



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANATOMİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

**SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ  
DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞI'NDA FESLEĞEN  
ÖZÜTÜNÜN ( OCİMUM GRATİSSİMUM ) HİPOKAMPUS  
NÖRON KAYBINDA KORUYUCU ETKİSİ VE UZAYSAL  
HAFIZAYA DAVRANIŞ TESTLERİNE YANSIMASI**

**DANIŞ AYGÜN**

Ocak 2021  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ DENEYSEL  
ALZHEİMER HASTALIĞI'NDA FESLEĞEN ÖZÜTÜNÜN ( OCİMUM  
GRATİSSİMUM ) HİPOKAMPUS NÖRON KAYBINDA KORUYUCU  
ETKİSİ VE UZAYSAL HAFIZAYA DAVRANIŞ TESTLERİNE  
YANSIMASI

ANATOMİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

Danış AYGÜN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR

Denizli, 2021

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar" gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-1 **Aygün D**, Ekici S, Akyer Ş.P. "Morphometric measurements of the students of Pamukkale University, Faculty of Dentistry and the effects on their success in applied courses." **Anatomy: International Journal of Experimental & Clinical Anatomy 13.**

Ek-2 **Aygün D**, Kurbetli N, Akyer Ş.P. "Türkiye'deki Anatomi yayınlarının bibliyometrik analizi" **Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi Temel Tıp Bilimleri Tam Metin Kitabı, 2020.**

Ek-3 **Aygün D**, Zeybek V. "Anatomi eğitiminde sosyal medya; bibliyometrik analiz" **Uluslararası Sağlık Yönetimi ve Stratejileri Araştırma Dergisi**

Ek-4 Pamukkale Üniversitesi hayvan deneyleri etik kurul onam belgesi



Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğinin ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı: Daniş AYGÜN

İmza:

## ÖZET

### SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ DENEYSSEL ALZHEİMER HASTALIĞI'NDA FESLEĞEN ÖZÜTÜNÜN (OCİMUM GRATISSİMUM) HİPOKAMPUS NÖRON KAYBINDA KORUYUCU ETKİSİ VE UZAYSAL HAFIZAYA DAVRANIŞ TESTLERİNE YANSIMASI

Danış AYGÜN

Doktora Tezi, Anatomi AD.

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR

Ocak 2021

Alzheimer Hastalığı yaşa bağlı demansların en sık sebebidir. Bu hastalık progresif, dejeneratif yaygın bir santral sinir sistemi hastalığıdır. Nöron kaybı Hippocampus piramidal hücrelerinde daha belirgindir. Tedavisi için çeşitli ajanlar bilinmesine rağmen daha güçlü veya kesin bir tedavi henüz bulunamamıştır. Alzheimer Hastalığı, diyabetes mellitus hastalarının yarısından fazlasında görülmektedir. Bu iki hastalık arasındaki ana benzerlik insülin direnci ve inflamatuvar yolaklardır. Bu yüzden Alzheimer Hastalığı Tip 3 Diyabet olarak da isimlendirilmektedir. Fesleğen (Ocimum Gratissimum)'in antidiyabetik etkisi bilinmekte ve kullanılmaktadır. Fakat Alzheimer Hastalığı'ndaki davranışsal ve nöroprotektif etkisi henüz yeterli şekilde çalışılmamıştır. Bizim amacımız, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan Alzheimer Hastalığı deneysel sıçan modelinde, fesleğenin Hippocampus piramidal hücreleri üzerindeki anti-apoptotik etkisini göstermek ve buna paralel olarak sıçanlarda öğrenme ile ilgili davranışı test etmektir. Bu amaçla, Wistar cinsi 33 adet 4 aylık erişkin erkek sıçanlar alınıp, kontrol, sham, STZ ve fesleğen grupları ile beraber fesleğen-STZ grubu oluşturuldu. Uygun şartlarda bakılan hayvanların hepsine 8 kollu radial maze testi öğretildi. Kontrol grubu sıçanlara deneysel hiçbir şey enjekte edilmedi. Sham grubuna serum fizyolojik (SF), fesleğen grubuna fesleğen SF'de çözülerek intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. STZ, i.p. olarak verildi ve sıçanların kan şekerleri ölçüldü. Son olarak STZ ile beraber fesleğen özütü sıçanlara i.p. olarak beraber verildi. Tüm sıçanların kan şekerleri ve ağırlıkları düzenli ölçüldü. Tüm gruptaki sıçanlara 8 kollu radial maze testi yapıldıktan sonra, sıçanlar dekapite edildi ve beyinlerinden histolojik yöntemler ile kesitler alınıp Tunnel boyama ile Hippocampus'taki tüm apoptotik hücreler sayıldı. İstatistiksel analiz (ANOVA) ile tüm gruplar karşılaştırıldı. STZ ile uzaysal öğrenmesi bozulan sıçanlarda fesleğen özütü ile beraber istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde öğrenme davranışı düzeldi ( $p<0,05$ ). Buna paralel olarak fesleğen, Hippocampus CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki apoptotik nöron kaybını, STZ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttı ( $p<0,05$ ). Sonuçta, fesleğen özütü, Alzheimer Hastalığı'na benzer şekilde, STZ'nin sebep olduğu Hippocampus nöron kaybına karşı nöroprotektif etki göstermiş ve buna paralel uzaysal öğrenme davranışını korumuştur. Bu çalışma, fesleğen özütünün Alzheimer Hastalığı'nda kullanılması yönünde ileride yapılacak moleküler ve klinik çalışmalar için önemli bir kaynak olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Alzheimer Hastalığı, Diabetes Mellitus, Deneysel Alzheimer Hastalığı, STZ, Fesleğen (Ocimum Gratissimum), Hippocampus, 8 kollu radial maze testi, apoptozis

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2019SABE024).**

## ABSTRACT

### PROTECTIVE EFFECT OF HIPOCAMPUS NEURON LOSS AND BEHAVIOR TO SPACE MEMORY TESTS IN EXPERIMENTAL ALZHEIMER DISEASE INDUCED WITH STREPTOSOTOCIN IN RATS

Daniş AYGÜN

PhD Thesis in Anatomy

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR (MD. PhD)

January 2021

Alzheimer's Disease is the most common cause of age-related dementia. This disease is a progressive, degenerative central nervous system disease. Neuron loss is more pronounced in Hippocampus pyramidal cells. Although various agents are known for its treatment, a stronger or definitive treatment has not yet been found. Alzheimer's Disease is seen in more than half of diabetes mellitus patients. The main similarities between these two diseases are insulin resistance and inflammatory pathways. Therefore, Alzheimer's disease is also called Type 3 Diabetes. The antidiabetic effect of Basil (*Ocimum Gratissimum*) is known and used. However, its behavioral and neuroprotective effect in Alzheimer's Disease has not been sufficiently studied yet. Our aim is to demonstrate the anti-apoptotic effect of basil on Hippocampus pyramidal cells in an experimental rat model of Alzheimer's disease induced by streptozotocin (STZ) and in parallel to test learning-related behavior in rats. For this purpose, 33 male Wistar rats, 4 months old, were taken and the basil-STZ group was formed together with the control, sham, STZ and basil groups. 8-arm radial maze test was taught to all animals that were kept under suitable conditions. The control group rats were not experimentally injected with anything. Saline (SF) was given to the sham group, and basil was dissolved in SF to the basil group and administered intraperitoneally (i.p.). STZ was given as i.p. and blood sugars of rats were measured. Finally, STZ and basil extract were given to rats together as i.p. . Blood glucose and weight of all rats were measured regularly. After the 8-armed radial maze test was performed on the rats in all groups, the rats were decapitated and their brains were sectioned by histological methods and all apoptotic cells in the Hippocampus were counted with Tunnel. All groups were compared by statistical analysis (ANOVA). In rats whose learning was impaired with STZ, learning behavior improved in a statistically significant way with basil extract ( $p < 0.05$ ). In parallel, basil Hippocampus significantly reduced neuron loss in CA1, CA2 and CA3 areas when compared to STZ ( $p < 0.05$ ). As a result, basil extract showed a neuroprotective effect against the loss of Hippocampus neuron caused by STZ, similar to Alzheimer's disease, and maintained learning behavior parallel to this. This study will be an important resource for future molecular and clinical studies on the use of basil extract in Alzheimer's disease.

**Keywords:** Alzheimer's disease, Diabetes Mellitus, experimental Alzheimer disease, STZ, Basil (*Ocimum Gratissimum*), Hippocampus, 8 arm radial mase test, apoptosis

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit ( Project numbers: 2019SABE024)**

## TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'ndaki eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime katkı sağlayan ve tezimin hazırlanması sürecinde değerli katkılarıyla ve emekleriyle yardımını esirgemeyen ve beni yönlendiren kıymetli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR hocama,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana sağladıkları katkılarından dolayı Anatomi Anabilim Dalındaki değerli Hocalarım Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL'e, Doç. Dr. Şahika Pınar AKYER'e, Doç. Dr. Özgür Barış DÖNMEZ'e ve Dr. Öğr. Üyesi Şule ONUR'a,

Asistanlığımın başlangıcından bu güne kadar beraber çalışmış olduğum tüm asistan arkadaşlarım ve anabilim dalı çalışanlarımıza,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını eksik etmeyen Bilge SARIKEPE, Nuriye KURBETLİ ve Gül NEŐET'e,

Hayatım boyunca yanımda olduklarını hissettiğim annem, babam ve ablama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Danış AYGÜN



# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Amaç.....	<b>2</b>
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>4</b>
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	<b>4</b>
2.1.1. Epidemiyoloji.....	<b>4</b>
2.1.2. Klinik Özellikleri.....	<b>4</b>
2.1.3. Patolojisi.....	<b>5</b>
2.1.4. Patogenezi.....	<b>7</b>
2.1.5. Alzheimer Hastalığı Ve Diabetes Mellitusun Mekanizması Arasındaki Benzerlikler..	<b>8</b>
2.1.6. Alzheimer Hastalığı'nda Tedavi.....	<b>9</b>
2.1.6.1. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Bitkilerin Kullanılması.....	<b>9</b>
2.2. Fesleğen(Ocimum Gratissimum).....	<b>10</b>
2.3. Limbik Sistem ve Hipokampus Anatomisi.....	<b>11</b>
2.4. Hipokampus Histolojisi.....	<b>14</b>
2.5. Hipokampus Fizyolojisi ve Bellek.....	<b>15</b>

2.6. Streptozotosin İle Alzheimer Model Oluşturma .....	17
2.6.1 Streptozotosin Uygulanan Sıçanların Özellikleri.....	17
2.7. Hipotez.....	18
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>19</b>
3.1. Deney Hayvanları.....	19
3.2. Sıçanlarda Streptozotosin İle Deneysel Diyabet Oluşturulması.....	19
3.3. Sekiz Kollu Labirent Testi Uygulanması.....	20
3.4. Hayvanların Dekapite Edilmesi, Kranyotomi Ve Boyama İşlemlerine Hazırlık.....	22
3.4.1. Kesitlerin Hazırlanması ve Boyanması.....	23
3.4.2. Hematoksilen ve Eozin Boyama.....	24
3.4.3. Apoptozis için TUNNEL Uygulama.....	24
3.5. İstatistiksel Yöntemler.....	28
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>29</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>39</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>46</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>47</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>53</b>
<b>9. EKLER.....</b>	<b>54</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 2.1</b> İnsülin sinyalizasyonunun kısa açıklaması.....	8
<b>Şekil 2.2</b> Alzheimer Hastalığı'nda T2DM/ İnsülin direncinin şematik gösterimi ....	9
<b>Şekil 2.3</b> Hipokampal anatominin karşılaştırılması.....	14
<b>Şekil 2.4</b> Kontrol grubunda Hipokampus ve gyrus dentatus transvers eksenine boyunca koronal kesit .....	15
<b>Şekil 3.1</b> Sekiz kollu labirent testinin şematize edilmiş hali. ....	21
<b>Şekil 3.2</b> Anestezide kullanılan maddeler.....	22
<b>Şekil 3.3</b> Streptozotosin.....	22
<b>Şekil 3.4</b> Deney Hayvanları Cerrahi İşlem Pozisyonu.....	23
<b>Şekil 3.5</b> Beyin Üstten Görünüm.....	23
<b>Şekil 3.6</b> Beyin Alttan Görünüm.....	23
<b>Şekil 3.7</b> Beyin İkiye Ayrılmış Görünüm.....	23
<b>Şekil 4.1</b> Sekiz kollu radial maze zaman testinde öğrenme grafiği .....	30
<b>Şekil 4.2</b> Sekiz kollu radial maze zaman testinde hata grafiği .....	30
<b>Şekil 4.3</b> Sekiz Kollu Radial Maze testi bitirme zaman grafiği.....	31
<b>Şekil 4.4</b> Sekiz Kollu Radial Maze testi hata grafiği.....	32
<b>Şekil 4.5</b> Gruplardaki tüm ratların ağırlık grafiği.....	33
<b>Şekil 4.6</b> Grupların test sonu kan glikoz seviyeleri.....	34
<b>Şekil 4.7</b> Grupların Hippocampus CA1, CA2, CA3 alanlarındaki Apoptotik ve normal hücre dağılımı.....	36
<b>Şekil 4.8</b> Grupların Hippocampus CA1, CA2, CA3 alanlarındaki hücre sayıları..	36
<b>Şekil 4.9</b> Sham grubunun HE boyaması .....	37
<b>Şekil 4.10</b> Kontrol grubunun HE boyaması; .....	37
<b>Şekil 4.11</b> STZ+FES grubunun Tunnel boyaması .....	38
<b>Şekil 4.12</b> FES grubunun Tunnel boyaması .....	38
<b>Şekil 4.13</b> STZ grubunun Tunnel boyaması .....	38

## TABLOLAR DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 3.1</b> Maze Testi Uygulama Takvimi .....	21
<b>Tablo 3.2</b> Tunnel apopitozis kiti içeriği .....	24
<b>Tablo 3.3</b> Doku parafinden arındırma prosedürü .....	25
<b>Tablo 3.4</b> DNase I solüsyonu .....	26
<b>Tablo 3.5</b> TdT reaksiyon karışımı .....	26
<b>Tablo 3.6</b> HRP- Streptavidin boyama solüsyonu .....	27
<b>Tablo 3.7</b> DAB boyama solüsyonu .....	28
<b>Tablo 4.1</b> Testi bitirme zamanlarına göre edinme-öğrenme (acquisition) zaman ve hata tablosu.....	29
<b>Tablo 4.2</b> Sekiz Kollu Radial Maze testi bitirme zamanları.....	31
<b>Tablo 4.3</b> Sekiz Kollu Radial Maze testi hata sayısı .....	32
<b>Tablo 4.4</b> Test sonucundaki ağırlıklar.....	33
<b>Tablo 4.5</b> Grupların test sonu kan glikoz seviyeleri .....	34
<b>Tablo 4.6</b> Grupların Hippocampus CA1, CA2, CA3 alanlarındaki Apopitotik ve normal hücre sayıları.....	35

**SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ**

AH.....	Alzheimer Hastalığı
APP.....	Amiloid prekürsör protein
A $\beta$ .....	Amiloid beta
betaAPP.....	Amiloid prekürsör protein
Bcl2.....	B-cell leukemia/lymphoma2
BIM.....	Bcl benzeri protein
CA1.....	Kornu Ammonis 1
CA2.....	Kornu Ammonis 2
CA3.....	Kornu Ammonis 3
CA4.....	Kornu Ammonis 4
Cm.....	Santimetre
Dk.....	Dakika
DI.....	Desilitre
DM.....	Diabetes mellitus
EC.....	Entorhinal korteks
FES.....	Fesleğen
FOXO.....	Forkhead box protein
GABA.....	Gamma amino butrik acit
GD.....	Gyrus dentatus
Grp.....	Grup
GSK3 $\beta$ .....	Glikoz sentaz kinaz 3 beta
HE.....	Hematoksilen Eozin

IR.....	İnsülin reseptörü
IRS.....	İnsülin reseptör substratı
İP.....	İntraperitoneal
İV.....	İntravenöz
JNK.....	c-Jun N-terminal kinaz
KBB.....	Kan beyin bariyeri
Kg.....	Kilogram
KGD.....	Kan glikoz değeri
Mg.....	Miligram
NFY.....	Nörofibriler yumak
NINCDS.....	Ulusal nörolojik ve iletişimsel bozukluklar ve inme enstitüsü
NMDA.....	N- metil- D- aspartaz
OB.....	Ocimum basilicum
PIP2.....	Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfat
PIP3.....	Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat
PI3K.....	Fosfatidil inositol 3 kinaz
PKB.....	Protein Kinaz B
RNS.....	Reaktif azot türleri
ROS.....	Reaktif oksijen türleri
SD.....	Seçim doğruluğu
Sn.....	Saniye
STZ.....	Streptozotosin
T1DM.....	Tip 1 Diabetes mellitus
T2DM.....	Tip 2 Diabetes mellitus

## 1. GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı yaşa bağlı demansların en sık sebebidir ve progresif, dejeneratif bir santral sinir sistemi hastalığıdır. 1906 yılında nöropatoloji uzmanı Alman Alois Alzheimer tarafından tanımlanmış bu hastalık şu anda 24 milyon kişiyi etkilemektedir. Alzheimer Hastalığı'nda hafıza kaybı, davranış değişikliği ve yaşam aktivitelerini etkilenmesi karakterize bulgulardır. Alzheimer Hastalığı, merkezi sinir sisteminin çeşitli kısımlarında nöron ve sinaps kayıpları sebebiyle ortaya çıkan bilişsel işlevlerde azalma, öz bakım yetersizlikleriyle çeşitli nöropsikiyatrik ve davranış bozukluklarının olduğu ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (Gilman 1997).

Alzheimer Hastalığı patogeneğinde beta amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar vardır. Moleküler mekanizmasında ise ekstrasellüler beta amiloid plakların kümeleşmesi etkilidir ve nörofibriler tau yumakları nörodejeneratif bozukluklardan sorumludur (Watanabe, Iwasaki et al. 2008). Alzheimer Hastalığı kapsamında deneysel Alzheimer modellerinde hastalığın mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır (Özdemir, Erdogan et al. 2013; Yonguc, Ozdemir et al. 2014). Alzheimer Hastalığı'nın mekanizmalarının ortaya konması tedavi seçeneklerini de arttıracaktır.

Alzheimer Hastalığı'nın tedavisinde birçok ilaç kullanılmaktadır. Fakat hastalığın kesin tedavisi yoktur. Kalsiyum kanal blokerleri ve asetilkolin esteraz inhibitörleri günümüzde yaygın uygulanan mevcut tedavilerdendir. Bu yüzden daha çok hastalığın semptomlarını kontrol altına almaya ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Hormon terapileri, antioksidanlar, antiinflamatuvar ilaçlar ve aşular Alzheimer Hastalığı tedavisi için araştırılmaktadırlar. Çin ve Ayurveda kültürü başta olmak üzere birçok yerde birçok farklı zamanda kullanılan medikal bitkilerin kullanılması da günümüzde artmaktadır. Bu medikal bitkiler özellikle hafıza güçlendirici olarak da kullanılmaktadır. Bu bitkilerden bir grup da Labiatae familyasından bir bitki olan fesleğen (*Ocimum gratissimum*) 'dir. Bu bitki enfeksiyon, diyare ve özellikle diyabette kullanılmaktadır, hipoglisemik etkisi önemlidir.

