3 ana yolağı vardır;

1. Perforant yolak; Entorhinal korteks'ten gyrus dentatus'un granüler hücrelerine projekte olan lifler tarafından oluşturulur.
2. Yosunsu lifler yolağı; Gyrus dentatus'taki granüler hücrelerin hippocampus'un CA3 alanındaki pyramidal hücrelerine projekte olan aksonlarını içerir.
3. Schaffer kollateral yolağı; Hippocampus'un CA3 alanındaki pyramidal hücrelerinin CA1 alanındaki pyramidal hücrelerinde sonlanan eksitatör kollaterallerini içerir (22).

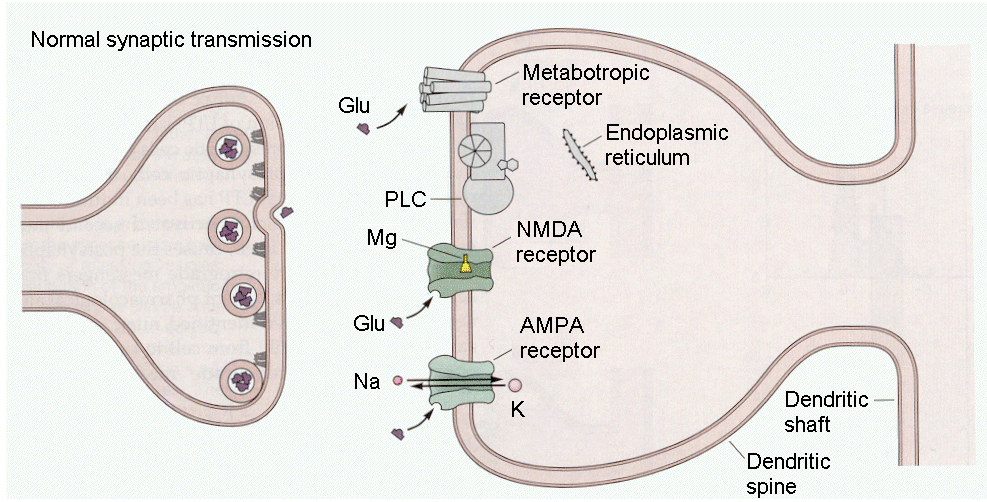
İlk olarak 1973'te Bliss ve Lomo bu yolaklardan herhangi birisinden kalkan yüksek frekanslı bir stimulusun, hedef hippocampus hücresinin eksitatör postsinaptik potansiyelinde saatlerce hatta günlerce devam eden amplitüd artışına neden olduğunu göstermişlerdir. Yani hippocampus'taki yolların yüksek frekanslı uyarılması sinaptik etkinlikte uzun süreli bir artışa neden olur. Sinaptik etkinlikteki bu artışa LTP denir (22, 23). Başka bir deyişle LTP sinaptik yolakların elektriksel stimülasyonuna bağlı olarak sinaptik şiddetin değişmesidir.

Daha sonra LTP'nin çeşitli neokortikal alanlar da dahil olmak üzere beyinin diğer bölgelerinde de oluştuğı gösterilmiştir. Fakat en sık olarak hippocampus'ta çalışılmıştır (23). LTP'nin uzun süre saklanabilen bellek oluşumlarına uygun zamansal özellikler gösteren ilk ve tek sinaptik plastisite örneğı olması nedeniyle bellekte rolü olduğu düşünülmektedir.

LTP oluşumunun erken ve geç olmak üzere iki fazı bulunmaktadır;

1. LTP'nin erken fazı; bir ile üç saat arası devam eder. Bu fazda yeni protein sentezi bulunmaz.
2. LTP'nin geç fazı; en az yirmi dört saat sürer. Yeni protein ve RNA sentezi meydana gelir (22).

Normal, düşük frekanslı sinaptik geçiş (bazal aktivite) sırasında presinaptik membrandan salınan glutamat hem N-methyl-D-aspartate (NMDA) hem de α -amino-3-hidroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) reseptörlerine etki eder. İstirahat halindeki membran potansiyelinde NMDA reseptörlerinin kanalları Mg^{+2} blokajı nedeniyle kapalıdır. Bu durumda AMPA reseptörlerinin kanalları üzerinden hücre içine Na^{+} ve K^{+} akışı olur (Şekil 5) (22).

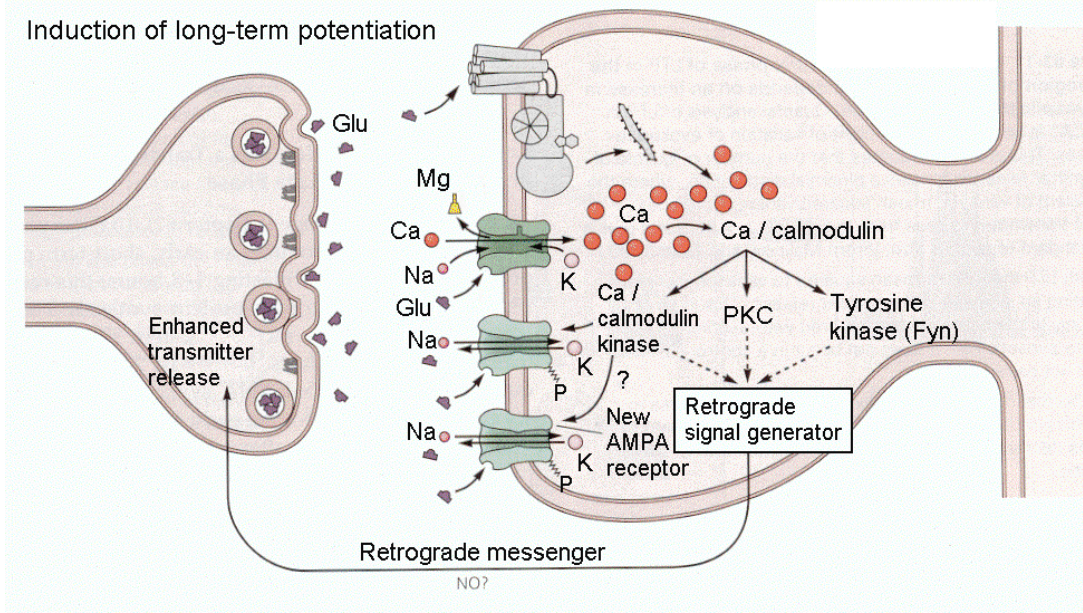


Şekil 5: İki sinir hücresi arasındaki normal sinaptik geçiş (23 nolu kaynaktan değiştirilmeden alınmıştır)

LTP oluşumuna neden olan yüksek frekanslı uyarıya bağlı olarak postsinaptik membran AMPA reseptör kanallarının aktivitesi aracılığı ile depolarize olur ve NMDA reseptör kanalındaki Mg^{+2} blokajı kalkar. NMDA reseptör kanalından hücre içine Ca^{+2} akışı gerçekleşir. Postsinaptik uçtaki Ca^{+2} artışı LTP oluşumuna neden olan Ca^{+2} bağımlı kinazları (Ca^{+2} /kalmodulin kinaz ve protein kinaz C (PKC)) ve tirozin kinaz Fyn'i aktive eder. Aktive olan Ca^{+2} /kalmodulin kinaz, AMPA reseptör kanallarını fosforile ederek, kanalların glutamat'a olan hassasiyetini artırır aynı şekilde normal durumda sessiz olan bazı AMPA reseptörlerini de aktive eder. Bu değişiklikler postsinaptik LTP'nin sürdürülmesine katkı sağlarlar.

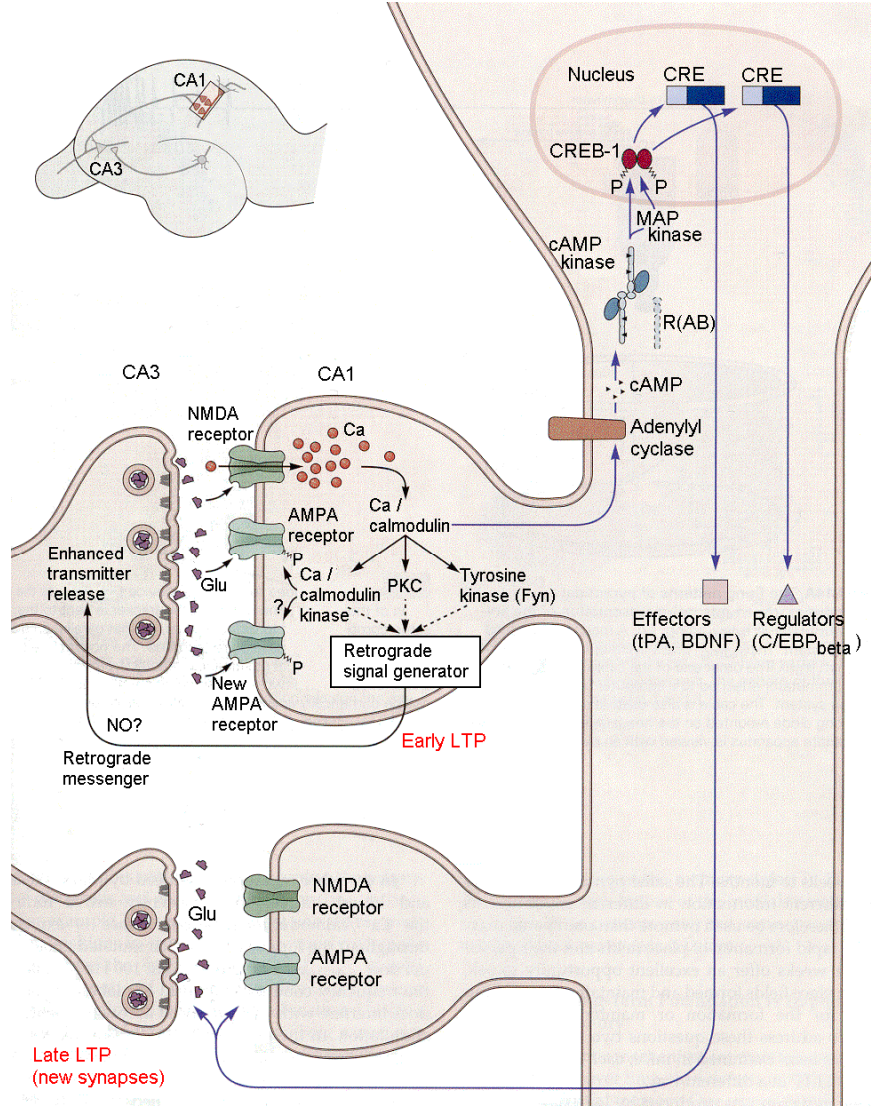
LTP oluşuktan sonra tam olarak bilinmeyen mekanizmalarla postsinaptik hücreden, presinaptik uça etki oluşturan bazı geri dönen haberci moleküller salınır. Farmakolojik ve genetik çalışmalar bu geri dönen habercilerden bir tanesinin hücreden hücreye geçebilen bir gaz olan nitrik oksit (NO) olduğunu göstermektedir.

Bu moleküller presinaptik uçta glutamat salınımını arttırmaları ve hala uyarı geliyormuş gibi aynı uyarı için glutamat salgısı devam eder. Yani LTP bir kez olduğu takdirde kendi kendini devam ettirmektedir (Şekil 6) (22,23).



Şekil 6: Sinaptik plastisitenin bir formu olan hipokampal Long Term Potentiation oluşumu (23 nolu kaynaktan değiştirilmeden alınmıştır)

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının sürekli artması adenil siklaz'ı aktive eder. Adenil siklaz cAMP miktarını arttırarak, cAMP bağımlı protein kinazı (cAMP kinaz) aktive eder. Aktive olan cAMP kinaz hücre çekirdeğine girer ve CREB proteinini fosforile eder. CREB'de hedef genleri aktive ederek yapısal değişikliğe neden olan protein sentezini başlatır. Yeni sinaps oluşumunda rol alan doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) sentezlenir. Bu sentez sırasında bazı transkripsiyon faktörleri (C/EBP_{beta} gibi) düzenleyici rol oynarlar (Şekil 7) (22).



Şekil 7: Sinaptik plastisitenin bir formu olan hipokampal Long Term Potentiation'un erken ve geç fazlarının sinaptik modeli (23 nolu kaynaktan değiştirilmeden alınmıştır)

Diğer bir sinaptik plastisite formu olan LTD ise uzamış düşük frekanslı aktivitenin sinaptik şiddette kalıcı azalmaya neden olmasıdır. Sinaptik sensivitede azalma meydana gelir. LTP'nin zıttıdır. İlk olarak hippocampus'ta gösterilmiştir. Daha sonra gyrus dentatus'ta, çeşitli kortikal alanlarda ve cerebellum'da çalışılmıştır (23).

Streptozotosin (stz) ile diyabet oluşturulan sıçanların hippocampus kesitlerinden yapılan kayıtlarda, kontrol grubuna göre, yüksek frekanslı stimulusun

LTP oluşumunu azalttığı, düşük frekanslı stimulusun ise LTD oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (5,7,24).

HIPPOCAMPUS'UN UZAYSAL ÖĞRENMEDEKİ ROLÜ

Sıçanlar, fareler ve güvercinler gibi çeşitli hayvan türlerinin tabiatlarında davranışlarını düzenleme ve idare etmede uzaysal bilgiyi kullanma eğilimleri vardır. Hippocampus ve ilgili yapıların (entorhinal korteks, subiculum gibi) uzaysal bilgiyi kullanmayı gerektiren öğrenme ve bellek testlerindeki rolü pek çok çalışmada araştırılmıştır. Hippocampus lezyonlarının hayvanlarda ve insanlarda spontan dikkati, uzaysal öğrenmeyi ve uzaysal bellek kullanımını bozduğu gösterilmiştir. Hippocampus hayvanların davranışlarını düzenlemeleri ve kontrol etmeleri için uzaysal bilgiyi kullanmalarında önemli rol oynar (25).

1971 yılında John O'Keefe ve John Dostrovsky deneysel çalışmalar sırasında hippocampus'un hayvanın hareketiyle ilgili olarak meydana gelen kognitif bir harita içerdiğini göstermişlerdir. Spesifik bir ortamda hayvanın lokalizasyonu pyramidal hücrelerin birbirlerinden ayrı olarak uyarılmasıyla kodlanmaktadır (22).

Hippocampus'ta bulunan her bir pyramidal hücre hayvanın ortamdaki pozisyonunu kodlayan potansiyel 'place cell'lerdir. Bu hücrelerin ortamda kodladıkları alanlar da 'place field' olarak adlandırılmaktadır. Hayvan ortamda hareket etmeye başladığında farklı place cell'ler uyarılır. Örneğin; hayvanın başı alanın kuzeyine girdiğinde sadece bir hücre uyarılır. Böylece hayvanın nerede olduğu hippocampal place cell'lerin bir bölümünün uyarılmasıyla belirlenir.

Hayvan yeni bir ortama girdiği zaman bir 'place field' oluşturmayı düşünür. Bu 'place field''ler dakikalar içinde biçimlenir ve haftalarca, aylarca sabit kalır.

Aynı 'place cell''ler farklı ortamlarda farklı bilgiler için yani birden fazla uzaysal harita oluşturulmasında kullanılabilirler. Böylece hippocampus uzaysal bilginin primer komponent olarak kullanıldığı davranışlarda 'kognitif harita' görevi görür (22,25,26).

Normal insanların beyinlerinde yapılan fonksiyonel görüntülemelerde sağ hippocampus'ta kelimeler, nesnelere, kişiler için olan belleğe göre uzaysal bellekte daha yoğun hippocampal aktivite gözlemlenmiştir. Kelimeler, nesnelere, kişiler için olan bellek dominant hemisfer'de bulunan sol hippocampus'ta daha yoğun aktiviteye neden olmuştur. Bu fizyolojik bulgular, sağ hippocampus lezyonlarının uzaysal oryantasyon sorunlarına yol açarken, sol hippocampus lezyonlarının sözel bellek defektlerine yol açmasını desteklemektedir (11,26,27).

Hippocampus uzaysal belleğin oluşturulmasında ve yön öğrenilmesinde, etraftaki nesnelere referans alınarak kognitif haritanın oluşturulmasında (allocentric kognitif map) önemli, belki de esas role sahip olmakla birlikte uzaysal öğrenmenin diğer elemanları muhtemelen diğer beyin yapıları tarafından sağlanmaktadır. Bu yapılar kısa süreli bellek (çalışma belleği) için frontal lob, uzaysal oryantasyon, dikkat ve insanın veya deneğin kendini referans alarak (egocentric, body-related mapping) oluşturduğu haritalama için parietal korteksdir. Uzaysal belleğin işlevinin bu yapıların hepsinin yüksek seviyedeki organizasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (27).

DIABETES MELLITUS

DM, ortak özelliği hiperglisemi olan bir grup metabolik hastalıktır. DM'un sınıflandırılmasında son olarak, hiperglisemiye yol açan patojenik süreç temel alınarak yapılan sınıflama kullanılmaktadır. Buna göre tip 1 DM; Insulin Dependent Diabetes Mellitus'un (IDDM), tip 2 DM; Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus'un (NIDDM) yerini almıştır. Tip 1DM insülin yetersizliği ve ketoasidoz eğilimi ile tanımlanmaktadır. Tip 2 DM çeşitli derecelerde insülin rezistansı ve bozulmuş insülin sekresyonu ve aşırı hepatik glukoz üretimi ile tanımlanan heterojen bir grup bozukluktur. Diğer özel DM tipleri ise genetik defekte, ekzokrin pankreas hastalıklarına, endokrinopatilere, ilaçlara ve gebeliğe bağlı olarak gelişmektedir (28).

Genel olarak DM tanısı üç şekilde konulabilmektedir:

1. Diyabet semptomları ve rasgele plazma glukoz konsantrasyonu ≥ 200 mg/dL (≥ 11.1 mmol/l). Rasgele kelimesi ile günün herhangi bir zamanı, diyabetin klasik semptomları ile poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı kastedilmektedir.
2. Açlık plazma glukozu ≥ 126 mg/dL (≥ 7 mmol/L). Açlık, en az 8 saat süren gıda alımının olmadığı süreyi belirtmektedir.
3. 75 gr oral glukoz tolerans testi'nin (OGTT) 2. saatinde plazma glukozu ≥ 200 mg/dl olması (29,30).

Diabetes Mellitus'un epidemiyolojisi

2000 yılında Dünya Sağlık Örgütü' nün verilerine göre, dünya genelinde en az yüz yetmiş bir milyon DM hastası bulunmaktadır. DM insidansı hızla artmakta ve bu rakamın 2030 yılında iki katına ulaşacağı tahmin edilmektedir (1). Tüm diyabet olgularının %90-95'i tip 2 diyabetlidir ancak hiperglisemi derece derece geliştiği ve sıklıkla hipergliseminin klasik semptomlarına yol açmadığı için toplumda etkilenmiş bireylerin % 50' sinden fazlasının tanı almadığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle net insidanstan söz edilememektedir ve prevelansa yönelik çalışmaların daha güvenilir olduğu kabul edilmektedir. Tip 1 DM tüm dünyada ve tüm toplumlarda görülebilmektedir (2,31).

Diabetes Mellitus'un etyopatogenezi

Tip 1 DM: Tip I diyabet pankreatik β hücrelerinin otoimmün destrüksiyonu ile karakterizedir ve insülin defektine yol açar. Neticede bu hastaların hayatlarını devam ettirebilmeleri için insülin tedavisi gereklidir ve tedavinin kesilmesi ketoasidoza yol açar. Tanı sırasında hastaların % 85-90'ında insüline veya pankreas adacık hücre bileşenlerine karşı otoantikörler tesbit edilebilir.

Tip 2 DM: Tip 2 diyabet insülin resistansı ve relatif insülin defekti ile karakterizedir. Tedaviler insülin rezistansını azaltmaya (diet, egzersiz, ilaç tedavisi gibi) ve endojen insülin salınımını artırmaya yöneliktir. İnsülin tedavisi kesilse bile hastalar ketoasidoza meyilli değildirler, çünkü az da olsa insülin üretimi vardır. Patogenez, insülin reseptörüne veya onun intraselüler sinyal yollarındaki defekte bağlı ilerleyici insülin direncine ve β hücrelerinin kaybına bağlıdır (31).

Diabetes Mellitus'un kliniği

Klasik semptomlar poliüri, polidipsi, kas kaybı, kilo kaybı, polifaji halsizlik, artmış enfeksiyon riski ve görme bulanıklığıdır. Hastadan özellikle kilo, egzersiz, etanol kullanımı, DM için aile öyküsü ve kardiyovasküler risk faktörlerinin sorgulandığı tam bir öykü alınmasına dikkat edilmelidir (28).

Diabetes Mellitus'un komplikasyonları

Diyabette görülen komplikasyonlar akut ve kronik olarak 2 grupta incelenebilir. Akut komplikasyonlar genellikle metabolik (ketoasidoz, nonketotik koma, asidoz gibi) kökenlidir. Kronik komplikasyonları kendi içerisinde DM'ye özgün olan (retinopati, nefropati, nöropati vb.) ve özgün olmayan (enfeksiyon, vasküler hastalıklar vb.) şeklinde ayırmak mümkündür.

Diyabetin her iki formu da gözleri, böbrekleri, kalbi, kan damarlarını ve sinirleri etkileyen kronik komplikasyonlarla ilişkilidir. Bu komplikasyonların ortaya çıkışı diyabetin süresi ve metabolik kontrolün kalitesiyle ilişkilidir ve kısmen insülin tedavisi ile önlenir (31).

Diyabetik Ensefalopati;

DM nörofizyolojik ve nöroradyolojik değişikliklerle paralel yavaş ilerleyen, klinik olarak önemli kognitif değişikliklerle karakterizedir. Tip 1 ve tip 2 diyabet hastaları pek çok nörofizyolojik testte performans bozuklukları göstermektedir.

Tip 1 diyabetik hastalar öğrenme ve bellekte, problem çözmede, mental ve motor hızda bozulmalar gösterebilirler. Bu bozulmalar genellikle hafiftir fakat bazen ciddi olabilir.

Tip 2 diyabetik hastalarda yapılan nörofizyolojik çalışmaların sonucunda kompleks bilgi süreçlerinde ve sözel bellekte hafif kognitif bozukluklar gösterdikleri bildirilmiştir (31).

YÜKSEK GLUKOZUN YOL AÇTIĞI OKSİDATİF VE NİTROSATİF STRES

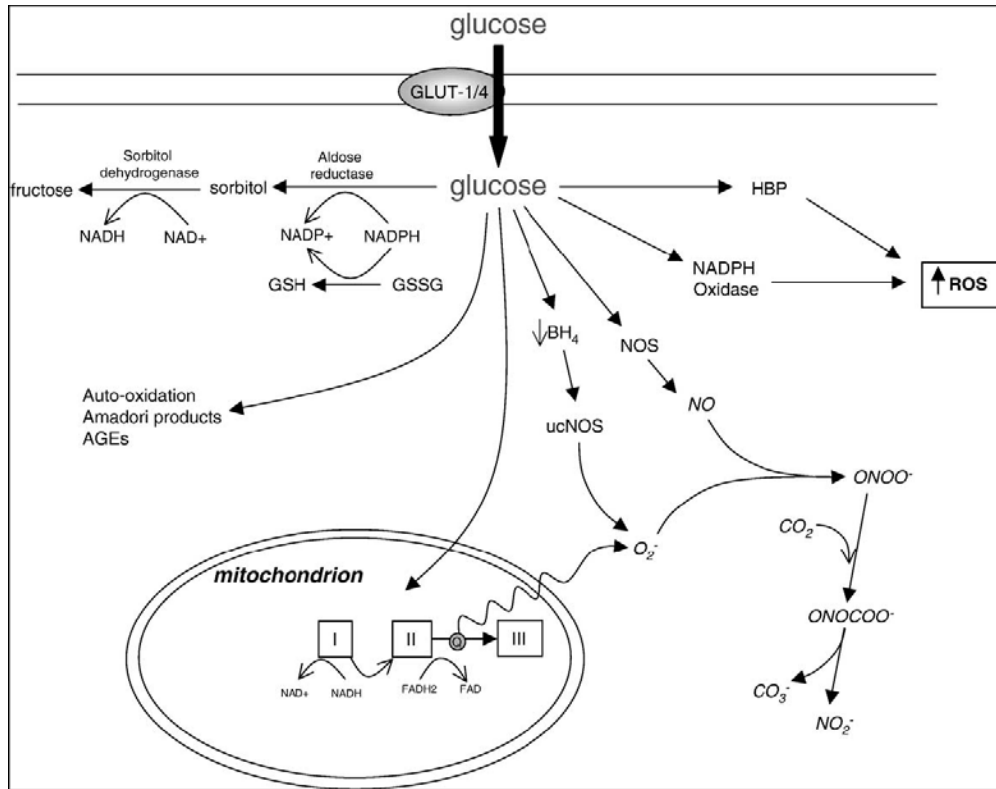
Yüksek glukoz, birçok hücre tipinde oksidatif ve nitrosatif strese yol açar. Hücrenin yüksek glukoz konsantrasyonuna tesbit edilebilen ilk cevaplarından birisi reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin üretilmesidir. Yüksek glukoz mitokondrial elektron transport zinciri aracılığı ile süperoksid üretimine neden olur. Elektron transport zincirinin kompleks 3'te kesilmesine yol açar bu da moleküler oksijenin koenzim Q tarafından süperoksit anyonuna oksidasyonunun artmasına neden olur. Böylece normalde iyi çalışan glukoz metabolizması, hiperglisemi gibi stres durumlarında, aşırı serbest radikal üretimine ve oksidatif strese neden olur (Şekil 8).