Alzheimer Hastalığı, diyabetes mellitus hastalarının %50-60'nda görülmektedir. Bu iki hastalık arasındaki ana benzerlik insülin direnci ve inflamatuvar yolaklardır. Birçok çalışma Alzheimer Hastalığı'nda tau proteininin hiperfosforilasyonunun ve beta amiloidlerin anormal kümeleşmelerinin diyabeti olmayanlara göre diyabetlilerde daha fazla olduğunu göstermektedir. Alzheimer Hastalığı bozulmuş glikoz regülasyonu ve insülin direnci nedeniyle Tip 3 Diyabet olarak da isimlendirilmektedir. Alzheimer Hastalığı'nın moleküler mekanizması ile diabetes mellitus'un moleküler mekanizmasındaki benzerlikler göstermektedir. Bu hastalıkların Hippocampus'ta

yaptığı dejeneratif bozukluklar en belirgin bulgulardır. Bu bilgiler ışığında, fesleğenin Hippocampus'taki dejenerasyonu önleyebileceğini düşündük. Fesleğen 'e baktığımızda baş ağrısı, diyabetes mellitus, bakteriyel enfeksiyon, diyare ve gastrit tedavisinde kullanıldığını görmekteyiz. Bu bitkinin dünyanın farklı bölgelerinde farklı alt türleri yetişmektedir. Fesleğenin özellikle hipoglisemik etkisi Alzheimer Hastalığı tedavisi için önemlidir. Bunun etki mekanizması hakkında henüz kesinleşmiş bir bulgu yoktur fakat GLUT 4 translokasyonu ile ilgili çalışmalar da yapılmalıdır.

Bu hipotezi doğrulamak için deneysel Alzheimer modeli oluşturmak istedik. Bunun için de streptozotosin (STZ)'yi seçtik. Moleküler olarak baktığımızda bu ratlarda STZ' nin insülin baskılaması yaptığını ve tau protein fosforilasyonu arttırdığını biliyoruz. Yaptığımız önceki çalışmalarda STZ'nin özellikle Hippocampus'taki CA1, CA2 ve CA3 alanlarında piramidal hücre dejenerasyonu yaptığını gözlemledik.

Dejenerasyona giden hücreler genellikle apoptotik hücrelerdir. Bu apoptotik hücreleri belirlemek için histokimyasal yöntemler içinde Tunnel boyama yöntemini seçtik. Tunnel boyama yapmak için Wistar cinsi ratlarda dekapitasyon sonrası beyin kesitleri planladık.

Sekiz kollu radial labirent davranış testi ratlarda özellikle hipokampustaki hasar sonucunda oluşan kognitif bozuklukları değerlendirmede doğru bir testtir. Çalışan belleği (working memory) ve referans belleği (reference memory) zaman ve hata ölçekleriyle ölçmemizi sağlayan en iyi uzaysal öğrenme testlerinden biridir. Hüresel değişimleri davranış testi ile korele etmek için sekiz kollu radial maze testini yapmaya karar verdik. Histolojik yöntemlerle elde edilen hipokampus hücre sayılarının davranış testi sonuçlarıyla değerlendirilmesi bulguların gücünü arttıracaktır.

Deneysel Alzheimer Hastalığı'nda fesleğen özütünün nöron koruyucu etki mekanizmasının ve buna paralel olarak öğrenmedeki etkisinin ortaya konması Alzheimer Hastalığı'nın anlaşılması ve tedavi alternatiflerinin artırılması açısından literatüre katkı sağlayacaktır.

## 1.1 Amaç

Fesleğen antidiyabetik etkisi daha önceki çalışmalarla ortaya konmuş bir bitkidir. Nöroprotektif etkisinin mekanizmalarıyla ortaya konması bu bitkinin aynı zamanda yaygın görülen nörodejeneratif hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılmasının yolunu açacaktır. Mevcut kullanılan tedavi yöntemleri demans, Alzheimer, Parkinson gibi yaşın ilerlemesiyle beraber görülen yaygın hastalıklarda kesin tedavi çözümü olamamışlardır. Bu çalışmadaki amacımız fesleğenin deneysel olarak nöroprotektif etkisinin ortaya



konması, mekanizmaların açıklanması ile literatüre yeni bir tedavi alternatifi olarak kazandırılmasının önünü açıp, literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırmak ve literatüre katkıda bulunmaktır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı beynin dejeneratif hastalıklarından en sık görüleni ve buna bağlı olarak da en önemlisidir. Bu hastalık her geçen gün daha çok kişiyi etkilemekte ve zamanla artan sosyal bir etki oluşturmaktadır.

Gerek beyin boyutunda küçülmeye gerekse beyin ağırlığında azalmaya sebep olan atrofi yaşlanma süreciyle ilişkili olsa da birkaç sene içinde ortaya çıkan şiddetli derecede bir serebral atrofi demansla ilgilidir. Altta yatan patolojik değişiklikler de Alzheimer Hastalığı ile ilişkilidir. Alzheimer Hastalığı'nın erken evrelerinde serebral atrofi Hippocampus ve temporal lobların medial loblarında görülmektedir.

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

Alzheimer Hastalığı daha çok ileri yaş grubunda görülse de göreceli olarak daha az hasta ellili yaşlarda veya daha genç yaş gruplarında da görülmektedir. Sinir sisteminin dejeneratif hastalıklarından en sık görüleni Alzheimer Hastalığı'dır(Adams 1997). Alzheimer Hastalığı'nın diğer olası risk faktörlerine bakıldığında düşük eğitim seviyesi, Down sendromu, bilinç kaybına neden olabilen kafa travmaları, kalp krizi öyküsü ve atrial fibrilasyon gibi kalp rahatsızlıkları sayılabilir, depresyon ve alkol kullanımının da risk faktörleri arasında olduğunu ileri süren çalışmalar da vardır (Gilman 1997).

#### 2.1.2. Klinik özellikleri

Mental değişikliklerin başlangıcı çok zor anlaşılabilen ve ne yazık ki sinsi bir şekilde ilerlemektedir. Hastalar bu değişimleri fark edemediği gibi çoğunlukla hasta yakınları da fark edememektedirler. Bu değişiklikler bazen önemli ve normalde olmaması gereken durumlar olduğunda, örneğin cerrahi bir operasyon ya da kafa travması gibi, dikkat çekebilmektedir.

Alzheimer Hastalığı'nın temel semptomu yavaş yavaş gelişen unutkanlıklardır. Bu durumda önce basit günlük olaylar unutulmaktadır. Özellikle seyrek kullanılan isimler, seyrek kullanılan kelimeler, takvimde planlanan işler hatırlanmamaktadır. Bu süreçte Alzheimer hastalarında konuşma esnasında konuşulan konuyu bile unutkanlık durumu olabilmekte, aynı soruları tekrar tekrar sorabilmekte, hatta kullandığı eşyaların yerlerini untabilmektedirler. Hastaların uzak hafızalarını koruyup yakın hafızalarını kaybettikleri yönünde söylemler tamamen doğru değildir, yapılan bir

çalışmada hastaların tüm dekadlarında az da olsa unutma durumu olduğunu göstermişlerdir (Adams 1997).

Hafıza bozukluğu belirgin bir hale geldikten sonraki dönemde serebral işlevlerdeki yetersizlikler artar ve bu artış ağır klinik bulgular ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Öyle ki hasta konuşurken kullanacağı kelimeleri o kadar unutmaktadır ki duraksayarak konuşmaya başlar. Sonrasında kullandığı kelimeler iyice azalmakta, konuşma donuk bir hale dönüşmektedir. Bu tür lisan bozuklukları hastalık ilerledikçe belirginleşir ve yıllar içerisinde hastalar tam cümle kuramaz ve çok az şeyi anlatabilir hale gelirler. Herhangi bir soru yöneltildiğinde hastalar soruyu tekrarlayıp öyle cevaplandırır. Cevap verirken de kullanılan kelimeleri tekrarlamaktadırlar ki buna ekolali denir. Sonraki zamanlarda kelimeler ve heceler zorla söylenmekte ve buna bağlı olarak da isimler söylenemez hale gelmektedirler ki buna da anomik afazi denir. Anomik afaziye reseptif afazi ve eksekütif afazi de eklenir. Genel olarak zihinsel aktivitelerin git gide azaldığı ve konuşmaların duraksayıp donuklaştığı görülmektedir. Aynı zorluklar yazıda da görülür. Hastaların yazabildikleri kelimeler azalmaktadır ve zamanla çok az şeyi anlaşılır şekilde yazabilirler. Matematiksel işlem becerileri de aynı şekilde geriler ve basit hesaplamaları bile yapamazlar (Linn 2014).

Alzheimer Hastalığı'nı belirlemek için National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) ve the Alzheimer's Disease and Related Diseases Association bazı tanı kriterleri önermişlerdir. Bunlar; (1) Hastanın 40 yaş üstü olması, (2) klinik muayenede Mini- Mental skala yapılması, (3) kognisyon alanlarından en az ikisinde defisit ve hafıza- lisan, algı- motor becerileri gibi kognitif işlevlerin ilerleyerek kötüleşmesi, (4) bilincin sağlıklı olması ve (5) diğer nörolojik hastalıkların olmamasıdır. Bu beş kriterle %85 ve üzeri oranda tanı koyulabilmektedir (McKhann, Knopman et al. 2011).

### **2.1.3. Patolojisi**

Alzheimer Hastalığı'nda nöronların kaybına ve gliozisin başlamasına bağlı olarak serebral kıvrımları daralıp sulkusları genişleyen ileri evredeki Alzheimer hastasının beyni yaygın bir atrofi ve buna bağlı olarak da %20 oranında ağırlık kaybı ile kendini belli etmektedir (Allan H. Ropper 2006).