Oksidatif ve nitrosatif stresin kombinasyonu çeşitli hücre tiplerinin apoptozisine ve nekrozuna yol açar. Süperoksit ve nitrik oksit'in birlikte üretimi, peroksinitrit (ONOO^-) üretimine yol açar. ONOO^- 'in protonlanması, hidroksil radikali oluşturmak üzere ayrışabilen peroksinitröz asid oluşumuna sebep olur. ONOO^- 'in, karbon dioksit (CO_2) ile oksidasyonu sonucu yarı ömrü bilinmeyen bir ara ürün olan nitrosoperoksikarbonat (ONOCOO^-) oluşur. Bu kısa ömürlü radikalın ayrışması ile oksidasyon ve nitrasyon reaksiyonlarına neden olan nitrojen dioksit (NO_2^-) ve karbonat (CO_3^-) anyonları oluşur (32).

ONOO^- , lipid peroksidasyonuna neden olur ayrıca direkt olarak nokta mutasyonu, çift sarmallı yapının kırılması gibi oksidatif deoksiribonükleik asid (DNA) hasarına neden olur.

Yüksek glukozun indüklediği oksidatif stresin diğer bir kaynağı polyol pathway'idir. Burada glukoz, aldoz redüktaz aracılığı ile sorbitol'e indirgenir ve bunun için nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Sorbitol daha sonra sorbitol dehidrogenaz ile fruktoza çevrilir ve bu arada nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) üretilir. NADPH'ın kullanılması hücre için esansiyel bir antioksidan olan ve NADPH'a bağımlı olarak üretilen indirgenmiş glutatyon oluşumunu bozar. İndirgenmiş glutatyon'un bulunmaması DNA hasarına neden olmaktadır.

Glukoz, reactive dicarbonyls glyoxal, methylglyoxal ve 3-deoxyglucosone oluşturmak için oto-oksidasyona veya ayrışma uğrayabilir. Bunlar daha sonra advanced glycation end products (AGEs) oluşturmak üzere reaksiyona girerler bu da hücre ölümüne yol açmaktadır. Çeşitli çalışmalarda AGEs'in nefropati, nöropati ve mikrovasküler hastalığı içeren diyabetik patofizyolojinin mediatörleri olduğu kabul edilmektedir (32).



Şekil 8: Yüksek glukozun indüklediği oksidatif ve nitrosatif stresin olası yollarını gösteren şematik diyagram (32 nolu kaynaktan değiştirilmeden alınmıştır)

Polyol ve heksozamin yollarının ürünleri ve NADPH oksidaz gibi enzimlerin aktivitesi oksidatif hasara neden olurlar. Glukozun mitokondrial süperoksit üretimini ve daha sonra nitrik oksid sentaz (NOS) aktivasyonunu etkilemesi güçlü bir oksidan olan peroxynitrite oluşumuna neden olur. Perxynitrite daha sonra karbonat (CO_3^-) anyonu ve nitrojen dioksit (NO_2^-) oluşturmak üzere ayrışır. Glukozun oto oksidasyonu ve dekompozisyonu, hücrel proteinlerin ve lipidlerin hasarına neden olan AGEs oluşumuna yol açar (32).

APOPTOZİS VE YÜKSEK GLUKOZUN YOL AÇTIĞI HÜCRE HASARI İLE İLİŞKİSİ

Akut hasardan sonra tesadüfi olarak meydana gelen hücre ölümünden farklı olarak programlanmış hücre ölümü, apoptozis olarak bilinen farklı morfolojik değişiklikler ile karakterize aktif bir süreçtir. Kaspazlar (caspase) çeşitli uyarılar sonucu indüklenen apoptozisi hem regüle eden hem de apoptozisi meydana getiren bir proteaz ailesidir. Kaspazların ana hedefi aktive olduğunda DNA'nın parçalanmasından sorumlu olan bir DNAaz inhibitörüdür. Kaspazlar hücre çekirdeğinin membranına bağlanarak DNA'nın ve yapısal proteinlerin parçalanmasına, hücre iskeletinin bozulmasına ve hücrenin parçalanmasına neden olurlar.

Kaspazlar prekürsör olarak sentezlenirler ve diğer kaspazlar tarafından katalizlenen proteolitik ayrılma ile aktif hale gelirler. Caspase-9 memeli hücrelerinde apoptozisin başlamasında anahtar role sahiptir. DNA hasarı, growth faktör yokluğu gibi hücre ölümünü tetikleyen pek çok stimulus mitokondri hasarına ve normalde mitokondri membranında bulunan cytochrome c'nin stoplazmaya salınmasına neden olur. Stoplazmada cytochrome c, Apaf-1'e bağlanır ve apoptosome olarak adlandırılan Apaf-1/caspase-9 kompleksinin oluşmasına neden olur. Bu yapı içinde aktive edilen caspase-9 hücre ölümüyle sonuçlanan özellikle caspase-3 gibi diğer kaspazları aktive eder (33).

Mitokondrial apoptozis, sistein proteazlarının aktivitelerini direkt veya indirekt olarak aktive veya inhibe eden proteinler tarafından düzenlenir. Apoptozis düzenleyici bu proteinlerin homoloji gösteren birkaç tanesi bcl-2 ailesi olarak adlandırılırlar (32). Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondrial bütünlüğü ve cytochrome c salınımını düzenlerler. Apoptozisi inhibe eden Bcl-2 ailesi üyeleri (Bcl-2'nin kendisi gibi) cytochrome c salınımını önlerlerken hücre ölümüne neden olan Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondrial membran hasarını, cytochrome c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu indükleyerek etki gösterirler (33).

Bulundurdıkları Bcl-2 homolog (BH) alanlarının tipleri ve sayılarına göre tanımlanırlar. Çok sayıda BH alanları içeren ve pro-apoptotic proteinler olan Bax ve Bak; birkaç adet BH alan içeren ve anti-apoptotic etkili olan Bcl-2, Bcl-w, Bcl-XL ve Mcl-1; bir adet BH alanı içeren Bim, Bad ve Bid ve olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sadece tek BH alan içeren proteinler Bcl-2'nin anti-apoptotic aktivitelerini direkt bağlanarak ve Bax-homo oligomer formasyonunu inhibe etmesini önleyerek inhibe ederler.

Bax 25-kDa ağırlığında bir proteindir ve mitokondrial membran permeabilitesini arttırarak cytochrome c salınımına ve Apaf-1 ile birlikte apoptosome oluşumuna neden olur (32). Apaf-1/caspase-9 kompleksi apoptosome olarak adlandırılır ki bu yapı içinde caspase-9 aktive edilmektedir. Aktive caspase-9 özellikle caspase-3 gibi diğer efektör kaspazları aktive eder ve devam eden süreçte hücre ölümü meydana gelir (33).

Bu mekanizmaların bir kısmı veya hepsi çalışılan hücre veya doku tipine bağlı olarak yüksek glukozun indüklediği apoptozis ile ilgilidir. Yüksek glukozun indüklediği apoptozis ve oksidatif stres arasındaki ilişki de aynı derecede karmaşıktır (32).

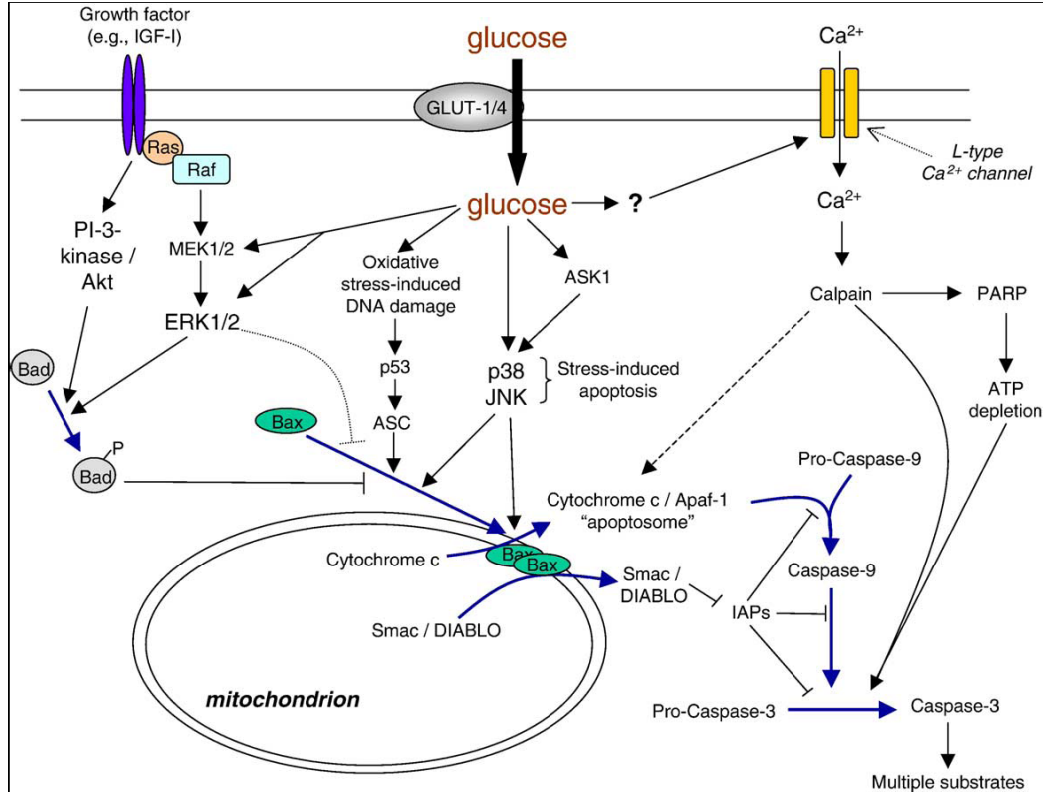
Yüksek glukoz konsantrasyonları ya direkt olarak ya da apoptosis signal regulating kinase-1 (ASK1) aracılığı ile c-Jun-NH₂-terminal kinase (JNK) ve p38 gibi Bax oligomerizasyonuna ve mitokondriden cytochrome c salınımına neden olan ve hücrel strese cevap olarak aktive olan, mitogen activated protein kinase'ları (MAPK) aktive eder. Bunu apoptosome formasyonu, caspase-9 ve caspase-3 aktivasyonu takip eder. İlâveten, artmış mitokondrial dış zar permeabilitesi kaspaz kaskadını genişleten bazı apoptozis regülâtörlerinin salınımına neden olur. Yüksek glukozun indüklediği apoptozise Smac/DIABLO'nun katkısı (apoptozis proteinlerinin inhibitörlerinin (IAPs) antagonisti) burada belirtilmektedir fakat henüz kanıtlanmamıştır. Yüksek glukozun indüklediği oksidatif stres DNA hasarına neden olur ve kısmen associated speck-like protein (ASC) aracılığı ile p53-ilişkili mekanizmalarla apoptosisi indükleyebilir. Yüksek glukoz, kalsiyum bağımlı bir proteaz olan calpain'ı aktive eder. Calpain kaspaz bağımlı ve bağımsız mekanizmalar

ile apoptozisi başlatabilir. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) gibi growth factor'ler yüksek glukoz indüklü apoptozisi önleyebilir ve Ras/Raf–MEK/ERK veya phosphatidylinositide 3-kinase (PI-3-kinase) ve proteine-serine/threonine kinase (Akt) (PI 3-kinase/Akt) yolağı üzerinden etki göstermekte oldukları görülmektedir. IGF-I'in aktive ettiği Akt veya ERK, pro-apoptotic protein Bad'ı fosforilleyebilir Bad fosforillenince Bax oligomerizasyonunu arttıramaz (Şekil 9) (32).

MAPK'lar çeşitli growth faktörlere ve diğer sinyali moleküllere cevaben aktive olan protein-serine/threonine kinase'lar olarak adlandırılan bir protein ailesidir. Ökaryotik hücrelerde geniş kapsamlı stimuluslara cevaben sinyal iletiminde rol oynayarak hücre yaşamını, proliferasyonunu ve apoptozisini kontrol ederler (32,33). Memeli hücrelerinde en iyi karakterize edilmiş MAPK'lar extracellular signal-regulated kinase (ERK) ailesidir. ERK aktivasyonu, growth faktörler tarafından indüklenen hücre proliferasyonunda anahtar role sahiptir (32,33).

ERK aktivasyonu, Ras diye adlandırılan, guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı protein aracılığı ile growth faktör reseptörlerine bağlanan iki protein kinaz aracılığı ile gerçekleşir. Ras aktivasyonu, Raf protein-serine/threonine kinase aktivasyonuna neden olur. Bu da MEK olarak adlandırılan ikincil protein kinazı fosforile ve aktive eder. MEK, ERK ailesinin elemanlarını fosforilleyerek aktive eden bir protein kinazdır. ERK aktive olunca diğer protein kinazları ve tanskripsiyon faktörlerini de içeren çeşitli hedefleri fosforillemektedir (33).

p38 MAPK ve JNK'lar, ERK ailesindedirler ve hücrel strese cevap olarak aktive olurlar (33).



Şekil 9: Yüksek glukozun indüklediği apoptozis mekanizması (32 nolu kaynaktan değiştirilmeden alınmıştır)

DİYABET OLUŞTURULMASINDA KULLANILAN HAYVAN MODELLERİ

Diyabet oluşturulmasında kullanılan hayvan modelleri, genetik predispozisyona bağlı olarak spontan diyabet gelişen ve deneysel prosedürler ile diyabet oluşturulan hayvan modelleri olarak ikiye ayrılabilir (Tablo 1) (34).

1.Genetik predispozisyona bağlı spontan diyabet gelişen hayvan modelleri

BB/Wor Sıçanlar ve Non Obese Diyabetik (NOD) Fareler

BB/Wor sıçanlar ve Non Obese Diyabetik (NOD) farelerde, pankreas β hücrelerinin immün sistem aracılığı ile yıkımına bağlı spontan olarak diyabet gelişir. Yaşamalarını sürdürebilmeleri için insülin tedavisi gereklidir. NOD fareler

ketoasidozise BB/Wor sıçanlar'dan daha az meyillidirler. Bu iki model insanlardaki tip 1 DM'a uyar.

Zucker sıçanlar ve db/db fareler

Zucker sıçanlar farklı cinslerden gelirler. Zucker fa/fa sıçanların fa geninde otozomal resesif mutasyon vardır. Bu gen leptin reseptörünü kodlar. Hayvanlar hiperfajik, hiperlipidemik ve obezdirler. Aynı zamanda periferik insülin direnci, hiperinsülinemi ve bozulmuş glukoz toleransı gösterirler. Hiperglisemi genellikle orta şiddettedir. Diyabetik Zucker sıçan (ZDF/DRT-fa) hiperglisemi için inbred bir fa/fa sıçan alt cinsidir.

db/db farelerin, diyabet (db) geninde otosomal resesif mutasyon vardır. Farelerde bu gen, leptin reseptörünü kodlayan gendir. Bu nedenle bu farelerin özellikleri, fa/fa sıçanların özellikleri ile tam olarak benzerdir.

Zucker, db/db modelleri bazı açılardan tam olarak tip 2 DM'yi taklit etmelerine rağmen her birinin altında yatan genetik bozukluk, tip 2 DM hastalarındaki primer bozukluğu karşılamaz. Otsuka Long-Evans Tolushima Fatty (OLETF) sıçanlar, Goto Kakizaki (GK) sıçanlar ve Akita fareler genetik predispozisyona bağlı olarak spontan diyabet gelişen diğer hayvan modelleridir (31,34).

2.Deneysel yöntemler ile diyabet oluşturulan hayvan modelleri

Deneysel diyabet oluşturulması için pankreatektomi, virüslere maruziyet ve pankreas β hücrelerine sitotoksik ajanların uygulanması gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanı pankreas β hücrelerine spesifik olan streptozotosin uygulamasıdır (31,34).

STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN DİYABET

Diyabetin patofizyolojisinin ve komplikasyonlarının araştırıldığı çalışmalarda intravenöz veya intraperitoneal olarak streptozotosin uygulanması çok sık kullanılmaktadır (31). Streptozotosin glukoz analogu olan glucosamine-nitrosourea

(2-deoxy-2-[3-methyl-e-nitrosourido]-D-glucopyranose) bileşimidir. İlk kez 1960 yılında *Streptomyces achromogenes*'den antibiyotik olarak elde edilmiştir. Spesifik olarak pankreatik β hücrelerine hasar verici etkisi nedeniyle diyabetojenik etki gösterir (35).

Streptozotosin, pankreas'ın Langerhans adacık hücrelerinden insülin üreten β hücrelerinde yüksek miktarda bulunan GLUT-2 glukoz taşıyıcısı aracılığı ile hücre içine alınır. Streptozotosin'in toksik etkisi nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) seviyelerini azaltması, hücre içinde serbest radikal oluşumunu arttırması ve DNA çift sarmalında kırılmalara yol açması aracılığı ile ortaya çıkar. Langerhans adacık hücrelerinden insülin üreten β hücreleri fazla miktarda GLUT-2 glukoz taşıyıcısı eksprese etmelerinin yanında düşük miktarda NAD içermeleri nedeniyle de streptozotosin'e oldukça duyarlıdırlar.

Streptozotosin intraserebroventriküler uygulanmasından sonra beyinde direkt toksik etkilidir. Fakat kan-beyin bariyeri'nde GLUT-2 glukoz taşıyıcıları yoktur. Bu nedenle streptozotosin'in sistemik uygulanmasından sonra beyine geçişi ve beyinde direkt etkisi yoktur (34,36).

Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanların özellikleri

Streptozotosin diyabet modelinin yararları, iyi karakterize edilmiş olması ve hangi yaşta verilirse verilsin diyabet oluşturmasıdır.

Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlar hipoinsülinemiktir, fakat hayatlarını devam ettirebilmeleri için insülin tedavisi gerekmez. Kan glukoz seviyeleri 20-25 mmol/L düzeyindedir (normali; 5 mmol/L).

Diyabetik insanlarda olduğu gibi streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda da göz, böbrek, kalp ve sinir sisteminde organ hasarları görülür (34).

Streptozotosin ile oluşturulan diyabetin kognüsyon ve sinaptik plastisiteye etkisi

Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda ortaya çıkan kognüsyon ve hipokampal sinaptik plastisitedeki değişiklikler bildirilmiştir. Bu hayvanların relatif olarak kolay davranış testlerinde (pasif kaçınma testi gibi) gösterdikleri performans etkilenmemiş iken daha kompleks testlerdeki (su tankı testi gibi) performansları bozulmuştur. Performans bozukluğunun düzeyi diyabetin süresine ve hipergliseminin şiddetine bağlıdır ve insülin tedavisi ile önlenemez, fakat tam anlamda bir düzelme sağlanamaz.

Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda uzaysal öğrenme testleri ve LTP’de gözlemlenen değişiklikler arasındaki ilişki pek çok çalışmada bildirilmiştir. Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlardan diyabet oluşturulmasından altı hafta sonra elde edilen hippocampus kesitlerinde LTP oluşumunun bozulduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda diyabet oluşturulmasından sonraki altıncı ve sekizinci haftalarda AMPA reseptörleri’nin glutamat affinitesinin azaldığı fakat NMDA reseptörlerinin glutamat affinitesinin değişmediği gözlemlenmiştir. Fakat NMDA reseptörlerinin NR2B komponentinin (bu komponentin LTP oluşumunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir) sentezinin belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (31).

Tablo 1: Deneysel diyabet oluşturulmasında kullanılan hayvan modelleri (34)

Model	Diyabet mekanizması	Glukoz	İnsülin
Stz diyabeti	β hücre toksisitesi	↑↑	↓↓
BB/Wor sıçan	β hücre oto immunitesi	↑↑	↓↓↓
NOD mouse	β hücre oto immunitesi	↑↑	↓↓↓
Zucker fa/fa sıçan	Defektif leptin reseptörü	=/↑	↑↑
Diyabetik Zucker sıçan	Hiperglisemi için inbred fa/fa sıçan	↑↑	↑↑
Db/db fare	Defektif leptin reseptörü	=; yaşla↑↑	↑↑; yaşla↓
GK sıçan	Glukoz intoleransı için inbred	↑	↑
OLETF sıçan	Defektif CCK-A reseptörü	=; yaşla↑	↑; yaşla↓
Akita fare	Proinsülin’in yanlış kıvrılması, β hücre destrüksiyonu↑	↑; yaşla↑↑	↓; yaşla↓↓

=; normal, ↑ ; orta derecede artmış; ↑↑; belirgin olarak artmış, ↓; orta derecede azalmış, ↓↓; belirgin olarak azalmış

SU TANKI TESTİ

Yaklaşık 25 yıl önce Morris tarafından, laboratuvar ortamında uzaysal öğrenme ve belleği değerlendirmek için su tankı modeli tanımlanmıştır (37). Zaman içinde davranışsal nörobilimde en sık kullanılan modellerden biri olmuştur. Araştırmacılar pek çok farklı uygulamada Morris su tankı testinin pek çok farklı tiplerini kullanmaktadırlar. Model, su ile doldurulmuş geniş bir havuz ve havuz içinde bulunan bir platformdan oluşmaktadır. Denemeler süresince hayvanlar görünür yada saklı yerleştirilen platformu bularak havuzdan kaçmayı öğrenirler. Yıllar içinde Morris'in tanımladığı test için “Morris yüzmeye havuzu”, “Morris maze”, “water maze”, “Morris su tankı” gibi çeşitli adlandırmalar yapılmıştır. Bu çalışmada ise testin adı ‘su tankı testi’ olarak kullanılmıştır. Genel olarak su tankı testinin alternatif öğrenme ve bellek testlerine göre daha az karmaşık ve protokollerinin daha az zahmetli olduğu kabul edilmektedir. Su tankı testi göreceli olarak daha basit bir test olmasına rağmen zaman içinde uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesinde ‘altın standart’ olmuştur (37,38).

Su tankı testi hayvanların başka bir kaçma yolu olmadığı varsayımıyla, hoşlanmadıkları bir ortamda kaçış yolu aramalarına bağlı olan bir testtir. Sıçanlar da doğal yüzücüler olmalarına rağmen sudan kaçmak isterler ve bunun için çaba harcarlar (39). Hayvanların suya daldırılması ve tuzağa düştüklerini hissetmeleri testin ilk aşamalarında bazı hayvanlar için uyum problemi yaratabilir (37,38). Ancak yapılan denemeler bu problemin deneme blokları ilerledikçe ortadan kalktığını göstermektedir.

Su tankı yüzen hayvanın görebileceği şekilde duvarlarında işaretler bulunan bir odaya yerleştirilir. Test süresince her gün tekrarlanan deneme bloklarında (acquisition blokları) hayvanlar önce su yüzeyinin üzerinde daha sonra, uygulanan protokole göre, su düzeyinin altında olacak şekilde gizlenmiş platformun yerini saptayarak sudan kaçmayı öğrenirler. Deneme bloklarından sonra öğrenmenin test edildiği prob trial denilen bir kez tekrarlanan bir uygulama daha yapılır. Bu uygulamada platform havuzdan kaldırılır ve hayvan belirli bir süre havuzda serbest olarak yüzdürülür. Platformun bulunduğu kadranda geçen süre, platformun

bulunduğu alandan geçme sayıları gibi verilerle hayvanın uzaysal öğrenmesinin doğruluğu değerlendirilir.

Denemeler boyunca hayvanlar saklı platformu bulmak için temel olarak  strateji geliştirirler; kendisini platforma götüren öğrenilmiş ardışık hareketleri kullanabilir, kendisini referans olarak (platformun kendisine göre sürekli sağında olması gibi) platforma ulaşabilir veya ortamdaki işaretlerin şekli, görünüşü hakkındaki bilgilerini kullanarak platforma g eder. Hayvanlar ğrenilmiş ardışık hareketler ile ve kendilerini referans olarak platformu bulmaları ihtimallerinden dolayı her denemede farklı başlangıç pozisyonlarından bırakılırlar.

Su tankı testinin kuru ortamda yapılan öğrenme testlerine göre bir avantajı da hayvanların kokuyu takip ederek yol alma ihtimalini en aza indirmesidir. Su tankı testinin izlenmesi verilerin kamera yardımı ile kaydedilerek bilgisayar ortamına aktarılmasıyla gerçekleştirilir. Bu yolla deneysel yan tutma önlenmektedir.

Araştırmacılar tarafından su tankı testi sıçanlardaki hippocampal lezyonların etkilerine özel sensitivitesi olan bir yöntem olarak gösterilmektedir (37,38). Hippocampus hasarı olan sıçanların su tankı testinde performanslarının bozulduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (37-41).

STEREOLOJİ

Stereoloji temel olarak kesitlerden yapılan incelemeler ile  boyutlu mikroskopik yapılar hakkında sayısal bilgi edinmeyi sağlayan basit ve etkin yöntemler ile ilgili bir bilim dalıdır (42). Bu yöntemler ile beyinde toplam nöron sayısı, sinaps yoğunluğu ve hacim hesaplaması yapılabildiği gibi pek çok histolojik yapı da değerlendirilebilmektedir (43,44). İki boyutlu kesitler  boyutlu yapılar hakkında sadece istatistiksel olarak sayısal bilgi verirler. Bu istatistiksel bilginin doğru veya tarafsız olması için kesitler ile ve kesitlerin elde ediliş biçimi ile ilgili olarak dikkat edilmesi gereken bazı detaylar bulunmaktadır (42).

Stereoloji ile ilgili olarak istatistiksel anlamda sıklıkla kullanılan iki kavram bulunmaktadır; 'tarafsızlık' ve 'etkinlik'. Tarafsızlık gerçek değerden sistematik sapma göstermeyen sonuçların elde edilmesidir. Etkinlik ise en düşük miktarda zaman harcanmasından sonra en düşük seviyede değişkenlik gösteren verilerin elde edilmesidir (42).