Alzheimer Hastalığı'nın makroskopik olarak patolojik bulgularında atrofının beyinde yaygın olduğu, giruslarda daralma ile sulkuslarda genişlemenin olduğu görülmektedir (Özkay, Öztürk et al. 2011). Nöronlar içerisinde biriken nörofibriller yumaklar (NFY), ekstrasellüler biriken amiloid plaklar ve bunlara eşlik eden nöron

kayıpları da mikroskobik değişiklikler olarak görülmektedir (Lopes, Oliveira et al. 2009). NFY patolojik olarak incelendiğinde beyindeki klinik belirtilere paralel bir ilerlemenin olduğu, amiloid plaklarla ise kliniğin arasında ise böyle bir paralelliğin olmadığı görülmüştür (Duyckaerts, Panchal et al. 2009). NFY yapıları mikrotubul bağlantılı Tau proteininin hiperfosforile hali ile hücre gövdelerinde ve dendritlerde biriken çift sarmal iplikçiklerden oluşmaktadır (Octave and Pierrot 2008). Tau proteininin hiperfosforile olmasını düzenleyen nedenin kinazlarla fosfatazların aktiviteleri arasındaki dengesizlik olabileceği de ileri sürülmüştür (Chung 2009). Hiperfosforile hale gelmiş Tau proteininin mikrotubuler ile etkileşimi azaldığında hücre aktivitelerinin bozulabileceği de bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Mohandas, Rajmohan et al. 2009). Sonuçta Alzheimer Hastalığı senil plaklarda APP den türemiş olan amiloid betanın hücre dışında birikmektedir (Octave and Pierrot 2008). Bu birikimi engelleyen iki yolak vardır, bunlar alfa sekretaz ve gama sekretaz enzimlerinin oluşturduğu bir yolak ile beta sekretaz ve gama sekretaz enzimlerinin oluşturduğu ikinci yolaktır (Hooper 2005; Kolev, Ruseva et al. 2009) . İkinci yolakta  $A\beta_{1-40}$  ve  $A\beta_{1-42}$  vardır.  $A\beta$  nın %90 a yakını  $A\beta_{1-40}$  dır, ancak amiloid birikiminde  $A\beta_{1-42}$  ana bileşendir (Silvestrelli, Lanari et al. 2006). Hüresel olarak zarara sebep olan nörotoksik Amiloid beta mitokondriyal ve sinaptik hasara ve tau proteininin hiperfosforilasyonu ile etki etmektedir (Reddy and Beal 2008).

Alzheimer Hastalığı'nda öğrenmede ve dikkat arttırmada etkili olan ACh seviyelerinde değişiklikler de görülmüştür (Fisher 2008). ACh gibi nöromediyatörlerin düzeylerinde en çok değişiklik ACh seviyesinde olmuştur (Mattson 2004). Bu seviyeyi etkileyen olay da ACh sentezinin azalmasıdır ki bunu azaltan kolinasetiltransferaz enziminin miktarının ve fonksiyonunun azalmasıdır. Aynı zamanda nikotinik reseptörlerde ve presinaptik M2 muskarinik reseptörlerdeki azalma da gösterilmiştir, ki bu reseptörle öğrenme ve bellek üzerinde etkisi olan reseptörlerdir (Fisher 2008), Alzheimer Hastalığı'ndaki psikiyatrik bozuklukların, depresyon, anksiyete, psikoz ve ajitasyon gibi, kolinerjik kayıplarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Grossberg 2002). Kolinerjik fonksiyonların azalmasıyla birlikte serotonerjik ve dopaminerjik nörotransmitterlerde değişiklikler de bu durumda etkilidir (Grossberg 2002; Tanaka, Meguro et al. 2003).

Mikroskobik olarak baktığımızda ise büyük ölçüde sinir hücrelerinin kaybı vardır ve bu kayıp erken dönemde entorhinal korteksin 2. tabakasında belirgindir. Sinir hücrelerinin kaybı hipokampusu yakın parahipokampal giruslarda ve subikulumda, anterior talamik çekirdeklerde, septal çekirdeklerde, amigdalada ve monoaminerjik beyin sapı alanlarında da görülmektedir. Serebral kortekste sinir hücrelerinden özellikle büyük piramidal nöronlar kaybedilir. Bu değişikliklere ek olarak senil plaklar, nörofibriler

yumaklar ve nöron kaybı vardır ki bu üç önemli mikroskobik değişiklik Alzheimer Hastalığı'na karakteristiktir (Allan H. Ropper 2006).

Nöritik plaklar ve yumaklar korteksin bütün asosiasyon alanlarında görülse de yumakların miktarı ile demans şiddeti orantılı şekilde artmaktadır (Arriagada, Growdon et al. 1992). Beynin her bölümü aynı oranla etkilenmemektedir, orantısız etkilenen bölgelere örnek olarak hipokampus ve amigdala'yı verebiliriz. Hipotalamus, talamus ve tegmentumta ise çok az yumak ve plaklara rastlanılmaktadır. Klinik açıdan baktığımızda hayatta iken mental durumu iyi olan bir kişide nöritik plaklara rastlanılmaktadır. Alzheimer Hastalığı ile karışan diğer bir durum da Parkinson Hastalığı'dır ki buna da Alzheimer hastalarında nöron kaybının ve Lewy cisimciklerinin bulunması neden olmaktadır (Gurd, Herzberg et al. 2000).

Alzheimer Hastalığı'ndaki en önemli patolojik yapı olan nöritik plaklar Blocq ve Marinesco tarafından 1892 yılında tanımlanmıştır. 1902 yılında ise Alzheimer isimli bir bilim insanı 51 yaşında bir demans hastasının ölümü sonrası serebral korteksinde nöronal sitoplazmalar içinde fibrillerin biriktiğini ve belirgin bir bozulma olduğunu göstererek hastalığa ismini vermiştir. Diğer önemli bulgular da Hirano cisimleri ve serebral amiloid anjiopatidir.

Hirano cisimleri: granülovaküolar dejenerasyonlar gibi bu yapılar da hipokampustaki nöronlarda bulunurlar. Yaklaşık 10- 15 µm kalınlığındaki eozinofilik çubuklardır. Bu yapılar da Alzheimer Hastalığı için tanı koydurucu değillerdir. Normal yaşlı bireylerin beyinlerinde ve başka nörolojik hastalıklarda da görülebilmektedirler.

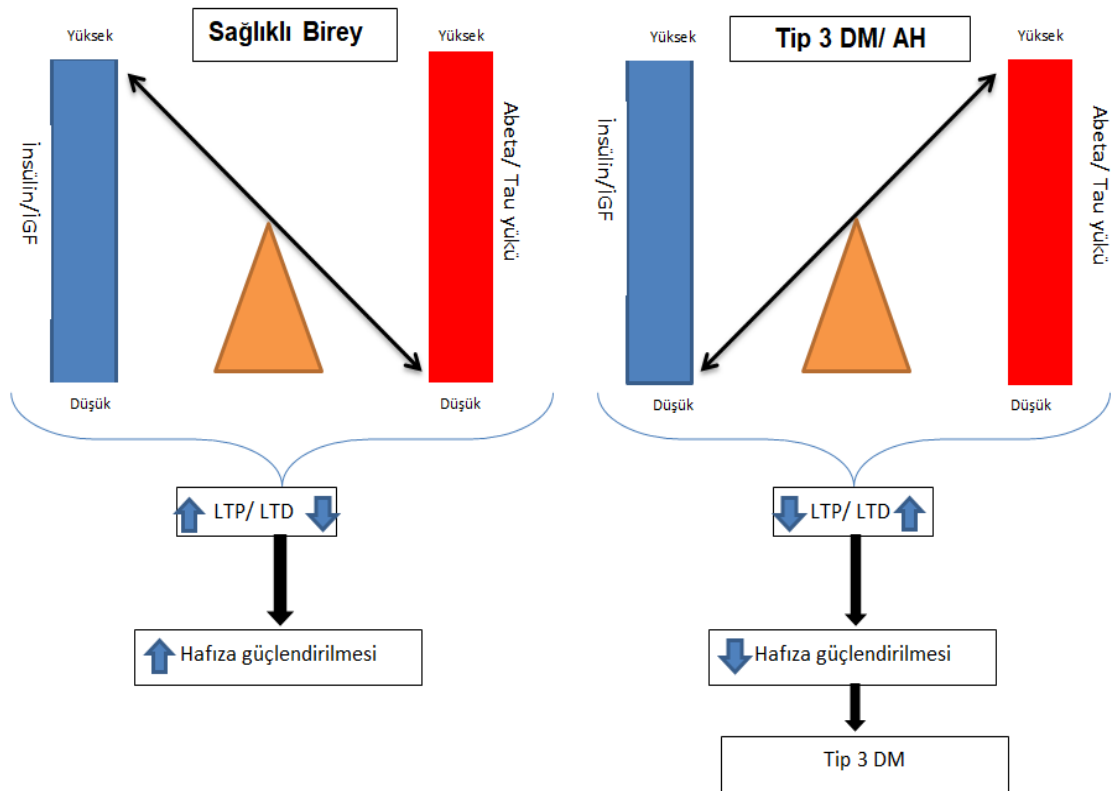
Serebral amiloid anjiopati: intrakortikal ve subaraknoid damarlarda, damarın duvarında Aβ birikimi Alzheimer Hastalığı'nda çoğu zaman izlenmektedir.

#### **2.1.4. Patogenezi**

Alzheimer Hastalığı'ndaki vasküler değişikliklere baktığımızda birçok farklı görüş olsa da patogeneizde önemli bir etkisi olduğu aşikardır. Bu hastalığın arteriyoskleroz yapan faktörlere bağlı olmadığı çok eskiden beri ortaya konulmuşsa da serebral kan akımını azaltabilecek küçük vasküler değişiklikler bazı Alzheimer hastalarında bildirilmiştir. Bu vasküler değişiklikler serebral atrofiye sekonderdirler ve mental olarak sağlıklı yaşlı bireylerde de görülmektedir. Bazı çalışmalarda da serebral infarktların Alzheimer Hastalığı'nda amiloid depolanmasının ve nörofibriler yumakların ortaya çıkmasının daha hızlı olduğu gösterilmektedir. Zaten kişide ortaya çıkan serebro vasküler hastalıklar da demansın hızlı ilerlemesine neden olmaktadır.

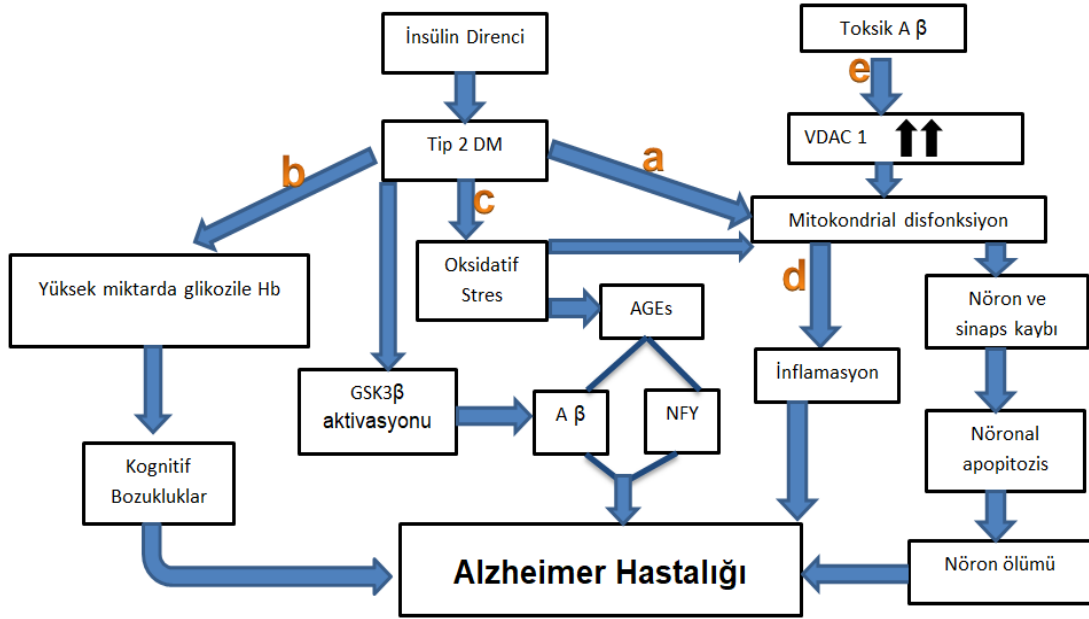
### 2.1.5. Alzheimer Hastalığı ve Diabetes Mellitusun Mekanizması Arasındaki Benzerlikler

DM ve Alzheimer hastaları ile ilgili son klinik ve temel çalışmalar DM, insülin direnci ve Alzheimer Hastalığı arasında hücresel ve patolojik benzerlikler olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmalar insülinin Alzheimer Hastalığı'nın patolojisindeki etkilerini hücresel ve moleküler mekanizmalar yoluyla çözen çeşitli temel biyolojik çalışmalar ile de güçlendirilmiştir. Bu benzerlikten dolayı Alzheimer Hastalığı'na Tip 3 Diyabet adı da verilmiştir. Şekil 2.1 de görüldüğü gibi sağlıklı bireylerde insülin/IGF oranı yükseldikçe Alzheimer Hastalığı temel proteinleri Abeta/Tau yükü azalmaktadır. Fakat Alzheimer Hastalığı'nda bu oran tam olarak tersine dönmekte ve Abeta/Tau yükü artmaktadır. Bu durum hafızayı güçsüzleştirmektedir (Kandimalla, Thirumala et al. 2017).



**Şekil 2.1** İnsülin sinyalizasyonunun kısa açıklaması a) Sağlıklı birey beyni b) Alzheimer Hastası beyni (Kandimalla, Thirumala et al. 2017).

Aşağıdaki şekilde ise Alzheimer Hastalığı'nı sebep olduğu nöronal apoptozis ile insülin direncinin sebep olduğu apoptozisin de benzer olduğu gözlenmektedir (Kandimalla, Thirumala et al. 2017).



**Şekil 2.2** Alzheimer Hastalığı'nda T2DM/ İnsülin direncinin şematik gösterimi (Kandimalla, Thirumala et al. 2017)

- Sinaptik hasara ve nöron ölümüne neden olan mitokondriyal disfonksiyon,
- Nöronlar için glikoz taşınamadaki başarısızlık nedeniyle bozulmuş bilişsel işlevde glikozile edilmiş hemoglobin,
- Oksidatif stres kaynaklı amiloid  $\beta$  ve gelişmiş glikasyon son ürünleri yoluyla fosforile tau oluşumları,
- Mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklanan inflamasyon ve amiloid  $\beta$  ve glikasyon son ürünlerinin toksisiteleri,
- Voltaja bağlı anyon kanalının nöronal kayıpta amiloid  $\beta$  indüksiyonu ile aktivasyonu.

### 2.1.6. Alzheimer Hastalığı'nda Tedavi

Alzheimer Hastalığı tedavisi için günümüzde verilen tedaviler ki bunlar serebral vazodilatörler, L- dopa seviyesi yüksek vitaminler ve benzeri ilaçları içerir, ne yazık ki iyileştirici etkiye sahip değildir. Hafızaya yönelik bir etkisi olup olmadığına yönelik çok çalışma olmasa da, denge bu ilaçların kullanılmasına doğru kaymıştır. Kolinesteraz inhibitörleri orta ılımlı Alzheimer hastalığında standart tedavi olarak verilmektedir (Rowland 2008).

#### 2.1.6.1. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Bitkilerin Kullanılması

Fitofarmasötiklerin kullanımı yıllar öncesine dayanmaktadır ki eski çağlardan beri özellikle Hint geleneksel tıbbında çok önemli rolü vardır. Kutsal metinlerde ve Hint edebiyatında dahi sinir sistemi hastalıkları için bitkisel ilaçlardan bahsedilmektedir (Srivastava and Yadav 2016). Sinir sistemi hastalıklarında kullanılan sentetik ilaçların neden oldukları yan etkiler nedeniyle, bitkilerin nörolojik bozuklukların tedavisinde fonksiyonel kullanımı da büyük ilgi uyandırmıştır. Sentetik ilaçlar daha spesifik

olmalarına rağmen yan etkileri hala büyük sorun olmaktadır. Bitkisel tedaviler ise etkinlikleri ve işlevsellikleri açısından keşfedilmeye açıktırlar ve büyük bir potansiyele sahiptirler. Özellikle nöroprotektif etkiler sağlayacak aktif molekülleri izole etmek için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır (Srivastava and Yadav 2016).

Bazı çalışmalarda nörolojik bozuklukların tedavisinde birkaç türe sahip geniş ve yaygın bitki ailelerinden de bahsedilmiştir (Amoateng, Quansah et al. 2018). Bitkisel ilaçların hafızayı önemli bir ölçüde güçlendirdiğine dair çalışmalar da vardır (Malve, Raut et al. 2014).

## 2.2. Fesleğen (Ocimum Gratissimum)

Alzheimer Hastalığı'nda ilaçlar ve davranışlara yönelik aktiviteler dışında medikal bitkiler de tedavide kullanılmaktadırlar. Medikal bitkilerden önemli bir bitki de Ocimum Gratissimum (OG) 'dur. OG ve diğer fesleğen türleri sağlık alanında üriner sistem hastalıklarında (idrar söktürücü olarak) , bronşiyal hastalıklarda (özellikle öksürük kesici olarak), sindirim sistemi hastalıklarında (parazit tedavisinde ve sindirim düzenleyici olarak) , antibakteriyel ve antifungal olarak kullanılmaktadır. Önemli bir özelliği de antioksidan olmasıdır. İçerdiği toplam fenolik asit yüksek miktardadır, özellikle rozmarinik asit çok fazla miktardadır. Rozmarinik asit polifenol antioksidant karboksilik asit bileşimidir ki bu antioksidant, antiseptik özellikleri sağlayan biyolojik etkidir. Sadece bu etkeni içeren ilaçlar günümüzde kullanılmaktadır (Sahbaz, Sahin et al. 2011).

Ayrıca fesleğenin uçucu yağlarının strese maruz kalmaya bağlı hafıza bozukluğunda ve de hipokampal nörodejeneratif değişikliklerde hafifletici etkileri de vardır (Ayuob, Abd El Wahab et al. 2018). Yapılan çalışmalarda yine strese maruz bırakılmış hayvanlarda kısa süreli hafıza bozukluğunun ve depresyon belirtisinin azaldığını, beyinde oluşan nörotropik faktörleri arttırdığı ve stres sonrası indüklenen nörodejenerasyon ve atrofik değişiklikleri azaltmıştır (Ayuob, Abd El Wahab et al. 2018).

Sağlık alanı dışında aromatik özelliğinden ötürü Türk ve Dünya mutfağında yemeklerde kullanılmaktadır. Uçucu yağları da içerdiğinden ötürü fesleğen yağı da ticari olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde sadece Ege bölgesinde bu yağ üretimi 350 kg civarındadır (Sahbaz, Sahin et al. 2011).