Stereoloji ilk kez 1961 yılında Elias tarafından kullanılmıştır ve bu tarihten itibaren bir çok metod kullanılmıştır. Önemli olan kullanılan yöntemin etkin ve tarafsız olmasıdır. 1984 yılında Sterio tarafından tanımlanan üç boyutlu sonda: 'Disektör' yöntemi tanımlanmıştır ve 1986 yılında Gundersen 'Optik Disektör' fikrini öne sürmüştür. 1991 yılında West, temel olarak yapıları bilinen ve önceden belirlenmiş olasılıkla rasgele örnekleme dayanan ve stereoloji alanında Gundersen tarafından kullanılmaya başlanılan 'Fractionator' örnekleme prensibi ile Optik Disektör'ü kombine ederek Optik Parçalama Yöntemini ortaya koymuştur. Optik Parçalama analizi yapılan alanın bölümünün belirlenmiş bir parçasından oluşan tek tip sistematik örnekleme içinde Optik Disektör ile nöronların (diğer hücre tipleri, organeller vb.) sayılması mantığından oluşmaktadır. Bu yöntem ile tüm uygulamalar için tarafsız bir değerlendirme sağlamıştır (20,43,45-47).

Stereolojik yöntemlerin etkinliğinin ana unsuru 'Sistematik Rasgele Örnekleme' prensibidir. İlgilenen yapılardaki tüm elemanlar eşit olarak örnekleme şansına sahiptir (16,48).

Optik Parçalama Yöntemi nöron sayısını değerlendirmede etkinliği ve tarafsızlığı nedeniyle nörobilimde 'altın standart' olarak kabul görmüştür ve özellikle de hippocampus'ta nörolojik kantitatif çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (20).

OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNİN PRENSİPLERİ

Sistematik Rasgele Örnekleme;

Stereolojik yöntemlerin temel prensiplerinden bir tanesi sistematik rasgele örnekleme prensibidir. Klasik rasgele örnekleme ile kesitler herhangi bir sıralama

gözetmeksizin bir önceki kesitten bağımsız ve tamamen rasgele olarak seçilir. Sistematik rasgele örneklemede ise rasgele ve uygun olarak seçilen kesitten başlanarak yapının uzunluğu boyunca sistematik olarak sabit ve önceden belirlenmiş aralıklarla seçilen kesitlerle yapının tamamı örneklenir. Önceden belirlenen örnekleme aralığı örneklemenin sistematik olmasını, ilk seçilen kesitin rasgele bir noktadan alınması ise örnekleminin rasgele olmasını sağlar. Sistematik rasgele örnekleme prensibi ilgilenen yapının her bir noktasına eşit olarak örnekleme şansı tanır ve bu nedenle örneklemin yapıyı temsil edebilirliği artar ve gerçek değere sistematik biçimde yaklaşılır (48-50). İlgilenilen yapının tamamından uzun eksen boyunca seçim yapıldığı için klasik rasgele örneklemeyle göre daha etkin bir yöntemdir (46).

Tarafsız bir çalışma için sistematik rasgele örnekleme her seviyede uygulanmalıdır. Yani organdan alınacak kesitlerde, kesitlerde inceleme yapılacak alanlarda olmak üzere çalışmanın her aşamasında sistematik rasgele örnekleme yöntemi uygulanmalıdır. Bu aşamaların herhangi bir yerinde seçim yapma hakkı yoktur aksi takdirde çalışma taraflı olur (51).

Optik Disektör;

Disektör yöntemi (Oorschot ve arkadaşları tarafından 1991'de tarif edilen fiziksel disektör yöntemi ile aynıdır) kullanılarak sayım yapılırken nesnelere kesitsel profillerinin iki ayrı kesitte bulunması ve incelemenin birbiriyle aynı iki mikroskopta yapılması gerekmektedir (47). Bu işlemler örnekleme ve hücre sayımı aşamasında harcanılan zamanı arttırmaktadır. 1986 yılında Gundersen tarafından 'optik disektör' fikri ortaya atılmıştır (43). Bu yöntem oldukça pratik ve etkin bir yöntemdir pek çok stereolojik yöntemin uygulanmasını kolaylaştırır. Büyük sayısal açıklığı olan mikroskop objektifleri kullanarak kalın histolojik kesitlerin optik olarak kesitlere ayrılabilmesi esasına dayanmaktadır (46). Optik disektör yönteminde kullanılacak kesitin kalınlığı sayılacak partikülün en uzun olanından daha kalın olmalıdır bu nedenle ilk olarak relatif olarak kalın bir kesit elde edilmelidir. Bu değer yaklaşık olarak 40-60 μm 'dir (47). Kalın kesit içinde odağın düzlemi yukarı ve aşağı yani 'z' eksenini boyunca hareket ettirilerek elde edilen iki veya daha fazla ince paralel kesit planları 'optik kesitler' olarak adlandırılır. Yüksek sayısal açıklıklı immersiyon yağı

merceklerin uygun sayısal açıklığı olan kondansörler ile birlikte kullanımı en ince optik kesitleri elde etme olasılığını sağlar (43).

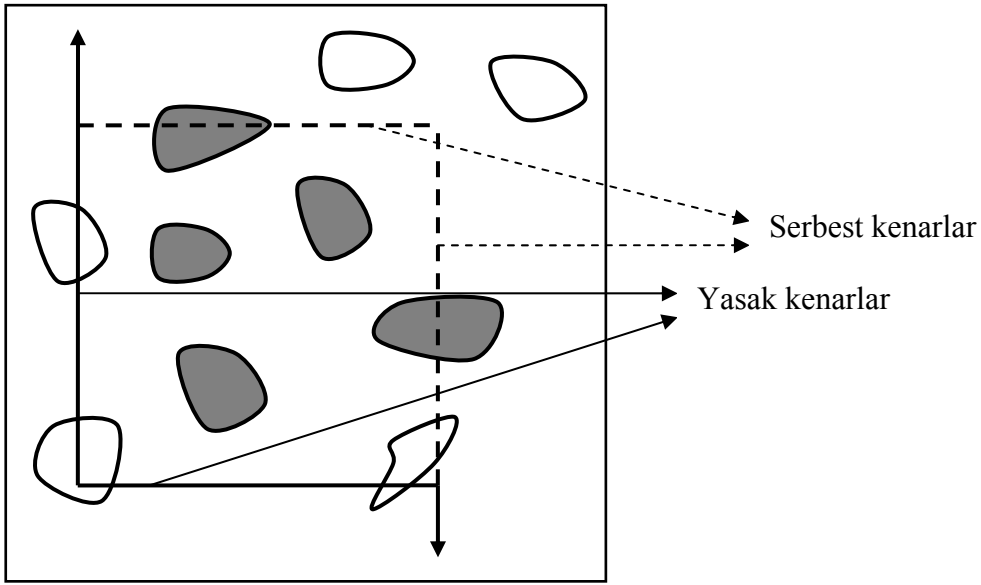
Optik olarak kesitin içinde (z ekseninde) ilerlerken hücrelerin kesitin hem altında hem de üstünde ilk görüldüğü odak düzlemleri arasındaki uzaklık 'kesit kalınlığı'nı verir (52). Işık mikroskopunda kesit içinde optik olarak 'z' eksenini boyunca ilerlerken bu eksenindeki hareketin seviyesi elektronik mikrokator yardımıyla belirlenebilir (43).

Kesitlerin alınması sırasında kesit yüzeylerinde kesilmiş veya kesilmemiş hücrelerin bulunması veya bazı hücrelerin düşmesi sonucunda boşluklar oluşması gibi nedenlerle hücre sayımı yapılırken z eksenini boyunca kesitin üst ve alt yüzlerinde daha önceden belirlenen mesafelerde hücre sayımı yapılmayan mesafeler bırakılır. Bu mesafelere 'üst ve alt güvenlik kuşakları' denilir (16,46,53). Üst ve alt güvenlik kuşaklarının bırakılmasından sonra z eksenini boyunca sayım yapılan disektör örnekleme alanına 'disektör yüksekliği' ('h') denir. Kesitin üst ve alt yüzlerinden 3-5µm kesit içine doğru gidilmek suretiyle üst ve alt güvenlik mesafeleri bırakılarak geri kalan disektör örnekleme (veya optik kesit) alanında sayım yapılabilir (53). Diğer bir yöntem de kesitin üst yüzeyinden 3-5 µm mesafe bırakarak daha önceden belirlenilen disektör yüksekliğinde (örneğin; 10 µm,15 µm,20 µm...vb) sayım yapılır ve kesitin kalınlığının alt tarafında kalan mesafe bırakılır. Bu disektör yüksekliği sayımı yapılacak hücre tipinin özelliğine göre uygun gözlem yapılabilecek şekilde seçilir. Disektör yüksekliği boyunca ilerlenirken görüntü alanına giren partiküller 'disektör partikülü' olarak sayılırlar (16,20,52,53).

Tarafsız Sayım Çerçevesi;

Stereolojik metodların uygulanması aşamasında kesit alanında yapılan örneklemelemlerden birisi de tarafsız sayım çerçevesinin kullanılmasıdır. Çünkü hücreleri ancak bu seviyede, yani büyütülmüş halde rahatlıkla tanımlanabilir. Kesit alanlarından elde edilen görüntüler hücrelerin kendileri değil onların iki boyutlu profilleridir. Görüntü alanındaki bu profillerin tarafsız olarak örneklenecek sayılması 1977 yılında Gundersen tarafından geliştirilen 'tarafsız sayım çerçevesi' ve sayım kuralının uygulanması ile sağlanabilir. Bu çerçeve ile yapılan partikül sayımlarının tarafsız olduğu kanıtlanmıştır. Tarafsız sayım çerçevesinin sol ve alt kenarları kalın

ve devamlı çizgilerle çizilmiştir ve yasak kenarlardır, sağ ve üst kenarları kesikli çizgilerle çizilmiştir ve serbest kenarlardır. Yasak ve serbest kenarların birbirleri ile kesiştikleri sol üst ve sağ alt köşelerde yasak kenarların uzantıları bulunmaktadır (Şekil 10). Tarafsız sayım çerçevesinin yasak kenarlarına ve yasak kenarların uzantılarına temas eden hücreler sayılmazken, çerçeve içindeki ve serbest kenarlara temas eden partiküller sayılırlar (15,42,49,51). Sayım çerçevesinin üzerine yerleştirildiği alandan küçük olması, profillerin yasak kenarların uzantılarına değip değmediğinin ve komşu iki profilin aynı hücreye ait olup olmadığının anlaşılmasını sağlar (53).



Şekil 10: Tarafsız sayım çerçevesinin şematize edilmiş görünümü

Devamlı çizgiler yasak kenarları, kesikli çizgiler serbest kenarları ifade etmektedir. Koyu renkle boyanmış olan partiküller sayıma dahil edilirken diğerleri dahil edilmez.

Optik Parçalama Yöntemi;

Histolojik bir örnekte sayım yaparken partiküllerin hepsini saymak genellikle pratik değildir bunun yerine partikül sayısı ilgili alanın bilinen bir parçasında partikül sayımı yapılır. Parçalama prensibi partiküllerin hepsini aynı şekilde rasgele olarak daha önceden belirlenen ve bilinen olasılıkla örnekleme esasına dayanmaktadır. Stereoloji alanı dışında uzun süredir kullanılan parçalama yöntemi stereolojide ilk olarak 1986'da Gundersen tarafından yetişkin memeli cerebellum'unun toplam nöron sayısının hesaplanmasında kullanılmıştır. Bu yöntem ile kesitlerin hazırlanması sırasında ortaya çıkabilen hacim değişikliği (büzülme, şişme gibi) sorununun önüne

geçilmiştir. Bu nedenle frozen veya parafin kesitler kullanılabilir. İlgilenilen tüm beyin yapısı daha küçük parçalara kesilerek ayrılır. Daha sonra bu parçalardan sistematik rasgele olarak seçilen parçalar örneklenir (örneğin; rasgele bir başlangıç ile her 10. parça seçilir). Seçilen her parçadan seri kesitler alınırken rasgele bir başlangıç ile kesitler seçilir (örneğin her 5. kesit disektör kesiti ile birlikte seçilir) ve disektör yöntemi ile disektör partikülleri (Q^-) hesaplanır. Seçilen kesitlerden hesaplanan disektör partikülleri toplanır ($\sum Q^-$). $\sum Q^-$ ile bu hesaplamamın yapılmasında kullanılan kesitlerin parçalanarak elde edilişi sırasındaki işlemler ters çevrilip çarpılarak toplam nöron sayısı elde edilir.

Daha sonra 1991 yılında West ve arkadaşları optik parçalama yöntemini ortaya koymuştur. Toplam partikül sayısını hesaplamada şimdiye kadar tanımlanmış olan yöntemlerin en yenisi ve kolay uygulanabilirliği nedeni ile de en etkin olarak kabul edilmektedir. Bu uygulamada optik disektör ve parçalama (fraksiyonlayarak) ile örnekleme birlikte kullanılarak ilgilenen yapıdan belirli bir parçalama ile yapılan örneklemenin sonucunda optik disektör ile sayım yapılır. Bunun için öncelikle yukarıda bahsedilen parçalama prensibinde olduğu gibi doku, kesit ve kesit alanı seviyelerinde örnekleme yapılır. Optik disektör prensibine uygun olarak kalın kesitler alınır ve son örnekleme aşaması olarak kesit kalınlığı içerisinde tekrar örnekleme yapılır. Yani kesitin kalınlığı içerisinde belirli bir parçada tarafsız sayım çerçevesi kullanılarak optik disektör ile sayım yapılır (43,47,51,53).

Optik parçalama yöntemi 'parçalama' prensibine bağlı olarak işlemlerin herhangi bir basamağında oluşabilecek olan doku büzüşmesi veya şişmesinden, 'optik disektör' prensibine bağlı olarak ta partiküllerin büyüklüğü, şekli ve yöneliminden etkilenmez. Pratikte kullanılan tüm uygulamalar için 'tarafsız' olarak toplam partikül sayısını elde etmeyi sağlar (15,46,47).

Pratikte optik parçalama yöntemi sistematik rasgele örneklemenin de kullanılması şartıyla, sayım yapılan kesitin yapıyı hangi oranda temsil ettiğinin, sayım yapılan alanın kesitteki yapının bütününe hangi oranda temsil ettiğinin ve sayım yapılan kalınlığının kesit kalınlığını hangi oranda temsil ettiğinin yani parçalama oranlarının bilinmesi ile başarıyla sonuçlandırılır (46).

GEREÇ VE YÖNTEM

DENEY HAYVANLARI

Çalışma için gerekli hayvanlar etik kurulu onayı alınarak Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlandı. Bu amaçla 4 aylık erişkin, 250-300 gr ağırlığında, 30 adet erkek, Wistar cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rasgele seçilerek Kontrol Grubu (K grubu; n=10), Sham Grubu (S grubu; n=10) ve Diyabet grubu (D grubu; n=10) olmak üzere 3 eşit gruba ayrıldı. Sıçanlar boyutları 30x35x17 cm, altı plastik üstü tel olan özel kafeslere dağıtılarak yerleştirildi.

Sıçanların tamamı çalışma süresince oda ısısında ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), $50\pm 5\%$ nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan laboratuvar koşullarında takip edildi ve aynı cins yem ile beslendi.

Tüm sıçanların başlangıç ağırlıkları ve kan glukoz düzeyleri (KGD) ölçüldü (Tablo 5). Kan glukoz değeri ölçümü kuyruk veninden ince bir iğne batırılarak elde edilen kandan yapıldı. Ölçüm için Clever Check TDCC 4222 marka glukometre ve aynı markanın 14 numaralı stripleri kullanıldı.

SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMASI

Sıçanlarda deneysel diyabetin geliştirilmesi amacı ile stz kullanıldı (Tablo 2). Literatürde sıçanlarda deneysel olarak diyabet oluşturulması amacıyla en sık kullanılan yöntem stz'nin 60mg/kg intraperitoneal (ip) enjeksiyonudur (54-56). Bu amaçla D grubundaki her bir sıçan için verilmesi gereken doz miktarı hesaplandıktan sonra soğuk zincir ile taşınan ve -4°C sıcaklıkta saklanan 250 mg'lık flakonlarda bulunan streptozotosin hassas tartı ile tartılarak doz ayarlaması yapıldı. Her bir hayvan için ayarlanan stz'nin tamamı 0,5ml fizyolojik serum ($0,9\%$ NaCl) içinde çözdürülerek tek seferde ip olarak enjekte edildi. S grubundaki sıçanlara D

grubundakiler ile eş değer miktarda (0,5ml) fizyolojik serum i.p. olarak enjekte edildi. K grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem yapılmadı (Tablo 2).

Tablo 2: Deney grupları

Gruplar	Streptozotosin	Salin
1. grup: K grubu	-	-
2. grup: S grubu	-	+
3. grup: D grubu	+	+

Stz uygulamasından sonraki 3. gün sıçanların kuyruk veni kanlarından KGD'leri ölçüldü (Tablo 5). Önceki çalışmalar göz önüne alınarak KGD'leri 300mg/dL üzerinde olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi (55,56). D grubundaki sıçanların tamamında diyabet oluştu.

Deneysel diyabet oluşturulmasından 10 gün sonra sıçanların KGD'leri kontrol amaçlı olarak tekrar ölçüldü (Tablo 5).

Sıçanların kafeslerinin temizlenme sıklığı ve günlük tükettikleri su şişesi sayısı takip edilerek poliüri, polidipsi belirtilerinin varlığı araştırıldı (Tablo 5) (57).

Diyabet oluşturulmasından 6 hafta sonra 6 günlük klasik su tankı testi protokolü uygulandı (58,59).

SU TANKI TESTİ PROTOKOLÜ

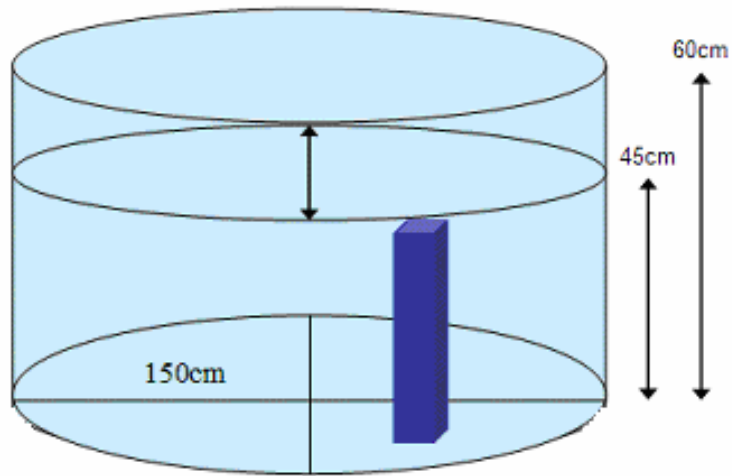
Su tankı 4m×3m boyutlarında, duvarlarında ipucu olarak posterler bulunan bir odada bulunmaktaydı. 150 cm çapında ve 60 cm yüksekliğinde olan dairesel su tankı üstte 15 cm boşluk kalacak şekilde 45 cm derinliğinde su ile dolduruldu. Su ısı tankın dibinde bulunan bir termostat sistemi, ile 22°C'de sabit tutuldu. Su tankı dış yüzü üzerinde kuzey (K), batı (B), güney (G) ve doğu (D) olmak üzere başlangıç noktaları işaretlenerek kendi içinde kuzeybatı (KB), kuzeydoğu (KD), güneybatı (GB), güneydoğu (GD) olacak şekilde dört farklı sanal kadrana ayrıldı. GD

kadranının ortasına, sabit pozisyonda pleksiglas platform (12cm×12cm) yerleştirildi (Şekil 11). Platform, görünür platform uygulamasında su yüzeyinden 1,5cm yükseklikte, gizli platform uygulamasında su seviyesinden 2cm aşağıda olacak şekilde ayarlandı.

Denemeler havuzun tam orta bölgesinin tavanına monte edilmiş bir kamera yardımı ile kaydedilerek bilgisayara aktarıldı. Bilgisayara aktarılan veriler Noldus, Ethovision 3.1 bilgisayar yazılımı ile analiz edildi.

Öğrenme değerlendirmesi için 6 günlük klasik su tankı protokolü kullanıldı. Protokol günün aynı saatinde ve aynı araştırmacı tarafından yürütüldü. Bu protokole göre; ilk gün platform 'görünür' olarak GD kadranına yerleştirildi, 2-5. günlerde platform suyun 2 cm altında 'saklı' olarak kullanıldı.

Her çalışma günü dört deneme yapıldı, denemeler arasında 10 dakika ara verildi. Deneme bloklarında sıçanlar sırasıyla K, B, D, G noktalarından yüzleri havuzun duvarına bakacak şekilde bırakıldı. Hayvanların havuza bırakılma noktaları denemeler süresince her gün sistematik olarak sıralı bir şekilde değiştirildi (Tablo 3). Her deneme sıçan platforma tırmandığında sona erdi. Sıçan 60 sn içinde platformu bulamadıysa sudan alınarak platformun üzerine bırakıldı ve platform üzerinde 15 sn bekletildi.



Şekil 11: Öğrenme testinde kullanılan su tankının özellikleri

Tablo 3: Su tankı testi protokolünün tablosu

Günler	Bırakılan kadran	Platform
1	K,B,G,D	Görünür
2	B,G,D,K	Gizli
3	G,D,K,B	Gizli
4	D,K,B,G	Gizli
5	K,B,G,D	Gizli
6		PT

K: kuzey, B: batı, G: güney, D: doğu, PT: probe trial.

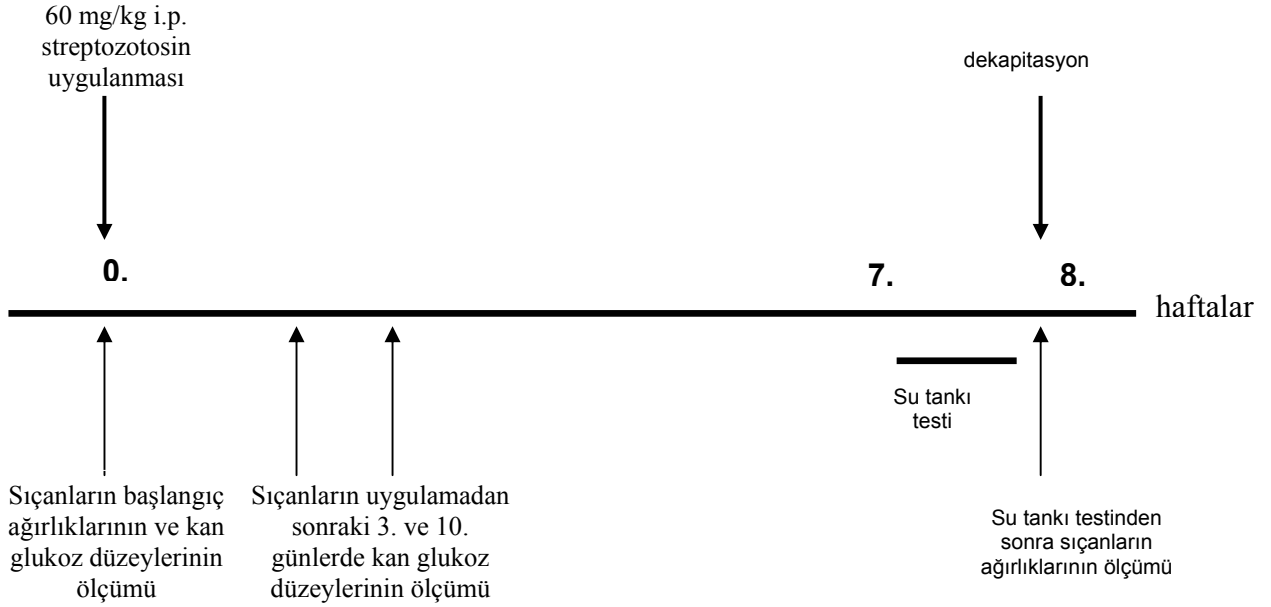
Her sıçanın, 5 gün boyunca süren denemelerdeki performansı, deneğin platforma ulaşması için geçen zaman (Escape Latency; EL), platforma ulaşmak için kullandığı yol uzunluğu (Path Length; PL) ve hızı (Velocity; V) olmak üzere üç parametre ile değerlendirildi.

6. gün platform kaldırıldı ve probe-trial (PT) uygulaması yapıldı. Sıçanların her biri K başlangıç noktasından bırakılarak 60 sn yüzdürüldüler ve daha önceden gizli platformun bulunduğu GD kadranında geçirdikleri süre (Güney Doğu Escape Latency; GDEL), GD kadranında aldıkları yol (Güney Doğu Path Length; GDPL), güney doğu kadranında kaç kez görüldükleri (Güney Doğu Frekans; GD frekans), platformun bulunduğu alanda kaç kez görüldüklerine (Platform Frekans; PLT frekans) ait verileri kaydedilerek değerlendirildi.

Denemeler süresince su tankı testine uyum sağlayamayan sıçanlar değerlendirme dışı bırakıldı. Bu nedenle K grubunda üç adet, S grubunda 2 adet ve D grubunda bir adet hayvan değerlendirmeye alınmadı (5).

BEYİN KESİTLERİNİN ALINMASI VE HAZIRLANMASI

Diyabet oluşturulmasından yedi hafta sonra (su tankı testinin bitiminden hemen sonraki gün) tüm sıçanların ağırlıkları ölçüldükten sonra Optik Parçalama Yöntemi ile K, S ve D grubundaki sıçanların hippocampus'larının stratum pyramidale alanlarındaki pyramidal hücrelerinin sayımı için her üç gruptan rasgele olarak 6'şar sıçan seçildi (K grubu n=6, S grubu n=6, D grubu n=6). Sıçanlar 30mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis, İstanbul, Türkiye) ve 6 mg/kg %2'lik xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) kombinasyonunun ip olarak uygulanmasıyla sağlanan genel anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildiler (Şekil 12).



Şekil 12: Deney planı

Dekapitasyon işleminden sonra beyin dokuları en kısa sürede (3 dakika içinde) çıkartıldı ve Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan -50°C 'ye ayarlanmış kriyostat cihazına (Leica CM 3050) ait taşıma tablalarının üzerine alınarak cihazın içine yerleştirildi. Taşıma tablasına yapışması ve dondurma işleminin hızlanması için tablanın ve beyin dokusunun üstüne jel (tissue freezing medium) döküldü.