### 2.3. Limbik Sistem ve Hipokampus Anatomisi

Beynin önemli görevlerinden bazıları olan hatırlama, hafıza, öğrenme ve unutmama gibi davranışlarımızı fonksiyonel hale getiren yapıların oluşturduğu sisteme limbik sistem denilmektedir. Limbik kelimesi Broca tarafından ilk kullanılarak anatomiye kazandırılmıştır. Günümüzde de bu limbik sistem lobus limbicus dediğimiz yapı ve bu yapıyla bağlantıları olan yapıların hepsine verilen fonksiyonel isimdir. Diencephalon'u çevreleyen yapı olan lobus limbicus'u oluşturan yapılar Gyrus cinguli, gyrus parahippocampalis, gyrus subcallosus ve area septalis'tir. Lobus limbicus ile bağlantıları olan yapılar ise orbitofrontal korteks, corpus amygdaloideum, formatio hippocampi, corpus mamillare ve nuclei anteriores thalami et nucleus medialis dorsalis'tir. Bu yapıların anatomilerine sırayla bakacak olursak öğrenme üzerine önemli fonksiyonel etkisi olan formatio hippocampi'den başlamak gerekir. Formatio hippocampi subiculum, gyrus dentatus, entorhinal korteks ve hipokampus yapılarından oluşan bir limbik sistem bölümüdür. Bu yapılar ventriculus lateralis'in cornu inferior'unun tabanı boyunca bulunurlar. Hipokampus bilaminer yapıdadır ve bu laminalardan biri iç tarafa doğru kıvrılıp cornu ammonis'i oluşturur ki bu yapı anatomik olarak en iyi bildiğimiz limbik yapıdır. Cornu ammonis ile gyrus dentatus filogenetik özellik olarak archicortex özelliğindedirler.(Songur, Özen et al. 2001).

Hippocampus gri cevher yapısındadır ve ventrikulus lateralisin alt boynuzunun tabanında ilerler. Alt yüzü konkav, üst yüzü ise konvektir. Uzunluğu da yaklaşık olarak 5 cm'dir (Arıncı and Elhan 2001) Ön tarafa doğru genişlemiş bir yapıdadır ve buraya pes hippocampi denir, bunların ucundaki küçük çıkıntılara da digitationes hippocampi denir ki bunlar iki ya da üç tanedirler. Ayrıca konveks yüzünü alveus denilen bir yapı örter ve bu yapı aslında kendi hücrelerinden gelen aksonların oluşturduğu bir yapıdır. Bu lifler de birbirine yaklaşarak fimbria hippocampi yapısını oluştururlar ki bu yapının uç kısmı alveus ile birlikte crus fornicis'i oluştururlar. Ön ucu ise uncus gyri hippocampi'nin beyaz cevherinde sonlanır (Barr ML and JA. 1988: 266-9.; Arıncı and Elhan 2001) .

Hippocampus, her iki hemisferde birbirleriyle simetrik yerleşimli, 'C' harfine benzer şekilde kıvrılmış kornu ammonis ve gyrus dentatus birleşmesiyle oluşmuş bir yapı olarak görünür. Bu birleşim yerinde de sulcus hippocampalis vardır. Bu iki yapıya ek olarak da subikulum denilen bir yapı daha Hippocampus'e dahil edilmiştir. Ratlarda ve insanlardaki yerleşimi benzerlik göstermektedir (Şekil 2.3) (Strange, Witter et al. 2014).

Hippocampus'e koronal kesitte baktığımızda 'C' harfine benzer ama dikkatli bakıldığında denizatını anımsatmaktadır. Denizatına benzerliğinden dolayı da ismi

Yunanca denizati demek olan 'hipokampus'den gelmektedir. Dış yüzü de koçboynuzunu anımsattığı için Yunancada aynı anlama gelen 'cornu ammonis' olarak da bölümleri adlandırılmıştır (Amaral and Insausti 1990) .

Hippocampus Cornu Ammonis'in baş harflerinden dolayı CA olarak da adlandırılır. Hippocampus anatomisinde önemli bir durum da bu CA yapısının içindeki hücrelerin, bağlantılarının ve görünülerinin farklı olmasıdır ki bundan dolayı da CA 4 farklı alt bölgeye ayrılmıştır, CA1, CA2, CA3 ve CA4. Bu alt bölgelere baktığımızda CA1 'in geniş bir bölge olduğu ve dağınık yerleşimli üçgen şeklinde piramidal nöronları içerdiği görülmektedir. CA1 subikulum'a en yakın bölgedir. CA2' ye baktığımızda ise ovoid şekilde piramidal nöronları içerdiği ve CA1 ile CA3 bölgeleri arasında bulunduğu görülmektedir. CA3 Hippocampus'un eğriliğinin başladığı alt bölgedir ve de ovoid tipte piramidal nöron içerir ama bu hücreler daha az yoğunluktadır, CA3 gyrus dentatus'a en yakın bölgedir. CA4 alt bölgesi de gyrus dentatus'un kavitesinde bulunan bölgedir ve dentat hilus olarak adlandırılmaktadır (Berry M and LH 1995).

Hippocampusun uzunluğundan bir kesit alındığında ekseni ve anatomik bağlantılarından ötürü Trisinaptik döngü gözlenmektedir. Trisinaptik döngü 3 sinapstan oluşmaktadır. Entorhinal korteks en güçlü kortikal projeksiyonları ile hipokampus kortikal inputu sağlar. Bu projeksiyonlar delici yol ile gyrus dentatus (GD) bölgesine girerler ki buna 1. sinaps diyebiliriz. GD üzerinden CA3 bölgesine giden yosunlu lif yoluna da 2. sinaps denir. CA3 üzerinden CA1 bölgesine giden Schaffer kollateral yoluna da 3. sinaps denir. Son olarak da CA1 bölgesinden entorhinal kortekse lifler gider ve döngü böylelikle tamamlanmış olur. Bu trisinaptik döngüye önemli bir katkı da CA3 aksonlarıdır ki bu aksonlar CA1 projeksiyonlarına sinaps yapan CA3 nöronlarına ek olarak diğer CA3 nöronlarına kollateraller yollarlar. Bu tekrarlayan kollateral yol bir nevi oto-ilişkisel bellek sistemine benzeyen birkaç etkileyici CA3 teorisinden ilham almıştır.

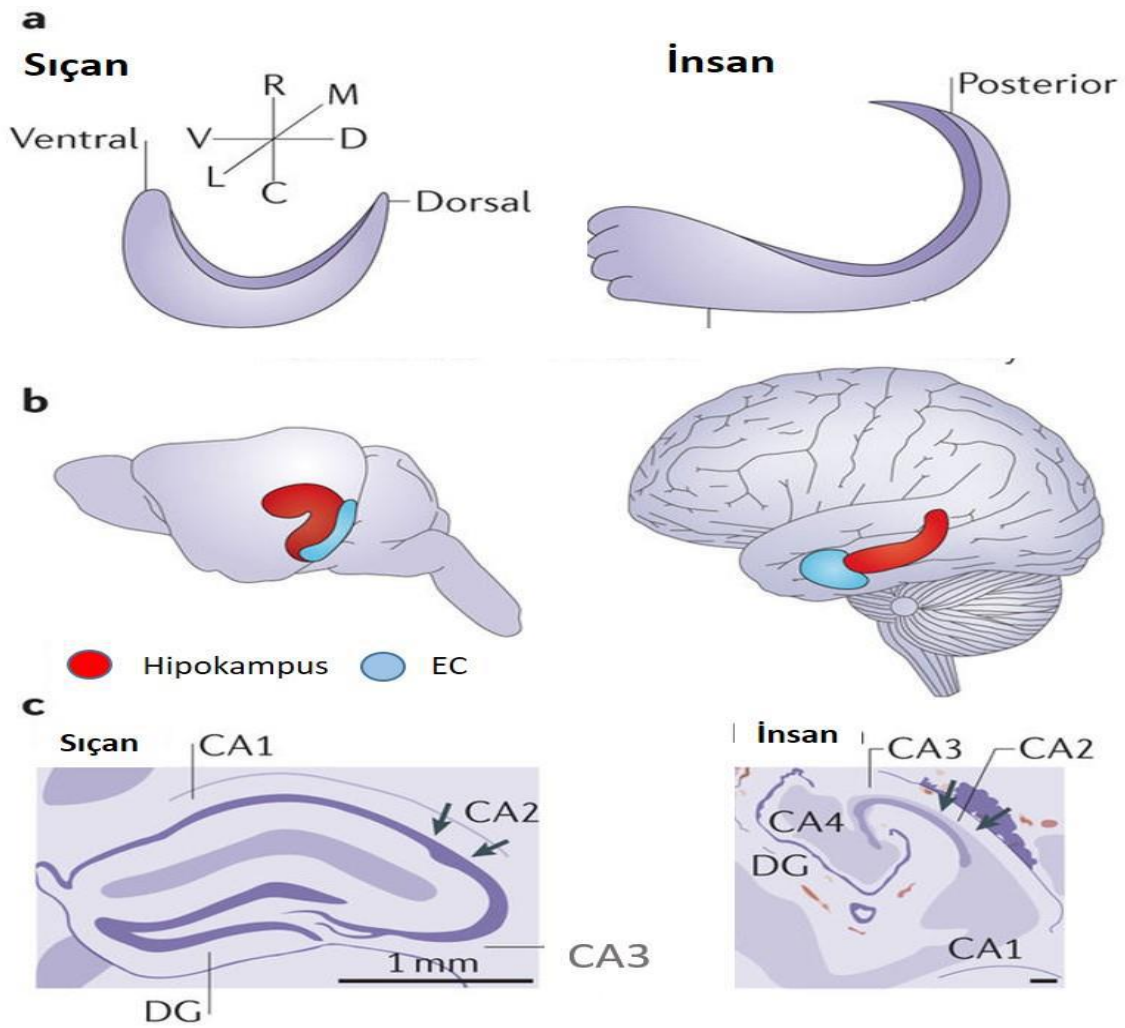
Trisinaptik döngünün tek yönlü devresinin başlangıçta hipokampusun bir kesit dilimi içerisinde bulunduğuna inanılırken modern anatomi çalışmalarında hipokampusun enine kesitlerde işlevsel olarak bağımsız olmadığı gösterilmiştir. Bu kesit içindeki bağımlılık, çoklu, paralel işleme ve geri besleme devreleri ile karışık bir hal almaktadır. Entorhinal korteks sadece GD'a değil aynı zamanda doğrudan CA1 ve CA3 bölgelerine de yansır. CA3 dental hilusun uyarıcı olan hücreleriyle GD'a bir geri bildirim tahmini sağlar. Bu da bize hipokampal değerlendirilmenin tek yönlü olmadığını

gösterir. Son dönemlerde yapılan çalışmalar CA3 ile CA1 arasında bir geçiş bölgesi olan CA2 bölgesinin kendine özgü fonksiyonlarının da olduğunu göstermektedir.