Kriyostat cihazında dondurulan beyin dokularından daha iyi kesit alınması için amacıyla kriyostat -15°C 'ye ayarlandı. Cihaz içinde bulunan mikrotom ile 150 mikrometre (μm) kalınlığında ve optik parçalama örnekleme yöntemine uygun olacak şekilde horizontal kesitler alındı. Kesitler dökülmemeleri için önceden hazırlanan 'jelatin' ile kaplanmış lamalar üzerine alındıktan sonra Anatomi Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Hematoxylin-Eosin (H&E) boyası ile boyandı.

Jelatin'in hazırlanması ve lamaların jelatin ile kaplanması;

500 ml distile su sıcaklığı 80°C 'yi geçmeyecek şekilde ısıtıldı. Suyun içine sırayla 5 gr jelatin (Gelatin, Sigma, G2500), 2,5 gr chromium III potassium sülfate (chromium III potassium sülfate dodecahydrate, $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Sigma, C5926) ve birkaç adet kristal timol (Thymol, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$, Sigma, T0501) koyularak iyice karıştırıldı ve soğumaya bırakıldı. Daha sonra lamalar karışımın içine batırılıp çıkarıldı ve kurumaya bırakıldı.

Boyama İşleminde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması;

Kesitlerin boyanması işleminde kullanılmak üzere %96, %90, %80 ve %70'lik alkol serileri istenilen oranda alkolün distile su ile seyreltilmesiyle hazırlandı. Hematoxylin solüsyonu (Hematoxylin solution modified acc. To Haris, Isolab) hazır olarak alındı. Eosin solüsyonu 3gr toz halindeki eosin'in (Eosin, Riedel- de Haen, 32617) 575ml alkol, 225 ml distile su ve 2,4ml asetik asit (Acetic Acid Glacial %99,5, Carlo Erba Reagenti, 302011) karışımı içinde çözdürülmesiyle hazırlandı. Asit-alkol solüsyonu 7,5 ml hidroklorik asit'in (Hydrochloric acid fuming %37, Merck, 30870114) 575 ml alkol ve 225 ml distile su ile karıştırılmasıyla hazırlandı. Amonyak solüsyonu ise 70ml amonyak ile (Ammonia Solution %25, Carlo Erba Reagenti, 419993) 700 ml distile suyun karıştırılması ile hazırlandı. Hazırlanan solüsyonlar boyama kaplarına aktarıldı.

Kesitlerin Boyanması;

Taşıyıcılara yerleştirilen kesitler sırası ile %96, %90, %80 ve %70'lik alkol içeren kaplarda 5'er dakika bekletildi. Kesitler suda yıkandı ve Hematoxylin'de 2,5-3 dakika bekletildi ve tekrar suda yıkandı. Asit-alkol solüsyonuna daldırılıp çıkartılan kesitler suda yıkandıktan sonra amonyak solüsyonuna daldırılıp çıkartıldı ve tekrar

yıkandı. Eosin solusyonunda 3-5 saniye bekletildikten sonra tekrar yıkama işlemi uygulanan kesitler sırası ile %70, %80, %90 ve %96'lık alkol içeren kaplardan her birinde 5'er dakika bekletilerek geçirildi. Bu işlemleri takiben kesitler 30 dakika ksilen (Xylenes Purified For Laboratory Use, Surgipath) içinde bekletildikten sonra üzerlerine entellan (Micromount Mounting Medium, Surgipath) dökülerek lam ile kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.

Kurutma işleminden sonra ışık mikroskobu altında 4, 10, 40 ve 100'lük büyütmelemler ile incelenen kesitlerde tüm beyin dokusu görülerek sağ ve sol hemisfer ayrımı yapıldı. Rat beyin atlası kullanılarak hippocampus'un lokalizasyonu tesbit edildi ve CA1 ve CA2-CA3 alanlarının ayrımı yapılarak Optik Parçalama Yöntemiyle nöron sayımı yapıldı (60).

OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE HÜCRE SAYIMI

Parçalayıcı örnekleme stratejisine uygun kesit alma ve kesit örnekleme oranı (KeÖO)

Dekapitasyondan hemen sonra çıkartılan beyinler -50 °C'de hızlı dondurma işlemi ile fiksasyonu sağlandıktan sonra kriyostat ortam ısısı -15°C, taşıyıcı ısısı -10°C'ye; kesit kalınlığı 150 µm'ye ayarlanarak seri kesitler alındı. Sistemik rasgele örnekleme prensibine uygun olarak ilk üç kesitten birisi rasgele olarak seçildi ve lam üzerine alındı ve numaralandırıldı (48). Lamlar taşıyıcılara yerleştirilerek H&E boyası ile boyandı. Boyanan kesitlerin hippocampus alanı içerenler belirlendikten sonra bu kesitlerde sayım yapıldı (60). Sonuç olarak bu örnekleme stratejisine göre kesit örnekleme oranı (KeÖO) $\frac{1}{3}$ oldu (15,52,53).

Alan örnekleme oranı (AÖO)

Optik parçalama yöntemine göre nöron sayımı yapılırken sistematik rasgele örnekleme ve parçalama prensipleri kesit düzeyinde de uygulandı ve hippocampus

kesitinin optik görüntüleri örneklendi. Örnekleme rasgele olarak başlandı ve hippocampus kesitinin tamamı boyunca önceden belirlenen aralıklarla diğer örnekler seçildi (15,16,45).

Hippocampus kesiti üzerindeki alan mikroskopta x ve y eksenleri boyunca, daha önceden belirlenen x, y adımlama aralığına göre adımlanarak tarandı ve alanlar seçildi. İlk sayım yapılacak alan, ilgilenilen yapının başlangıcında ve daha önceden belirlenen x, y adımlama alanı içinde rasgele olarak bir alanın seçilmesi ile belirlendi. Partikül sayımı ise her adımlama alanının daha önceden belirlenen bir bölümünde, yani tarafsız sayım çerçevesi içerisinde yapıldı. Sayım yapılan tarafsız sayım çerçevesinin alanının, x, y adımlama alanına oranlaması ile AÖO belirlendi (15).

Çalışmamızda monitör üzerinde x, y adımlama aralığını belirlemek için Adıgüzel ve arkadaşlarının Thoma lamı kalibrasyon yöntemi uygulandı (61). Bunun için mikroskop (Olympus CX31), mikroskoba monte edilmiş video kamera (Exwave HAD Color Video Camera SSc-DC88P) ile monitör (Sony LCD monitör LMD-2010) kullanıldı. Thoma lamının bir küçük karesinin kenar uzunluğu 0.05 mm'dir. Thoma lamı mikroskoba konularak 100X objektif (immersiyon yağlı, sayısal açıklık 1.25) ile bir küçük karenin görüntüsü mikroskoba monte edilmiş video kamera ile monitöre aktarıldı. Daha sonra monitör üzerine bir asetat konularak karenin kenarları cetvel ile asetat üzerine çizildi. Böylece asetat üzerinde kenar uzunluğu 50 µm (0.05 mm) olan bir kare elde edildi. Bu karenin ortasına gerekli kalibrasyonu yapılarak kenarları 20 µm olan tarafsız sayım çerçevesi çizildi. Tarafsız sayım çerçevesi, birbirine dik sol ve alt kenarları yasak kenarlar, diğer iki kenarı ise serbest kenarlar olacak şekilde çizildi. Yasak ve serbest kenarların birbirleri ile kesiştikleri sol üst ve sağ alt köşelere yasak kenarların uzantıları çizildi (42). Yasak kenarlar ve uzantıları düz çizgiler ile serbest kenarlar ise kesikli çizgiler ile belirlendi ve asetat kağıdı monitör ekranına yapıştırıldı. Çalışmamızda kullanılan tarafsız sayım çerçevesi ve ölçüleri Şekil 13'de gösterilmiştir.

Parçalama ile örnekleme prensibine göre sistematik olarak rasgele seçilmiş kesitler boyama işlemlerinden sonra mikroskoba yerleştirilerek x4 büyütmede sağ

hippocampus alanı bulundu. Hippocampus'un CA1, CA2 ve CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakaları sıçan beyin atlası kullanılarak tanımlandı (60). Hippocampus CA1 alanı ile subiculum'un ayrımı yapıldı. Monitör görüntüsünde, CA1 alanının stratum pyramidale tabakasının subiculum'a komşu olan ucunda, daha önceden belirlediğimiz x,y adımlama alanı içinde, rasgele bir alan tarafsız sayım çerçevesinin içine yerleştirildi. Bu alanda x100 büyütmede nöron sayımı yapıldıktan sonra tarafsız sayım çerçevesinin ortasında bulunduğu kenar uzunluğu 50 µm olan büyük kare ile mikroskoptaki kesit görüntüsünde x ekseninde 500 µm ve y ekseninde 50 µm adımlama aralıklarıyla tüm hippocampus alanı tarandı. Her adımlama sonucu monitör görüntüsüne gelen sağ hippocampus CA1 ve CA2-CA3 alanlarında nöron sayımı yapıldı. Hippocampus'ta CA1 ve CA2-CA3 stratum pyramidale tabakalarının ve CA3 ile gyrus dentatus'un hilus'unun ayrımı için sıçan beyin atlası görüntülerinden faydalanıldı (60). Böylece x,y adımlama alanı [alan(x.y adımlama)] = 500 µm x 50 µm = 25 000 µm² olarak hesaplandı. Tarafsız sayım çerçevesi, kenar uzunluğu 20 µm olan bir kare olduğu için alanı [alan(tarafsız sayım çerçevesi)] = 20 µm x 20 µm = 400 µm² olarak hesaplandı.

Bu iki değerden sonra;

$$\begin{aligned} A\ddot{O} &= [\text{alan(tarafsız sayım çerçevesi)}] / [\text{alan(x.y adımlama)}] \\ &= 400 \mu\text{m}^2 / 25\,000 \mu\text{m}^2 = 4/250 \text{ olarak bulundu (15,52)}. \end{aligned}$$

Kesit kalınlığı ölçümü

Daha önceden belirlediğimiz x, y adımlama aralığı ile örnekleme alanına geldikten sonra tarafsız sayım çerçevesi içinde optik disektör sayım kurallarına göre nöron sayımı yapıldı. Mikroskop ile kesit içinde z ekseninde elde edilen optik kesitler boyunca ilerlerken hem kesitin altında hem de üstünde ilk netleşen görüntülerin görüldüğü optik kesitler arası mesafe hesaplanarak 'kesit kalınlığı' elde edildi (52,53). Bunun için mikroskop mikrovidası kalibre edilerek mikroskobun mikrovidasındaki göstergede yer alan rakamlarının gerçekte kesit kalınlığının ne kadarına karşılık geldiği belirlendi (51). Bir lamelin üst ve alt yüzlerine asetat kalemleri ile iki farklı renkte çizgi çizildi. Lamel mikroskoba yerleştirildi ve

mikroskobun mikrovidası döndürülerek lamelin üst yüzüne çizilen ilk çizgi netleştirildi. Bu durumdaki mikrovida değeri kaydedildi. Mikrovida döndürülmeye devam edilirken lamelin altındaki, farklı renkte olan diğer çizginin görüntüsü netleştğinde yine mikrovida değeri kaydedildi. İki değer arasındaki fark hesaplandı. Daha sonra lamel, parafin damlası kullanılarak 90°C'lik açıyla dik olarak mikroskobun tablasına yerleştirildi ve x10 büyütmede dik konumdaki lamelin görüntüsü monitöre aktarıldı. Thoma lamı ile önceden kalibrasyonu sağlanan monitör görüntüsünde lamelin gerçek kalınlığı ölçüldü. Bu ölçüm ile, iki mikrovida değeri arasındaki fark değerlendirildi ve bu şekilde mikrovidadaki 1 birimlik hareketin z ekseninde katettiği mesafe μm olarak hesaplandı. Çalışmamızda kullanılan mikroskobun mikrovidasının bir birimlik hareketinin z ekseninde 1.5 μm 'lik mesafeye karşılık geldiği belirlendi.

Kesit kalınlığının örneklenmesi ve kalınlık örnekleme oranının (KaÖO) hesaplanması

Bu çalışmada mikroskobun mikrovidasının kalibre edilmesiyle kesit kalınlığı ölçüldükten sonra kesit üst yüzeyinden üst güvenlik kuşağı olarak 5 μm mesafe bırakıldı ve mikroskobun mikrovidası döndürülmeye devam edilerek 30 μm 'lik optik disektör yüksekliği (h) boyunca kesit içinde optik olarak ilerlenirken tarafsız sayım çerçevesi içindeki nükleuslar sayım kurallarına göre sayıldı. Bundan sonra kesit kalınlığının altında kalan diğer mesafe alt güvenlik kuşağı olarak bırakıldı (15,20,49,52). Her hayvan için örneklenen bütün kesitlerin sayım yapılan her alanında kesit kalınlıkları ölçüldü. Sırayla her bir kesit kesit ve her bir sıçan için kesit kalınlığı ortalama olarak hesaplandı.

Kalınlık Örnekleme Oranı (KaÖO) = optik disektör yüksekliği (h) / kesit kalınlığı (t) formülü ile hesaplandı.

Nöron Sayımı

Çalışmamızda hippocampus CA1 ve CA2-CA3 stratum pyramidale tabakalarında bulunan nöronların nükleusları sayılmıştır. Hesaplamalarda nükleus sayıları nöron sayısına eşit olarak kabul edildi.

Mikroskoba yerleştirilen kesitlerde hippocampus alanı x4 büyütmede belirlendikten sonra CA1 ve CA2-CA3 alanları tanımlandı. CA1 bölgesinin başlangıcında daha önceden belirlediğimiz x,y adımlama alanı içinde, rasgele bir alanın monitör görüntüsü tarafsız sayım çerçevesinin içine yerleştirildi ve görüntü x100 büyütmeyle getirildi. Kesit kalınlığı ölçüldükten ve üst güvenlik kuşağı bırakıldıktan sonra optik disektör yüksekliği boyunca ilerlenirken tarafsız sayım çerçevesi içinde görüntülenen nükleuslar tarafsız sayım çerçevesi sayım kurallarına göre sayıldı. Belirlenen optik disektör yüksekliğinin altında kalan mesafe alt güvenlik kuşağı olarak bırakıldı. Alt ve üst güvenlik kuşakları içinde herhangi bir nükleus görüntüye girse bile sayıma dahil edilmedi.

Hippocampus alanı daha önce belirlediğimiz x,y adımlama aralıkları ile taranarak her bir alanda yukarıdaki şekilde nükleus sayımı yapıldı. Her kesitteki hippocampus alanının taranması sırasında CA1 ve CA2-CA3 alanlarında sayılan nöronların sayıları (Q^- ; disektör partikül sayısı) ayrı ayrı kaydedildi. Kesitlerdeki nöron sayılarının toplanması ile her bir sıçanın CA1 ve CA2-CA3 alanlarında sayılan nöron sayısı (ΣQ^- ; toplam disektör partikül sayısı) hesaplandı.

Toplam nöron sayısının hesaplanması

Tüm bu işlemlerden sonra elde edilen veriler aşağıdaki formüle uygun olarak yerleştirildi. Her sıçan için hippocampus CA1 ve CA2-CA3 stratum pyramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları (N(toplam)) hesaplandı.

$$N(\text{toplam}) = (\Sigma Q^-) \times (1/Ke\ddot{O}) \times (1/A\ddot{O}) \times (1/Ka\ddot{O}) (15,20,52).$$

Hata katsayısının hesaplanması

Örnekleme planının yeterliliği her sıçana ait hata katsayısı hesaplanarak kontrol edilmektedir. Hata katsayısı hesaplanmasında her sıçanın her bir kesitinde sayılan disektör partikül sayıları (Q_i^-) kullanıldı. Hata katsayısının %10'un altında çıkması çalışmanın örnekleme planının yeterli ve çalışmanın güvenilir olduğunun bir göstergesidir (15,16,52). Tablo 4'de örnek olarak D grubundaki 1 numaralı sıçana ait disektör partikül sayıları ve hata katsayısının hesaplanmasında kullanılan formül gösterilmiştir.

Tablo 4: D grubu-1 numaralı sıçanın sağ hippocampus CA2-CA3 stratum pyramidale alanındaki toplam nöron sayısının bulunması sırasında gözlenen Hata Katsayısı (HK) hesaplanması

Kesit, i	Q_i^-	$Q_i^- \times Q_i$	$Q_i^- \times (Q_i^-+1)$	$Q_i^- \times (Q_i^-+2)$
1	58	3364	2146	2320
2	37	1369	1480	1443
3	40	1600	1560	1520
4	39	1521	1482	1248
5	38	1444	1216	950
6	32	1024	800	992
7	25	625	775	800
8	31	961	992	775
9	32	1024	800	-
10	25	625	-	-
Toplam	$\sum Q_i^- = 357$	$A = 13557$	$B = 11251$	$C = 10048$

Q_i^- ; Bir sıçana ait her bir kesite ait disektör partikül sayısı, Q_i^-+1 ; Serideki bir sonraki kesitte sayılan disektör partikül sayısı, Q_i^-+2 ; Serideki iki sonraki kesitte sayılan disektör partikül sayısı, $\sum Q_i^-$; Analizde kullanılan kesitlerdeki toplam disektör partikül sayısı

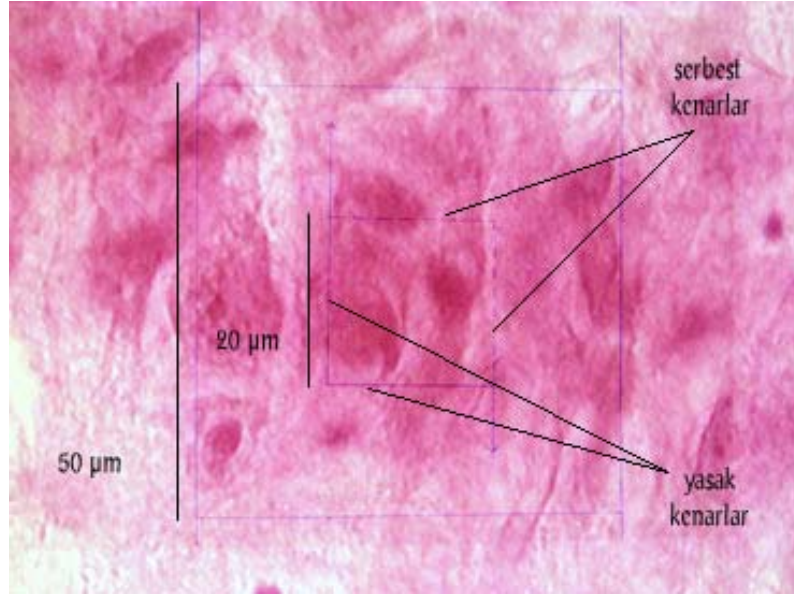
HK= %10'unun altında bir değerde ise çalışma güvenilirdir ve çalışmanın örnekleme planı yeterlidir.

$$HK = \sqrt{[(3A+C-4B) / 12] / \sum Q_i^-} \quad (15).$$

Bu formüle göre D grubundaki 1 numaralı sıçanın hata katsayısı değeri 0.0176 bulunmuştur.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Sıçanların ağırlıklarının karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi. Su tankı testinin 1-5. günler yapılan uygulamasındaki EL, PL ve V verilerinde gruplar arası farklılığının değerlendirilmesinde One-Way ANOVA testi; farkı yaratan grubun belirlenmesinde Post Hoc Bonferroni testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi. Probe trial uygulamasının verilerinde gruplar arası farklılığının değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sağ hippocampus CA1 ve CA2-CA3 alanlarındaki toplam nöron sayılarında gruplar arası farklılığının değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi; farkı yaratan grubun belirlenmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.



Şekil 13: Çalışmada kullanılan tarafsız sayım çerçevesi ve ölçüleri

BULGULAR

SIÇANLARDA DİYABET BULGULARI

Tüm sıçanların başlangıç ağırlıkları ve deneyin başlangıcından 7 hafta sonraki ağırlıkları (dekapitasyondan önceki ağırlıkları) Tablo 5’de gösterilmiştir.

Sıçanların başlangıç ağırlıkları K grubunun $266\pm 9,9$ gr, S grubunun $267,6\pm 9,6$ gr, D grubunun ise $266,5\pm 8,8$ gr idi (Tablo 5). K, S ve D grubundaki sıçanların başlangıç ağırlıkları arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$, Kruskal-Wallis) (Şekil 14).

Deneyin başlangıcından 7 hafta sonra sıçanların ağırlıkları K grubunun $287,6\pm 11,2$ gr, S grubunun $289,2\pm 8,3$ gr, D grubunun $204,5\pm 5,8$ gr idi (Tablo 5). D grubundaki sıçanların vücut ağırlıkları K ve S grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$, Mann-Whitney U). K ve S gruplarının vücut ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$, Mann-Whitney U) (Şekil14).

D grubundaki sıçanların 7 haftalık deney süresi sonunda vücut ağırlıklarını arttıramadıkları ayrıca başlangıç ağırlıklarına göre vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p<0,05$, Mann-Whitney U) (Şekil 14)..

D grubundaki sıçanların deneyin başlangıcında ilk KGD’leri K grubunda $118\pm 5,3$ mg/dl, S grubunda $119\pm 4,9$ mg/dl ve D grubunda $116\pm 3,8$ mg/dl olarak ölçüldü. Stz ile diyabet oluşturulmasından sonraki 3. gün ölçülen KGD’leri K grubunda $115,3\pm 6,2$ mg/dl, S grubunda $117\pm 4,9$ mg/dl iken D grubunda ise $443\pm 9,6$ mg/dl ölçüldü (Tablo 5). Diyabet oluşturulmasından sonraki 10. gün yapılan kontrol ölçümlerinde KGD’leri K grubunda $118,5\pm 6$ mg/dl, S grubunda $117,9\pm 3,4$, D grubunda ise $457,7\pm 7,1$ mg/dl olarak ölçüldü (Tablo 5). Deneyin başlangıcında K, S ve D grubundaki sıçanların KGD’ leri arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$, Kruskal-Wallis) (Şekil 15). D grubundaki sıçanların diyabet oluşturulmasından sonraki 3. ve 10. gün KGD’leri K ve S gruplarından anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$, Mann-

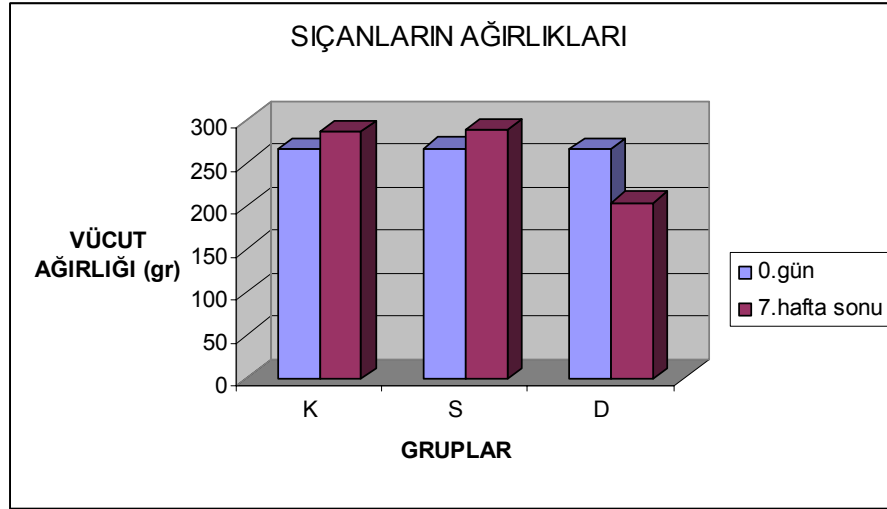
Whitney U) (Şekil 15) D grubundaki sıçanların tamamının diyabet oluşturulmasından sonraki 3. ve 10. gün KGD'leri 300 mg/dl'nin üzerindeydi (Şekil 15).

Sıçanlarının kafeslerinin temizlenme sıklığı ve günlük tükettikleri su şişesi sayısının takibi sonucunda D grubundaki tüm sıçanlarda poliüri ve polidipsi belirtileri gözlemlendi (Tablo 5).