Hippocampus lateral ventrikülün temporal boynuzuna komşu bir şekilde temporal lobun medialinde bulunan bir yapıdır (Amaral and Insausti 1990). Hipokampus bir gri cevher yapısıdır ki komşu olduğu lateral ventrikülün temporal boynuzu boyunca bulunmaktadır. Boyutlarına baktığımızda da yaklaşık 5 ila 8 cm olduğunu görürüz. Filogenetik açıdan baktığımızda aslında en eski beyin yapılarından olduğu görülmektedir (Songur, Özen et al. 2001). Hippocampus hafıza ve duygu durum gibi işlevlerinden ötürü gerek klinik gerekse laboratuvar çalışmalarının en çok yapıldığı beyin bölümüdür (Isaacson 2002). Laboratuvar çalışmalarında en çok kullanılan rat beyinleri 1,5-3 cm kadar olup yaklaşık 200 milyon nöron içerirler (Moser and Moser 2014). İnsan hipokampusu rat hipokampusundan yaklaşık 100 kat, maymun hipokampusundan ise yaklaşık 10 kat daha büyüktür ve hacim olarak da yaklaşık 3- 3,5 cm<sup>3</sup> dür ve tüm beyne oranı yaklaşık 0,009 dur (Suzuki, Hagino et al. 2005; Moser and Moser 2014). Tüm beyne hipokampusun oranı kemirgenlerde daha yüksektir (Suzuki, Hagino et al. 2005).

Hipokampusun kanlanmasına baktığımızda zengin bir arteryel ağ görülmektedir. Esas olarak arteria serebralis posterior ve dalları beslerken, arteria choroidalis anterior ve dalları da diğer besleyen arterlerdir (Erdem, Yaşargil et al. 1993). Bu arterler ve dalları unkal sulkusun yakınlarında yaygın olmak üzere birçok anastomoz yaparlar (Tatu and Vuillier 2014). Bu anastomozlardan oluşan arteria hipokampalis superior'lar hipokampusun derinine dallar verirler (Tatu and Vuillier 2014). Özellikle CA3 ve CA4 bölgeleri arteria intrahipokampalis ventralis ağı ile beslenirken, CA1 ve CA2 ise geniş ventral intrahipokampal arterler ağı ile beslenirler (Erdem, Yaşargil et al. 1993; Tatu and Vuillier 2014). Bu arterler aynı zamanda gyrus dentatus'un distalini de beslerler. Sonuç olarak arteria choroidalis anterior ve arteria cerebralis posterior bu bölgenin beslenmesinde etkili ana arterlerdir (Erdem, Yaşargil et al. 1993).

Hipokampusun venöz drenajına baktığımızda vena hippocampalis superficialis'e drene olduğu görülmektedir. Bu venler daha sonrasında iki venöz ark oluşturup vena basalis'e drene olurlar (Tatu and Vuillier 2014).

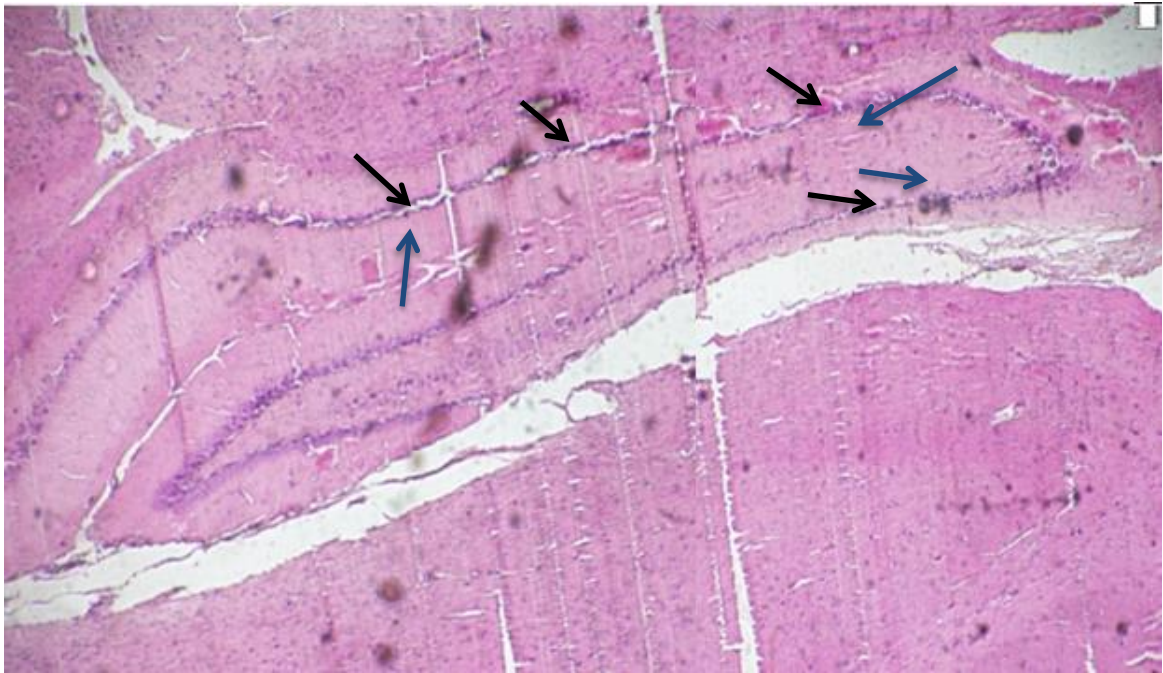


**Şekil 2.3** Hipokampal anatominin karşılaştırılması. a) Sıçan ve insanlardaki hipokampal uzun eksen yöneliminin şematik gösterimleri. b) Hipokampusun (kırmızı) ve entorhinal korteksin [(EC), mavi] tam uzun ekseninin sıçanlar ve insanlardaki görüntüsü. c) Sıçan ve insan hipokampusunun Nissl boyalı kesitlerinin çizimleri. (Strange, Witter et al. 2014)

#### 2.4. Hipokampus Histolojisi

Hipokampus histolojik açıdan incelendiğinde yedi tabakadan oluştuğu ve bu tabakaların birbiriyle bağlantılı olduğu görülmektedir. Bu tabakalardan bahsedecek olursak öncelikle Alveus tabakası gelir ki burası en derin tabakadır. Alveus subikulum ve hipokampusa ait piramidal hücrelerin aksonlarından oluşur ve buradan hipokampusun belki de en önemli çıktısı olarak fimbria ve fornixe uzanan aksonlar geçerler (Songur, Özen et al. 2001). İkinci tabakası olan Stratum oriens'te piramidal hücrelerin bazal dendritleri ve internöronların yerleştiği tabakadır. Üçüncü tabaka Stratum pyramidale'dir ve golgi tip 2 hücrelerin ve büyük piramidal hücrelerin gövdeleri bu tabakadadır. Piramidal hücrelerin gövdeleri üçüncü tabakada iken dendritleri stratum lucidum'a, aksonları da stratum oriens'ten geçip alveus tabakasındaki liflere

uzanır. Yine üçüncü tabakada Mossy lifleri ile yapılmış sinapslar da görülmektedir. Hipokampusu asıl şeklini veren de bu tabakadaki piramidal hücre dizilimidir. Hipokampusun dördüncü tabakası stratum lusidumdur ve en ince tabakadır. Sadece CA3 bölgesinde bulunur ve çoğu motor tip olan piramidal hücreler vardır ki bu hücreler ile gyrus dentatus arasındaki bağlantı beyindeki en gelişmiş ağlardan biridir. Bu ağlarda Mossy lifler vardır. Beşinci tabaka Stratum radiatum'dur ve hem septal hem de kommissural lifler vardır. Ayrıca CA3 ile CA1 arasındaki projeksiyon lifi olan Schaffer kollateral liflerini de bu tabakada görülmektedir. Altıncı tabaka stratum lakunozum'dur ve yine kollateral lifleri burada da görülmektedir. Diğer tabakalardan farklı olarak perforan lifleri vardır ki bu lifler entorhinal kortekse uzanan liflerdir. Çok ince bir tabaka olduğu için son tabaka olan stratum molekulare ile birlikte de anılırlar. Stratum molekulare en yüzeysel tabaka, perforan lifleri ve de piramidal hücrelerin dentritlerini içermektedir (Songur, Özen et al. 2001). Granüler hücre tabakası ve polimorfik hücre tabakaları da kontrol grubumuzun kesitinde gösterilmektedir (şekil 2.4).



**Şekil 2.4** Kontrol grubunda Hipokampus ve gyrus dentatus transvers ekseni boyunca koronal kesit. Siyah ok ile granüler hücre tabakası, mavi ok ile polimorfik hücre tabakası gösterilmektedir. (HE boyama, 10X )

## 2.5. Hipokampus Fizyolojisi ve Bellek

Hipokampus fizyolojisine James Papez'in öne sürdüğü Papez Halkası'nın bir parçası öngörüsüyle başlamak gerekir. Sonraki zamanlarda yapılan lezyon çalışmalarında hipokampusun özellikle öğrenme ve uzaysal hafızada önemli görevleri olduğu literatürde görülmektedir. Özellikle bilateral hipokampus eksizyon cerrahisi

yapılmış bazı hastalarda yeni birşeyin öğrenilemeyip geçmişten öğrendiklerini hatırladıkları görülmüştür. Bundan dolayı olarak kısa süreli belleğin uzun süreliye çevrilmede hipokampusun etkili olduğu da bazı çalışmalarda ileri sürülmüştür.