Tablo 5: Sıçanların ağırlıkları, kan glukoz düzeyleri ve diyabet semptomları

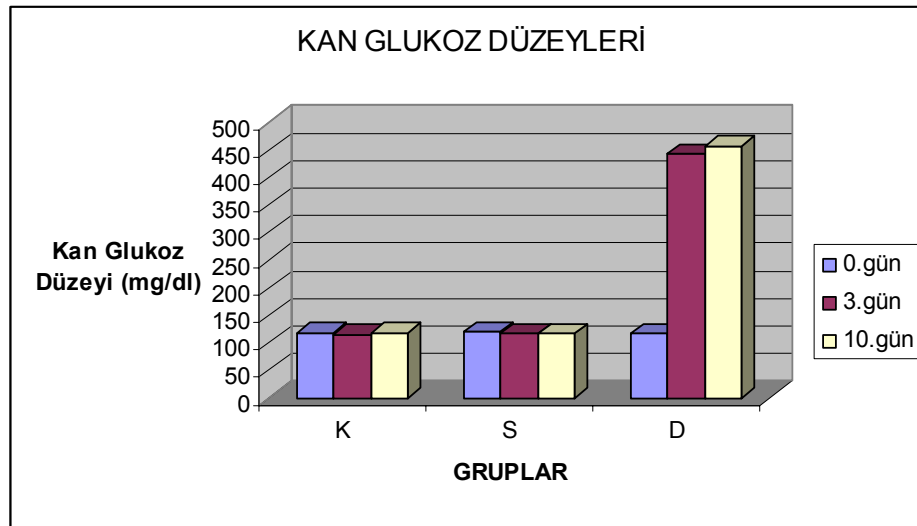
(ORT; ortalama, SD; standart sapma, gr; gram, KGD; kan glukoz düzeyi)

Sıçan no:	Gruplar	Ağırlıkları (gr)		Kan Glukoz Düzeyleri (mg/dl)			Poliüri, polidipsi
		0. gün	7. hafta sonu	0. gün	3. gün	10. gün	
1	K	260	280	118	120	119	-,-
	S	272	290	110	109	118	-,-
	D	253	210	120	442	451	+,+
2	K	255	273	124	120	124	-,-
	S	275	293	128	120	120	-,-
	D	280	205	116	452	462	+,+
3	K	260	280	109	110	114	-,-
	S	265	285	122	120	115	-,-
	D	270	200	120	460	465	+,+
4	K	270	287	118	106	120	-,-
	S	275	296	119	120	112	-,-
	D	272	195	109	448	465	+,+
5	K	285	304	125	124	108	-,-
	S	268	290	123	121	120	-,-
	D	265	204	115	436	452	+,+
6	K	270	295	110	109	114	-,-
	S	256	280	119	109	120	-,-
	D	270	210	122	450	468	+,+
7	K	258	280	120	110	114	-,-
	S	260	283	124	112	118	-,-
	D	265	215	114	446	460	+,+
8	K	270	294	120	114	124	-,-
	S	275	295	115	120	118	-,-
	D	270	204	117	432	452	+,+
9	K	260	278	116	122	128	-,-
	S	280	304	120	121	124	-,-
	D	260	202	120	436	454	+,+
10	K	280	305	122	118	120	-,-
	S	250	276	118	118	114	-,-
	D	260	200	116	430	448	+,+
ORT (±SD)	K	266±9,9	287,6±11,2	118±5,3	115,3±6,2	118,5±6	
	S	267,6±9,6	289,2±8,3	119±4,9	117±4,9	117,9±3,4	
	D	266,5±8,8	204,5±5,8	116±3,8	443±9,6	457,7±7,1	



Şekil 14: K, S ve D gruplarının başlangıç ağırlıklarının (0.gün) ve 7. hafta sonundaki ağırlıklarının ortalamalarının grafiği

K, S ve D grubundaki siçanların başlangıç ağırlıkları arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$, Kruskal Wallis). 7. hafta sonu D grubundaki siçanların vücut ağırlıkları K ve S grubundaki siçanlara göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,05$, Mann-Whitney U); K ve S gruplarını vücut ağırlıkları arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$, Mann-Whitney U). 7 hafta sonu D grubundaki siçanların vücut ağırlıklarının başlangıç ağırlıklarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p < 0,05$, Mann-Whitney U)



Şekil 15: K, S ve D gruplarının 0. gün, diyabet oluşturulmasından sonraki 3. gün ve 10. gün ölçülen kan glukoz düzeylerinin ortalamalarının grafiği

K, S ve D grubundaki siçanların 0.gün ölçülen KGD'leri arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis). D grubundaki siçanların diyabet oluşturulmasından sonraki 3. ve 10. gün KGD'leri K ve S gruplarından anlamlı olarak yüksekti ($p < 0,05$, Mann-Whitney U). D grubundaki siçanların diyabet oluşturulmasından sonraki 3. ve 10. gün KGD'leri 300 mg/dl'nin üzerindediydi.

SU TANKI TESTİ BULGULARI

Su tankı testinin her gün dört deneme olmak üzere ardı ardına beş gün yapılan bloklarında sıçanların platformu bulma zamanı (Escape Latency, EL) ortalamaları 1. gün K grubunun $35,1 \pm 2,8$ saniye (sn), S grubunun $34,6 \pm 4$ sn, D grubunun $43,7 \pm 3,7$ sn idi. EL ortalamaları 2. gün K grubunun $15,1 \pm 2,2$ sn, S grubunun $14,1 \pm 2,3$ sn, D grubunun $20,6 \pm 3$ sn; 3. gün K grubunun $9,6 \pm 2,1$ sn, S grubunun $9,1 \pm 1,2$ sn, D grubunun $13,4 \pm 2$ sn; 4. gün K grubunun $9,1 \pm 1,3$ sn, S grubunun $10,9 \pm 2$ sn, D grubunun $13,5 \pm 2,1$ sn; 5. gün K grubunun $8,2 \pm 0,9$ sn, S grubunun $7,5 \pm 0,8$ sn, D grubunun $11,6 \pm 1,9$ sn olarak bulundu. (Tablo 6). Çizdirilen EL grafiğinde, 1-5. günlerde yapılan denemelerde, K, S ve D grubundaki sıçanların platforma ulaşmaları için geçen sürelerin (EL) ortalamaları görülmektedir (Şekil 16).

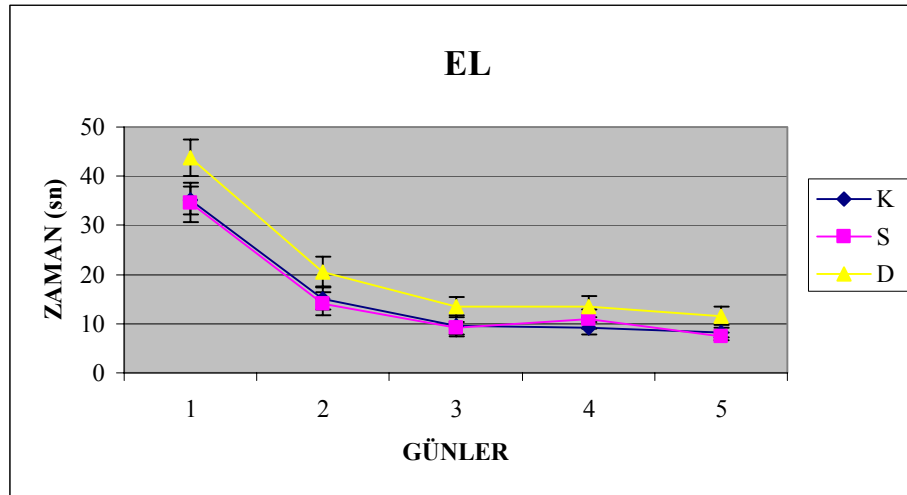
Yapılan istatistiksel analizde EL değerlerinde K, S ve D grupları arasında anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$; One-Way ANOVA). Bu farkın D grubundan kaynaklandığı, D grubunun EL değerlerinin, K ve S gruplarına göre anlamlı olarak arttığı bulundu ($p < 0,05$; One-Way ANOVA, Post Hoc Bonferroni). K ve S gruplarının EL değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$; One-Way ANOVA, Post Hoc Bonferroni). Gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesindeki p değerleri Tablo 9'da, grupların ikili karşılaştırmalarındaki p değerleri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 6: K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki EL değerleri

	K_m (sn)	S_m (sn)	D_m (sn)
GÜNLER			
1	$35,1 \pm 2,8$	$34,6 \pm 4$	$43,7 \pm 3,7$
2	$15,1 \pm 2,2$	$14,1 \pm 2,3$	$20,6 \pm 3,1$
3	$9,6 \pm 2,1$	$9,1 \pm 1,2$	$13,4 \pm 2$
4	$9,1 \pm 1,3$	$10,9 \pm 2$	$13,5 \pm 2,1$
5	$8,2 \pm 0,9$	$7,5 \pm 0,8$	$11,6 \pm 1,9$

(K_m ; K grubunun EL ortalamaları, S_m ; S grubunun EL ortalamaları, D_m ; D grubunun EL ortalamaları.

Veriler, ortalama \pm Standart Hata olarak verilmiştir.)



Şekil 16: K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki EL değerlerinin grafiği.

Su tankı testinin 1-5. günlerindeki denemelerinde K, S ve D grubundaki sıçanların ortalama EL değerleri hesaplanarak EL grafiği çizdirildi. Çizdirilen EL grafiğinde K, S ve D grubundaki sıçanların platformu bulmayı öğrendiği görüldü. Yapılan istatistiksel analizde D grubunda EL, K ve S gruplarına göre anlamlı olarak uzamış bulundu ($p < 0,05$; One-Way ANOVA, Post Hoc Bonferroni).

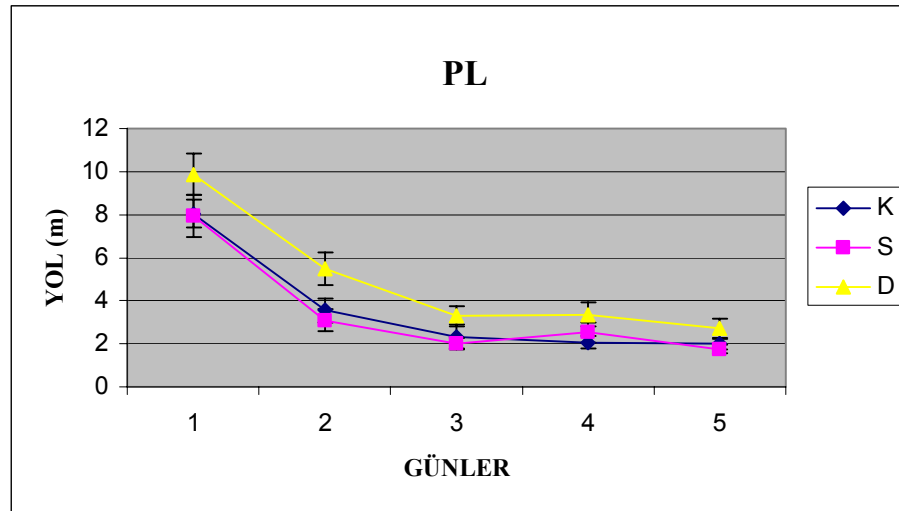
Su tankı testinin 1-5. günler deneme bloklarında sıçanların platforma ulaşana kadar aldığı yol (path length, PL) ortalamaları 1. gün K grubunda $8,05 \pm 0,64$ metre (m), S grubunda $7,96 \pm 0,98$ m, D grubunda $9,87 \pm 0,96$ m idi. 2. gün PL ortalamaları K grubunun $3,55 \pm 0,55$ m, S grubunun $3,1 \pm 0,53$ m, D grubunun $5,49 \pm 0,76$ m, 3. gün K grubunun $2,33 \pm 0,56$ m, S grubunun $2,01 \pm 0,26$ m, D grubunun $3,28 \pm 0,48$ m, 4. gün K grubunun $2,07 \pm 0,29$ m, S grubunun $2,53 \pm 0,46$ m, D grubunun $3,36 \pm 0,56$ m, 5. gün K grubunun $2,01 \pm 0,27$ m, S grubunun $1,75 \pm 0,2$ m, D grubunun $2,71 \pm 0,46$ m olarak bulundu (Tablo 7). Çizdirilen PL grafiğinde 1-5. günlerde yapılan denemelerde tüm grupların platforma ulaşmak için kullandıkları yolun uzunluklarının (PL) ortalamaları görülmektedir (Şekil 17).

Yapılan istatistiksel analizde PL değerlerinde K, S ve D grupları arasında anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$; One-Way ANOVA). Bu farkın D grubundan kaynaklandığı, D grubunun PL değerlerinin, K ve S gruplarına göre anlamlı olarak uzadığı bulundu ($p < 0,05$; One-Way ANOVA, Post Hoc Bonferroni) (Tablo 10). K ve S gruplarının PL değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$; One-Way ANOVA, Post Hoc Bonferroni). Gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesindeki p değerleri Tablo 9'da, grupların ikili karşılaştırmalarındaki p değerleri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 7: K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki PL değerleri

	K_m (m)	S_m (m)	D_m (m)
GÜNLER			
1	$8,05 \pm 0,64$	$7,96 \pm 0,98$	$9,87 \pm 0,96$
2	$3,55 \pm 0,55$	$3,1 \pm 0,53$	$5,49 \pm 0,76$
3	$2,33 \pm 0,56$	$2,01 \pm 0,26$	$3,28 \pm 0,48$
4	$2,07 \pm 0,29$	$2,53 \pm 0,46$	$3,36 \pm 0,56$
5	$2,01 \pm 0,27$	$1,75 \pm 0,2$	$2,71 \pm 0,46$

(K_m ; K grubunun PL ortalamaları, S_m ; S grubunun PL ortalamaları, D_m ; D grubunun PL ortalamaları. Veriler, ortalama \pm Standart Hata olarak verilmiştir.)



Şekil 17: K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki PL değerlerinin grafiği

Su tankı testinin 1-5. günlerindeki denemelerinde K, S ve D grubundaki sıçanların ortalama PL değerleri hesaplanarak PL grafiği çizdirildi. Çizdirilen EL grafiğinde K, S ve D grubundaki sıçanların platformu bulmayı öğrendiği görüldü. Yapılan istatistiksel analizde D grubunda PL, K ve S gruplarına göre anlamlı olarak artmış bulundu ($p < 0,05$; One-Way ANOVA, Post Hoc Bonferroni).

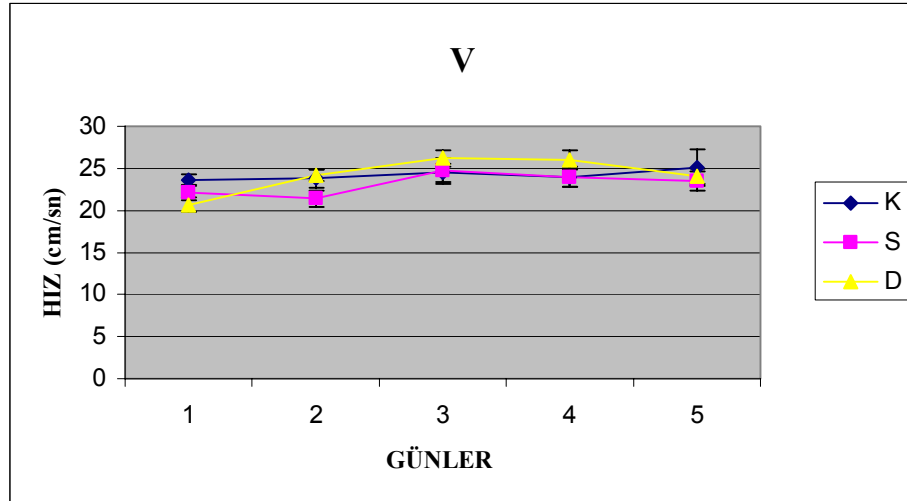
Su tankı testinin 1-5. günlerindeki deneme bloklarında K, S ve D gruplarındaki sıçanların V değerlerinin ortalaması K grubunun 1. gün $23,6\pm 0,7$ santimetre/saniye (cm/sn), S grubunun $22,1\pm 0,9$ cm/sn, D grubunun $20,7\pm 0,9$ cm/sn idi. Sıçanların V ortalamaları 2. gün K grubunun $23,8\pm 1,1$ cm/sn, S grubunun $21,4\pm 1$ cm/sn, D grubunun $24,2\pm 0,7$ cm/sn, 3. gün K grubunun $24,5\pm 1,1$ cm/sn, S grubunun $24,7\pm 1,5$ cm/sn, D grubunun $26,2\pm 1$ cm/sn, 4. gün K grubunun $24\pm 1,2$ cm/sn, S grubunun $23,9\pm 1,1$ cm/sn, D grubunun $26\pm 1,1$ cm/sn, 5. gün K grubunun $25,1\pm 2,2$ cm/sn, S grubunun $23,5\pm 1,1$ cm/sn, D grubunun $24,1\pm 0,9$ cm/sn olarak bulundu (Tablo 8). Çizdirilen V grafiğinde 1-5. günlerde yapılan denemelerde tüm grupların hızlarının (V) ortalamaları görülmektedir (Şekil 18).

Yapılan istatistiksel analizde V değerlerinde K, S ve D grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$; One-Way ANOVA). Gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesindeki p değerleri Tablo 9'da verilmiştir. Bu bize K, S ve D gruplarındaki sıçanlarda motor fonksiyon bozukluğu olmadığını göstermektedir. Motor fonksiyon bozukluğu olmaması EL ve PL değerlerinin sıçanların hızlarından bağımsız olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır.

Tablo 8: K,S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerdeki V değerleri

	K_m (cm/sn)	S_m (cm/sn)	D_m (cm/sn)
GÜNLER			
1	$23,6 \pm 0,7$	$22,1 \pm 0,9$	$20,7 \pm 0,9$
2	$23,8 \pm 1,1$	$21,4 \pm 1$	$24,2 \pm 0,7$
3	$24,5 \pm 1,1$	$24,7 \pm 1,5$	$26,2 \pm 1$
4	$24 \pm 1,2$	$23,9 \pm 1,1$	$26 \pm 1,1$
5	$25,1 \pm 2,2$	$23,5 \pm 1,1$	$24,1 \pm 0,9$

(K_m : K grubunun V ortalamaları, S_m : S grubunun V ortalamaları, D_m : D grubunun V ortalamaları. Veriler, ortalama \pm Standart Hata olarak verilmiştir.)



Şekil 18: K, S ve D gruplarının su tankı testinin 1-5. günlerindeki V değerlerinin grafiği

Su tankı testinin 1-5. günlerindeki denemelerde K, S ve D grubundaki sıçanların ortalama V değerleri hesaplanarak V grafiği çizdirildi. Yapılan istatistiksel analizde V değerlerinde K, S ve D grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$; One-Way ANOVA).

Tablo 9: K, S ve D gruplarının EL, PL ve V verilerinin gruplar arasındaki farklılığının değerlendirilmesindeki p değerleri

	p değerleri
EL	0,007*
PL	0,002*
V	0,248

Gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde One-Way ANOVA testi kullanılmıştır.

*Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Tablo 10: K, S ve D gruplarının EL ve PL verilerinin ikili karşılaştırmalardaki p değerleri

	p değerleri
D - K	0,031*
D - S	0,016*
EL K - S	1
D - K	0,014*
D - S	0,004*
PL K - S	1

İkili karşılaştırmada Post Hoc Bonferroni testi kullanılmıştır.* Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

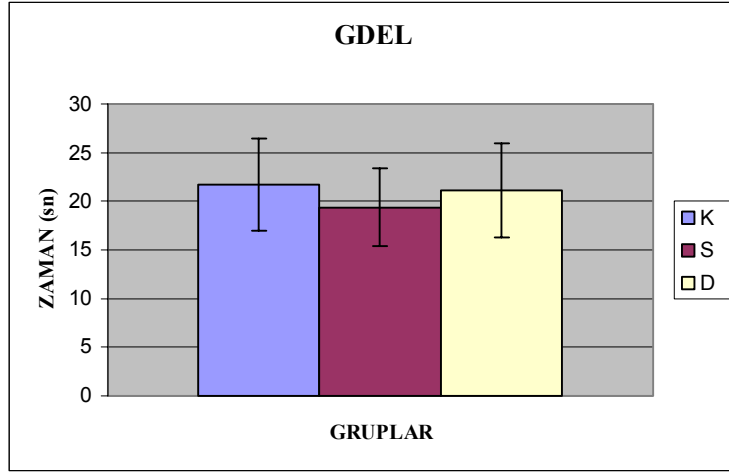
6. gün yapılan probe trial uygulamasında K, S ve D grubundaki sıçanların GDEL, GDPL, GD frekans ve PLT frekans verilerine bakıldı. K grubunda GDEL $21,7 \pm 4,75$ sn, GDPL $4,35 \pm 0,66$ m, GD frekans $6,57 \pm 0,53$ defa ve PLT frekans $1,57 \pm 0,53$ defa olarak bulundu. S grubunda GDEL $19,38 \pm 3,96$ sn, GDPL $3,98 \pm 0,97$ m, GD frekans $6,62 \pm 1,19$ defa ve PLT frekans $1,38 \pm 0,74$ defa olarak bulundu. D grubunda GDEL $21,11 \pm 4,81$ sn, GDPL $4,29 \pm 0,92$ m, GD frekans $7 \pm 1,32$ defa ve PLT frekans $1,33 \pm 0,87$ defa olarak bulundu (Tablo 11, Şekil 19-22).

Yapılan istatistiksel analizde PT uygulamasında K, S ve D gruplarının GDEL, GDPL, GD frekans ve PLT frekans verilerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis). Probe trial uygulamasında GDEL, GDPL, GD frekans ve PLT frekans verilerinin K,S ve D grupları arasındaki farklılığının değerlendirilmesindeki p değerleri Tablo 12’de verilmiştir.

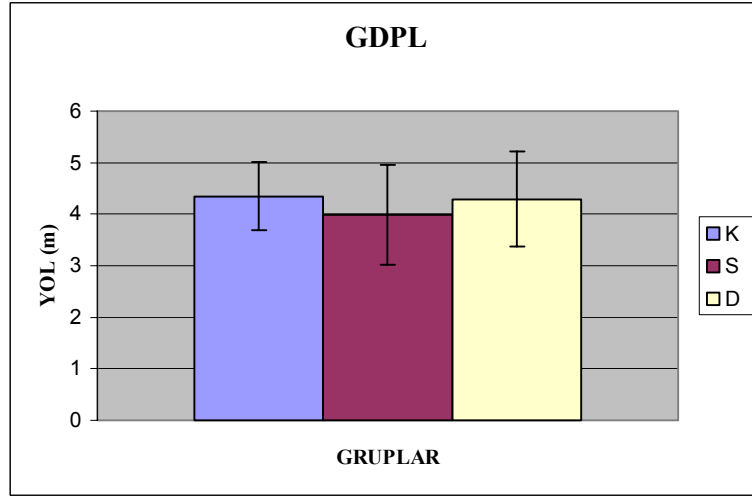
Tablo 11: Su tankı testinin PT uygulamasının verileri

	K _m	S _m	D _m
GDEL (sn)	$21,7 \pm 4,75$	$19,38 \pm 3,96$	$21,11 \pm 4,81$
GDPL (m)	$4,35 \pm 0,66$	$3,98 \pm 0,97$	$4,29 \pm 0,92$
GD frekans	$6,57 \pm 0,53$	$6,62 \pm 1,19$	$7 \pm 1,32$
PLT frekans	$1,57 \pm 0,53$	$1,38 \pm 0,74$	$1,33 \pm 0,87$

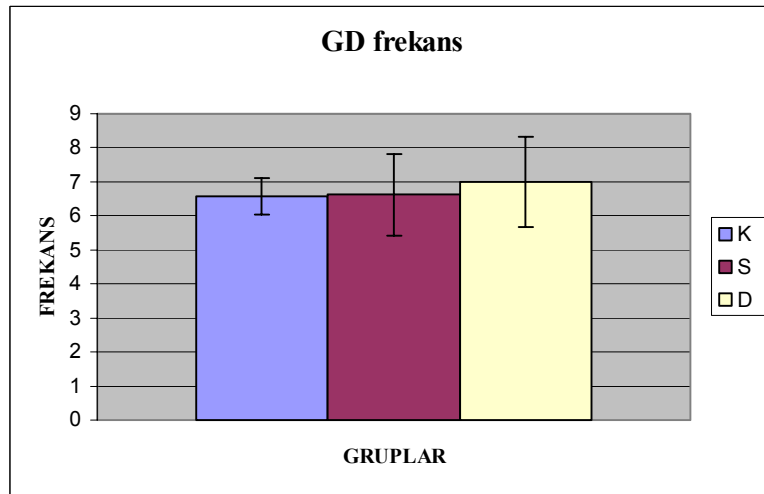
(K_m: K grubunun ortalama değerleri, S_m: S grubunun ortalama değerleri, D_m: D grubunun ortalama değerleri. Veriler ortalama \pm Standart Hata olarak verilmiştir.)



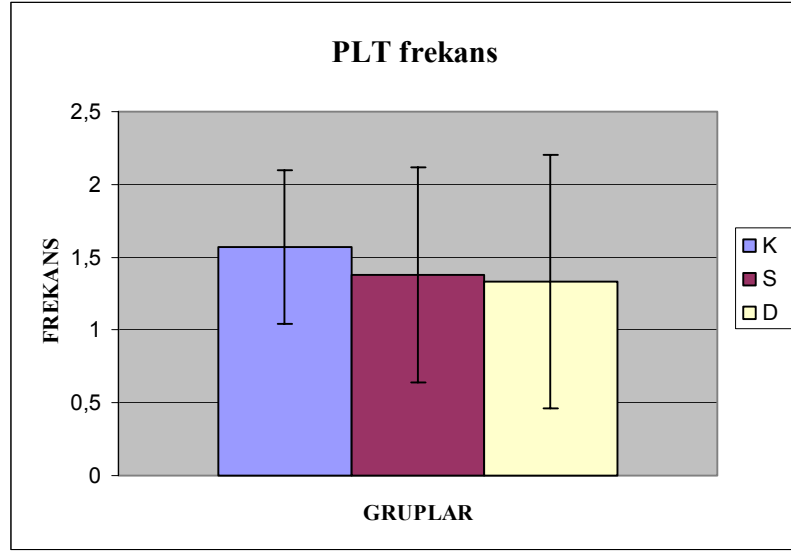
Şekil 19: K, S ve D gruplarının PT uygulamasının GDEL verileri



Şekil 20: K, S ve D gruplarının PT uygulamasının GDPL verileri



Şekil 21: K, S ve D gruplarının PT uygulamasının GD frekans verileri



Şekil 22: K, S ve D gruplarının PT uygulamasının PLT frekans verileri

Tablo 12: PT uygulamasında GDEL, GDPL, GD frekans ve PLT frekans verilerinin K,S ve D grupları arasındaki farklılığın değerlendirilmesindeki p değerleri.

	GDEL	GDPL	GD frekans	PLT frekans
p değerleri	0,56	0,65	0,83	0,6

Gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

SAĞ HIPPOCAMPUS CA1 VE CA2-CA3 ALANLARI STRATUM PYRAMIDALE TABAKASINDA NÖRON SAYIM BULGULARI

K, S ve D gruplarındaki sıçanların sağ hippocampus CA1 ve CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayılarının bulunması için her bir sıçanın kesitlerinde toplam disektör partikül sayısı ΣQ^{-} , $1/Ke\ddot{O}O$, $1/A\ddot{O}O$, $1/Ka\ddot{O}O$, t_{ort} , h , hata katsayısı hesaplandıktan sonra formülde yerine konularak toplam nöron sayısı (N) hesaplandı (Tablo 13-18).

K grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarının stratum pyamidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları Tablo 13’de gösterilmiştir. 6 sıçanın değerlendirildiği K grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarında toplam nöron sayısı en yüksek 131 786, en düşük 105 941 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 13: K grubu sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarının stratum pyamidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

SIÇANLAR						
	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6
Parametreler						
Q^-	311	258	251	297	308	314
$1/Ke\ddot{O}O$	3	3	3	3	3	3
$1/A\ddot{O}O$	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
$1/Ka\ddot{O}O$	2.26	2.19	2.31	2.22	2.21	2.21
t_{ort}	68.06	65.86	69.48	66.67	66.34	66.50
h	30	30	30	30	30	30
HK	0.0166	0.0168	0.0164	0.0141	0.0156	0.0108
N(toplam)	131 786	105 941	108 714	123 626	127 627	130 113

Q^- : Disektör sayısı, $1/Ke\ddot{O}O$: $1/Kesit$ örnekleme oranı, $1/A\ddot{O}O$: $1/Alan$ örnekleme oranı, $1/Ka\ddot{O}O$: $1/Kalınlık$ örnekleme oranı, t_{ort} (μm): Ortalama kesit kalınlığı, h (μm): Disektör yüksekliği, HK: Hata katsayısı, N(toplam): Toplam nöron sayısı.

S grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarının stratum pyamidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları Tablo 14’te gösterilmiştir. 6 sıçanın değerlendirildiği S grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarında toplam nöron sayısı en yüksek 132 423, en düşük 92 390 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 14: S grubu sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarının stratum pyamidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

SIÇANLAR						
	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
Parametreler						
Q ⁻	277	298	276	246	225	248
1/KeÖO	3	3	3	3	3	3
1/AÖO	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
1/KaÖO	2.38	2.37	2.43	2.25	2.19	2.51
t _{ort}	71.66	71.39	72.98	67.59	65.86	75.49
h	30	30	30	30	30	30
HK	0.0177	0.0143	0.0150	0.0154	0.0188	0.0159
N(toplam)	123 611	132 423	125 752	103 781	92 390	116 715

Q⁻: Disektör sayısı, 1/KeÖO: 1/Kesit örnekleme oranı, 1/AÖO: 1/Alan örnekleme oranı, 1/KaÖO:1/Kalınlık örnekleme oranı, t_{ort} (µm): Ortalama kesit kalınlığı, h (µm): Disektör yüksekliği, HK: Hata katsayısı, N(toplam): Toplam nöron sayısı.

D grubundaki sıçanların CA1 alanlarının stratum pyamidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları Tablo 15’de gösterilmiştir. 6 sıçanın değerlendirildiği S grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarında toplam nöron sayısı en yüksek 87 112, en düşük 63 101 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 15: D grubu sıçanların sağ hippocampus CA1 alanlarının stratum pyamidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

SIÇANLAR						
	D-1	D- 2	D-3	D-4	D-5	D-6
Parametreler						
Q ⁻	202	168	167	164	165	158
1/KeÖO	3	3	3	3	3	3
1/AÖO	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
1/KaÖO	2.3	2.21	2.29	2.17	2.12	2.13
t _{ort}	69.02	66.38	68.93	65.2	63.74	64.18
h	30	30	30	30	30	30
HK	0.0135	0.0161	0.0166	0.0165	0.0185	0.0181
N(toplam)	87 112	69 615	71 705	66 727	65 587	63 101

Q⁻: Disektör sayısı, 1/KeÖO: 1/Kesit örnekleme oranı, 1/AÖO: 1/Alan örnekleme oranı, 1/KaÖO:1/Kalınlık örnekleme oranı, t_{ort} (µm): Ortalama kesit kalınlığı, h (µm): Disektör yüksekliği, HK: Hata katsayısı, N(toplam): Toplam nöron sayısı.

K grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları Tablo 16’da gösterilmiştir. 6 sıçanın değerlendirildiği K grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarında toplam nöron sayısı en yüksek 260 641, en düşük 215 988 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 16: K grubu sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

SIÇANLAR						
	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6
Parametreler						
Q^-	529	526	518	585	621	629
$1/K_e\ddot{O}O$	3	3	3	3	3	3
$1/A\ddot{O}O$	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
$1/K_a\ddot{O}O$	2.26	2.19	2.31	2.22	2.21	2.21
t_{ort}	68.06	65.86	69.48	66.67	66.34	66.50
h	30	30	30	30	30	30
HK	0.0152	0.0155	0.0159	0.0115	0.0198	0.0156
N(toplam)	224 163	215 988	224 358	243 506	257 326	260 641

Q^- : Disektör sayısı, $1/K_e\ddot{O}O$: 1/Kesit örnekleme oranı, $1/A\ddot{O}O$: 1/Alan örnekleme oranı, $1/K_a\ddot{O}O$:1/Kalınlık örnekleme oranı, t_{ort} (μm): Ortalama kesit kalınlığı, h (μm): Disektör yüksekliği, HK: Hata katsayısı, N(toplam): Toplam nöron sayısı.

S grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları Tablo 17’de gösterilmiştir. 6 sıçanın değerlendirildiği S grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarında toplam nöron sayısı en yüksek 240 975, en düşük 192 796 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 17: S grubu sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

SIÇANLAR						
	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
Parametreler						
Q^-	277	298	276	246	225	248
$1/Ke\ddot{O}O$	3	3	3	3	3	3
$1/A\ddot{O}O$	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
$1/Ka\ddot{O}O$	2.38	2.37	2.43	2.25	2.19	2.51
t_{ort}	71.66	71.39	72.98	67.59	65.86	75.49
h	30	30	30	30	30	30
HK	0.021	0.0158	0.0212	0.0176	0.0165	0.0155
N(toplam)	240 975	222 187	206 853	192 796	195 046	204 251

Q^- : Disektör sayısı, $1/Ke\ddot{O}O$: $1/Kesit$ örnekleme oranı, $1/A\ddot{O}O$: $1/Alan$ örnekleme oranı, $1/Ka\ddot{O}O$: $1/Kalınlık$ örnekleme oranı, t_{ort} (μm): Ortalama kesit kalınlığı, h (μm): Disektör yüksekliği, HK: Hata katsayısı, N(toplam): Toplam nöron sayısı.

D grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları Tablo 18’de gösterilmiştir. 6 sıçanın değerlendirildiği S grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarında toplam nöron sayısı en yüksek 153 956, en düşük 117 016 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 18: D grubu sıçanların sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

SIÇANLAR						
	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6
Parametreler						
Q ⁻	357	322	300	298	308	293
1/KeÖO	3	3	3	3	3	3
1/AÖO	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
1/KaÖO	2.3	2.21	2.29	2.17	2.12	2.13
t _{ort}	69.02	66.38	68.93	65.2	63.74	64.18
H	30	30	30	30	30	30
HK	0.0176	0.0159	0.0157	0.0133	0.0141	0.0125
N(toplam)	153 956	133 428	128 812	121 248	122 430	117 016

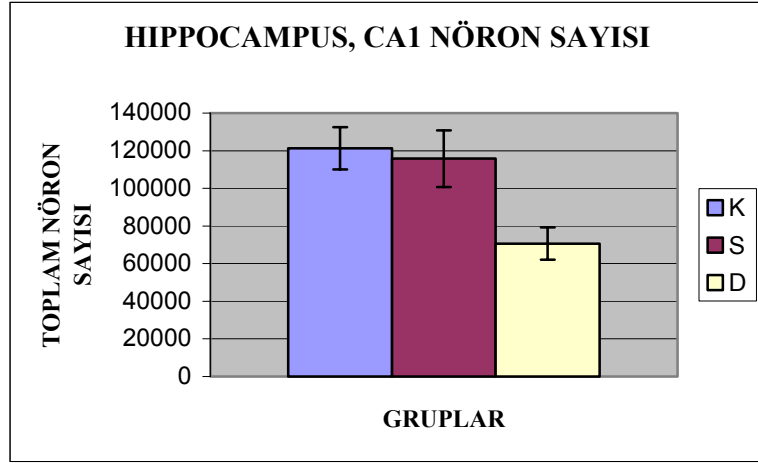
Q⁻: Disektör sayısı, 1/KeÖO: 1/Kesit örnekleme oranı, 1/AÖO: 1/Alan örnekleme oranı, 1/KaÖO:1/Kalınlık örnekleme oranı, t_{ort} (µm): Ortalama kesit kalınlığı, h (µm): Disektör yüksekliği, HK: Hata katsayısı, N(toplam): Toplam nöron sayısı.

K grubunun sağ hippocampus CA1 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayısı ortalaması $121\,301 \pm 11\,201$, S grubunun $115\,778 \pm 15\,031$, D grubunun $70\,641 \pm 8\,616$ olarak bulundu (Tablo 19). K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1 alanlarının toplam nöron sayılarının ortalamalarının grafiği Şekil 23’de görülmektedir. K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1 alanları toplam nöron sayılarının istatistiksel analizinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis). Bu farkın D grubundan kaynaklandığı, D grubunun sağ hippocampus CA1 alanlarındaki toplam nöron sayılarının, K ve S gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı bulundu. K ve S grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U). Gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesindeki p değerleri Tablo 22’de, grupların ikili karşılaştırmalarındaki p değerleri Tablo 23’de verilmiştir.

Tablo 19: K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1 alanı stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ortalamaları

GRUPLAR	Ortalama Toplam Nöron Sayıları
K	121301 ± 11201
S	115778 ± 15031
D	70641 ± 8616

(Veriler ortalama \pm Standart Hata olarak verilmiştir.)



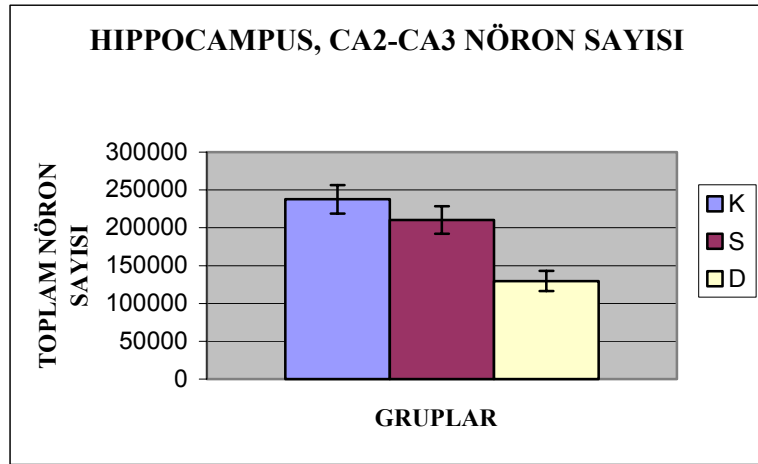
Şekil 23: K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1 alanları stratum pyramidale tabakalarının ortalama nöron sayıları

K grubunun sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayısı ortalaması $237\ 663 \pm 18\ 856$, S grubunun $210\ 351 \pm 18\ 274$, D grubunun $129\ 481 \pm 13\ 326$ olarak bulundu (Tablo 20). K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının toplam nöron sayılarının ortalamalarının grafiği Şekil 24’de görülmektedir. K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarının toplam nöron sayılarının istatistiksel analizinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis). Bu farkın D grubundan kaynaklandığı, D grubunun sağ hippocampus CA2-CA3 alanlarındaki toplam nöron sayılarının, K ve S gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı bulundu. K ve S grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U). Gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesindeki p değerleri Tablo 22’de, grupların ikili karşılaştırmalarındaki p değerleri Tablo 23’de verilmiştir.

Tablo 20: K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA2-CA3 alanı stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ortalamaları

GRUPLAR	Ortalama Toplam Nöron Sayıları
K	237663 ± 18856
S	210351 ± 18274
D	129481 ± 13326

(Veriler ortalama ± Standart Hata olarak verilmiştir.)



Şekil 24: K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA2-CA3 alanları stratum pyramidale tabakalarının ortalama nöron sayıları

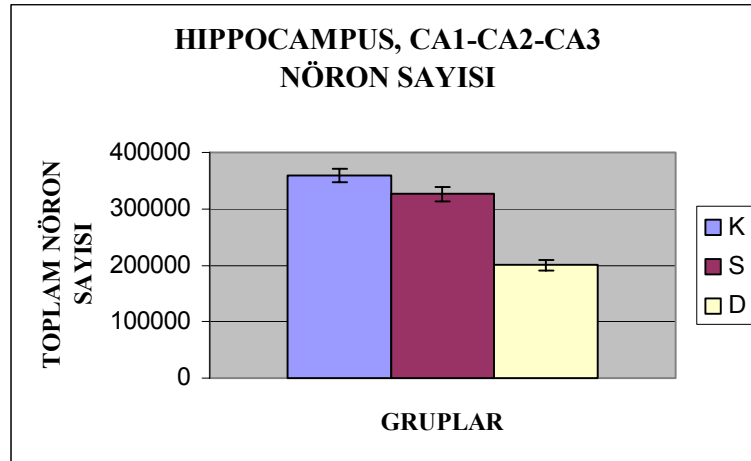
K grubunun sağ hippocampus CA1-CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayısı ortalaması 358 964±11 260, S grubunun 326 130±12 555, D grubunun 200 122±8 906 olarak bulundu (Tablo 21). K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1-CA2-CA3 alanlarının toplam nöron sayılarının ortalamalarının grafiği Şekil 25’de görülmektedir K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1-CA2-CA3 alanlarının toplam nöron sayılarının istatistiksel analizinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$; Kruskal-Wallis). Bu farkın D grubundan kaynaklandığı, D grubunun sağ hippocampus CA1-CA2-CA3 alanlarındaki toplam nöron sayılarının, K ve S gruplarına göre anlamlı olarak

azaldığı bulundu. K ve S grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$; Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U). Gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesindeki p değerleri Tablo 22’de, grupların ikili karşılaştırmalarındaki p değerleri Tablo 23’de verilmiştir.

Tablo 21: K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1-CA2-CA3 alanları stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayıları ortalamaları

GRUPLAR	Ortalama Toplam Nöron Sayıları
K	358964 ± 11260
S	326130 ± 12555
D	200122 ± 8906

(Veriler ortalama ± Standart Hata olarak verilmiştir.)



Şekil 25: K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1-CA2-CA3 alanları stratum pyramidale tabakalarının ortalama nöron sayıları

Tablo 22: K, S ve D gruplarının sağ hippocampus CA1, CA2-CA3 ve CA1-CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayılarının, gruplar arasındaki farklılığının değerlendirilmesindeki p değerleri

	p değerleri
CA1	0,003*
CA2-CA3	0,001*
CA1-CA2-CA3	0,001*

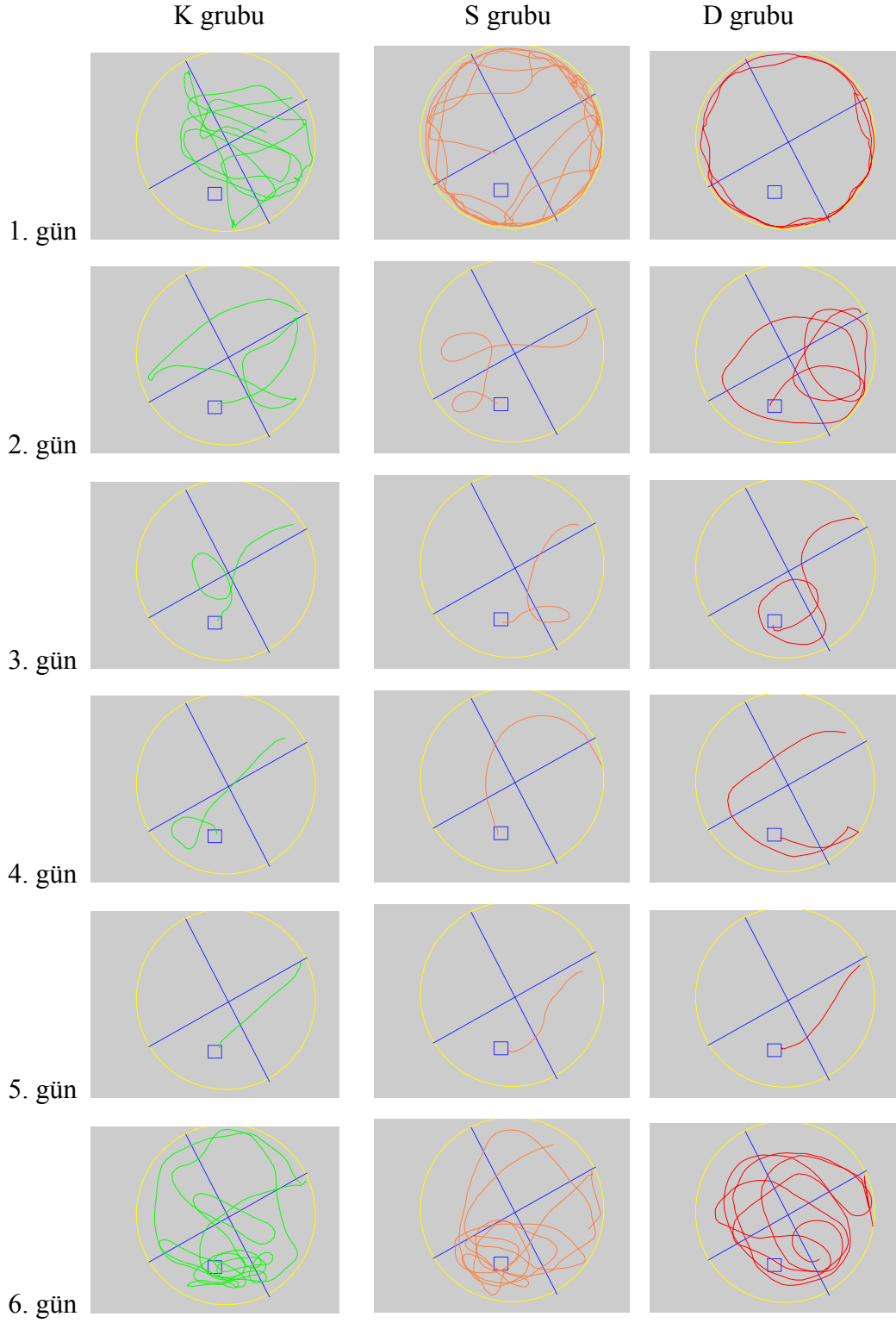
Gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. *Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Tablo 23: K, S ve D gruplarının, sağ hippocampus CA1, CA2-CA3 ve CA1-CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki toplam nöron sayılarının ikili karşılaştırmalardaki p değerleri

		p değerleri
CA1	D - K	0,002*
	D - S	0,002*
	K - S	0,485
CA2-CA3	D - K	0,002*
	D - S	0,002*
	K - S	0,026
CA1-CA2-CA3	D - K	0,002*
	D - S	0,004*
	K - S	0,65

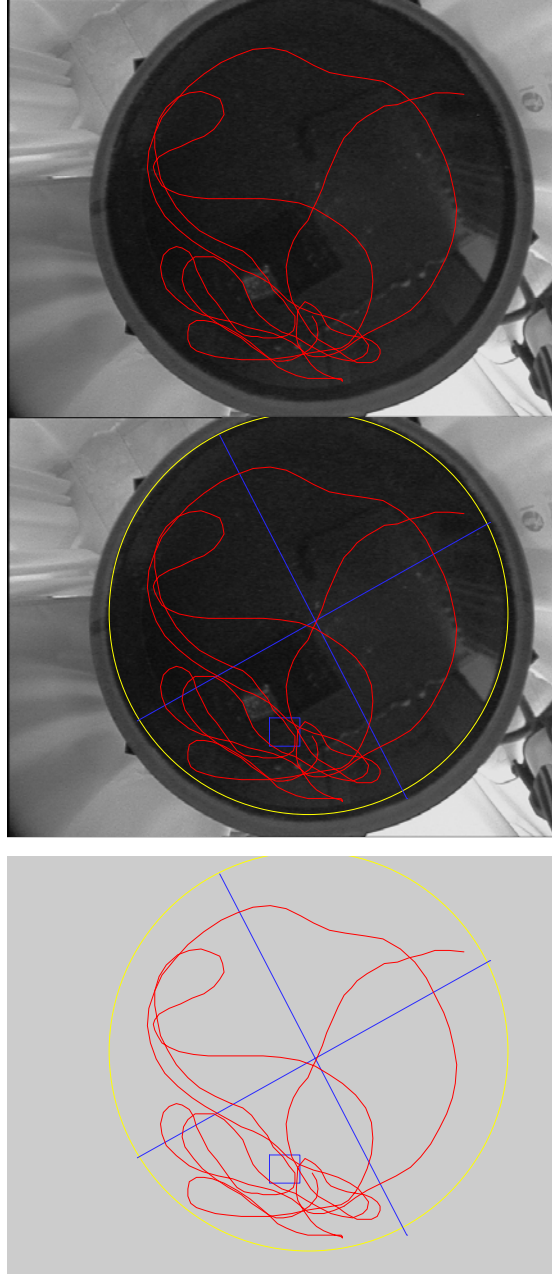
İkili karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. * Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

K, S ve D grubundaki sıçanların sağ hippocampus CA1 ve CA2-CA3 stratum pyramidale alanlarındaki toplam nöron sayısının bulunması sırasında gözlenen hata katsayıları hesaplanmıştır (Tablo 13-18).



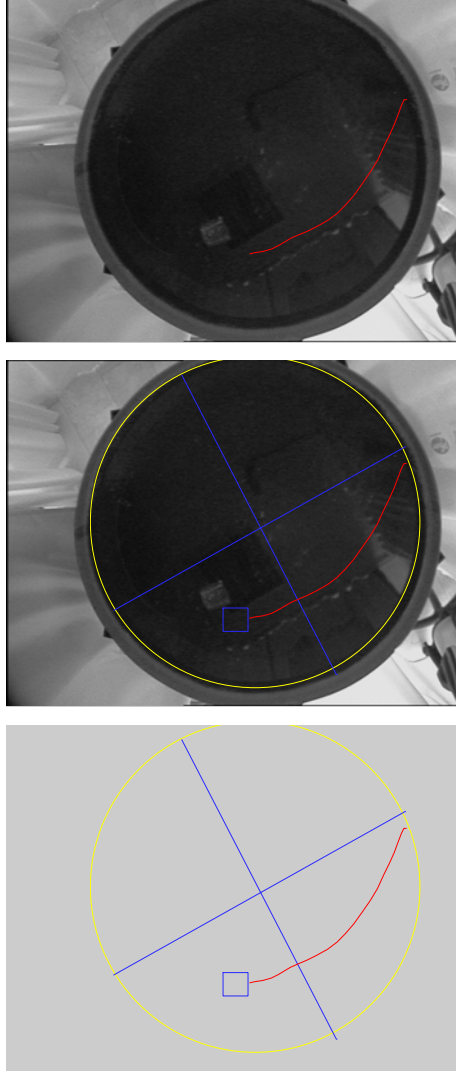
Şekil 26: K, S ve D gruplarından rasgele seçilen birer sıçanın su tankı testinde 1-5. günlerindeki deneme bloklarında ve 6. gündeki PT uygulamasındaki şematik görünümleri

Bütün günlerde sıçanların K kadrından bırakıldığı denemelerin şematik görünümleri seçilmiştir.



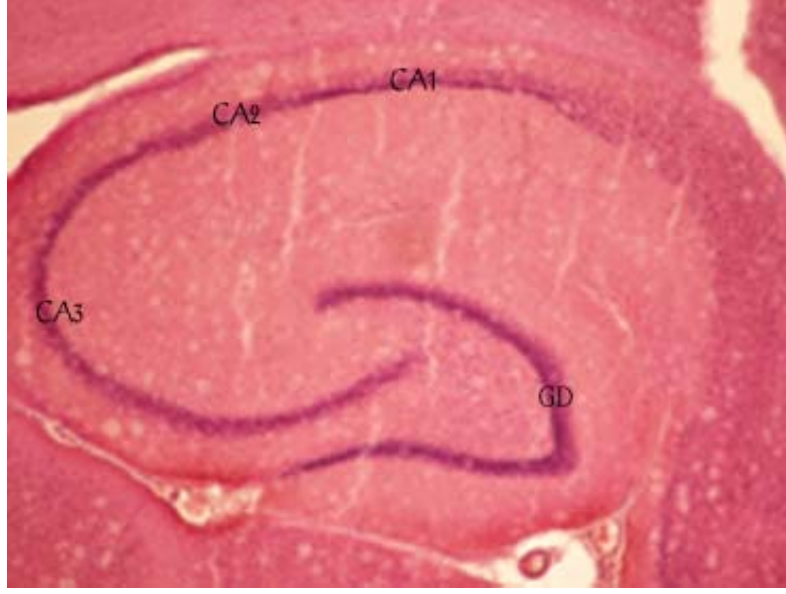
Şekil 27: 6. gün yapılan bir PT uygulamasının görüntüleri

Yukarıdan aşağı doğru sırayla gerçek görüntü, sanal kadrantların çizdirildiği görüntü, şematik görünüm.

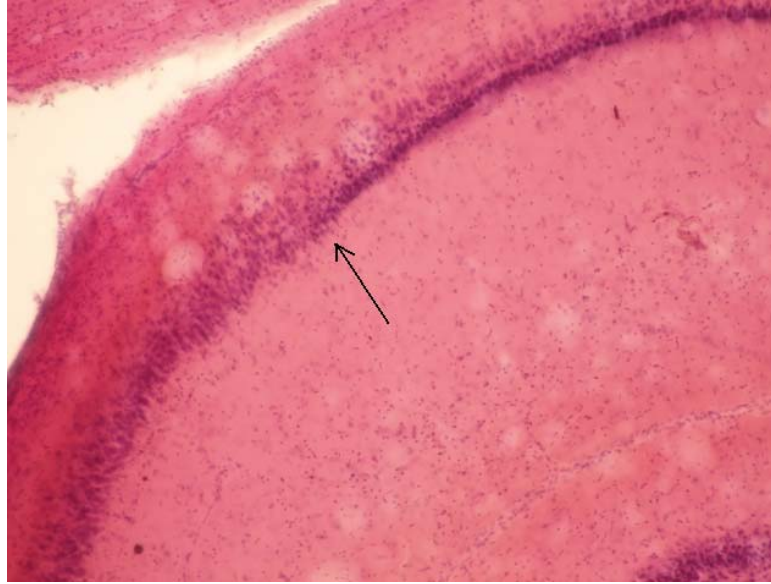


Şekil 28: Uzaysal öğrenmenin görüldüğü bir denemenin görüntüleri

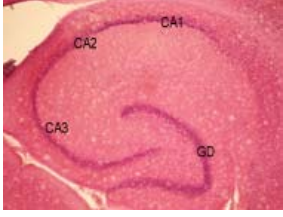
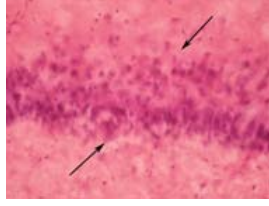
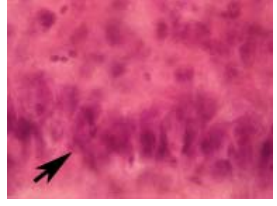

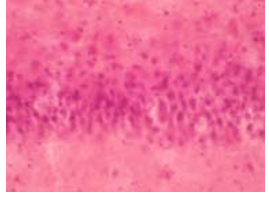
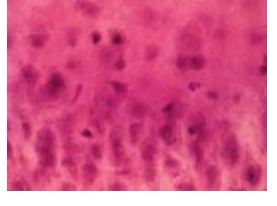
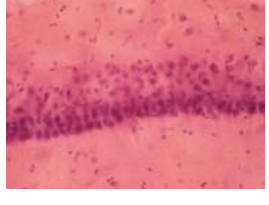

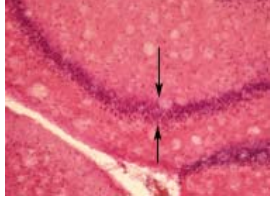
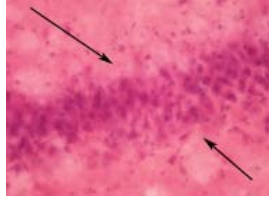


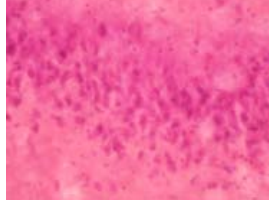




Yukarıdan aşağı doğru sırayla gerçek görüntü, sanal kadrانların çizdirildiği görüntü, şematik görünüm.



Şekil 29: Hippocampus kesitinde CA1, CA2 ve CA3 alanlarının görünümü
CA1-CA2-CA3: hippocampus stratum pyramidale tabakasını, GD: gyrus dentatus'u göstermektedir.
(H&E) (x4)



Şekil 30: Hippocampus kesitinde CA1, CA2-CA3 alanlarının geçişinin görünümü
(H&E) (x10)

	CA1 ve CA2-CA3, x4	CA1, x10	CA1, x40	CA1, x100
K grubu				
S grubu				
D grubu				
	CA1 ve CA2-CA3, x4	CA2-CA3, x10	CA2-CA3, x40	CA2-CA3, x100
K grubu				
S grubu				
D grubu				

Şekil 31: K, S ve D grubundaki sıçanların sağ hippocampus kesitlerinin CA1 ve CA2-CA3 alanlarının x4, x10, x40, x100 objektif büyötmelerindeki görüntüleri (H&E)

CA1-CA2-CA3: hippocampus stratum pyramidale tabakasını, GD: gyrus dentatus'u göstermektedir. Oklar hippocampus stratum pyramidale tabakasının sınırlarını göstermektedir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda stz ile diyabet oluşturulan sıçanların hippocampus CA1 ve CA2-CA3 alanlarında stereolojik bir yöntem olan optik parçalama yöntemi ile nöron sayımı yapıldı. Stz ile deneysel diyabet oluşturulan gruptaki sıçanların hippocampus'larının CA1, CA2-CA3 ve CA1-CA2-CA3 alanlarında nöron sayılarının kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı bulundu ($p<0,05$).

Optik Parçalama Yöntemi nöron sayısını değerlendirmede etkinliği ve tarafsızlığı nedeniyle nörobilimde 'altın standart' olarak kabul görmüştür ve özellikle de hippocampus'ta olmak üzere nörolojik kantitatif çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (20).

Hippocampus'un yoğun olarak paketlenmiş ince pyramidal tabakası belirgin olarak iki alana ayrılabilir; geniş hücreli proksimal alan ve küçük hücreli distal alan. Cajal bu iki alanı sırasıyla regio superior (üst bölge) ve regio inferior (alt bölge) olarak tanımlamıştır. En sık kullanılan ve kabul gören ise Lorento de No'nun hippocampus'u üç alana ayırarak (CA1,CA2 ve CA3) yaptığı isimlendirmedir. Bu isimlendirmeye göre hippocampus'un CA2 ve CA3 alanı Cajal'ın geniş hücreli regio inferior'unun karşılığı iken; CA1 alanı küçük hücreli regio superior'una karşılık gelir (15,17).

CA3, gyrus dentatus'un hilus'una komşudur ve bu alanın sonu nöronal hücre gövdelerinin organizasyonunun ani değişimi nedeniyle iyi tanımlanmıştır. CA1 subiculum ile komşudur. CA1'in pyramidal hücre tabakasının derininde bulunan hücreler subiculum'a yakın bölgelerde aşırı derecede gevşek olarak paketlenmişlerdir. Subiculum ile CA1 arasındaki sınır CA1'in pyramidal hücre tabakasının yüzeyel hücrelerinin birbiriyle temasının bittiği nokta olarak tanımlanır. CA2, Lorento de No'nun tanımladığı gibi CA3 ve CA1 arasında bulunan sınırlı bir hücresel alandır ve CA3'teki gibi geniş hücreler içerir. CA1 ile CA2-CA3 arasındaki sınır hücre organizasyondaki ve boyutundaki keskin değişim ile tanımlanır (14-16). CA2 alanı CA3'e ait olarak kabul edilmektedir çünkü klasik boyama yöntemleri ile boyanmış kesitlerde bu iki alan arasındaki sınır belirgin değildir (20).

CA2 ve CA3'te bulunan pyramidal hücreler CA1'de bulunanlara göre büyüktür ve sıkı paketlenmişlerdir. CA2'deki pyramidal hücreler ise CA3'tekilere göre daha gevşek paketlenmiştir.

Pyramidal hücrelerin büyüklüğünün yanında CA3 ve CA1 arasında çok net bir bağlantı farklılığı vardır. CA3 pyramidal hücreleri gyrus dentatus'tan yosunsu lifler aracılığı ile afferent impuls alırken, CA1 ve CA2 pyramidal hücreleri almazlar (17).

CA2 alanı Lorento de No'nun tanımladığı gibi CA3 ve CA1 arasında bulunan sınırlı bir hücresel alandır. CA3 gibi geniş hücreler içerir fakat CA1 gibi gyrus dentatus'tan yosunsu liflerle input almaz. Bazılarına göre CA2, CA3'ün terminal parçasıdır. Diğer yandan da CA2, CA3 ve CA1'den tamamen farklıdır (17).

Çalışmamızda hippocampus'un CA1 alanı, CA2–CA3 alanından kesin sınırlar ile ayrılabilirdi için, bu iki alandaki hücreler ayrı ayrı sayılmıştır. CA2-CA3 arasında böyle kesin bir ayırım yapılamadığı için CA2 ve CA3 alanları beraber sayılmıştır. Literatürde hippocampus alanlarının ayrı ayrı değerlendirildiği çalışmalarda da CA1 ve CA2-CA3 alanlarının ayrımı bizim çalışmamıza benzer şekilde yapılmıştır (15,20).

Uzaysal bellekte sağ hippocampus'un daha önemli olduğu düşünüldüğü için çalışmamızda sıçanların sağ hippocampus'larında sayım yapılmıştır (11,26,27).

Yüksek glukoza hücresel yanıtlar çok çeşitlidir fakat sonunda fonksiyonel değişikliklerle ve sıklıkla da hücre ölümüyle sonuçlanır. Yüksek glukoz akut hücre hasarına bağlı nekrotik hücre ölümüne ve programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozise yol açarak hücre kaybına yol açmaktadır (32).

Memelilerde hippocampus anoksik ve iskemik hasara en hassas beyin yapılarından birisidir. Bu hassasiyet hippocampus'un CA1 alanındaki nöronlarında CA3 alanındaki nöronlarına göre daha fazladır (62). Bizim çalışmamızda stz ile oluşturulan diyabette D grubundaki sıçanların hippocampus'larının hem CA1 hem de CA2-CA3 alanlarındaki nöron sayılarında azalma görüldü. K ve S gruplarındaki

sıçanların hippocampus'larının CA1 ve CA2-CA3 alanları dikkate alındığında, D grubunun CA1 alanındaki azalmanın CA2-CA3 alanlarındaki azalmadan daha fazla olmadığı gözlemlendi. Bunun anoksik iskemik hasarın ve diyabetik hasarın mekanizmalarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Yüksek glukoza ilk hücrel cevap çeşitli formlarda serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumudur. Reaktif nitrojen ürünlerinin üretimi, SOR ile kombine edildiğinde, hızla apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü hem mitokondri bağımlı hemde bağımsız yollar aracılığı ile indüklerler. Bax'ın indüklediği dış mitokondrial membran permeabilitesi ve cytochrome c salınımı apoptotik sinyalde kritik ve irreversibl safhalardır. Çalışılan çoğu hücre tipinde yüksek glukozun apoptotik sinyalde çeşitli safhaları etkilediği açıktır; oksidatif ve nitrosatif stresi arttırarak, proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerini aktive ederek ve caspase kaskadını başlatarak hücre ölümüne neden olur (32).

Ortamdaki yüksek glukoz konsantrasyonunu takiben hücrelerdeki oksidatif ve nitrosatif stresin gösterildiği pek çok çalışmada, antioksidanların faydalı etkileri gösterilmiştir. Ates ve arkadaşları yaptıkları iki ayrı çalışmada 60 mg/kg stz ile diyabet oluşturdukları sıçanlarda antioksidan özellikleri olduğu bilinen mexiletine ve resveratrol'ün hippocampus, cortex, cerebellum ve beyin sapında Malondialdehid (MDA), Ksantin oksidaz (XO), Nitrik Oksit (NO) düzeylerindeki artmayı önlediğini belirterek, oksidatif hasarı önlediğini göstermişlerdir (55,56). Bununla beraber bu çalışmalardan elde edilen bilgiler yorumlanırken dikkatli olunmalıdır. Ne serbest radikal türlerini (süperoksit gibi) tespit etmede kullanılan tekniklerin çoğu ne de bunları etkisizleştirmek için veya üretimini engellemek için kullanılan antioksidanlar spesifik değildir. Ayrıca bu serbest radikallerin yarı ömrü, olası reaktanların varlığında en fazla birkaç saniyedir. Bu özellikle oksidasyon ve nitrasyon reaksiyonlarının çok hızlı oranlarda meydana geldiği peroksinitrit ve türevleri için de geçerlidir (32).

Bunlara rağmen oksidanlar yüksek glukoza maruziyet sonucu ortaya çıkarlar ve oksidasyon ve nitrasyon ürünleri relatif olarak hem in vivo hem de in vitro kolayca tesbit edilebilirler. Doku parçalarında 3-nitrotirozin'in gösterilmesi sıklıkla

ONOO'in indüklediği oksidatif stres ve hücrel hasarın belirleyicisi olarak kullanılır. Diabetik nefropatili hastaların proksimal tubullerinde, endotoksin tedavisini takiben sıçanların böbreklerinde ve diabetik sıçanların renal kortekslerinde, artmış nitrotirozin boyanması tesbit edilmiştir. Bununla beraber myeloperoksidaz'ın tirozin rezidülerini de nitrate edebilmesi, ONOO'in indüklediği hücrel hasarın belirleyicisi olarak 3-nitrotyrosine kullanılması kısıtlamıştır. Tirozin parçalarının nitrasyonunun sıklıkla nitrit'in hidrojen peroksid (H₂O₂) aracılığı ile oksidasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (32).

Yüksek glukozun indüklediği süperoksit üretimi DNA zincirinde kırılmalara ve poly(ADP)-ribose polimerase (PARP) aktivasyonuna yol açar. PARP, glyceraldehyde phosphate dehidrogenase'ı (GAPDH) inhibe eder ve hücre ölümüne neden olur. Bu model mitokondrial SOR üretiminin yüksek glukozun indüklediği apoptozisteki önemli rolünü göstermektedir. Nöronlarda yüksek glukozun indüklediği SOR üretimi ve apoptotik hücre ölümü hipergliseminin ilk 2 saatinde gösterilebilir (32,63).

Oksidatif stresin indüklediği apoptozis için diğer bir model de H₂O₂'nin ASK1'i indüklemesidir. Bu Bcl-2'nin down regulasyonuna, mitokondrial membran potansiyelinin bozulmasına ve caspase kaskadının aktivasyonuna yol açar. Antioksidan özelliği olan selenit'in ASK1' in apoptotik etkilerini PI-3-kinase/Akt yolaklarını aktive ederek bloke ettiği gösterilmiştir (32).

NO vericisi, NOC-18'in, mitokondrial membran depolarizasyonunu, Bax indüklü cytochrome c salınımını ve caspase aktivasyonunu indüklemesinin gösterilmesi NO'in de apoptozise neden olduğunu göstermektedir (32).

Fujita ve arkadaşları nöronal hücrelerde yüksek glukoz kültürünün başlangıcından 12 saate kadar proapoptotic Bax ekspresyonunun lineer şekilde arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca yüksek glukozun nöronal hücrelerde protein kinase C aracılığı ile Bax indüklü cytochrome c salınımı ve caspase aktivasyonunu arttırarak apoptotik hücre ölümünü arttırdığı ve nekrotik hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (64).

Renal tubuler epitelyal hücrelerde, yüksek glukoz konsantrasyonunun, Bax ekspresyonunda 2 kat artışa ve Bcl-2 ekspresyonunun supresyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca yüksek glukoz Bad fosforilasyonunu artırır ve bununla ilişkili olarak Bax/Bcl2 oranını, cytochrome c salınımını ve caspase 3 aktivasyonunu artırır (32).

Yüksek glukoz konsantrasyonları ya direkt olarak ya da ASK1 aracılığı ile JNK ve p38 gibi Bax oligomerizasyonuna ve mitokondriden cytochrome c salınımına neden olan stres-induced MAPK'ları aktive eder. Bu da caspase-3 aktivasyonuna ve sonuç olarak Bax aracılı apoptozise neden olur (32). Nakagami ve arkadaşları insan aortunun endotelial hücrelerinde yüksek glukozun p38 MAPK fosforilasyonunu arttırdığını, mitokondriden cytochrome c salınımını arttırarak caspase 3 aktivasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (65).

Yüksek glukozun indüklediği apoptozisde p53'ün rolü ventriküler myosit hücrelerinde gösterilmiştir. Bu çalışmada p53'ün O-glukozilasyonunun, anjiyotensin-II birikimine ve Bax aktivasyonu aracılığı ile miyosit apoptozisine yol açmıştır. Ayrıca bu çalışmada, p53'ün (Ser¹⁸) noktasından fosforillendiği gösterilmiştir bu da JNK'yı aktive ederek hücre ölümünü başlatmaktadır (32,66).

Son olarak p53 ve Bax indüklü apoptozis arasındaki ilişki DNA hasarı aracılığı ile apoptozis indüksiyonunu takiben apoptosis-associated speck-like protein (ASC)'nin p53 tarafından indüksiyonunun Bax bağımlı cytochrome c salınımına, caspase-9, caspase-2, ve caspase-3 aktivasyonuna aracılık etmesi ile gösterilmiştir (32).

Yüksek glukozun indüklediği apoptosis IGF-I tarafından önlenir (36,40). IGF-I fizyolojik konsantrasyonlarda bile caspase 3 aktivasyonunu önleyerek nöronal apoptozisi önlemektedir (67). IGF-I'in çeşitli nöronal sistemlerde antiapoptotik etkileri olduğu bilinmektedir. IGF-I antiapoptotik etkisini iki mekanizma aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Bunlardan birisi IGF-1'in stimüle ettiği ERK tarafından yürütülen bir süreçte Bad'ın fosforilasyonudur. Diğerisi ise PI 3- kinase ve Akt sinyal

yolağı aracılığı ile Bad'ın fosforilasyonudur. Bad'ın fosforillenmesi mitokondrial membrana translokasyonunu 6nler (33). Pratikte IGF-I tarafından aktive olan bu mekanizmalarının birisinin veya ikisinin aktivasyonu h6cre tipine ve y6ksek glukoz konsantrasyonuna maruziyetin s6resine bağlıdır (32,33). Yeni 6alışmalar ins6lin'in kendisinin de antiapoptotik etkili olduğunu g6stermektedir (68).

6alışmamızda sı6anlarda diyabet oluşturmak i6in 60 mg/kg stz intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Glucosamine-nitrosurea bileşiği olan stz'in intraven6z veya intraperitoneal enjeksiyonu diyabetin patofizyolojisinin ve komplikasyonlarının araştırıldığı 6alışmalarda en sık kullanılan modeldir (34).

Bu modelin temel 6zelliklerinden birisi iyi karakterize edilmiş olmasıdır. Streptozotosin diyabetik sı6anlar hipoins6linemiktir, fakat hayatlarını devam ettirebilmeleri i6in ins6lin tedavisi gerekmez. Kan glukoz seviyeleri 20-25 mmol/L d6zeyindedir (normali; 5 mmol/L). Diyabetik insanlarda olduğu gibi diyabetik sı6anlarda da g6z, b6brek, kalp ve sinir sisteminde organ hasarları g6r6l6r.

Bu modelde yapılan g6zlemler tip 1 DM hastaları ile uyumlu olmakla birlikte bu model ile diyabet oluşturulan kemirgenlerin kan glukoz d6zeyleri, tip 1 DM hastalarından belirgin olarak y6ksektir.

Stz'in intracerebroventricular enjeksiyonundan sonra beyinde direkt toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Fakat kan beyin bariyerinde GLUT-2 glukoz taşıyıcıları bulunmadığı i6in stz beyini direkt olarak etkilememektedir. Bu stz uygulanmasından haftalar sonra kogn6syon ve sinaptik plastisitede meydana gelen değişikliklerin ins6lin tedavisi ile 6nlenebildiğinin g6sterilmesi ile desteklenmiştir (34).

6alışmamızda stz ile diyabet oluşturulan sı6anların hippocampus'larının CA1, CA2-CA3 ve CA1-CA2-CA3 alanlarında n6ron kaybının yanında uzaysal 6đrenmelerinin de bozulduğu, K ve S gruplarına g6re daha zor 6đrendikleri, su tankı testi ile ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda sıçanlara, stz ile diyabet oluşturulmasından sonraki 7. hafta su tankı testi uygulanarak sıçanların öğrenme ve bellek fonksiyonları değerlendirilmiştir. Su tankı testi yaklaşık 25 yıl önce, sıçanlarda laboratuvar ortamında uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere tanımlanmış bir modeldir. Zaman içinde davranışsal nörobilimde en sık kullanılan modellerden biri olmuştur. Testin popüleritesinin nedenlerinden birisi de su tankı testinin sıçanlardaki hippocampus lezyonlarına özel sensitivitesi olan bir test olarak gösterilmesidir. Bu su tankı testinin önemli bir özelliğidir Böylece davranışsal nörobilimciler oldukça kompleks olan öğrenme ve bellek sisteminin nöronal temellerini çalışabilmektedirler (37,38).

Bizim çalışmamızda su tankı testi uygulamasında klasik altı günlük protokol kullanılmıştır (58,59). Bu protokole göre 1. gün görünür, 2-5. günler saklı platform kullanılarak her gün dört deneme olmak üzere beş gün süresince deneme blokları yapıldı (acquisition blokları) ve bu denemelerden elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda D grubundaki sıçanların EL ve PL değerlerinin deneme günleri süresince tedricen azaldığı görüldü (Şekil 16 ve 17). Bu bize K, S ve D grubundaki sıçanların su tankı testinde platformu bulmayı öğrendiklerini gösterdi. Fakat gruplar arasındaki EL ve PL değerleri karşılaştırıldığında D grubundaki sıçanların EL ve PL değerleri, K ve S grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak artmış bulundu ($p < 0,05$). Bu da D grubundaki sıçanların K ve S grubundaki sıçanlara göre daha zor öğrendiğini gösterdi. D grubundaki sıçanlar öğrenme ve bellek yeteneklerini tam olarak kaybetmemekle birlikte öğrenme performansları bozulmuştu.

Su tankı testinin 1-5. günlerinde yapılan deneme bloklarında değerlendirdiğimiz diğer bir parametre sıçanların V değerleri idi. Yapılan istatistiksel analizde K, S ve D grubundaki sıçanların V değerleri arasında fark bulunmadı ($p > 0,05$). Diyabetin her iki formu da gözleri, böbrekleri, kalbi, kan damarlarını ve sinirleri etkileyebilir. Tip 1 diyabetik hastaların öğrenme ve bellekte, problem çözmede, mental ve motor hızda bozulmalar gösterdikleri bildirilmiştir. Bu komplikasyonların gelişmesi diyabetin süresi ve metabolik kontrolünün kalitesi ile ilişkilidir (31).

Çalışmamızda D grubundaki sıçanlarda, su tankı testinin 6 günlük sürecini de göz önüne aldığımızda, 6-7 haftalık stz ile oluşturulan diyabet süreci sonunda motor performans bozukluğu oluşmadı. Diğer yandan D grubunda motor performans bozukluğu oluşmamış olması su tankı testini EL ve PL verilerinin sıçanların hızından etkilenmediğini göstermektedir. Böylece EL ve PL verilerimizin standardizasyonu da yine su tankı testi ile sağlanmıştır.

6. gün yapılan probe trial uygulamasının GDEL, GDPL, GD frekans, PLT frekans verilerinin istatistiksel analizinde K,S ve D grupları arasında fark bulunmadı ($p>0,05$). Pek çok farklı araştırmada öğrenme ve bellekte hippocampus'un fonksiyonunu açıklayabilmek için su tankı testinin pek çok farklı metodolojik varyasyonları kullanılmaktadır. Bizim de çalışmamızda uyguladığımız şekilde seri halinde uygulanan acquisition bloklarından sonra platformun havuzdan kaldırılarak sıçanın belirli bir süre serbest olarak yüzmesinin sağlanmasıyla gerçekleştirilen bir probe trial uygulamasında hayvanın daha önceden platformun bulunduğunu öğrendiği kadranda (hedef kadranda) platformu araması sırasında sıçanın daha önceden platformun bulunduğu kadranda geçirdiği süre, platformun bulunduğu alandan geçme sayısı gibi veriler değerlendirilerek hayvanın uzaysal öğrenmesinin doğruluğu değerlendirilir. İyi öğrenmiş bir hayvan yüzme süresinin %50 veya daha fazlasını hedef kadranda tarayarak geçirir (37).

Hippocampus eksplisit belleğin özel bir parçası olmakla birlikte kemirgenlerde uzaysal öğrenme için gereklidir. Farelerde ve sıçanlarda hippocampus'taki pyramidal hücreler potansiyel 'place cell' olarak fonksiyon görürler. Bu hücrelerin ortamda kodladıkları alanlar da 'place field' olarak adlandırılmaktadır. Place cell'ler hayvanın ortamdaki pozisyonuyla ilişkili olarak uyarılırlar. Hayvan yeni bir ortama girdiği zaman bir 'place field' oluşturmayı düşünür. Bu place field'ler dakikalar içinde biçimlenir ve haftalarca, aylarca sabit kalır (11,26,27,69).

Hippocampus uzaysal belleğin oluşturulmasında ve yön öğrenilmesinde, etraftaki nesnelerin referans alınarak kognitif haritanın oluşturulmasında (allocentric kognitif map) önemli, belki de esas role sahip olmakla birlikte uzaysal öğrenmenin

diğer elemanları muhtemelen diğer beyin yapıları tarafından sağlanmaktadır. Bu yapılar kısa süreli bellek (çalışma belleği) için frontal lob, uzaysal oryantasyon, dikkat ve insanın veya deneğin kendini referans alarak (egocentric, body-related mapping) oluşturduğu haritalama için parietal korteks'dir. Uzaysal belleğin işlevinin bu yapıların hepsinin yüksek seviyedeki organizasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (27).

Çalışmamızda K, S ve D grubundaki sıçanlar 1-5. günler her gün dört deneme olacak şekilde yapılan deneme bloklarında platformun yerini ipuçlarını kullanarak bulmayı öğrendiler. Probe trial uygulamasında, sıçanlar daha önceden yerini öğrendikleri platformu aramak için beyinde birçok merkez ve kortikal alanı kullanacaktır. Çünkü uzaysal bilgi hippocampus'ta kodlanmış, limbik sistemde pekiştirilerek assosiasyon kortekslerinde depolanmıştır. Bu nedenle probe trial testi bilginin pekiştirilip pekiştirilmediğini, depolanıp depolanmadığını gösterir. Depolanan bilgi geri çağrılabilirdiği için, aynı zamanda geri çağırma da bu arada değerlendirilebilir (37,70). Geri çağırmanın değerlendirildiği probe trial uygulamalarının protokolleri farklı olmakla birlikte bizim uyguladığımız probe trial uygulamasında platformu aramak için sıçanın pekiştirdiği ve depoladığı bilgiyi kullanması gerektiği için geri çağırıp çağırmadığı da değerlendirilmektedir. Bunun için assosiasyon korteksleri arasında da bağlantılar kurulmalıdır. Biz probe trial uygulamasında K, S ve D grupları arasında fark olmamasını, D grubunda performans bozukluğu olmakla birlikte sıçanların platformu bulmayı öğrenmiş olması sonucu bunu kortikal bağlantılarla kortexe aktarabilmiş olmalarına ve bu yollarda bir bozulma olmamasına bağladık. Bu ekstrapokampal yapıların fonksiyonu sonucu gerçekleşmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar sıçanların hippocampus'larının az bir kısmı ile bile su tankı testini öğrenebileceklerini göstermektedir (69,70).

Stz ile diyabet oluşturulan kemirgenler relatif olarak daha kolay olan testleri normal olarak başarabilmektedir. Fakat su tankı testi gibi daha kompleks testlerde kemirgenlerin performansları açık olarak bozulmaktadır (31). Diyabetik sıçanlarda uygulanan testin kompleksliğinin artmasıyla, davranışsal protokoldeki değişikliklerle ve diyabetin süresi ile performans bozukluğu belirgin hale gelmektedir (71).

Baydaş ve arkadaşları 60 mg/kg stz ile diyabet oluşturdukları Wistar cinsi sıçanlara, diyabet oluşturulmasından 6 hafta sonra su tankı testi uygulamışlardır. Sıçanlar, iki gün içinde platform bulunmayan havuzda serbest olarak yüzdürüldükten sonra her gün dört deneme olacak şekilde beş gün süresince saklı platform kullanılarak yüzdürülmüştür. Sekizinci gün platform havuzdan kaldırılmış ve probe trial uygulaması yapılmıştır. Beş günlük deneme bloklarında sıçanların EL verilerinin analizinde diyabetik sıçanların performanslarının bozulduğu gösterilmiştir. Probe trial uygulamasında ise sıçanların 'daha önceden platformun bulunduğu kadranda geçirdikleri süre' verilerinin analizinde diyabetik sıçanların hedef kadranda daha az süre geçirdiği gösterilmiştir (54). Bu çalışmada sıçanlarda diyabet oluşturulmasından su tankı testinin uygulanmasına kadar geçen süre (6 hafta) bizim çalışmamızla aynı olmakla birlikte uygulanan protokol bizim protokolümüze tam olarak benzememektedir.

Biessels ve arkadaşları, 40 mg/kg stz ile diyabet oluşturdukları sıçanlarda diyabet oluşturulmasından 10 hafta sonra 5 gün boyunca her gün üç deneme olacak şekilde ve saklı platform kullanarak su tankı testini uygulamışlardır. Sıçanların EL ve PL verilerinin değerlendirilmesi sonucunda diyabetik sıçanların performanslarının bozulduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar daha önceki çalışmalarında diyabetik sıçanlarda görünür platform ile uyguladıkları su tankı testinde diyabet grubundaki ve kontrol grubundaki sıçanların performansları arasında fark bulmadıklarını, bu nedenle su tankı testinde diyabetik sıçanlarda görülen performans bozukluğunda motor defektin etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir (40). Biz çalışmamızda sıçanların su tankı testinde 1-5 günlerdeki V değerlerini analiz ederek D grubundaki sıçanlarda motor bozukluk görülmediği sonucuna vardık. Biessels ve arkadaşlarının çalışmasında, su tankı testinde 1-5. günlerdeki deneme bloklarında elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızda uyguladığımız su tankı testinin deneme bloklarının sonuçları ile benzerdir. Fakat bu çalışmada probe trial uygulaması yapılmamıştır. Bu çalışmada su tankı testi uygulanan sıçanlarda, diyabet oluşturulmasından 11-12 hafta sonra hippocampus'ta LTP (hippocampus CA1 ve CA3 alanlarından kayıtlar yapılarak) invitro olarak ölçülmüş ve diyabetik sıçanlarda LTP oluşmasının bozulduğu gösterilmiştir. Biessels ve arkadaşları diyabetik sıçanlarda hippocampus'ta sinaptik plastisitede ve su tankı testindeki bozulmaların

paralel olarak ortaya çıktığı ve diyabetik sıçanlardaki bu değişikliklerin bu iki parametre arasındaki bağlantının önemini desteklediği sonucuna varmışlardır (40).

Hücresele düzeyde LTP ve LTD öğrenme ve bellek mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda en çok dikkati çeken iki sinaptik plastisite formudur (5). Yine LTP, hücresele düzeyde en çok kabul gören öğrenme ve bellek modelidir. Genel olarak LTP farklı beyin alanlarında oluşan sinaptik plastisite aktivitesine bağlıdır. Hippocampus fonksiyonunun bir yansıması olan sinaptik plastisite, sinaptik şiddetteki değişikliklerin öğrenme ve bellekte değişikliklere yol açması nedeniyle, özellikle dikkat çekmektedir. Kamal ve arkadaşları 60 mg/kg stz ile diyabet oluşturduktan 12 hafta sonra 50-Hz frekansta verdikleri beş ardışık uyarı ile stimüle ettikleri sinapslarda AMPA reseptörlerinin sumasyon cevaplarını değerlendirmişlerdir. Yaptıkları intraselüler kayıtlarda hippocampus'taki pyramidal hücrelerin AMPA sumasyon cevaplarının diyabetik sıçanlarda anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Bu da stz diyabetik sıçanlarda sinaptik cevabın bozulduğunu ve sinaptik plastisitenin değiştiğini göstermektedir (4).

Hippocampus öğrenmenin belirli formlarında rol oynayan bir yapıdır. Hücresele düzeyde hippocampus'ta LTP ve LTD oluşumu öğrenme ve belleğin mekanizmalarının çalışıldığı pek çok çalışmada dikkat çeken iki sinaptik plastisite formudur (5). Stz diyabetik sıçanların hippocampus kesitlerinde LTP oluşumundaki defekt gösterilmiştir. Hippocampus CA1 ve CA3 alanlarında LTP oluşumunun bozulduğu bununla birlikte CA1 alanında LTD oluşumunun arttığı gösterilmiştir. LTP'deki bozulmanın derecesi hipergliseminin şiddeti ve diyabetin süresi ile ilişkilendirilmiştir (72).

Yine başka çalışmada sıçanlarda 60 mg/kg stz ile diyabet oluşturulmasından üç ay sonra Schaffer kollateral-komissural sinapsların hippocampus CA1 nöronları üzerindeki long-term plastisitesinin değerlendirilmesi sonucu diyabetik sıçanlarda LTD oluşumunun arttığı ve LTP oluşumunun inhibe olduğu gösterilmiştir (7).

Kamal ve arkadaşları stz ile diyabet oluşturdukları genç ve yaşlı sıçanlarda, diyabet oluşturulmasından 8 hafta sonra yaptıkları su tankı testinde hem genç hem de

yaşlı sıçanlarda öğrenmenin bozulduğunu göstermişlerdir. Daha sonra bu sıçanların hippocampus kesitlerinden yaptıkları elektrofizyolojik çalışmalarda LTP oluşumunun bozulduğunu göstermişlerdir (5).

Stz ile diyabet oluşturulan sıçanlarda su tankı testinde performans bozuklukları karakteristiktir. Bu performans bozuklukları, LTP oluşumundaki bozukluklarla ilişkilendirilmektedir (5,31,40).

Zhen-Guo Li ve arkadaşları BB/Wor sıçanlarda spontan diyabet geliştikten sonraki ikinci ve sekizinci aylarda su tankı testi uygulayarak sıçanların EL değerlerini değerlendirmişlerdir. İki aylık diyabetik sıçanların EL değerlerinin aynı yaştaki kontrol grubuna göre farklı olmadığını ($p>0,05$), Sekiz aylık diyabetik sıçanların EL değerlerinin ise aynı yaştaki kontrol grubuna göre arttığını göstermişlerdir. Sekiz aylık diyabetik sıçanları aynı kilodaki kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında yine bu diyabetik sıçanların EL değerlerinin artmış olduğunu göstermişlerdir. Bu diyabetik sıçanlarda görülen progresif öğrenme ve belek bozukluğunun vücut ağırlığı ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Yine iki aylık diyabetik sıçanlarda öğrenme ve bellekte bozukluğunun gösterilmemesi diyabetin süresi ile ilişkilendirilmiştir. Aynı araştırmacılar sekiz aylık diyabetik sıçanların hippocampus CA1 ve CA2 alanlarında pyramidal hücrelerde TUNEL pozitif nöronlar tesbit etmişlerdir. Hippocampus'ta nöronal kaybı doğrulamak için yaptıkları nöronal yoğunluk sayımı ile sekiz aylık diyabetik sıçanların CA1 ve CA2 alanlarında nöron yoğunluğunun azaldığını tespit etmişlerdir. Sekiz aylık diyabetik sıçanlarda Bax ekspresyonunun arttığını, Bax/Bcl- X_L oranının arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada kullanılan BB/Wor sıçanlar, pankreas β hücrelerinin immün sistem aracılığı ile yıkımına bağlı spontan olarak diyabet geliştiren, inbred Wistar cinsi sıçanlardır. Yaşamalarını sürdürebilmeleri için insülin tedavisi gereklidir (34). Zaten bu çalışmadaki sıçanlara da insülin tedavisi uygulanmıştır (68). Aynı ekip BB /Wor (hiperglisemik-hipoinsülinemik, Tip 1 diyabetik) sıçanlarda ve Zucker diyabetik sıçanlarda (hiperglisemik-hiperinsülinemik, Tip 2 diyabet) yaptıkları çalışmada BB/Wor sıçanların, Zucker diyabetik sıçanlara göre, CA1 alanlarında nöronal hücre kaybının ve apoptotik aktivitenin arttığını göstermişlerdir. Bu sonuçlarını insülin

defektinin hiperglisemideki nöronal apoptosisi arttırdığı yönünde yorumlamışlardır (73).

Deneysel olarak Tip 1 diyabette elektrofizyolojik bozukluklar, su tankı testi performans bozuklukları, apoptotik hücre kaybı, nöronal yoğunluğun azaldığı gösterilmiştir. Fakat optik parçalama yöntemi ile hücre kaybı ve su tankı testi ile uzaysal öğrenme ve bellekteki performans bozuklukları gösterilmemiştir. Biz bu çalışmamızda, klinikte tip 1 DM ile uyumlu, stz diyabet modeli uygulanan sıçanların hippocampus CA1, CA2-CA3 ve CA1-CA2-CA3 alanlarında nöron sayılarının azaldığını, buna paralel olarak diyabetik sıçanların su tankı testinde öğrenme performanslarının bozulduğunu gösterdik.

SONUÇLAR

Sıçanlarda stz ile oluşturulan diyabetin hippocampus nöron sayısı ve uzaysal öğrenme ve üzerine olan etkilerinin incelendiği bu çalışmada şu sonuçlar elde edildi:

1. Streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda sağ hippocampus'un CA1 ve CA2-CA3 alanlarının stratum pyramidale tabakalarındaki pyramidal nöron sayısı kontrol ve sham gruplarına göre, anlamlı derecede daha az bulunmuştur.
2. Streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlara uygulanan su tankı testinde öğrenme performanslarının, kontrol ve sham gruplarına göre, anlamlı olarak bozulduğu gösterilmiştir.
3. Streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanların su tankı testinin probe trial uygulamasındaki performanslarında kontrol ve sham gruplarına göre fark bulunmamıştır.

Streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabetin sıçanlarda hippocampus'ta pyramidal nöronların azalmasına yol açtığı; bu azalmanın öğrenme performansını bozabileceği ancak bellek oluşumunun tamamen kaybolmadığı sonucuna varılmıştır. Mekanizmaların açıklanması için sinaptik ve biyokimyasal düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL DİYABETİN HIPPOCAMPUS NÖRON SAYISI VE UZAYSAL ÖĞRENMEYE ETKİSİ DR. GÖKŞİN NİLÜFER YONGUÇ

DM'un demans için bir risk faktörü olduğu, öğrenme ve bellekte yetersizliklere yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı deneysel olarak diyabet oluşturulmuş sıçanlarda su tankı testi ile uzaysal öğrenme-belleği değerlendirmek ve hippocampus pyramidal nöron sayısındaki değişiklikleri ortaya koymaktır.

Bu amaçla 4 aylık erişkin, 30 wistar cinsi sıçan Kontrol (K), Sham (S) ve Diyabet (D) olmak üzere üç eşit gruba ayrıldı. D grubunda 60 mg/kg stz'in salin içinde çözdürülerek i.p. olarak enjeksiyonuyla diyabet oluşturuldu. D grubundaki sıçanların streptozotosin enjeksiyonundan sonraki 3. ve 10. günlerde yapılan ölçümlerde kan glukoz düzeyleri 300mg/dl'nin üzerindeydi. Diyabet oluşturulmasından 6 hafta sonra uygulanan su tankı testinde sıçanların performanslarına bakılarak uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonları değerlendirildi. Su tankı tetinden sonra her gruptan rasgele seçilen 6'şar adet sıçan seçilerek dekapite edildi ve beyinleri çıkarıldı. Hippocampus nöron sayıları optik parçalama yöntemiyle tespit edildi.

Sıçanların su tankı testinin beş günlük deneme bloklarında platformu bulmayı öğrendikleri fakat diyabetik sıçanların performanslarının azaldığı gözlemlendi. D grubundaki sıçanlarda motor fonksiyon bozukluğu gözlenmedi. Probe Trial uygulamasında K, S ve D grubundaki sıçanlar arasında fark bulunmadı. D grubundaki sıçanların hippocampus CA1, C2-CA3 ve CA1-CA2-CA3 alanlarında K ve S gruplarına göre nöron kaybı olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak diyabetik sıçanların hippocampus nöron kaybına paralel olarak su tankı testinde performansları azalmıştır. Fakat uzaysal öğrenme ve bellek yetenekleri tamamen kaybolmamıştır.

SUMMARY

EFFECTS OF STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETES ON HIPPOCAMPAL NEURON NUMBER AND SPATIAL LEARNING IN RATS

DR. GÖKŞİN NİLÜFER YONGUÇ

It is known that DM is a risk factor of demantia and it causes learning and memory deficiencies. The aim of this study is to evaluate spatial learning and memory and hippocampal pyramidal neuron number in streptozotocin induced diabetic rats.

To achieve this aim 4 months old, 30 adult Wistar rats were divided in to three groups: Control (K), Sham (S) and Diabetes (D). In group D diabetes was induced by intraperitoneally injection of 60 mg/kg stz dissolved in saline. In group D, at the 3rd and 10th days after stz injection, blood glucose levels of rats were above 300 mg/dl. Rats' spatial larning and memory functions were appraised with their performances in Water maze test six weeks after the induction of diabetes. After water maze test six rats were selected randomly from each group and decapitated. Hippocampal neuron numbers were counted by Optic Fractionator Method.

All rats in each group learned how to find platform at training trail blocks in the following 5 days but rats in group D showed lower performance. Motor performances of rats in group D were uneffected. At probe trial of Water maze test there were no differences between rats in K,S and D groups. In rats of group D neuronal loss were established in their hippocampal CA1, CA2-CA3 and CA1-CA2-CA3 regions according to the groups K and S.

It is the resultant that diabetic rats performances decreased in water maze test as parallelly to their hippocampal neuronal loss. But their spatial learning and memory abilities were not lost completely.

KAYNAKLAR

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Diabetes#Epidemiology> adresinden 19.01.2008 tarihinde ulaşılmıştır.
2. <http://www.turkdiab.org/index.php?id=122&kind=page> adresinden 19.01.2008 tarihinde ulaşılmıştır.
3. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006; 5:64-74.
4. Kamal A, Biessels GJ, Gispen WH, Ramakers GMJ. Synaptic transmission changes in the pyramidal cells of the hippocampus in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Brain Research* 2006; 1073-1074:276-280.
5. Kamal A, Biessels GJ, Duis SEJ, Gispen WH. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diyabetologia* 2000; 43:500-506.
6. Revsin Y, Saravia F, Roig P, Lima A, Ronald de Kloet E, Homo-Delarche F, De Nicola AF. Nueronal and astroglial alterations in the hippocampus of a Mouse model for type 1 diabetes. *Brain Research* 2005; 1038:22-31.
7. Artola A, Kamal A, Ramakers GMJ, Biessels GJ, Gispen WH. Diabetes mellitus concomitantly facilitates the induction of long term depression and inhibits that of long-term potentiation in hippocampus. *European journal of Neuroscience Societies* 2005; 22:169-178.
8. Biessels GJ, Koeffman A, Scheltens P. Diabetes and cognitive impairment. *J Neurol* 2006; 253:477-482.

9. Wu WW, Oh MM, Disterhoft JF. Age-related biophysical alterations of hippocampal pyramidal neurons: implications for learning and memory. *Ageing Research Reviews* 2002; 1:181-207.
10. Markowitsch HJ. Bellek ve Amnezi. In: Mesulam MM. Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin İlkeleri. Çeviri editörü: Gürvit İH. İstanbul: Yelkovan Yayıncılık, 2004: 256-293.
11. Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. Learning and Memory. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. Principles of Neural Science. International Edition: McGraw-Hill Companies, 2000: 1227-1246.
12. Papez JW. Visceral brain, its component parts and their connections. *J Nerv Ment Dis*, 1958; 126(1):40-56.
13. Iversen S, Kupfermann I, Kandel ER. Emotional States and Feelings. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. Principles of Neural Science. International Edition: McGraw-Hill Companies, 2000: 982-997.
14. Crossman AR. Cerebral Hemisphere. In: Standring S, editor. Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice. Spain: Elsevier Ltd, 2005: 387-417.
15. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record* 1991; 231, 482-497.
16. West MJ, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* 1990; 296, 1-22.
17. Witter MP, Amaral DG. Hippocampal formation. In Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. London: Elsevier Academic Pres, 2004: 635-704.

18. Clark DL, Boutros NN. The Brain and The Behavior, An Introduction To Behavioral Neuroanatomy. U.S.A.: Blackwell Science, Inc; 1999: 143-157. Chapter 11 Limbic System: Temporal Lobe.
19. Arıncı K, Elhan A, editörler. Anatomi 2. Cilt. Ankara, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., 1995.
20. Hosseini-Sharifabad M, Nyengaard JR. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Methods* 2007; 162:206-214.
21. Collins P. Development of The Nervous System. In: Standring S, editor. *Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice*. Spain: Elsevier Ltd, 2005: 241-274.
22. Kandel ER. Cellular Mechanisms of Learning and the Biological Basis of Individuality. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of Neural Science*. International Edition: McGraw-Hill Companies, 2000: 1247-1277.
23. Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG, Fuchs PA. From Neuron to Brain. U.S.A., Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2001: 227-242. Chapter 12, Synaptic Plasticity.
24. Kamal A, Biessels GJ, Urban IJA, Gispen WH. Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. *Neuroscience* 1999; 90:737-745.
25. Silvers JM, Tokunaga S, Berry RB, White AM, Matthews DB. Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone and the hippocampus. *Brain Research Reviews* 2003; 43:275-284.
26. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 2002; 35: 625-641.

27. Kessels RPC, Haan EHF, Kappelle LJ, Postma A. Varieties of human spatial memory: a meta analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews* 2001; 35:295-303.
28. Kasper, Dennis L. *Harrison's Manual of Medicine*(16th Edition). Blacklick, OH, USA: McGraw-Hill Companies, 2005; section 13:830-835.
29. The Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus, Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T. Report of the Comittee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2002; 55:65-85.
30. Gavin III JR. New classification and diagnostic criteria for diabetes mellitus. *Clinical Cornerstone. Diabetes*. Vol 1. No 3:1-9.
31. Gispen WH, Biessels G-J. Cognition and synaptic plasticity in diabates mellitus. *Trends Neurosci*. 2000; 23:542-549.
32. Allen D, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2005; 16:705-713.
33. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Aproach*. U.S.A., Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, : 541-589. Chapter 13 Cell Signaling.
34. Biessels GJ, Gispen WH. The impact of diabetes on cognition: What can be learned from rodent diabet models?. *Neurobiology of Aging* 2005; 26: 36-41.
35. Takada J, Machado MA, Peres SB, Brito LC, Borges-Silva CN, Costa CEM, Fonseca-Alaniz MH, Andreotti S, Lima FB. Neonatal streptozotocin-induced

diabetes mellitus: a model of resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism Clinical and Experimental* 2007; 56:977-984.

36. Kamal A, Artola A, Biessels GJ, Gispen WH, Ramakers GMJ. Increased spike broadening and slow after hyperpolarization in CA1 pyramidal cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience* 2003; 118:577-583.
37. D'Hooge, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 2001; 36:60-90.
38. McDonald RJ, Hong NS, Devan BD. The challenges of understanding mammalian cognition and memory-based behaviours: an interactive learning and memory systems approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2004; 28:719-745.
39. Koroğlu Ş. Sıçanlarda deneysel diabetin öğrenmeye etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kayseri, 2004.
40. Biessels GJ, Kamal A, Urban IJA, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Research* 1998; 800:125-135.
41. Florian C, Rouillet P. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice 2004; 154:365-374.
42. Gundersen.HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96:379-394.
43. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator, and

point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 1988; 96:857-881.

44. West MJ. How to count. Neurobiology of Aging 1996;17:503.
45. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. Journal of Microscopy 1984; 134:127-136.
46. West MJ. New stereological methods for counting neurons. Neurobiology of Aging 1993;14:275-285.
47. Oorschot DE. Are you using neuronal densities, synaptic densities or neurochemical densities as your definitive data? There is a better way to go. Progress in Neurobiology 1994; 44:233-247.
48. Coggeshall RE, Lekan HA. Methods for determining numbers of cells and synapses: A case for more uniform standards of review. The Journal of Comparative Neurology 1996;364:6-15.
49. Akdoğan I. Penisilin ile deneysel epilepsi oluşturulan sıçanlarda hippocampus nöron sayılarının optik parçalama yöntemi ile hesaplanması. Doktora Tezi. Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı, 2000.
50. Aslan H. Bir ve yedi günlük civcivlerin hippocampuslarında toplam nöron sayısının optik parçalama metodu ile hesaplanması. Uzmanlık tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Samsun, 1999.
51. Korkmaz A, Ayas B, Bahadır A, Yıldırım Ş. Mikroskopik kantitasyon kursu: Uygulamalı stereoloji kurs dökümanları ve uygulama rehberi 2002. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.

52. West MJ, Ostergaard K, Andreassen OA, Finsen B. Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: An insitu hybridization study using the optical fractionator method. *The Journal of Comparative Neurology* 1996; 370:11-22.
53. Kaplan S, Canan S, Şahin B, Ünal B. Stereolojik metodlar ve uygulamaları kurs kitapçığı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun,1997.
54. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *European Journal of Pharmacology* 2006; 537:106-110.
55. Ateş O, Cayli SR, Yucel N, Altinoz E, Kocak A, Durak MA, Turkoz Y, Yologlu S. Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Clinical Neuroscience* 2007; 14:256-260.
56. Ateş O, Cayli SR, Altinoz E, Yucel N, Kocak A, Tarim O, Durak A, Turkoz Y, Yologlu S. Neuroprotective effect of mexiletine in central nervous system of diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 286: 125-131.
57. Tekök S, Krnjevic K. Diabetes mellitus preserves synaptic plasticity in hippocampal slices from middle-aged rats. *Neuroscience* 1999; 91 No:1:185-191.
58. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1984; 11:47-60.
59. Baydas G, Özer M, Yasar A, Tuzcu M, Koz ST. Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. *Brain Research* 2005; 1046:187-194.
60. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain In Stereotaxic coordinates*: China: Elsevier Inc, 2007.

61. Adıgüzel E, Düzcan SE, Akdogan I, Tufan AC. A simple low-cost method for two dimensional microscopic measuring and stepping on the microscopic plate. *Neuroanatomy* 2003; 2:6-8.
62. Secaucus NJ. Brain in crisis. In: Lutz PL, editor. *The Brain Without Oxygen: Causes of failure – Physiological and molecular mechanisms for Survival*. U.S.A.: Kluwer Academic Publishers, 2003: 61-101.
63. Li Z, Zhang W, Sima AAF. The role of impaired insulin/IGF action in primary diabetic encephalopathy. *Brain Research* 2005; 1037:12-24.
64. Fujita R, Ueda H. Protein kinase C-mediated cell death mode switch induced by high glucose. *Cell Death and Differentiation* 2003; 10:1336-1347.
65. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Yoshimura S, Taniyama Y, Aoki M, Matsubara H, Kim S, Kanede Y, Ogihara T. Phosphorylation of p38 Mitogen Activated Protein Kinase downstream of Bax-Caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells. *Diabetes* 2001; 50:1472-1481.
66. Fiordaliso F, Leri A, Ceselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P, Kajstura J. Hyperglycemia activates p53 and p53- regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 2001; 50:2363-2375.
67. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiology of Disease* 1999; 6:347-363.
68. Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AAF. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Research* 2002; 946:221-231.
69. Hoz L, Moser EI, Morris RGM. Spatial learning with unilateral and bilateral hippocampal Networks. *European Journal of Neuroscience* 2005; 22:745-754.

70. Redish AD, Touretzky DS. The role of hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Computation* 1998; 10:73-111.
71. Popović M, Biessels GJ, Isaacson RL, Gispen WH. Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task. *Behavioural Brain Research* 2001; 122:201-207.
72. Kamal A, Biessels GJ, Urban IJA, Gispen WH. Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long term depression. *Neuroscience* 1999, 90:737-745.
73. Belanger A, Lavoie N, Trudeau F, Massicotte G, Gagnon S. Preserved LTP and water maze learning in hyperglycaemic-hyperinsulinemic ZDF rats. *Physiology & Behavior* 2004; 83:483-494.