Hipokampusta afferent (gelen) ve efferent (giden) yollar, lifler vardır. Afferent yolların entorhinal korteksten gelen duyuşal uyarıları içeren yollar olduğu, efferentlerin ise tek bir bölgeye gitmediği görülmektedir. Afferent yolları oluşturanlardan ilki perforan yollardır ki bu yol entorhinal korteksten gelir, gyrus dentatus'a ilerleyip CA4 dışında tüm hipokampusa yayılır. CA3 alanına gyrus dentatus'tan giden Mossy lifleri diğer bir afferent yoldur. CA3 ve CA2 den CA1 e giden piramidal hücre uzantıları olan Schaffer kollateral lifler de bir diğer afferent yolaktır. Son afferent yol da alvear lifleridir ve bunlar CA1 ve subikuluma dağılan liflerdir, subkortikal alanlardan gelirler. Hipokampus, parahipokampal girus korteksinden de uyarılar alır ve bu uyarıları forniks yolu ile corpus mamillare, area septalis ve bazı hipotalamik nükleuslara nakleder (Songur, Özen et al. 2001) . Ayrıca hipokampus forniks aracılığı ile anterior talamik nükleus, area hypothalamica posterior, corpus mamillare, area septalis, substantia innominata, ventral tegmental area, raphe nükleusu ve parabrakial nükleusdan da lifler alır.

Efferent yollara baktığımızda en büyük yolun Forniks olduğu aşikardır (Amaral and Insausti 1990) . Ayrıca alveustan fimbria hippocampi'ye giden miyelinli lifleri de hipokampus ve subikulumdan çıkan diğer yoldur (Raisman, Cowan et al. 1965). Bu miyelinli lifler corpus fornicis olarak ilerler. İki crus arasında çaprazlaşan lifler de diğer efferent yoldur ki bu liflere commissura hippocampi denir. Corpus fornicis olarak ilerleyen lifler daha sonra columna fornicis olarak foramen interventrikulare'nin önünden geçip anterior talamik nükleusa ve dorsolateral talamik nükleusa lifler iletir. Bu lifler hipotalamusu uzanan bu lifler corpus mamillare'de ve hipotalamusun ventro medial nukelus'unda biterler (Raisman, Cowan et al. 1965; Songur, Özen et al. 2001).

Hipokampus fizyolojisinde afferentler 3 çeşittir, GABAerjik, kolinerjik ve monoaminerjik. Hipokampusta en çok bulunan eksitatör transmitter glutamat ve aspartattır, sonrasında ise Kolesistokin stratum piramidalis'te, Glutamat dekarboksilaz stratum piramidalis'e ek olarak stratum radiatum ve stratum orienste, Somatostatin ise stratum oriens ve stratum lakünozum'da bulunurlar. Ayrıca CA3'e giden liflerde dinorfin, hipokampusun birçok farklı bölgesinde de yaygın vazoaktif intestinal polipeptid bulunmaktadır. EEG kayıtlarına bakıldığında uykunun REM evresinde iken daha çok yakın hafıza oluşturulmakta ve bunda hipokampusun serotonerjik raphe çekirdekleri aktif gözlenmektedir. Uykunun daha derin evrelerinde de hipokampus düzensiz ritimde, uyanıklık durumunda da daha düzenli ritimde teta dalgası olarak görülmektedir. Bu da

bize hipokampusun bilincin farklı evrelerinde etkili olduğunu gösterir (Saransaari and Oja 1997).

## **2.6. Streptozotosin (STZ) ile Alzheimer Model Oluşturma**

Diyabetin patofizyolojisinin ve tedavi yöntemlerinin araştırıldığı çalışmalarda streptozotosin intravenöz veya intraperitoneal olarak streptozotosin (STZ) uygulanması sık kullanılan bir yöntemdir. Alzheimer patofizyolojisi ile benzerlik gösterdiği için Alzheimer modeli oluşturmak için aslında ratlarda diyabet modeli oluşturulmaktadır STZ bir glikoz analogudur ve glucosamine- nitrosourea bileşimidir. 1960 yılında antibiyotik olarak *Streptomyces achromogenes*'den elde edilmiştir. Pankreasın  $\beta$  hücrelerine zarar vererek diyabetojenik etki göstermektedir. İnsülin üreten bu  $\beta$  hücrelere etkisi hücrelerdeki GLUT- 2 denilen glikoz taşıyıcıları ile hücreye girdikten sonra başlar. Bu hücrelerde çok fazla GLUT- 2 taşıyıcısı ve az miktarda nicotinamide adenine dinucleotide olduğu için STZ'e duyarlılıkları da fazladır. STZ toksik etkilerini de nicotinamide adenine dinucleotide seviyelerini düşürerek, serbest radikallerin oluşmasını arttırarak ve DNA yapısında çift sarmallarda kırılma yaparak ortaya çıkarır. (Gispen and Biessels 2000; Takada, Machado et al. 2007).

### **2.6.1. Streptozotosin Uygulanan Sıçanların Özellikleri**

STZ uygulanan sıçanlarda glikoz düzeyleri 20- 25 mmol/L seviyelerindedir ve bu hayvanlar insülin tedavisi almamalarına rağmen yaşarlar. İnsanlarda olduğu gibi organ hasarı da mevcuttur. Bu hayvanlarla yapılan değişik çalışmalarda kolay olan davranış testlerinde değişiklik gözlenmemiş iken daha karmaşık olan testlerde farklılıklar gözlenmiştir. Ayrıca kognüsyon ve hipokampal bölgede de değişiklikler olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Bu değişikliklerin şiddeti hipergliseminin şiddetine ve süresine bağlıdır. (Biessels and Gispen 2005).

STZ uygulanan bu deney hayvanlarında yapılan birçok çalışmada uzaysal öğrenme testlerindeki değişiklikler ile Uzun dönem potensiyonunda oluşan değişiklikler birbiriyle ilişkilendirilmiştir. Özellikle hipokampus histolojik olarak incelendiğinde Uzun dönem potensiyonu oluşumlarının bozulduğu,  $\alpha$ - amino- 3- hydroxy- 5- methyl- 4- isoxazolepropionic asit reseptörlerinin glutamata affinitesinin azalması, N- metil- D- aspartaz (NMDA) reseptörlerinin affinitesinin değişmediği bazı çalışmalarda görülmüştür (Gispen and Biessels 2000).

## 2.7. Hipotez

Bu çalışmada hipotezimiz; streptozotosin (STZ) ile oluşturulan Alzheimer hastalığı deneysel sıçan modelinde, fesleğenin Hippocampus piramidal hücreleri üzerindeki anti-apoptotik etkisini göstermek ve buna paralel olarak sıçanlarda öğrenme ile ilgili davranışı test etmektir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamıza başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu'na başvurularak 30/ 01/ 2017 tarih ve 60758568- 020/ 7215 sayılı onay kararı alınmıştır. İlgili etik kurul belgesi EK-3'de sunulmuştur.

Etik kurul kararından sonra Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan 300 – 482 gr ağırlıkları arasında Wistar cinsi 33 adet 4 aylık erişkin erkek sıçanlar alınıp kullanıldı. Sıçanlar rasgele seçilerek Kontrol Grubu (K grubu; n=6), Sham Grubu (Sham grubu; n=6), Fesleğen Grubu (FES grubu; n=6), Streptozotosin Grubu (STZ grubu; n=8) ve Streptozotosin + Fesleğen Grubu (STZ+FES grubu; n=7) olmak üzere 5 eşit gruba ayrıldı. Bu gruplar 30x 35x 17 cm boyutlarındaki özel kafeslerde tutuldular. Bu kafeslerin altları plastik üstleri ise telle çevrilidir. Deney hayvanlarının hepsi 12 saatlik aydınlık- karanlık siklusunda,  $22\pm 2^{\circ}$  C oda ısısında ve  $\%50\pm 5$  nem ortamındaki laboratuvar koşullarında bulundurulmuşlar ve aynı cinsteki yemlerle beslenmişlerdir. Yemleri fare tam yemi olarak alınmıştır. Bu yem 2750 KCal/ Kg enerji içerikli, ham selüloz, kalsiyum, sodyum, ham yağ, ham protein, fosfor, lysine ve methionine içeren bir yemdir.

Tüm sıçanların deney başlangıcında ağırlıkları ve kan glikoz değerleri (KGD) ölçüldü. KGD ölçümleri kuyruklarındaki vene Accu- Chek Softclix batırılarak yapıldı. Bu işlem için Accu- Chek Active marka glukometre ve bu cihaza ait stripler kullanıldı. Tartım işlemi için de deney hayvanlarında dijital tartı kullanıldı.

#### 3.2. Sıçanlarda Streptozotosin İle Deneysel Diyabet Oluşturulması

Sıçanlarda deneysel olarak diyabet yapmak için literatürde en çok intraperitoneal STZ kullanılmaktadır (Ates, Cayli et al. 2006; Tuzcu and Baydas 2006). İ.p. olarak 60 mg/kg STZ yapıldığından STZ ve STZ+FES gruplarındaki sıçanlara ağırlığına göre STZ hesaplanıp yapıldı. STZ 250 mg'lık flakonlarda soğuk zincirde taşınıp  $-4^{\circ}$  C de saklanmıştır (Şekil 3.3). Streptozotosin olarak Sigma- aldrich şirketinin WXBD0304V lot numaralı ürünü kullanıldı. Doz ayarı her bir sıçan için ayrı ayrı hassas tartı ile yapılmış, ayarlanan dozdaki STZ de 0,5 ml serum fizyolojik ( $\%0,9$  NaCl) içinde çözdürülerek intraperitoneal olarak tek seferde enjekte edildi.

Sham grubundaki sıçanlara diğer gruptakiler ile eş değer miktarda (0,5ml) fizyolojik serum i.p. olarak enjekte edildi. K grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem

yapılmadı. Stz uygulamasından sonraki 3. gün sıçanların kuyruk veni kanlarından KGD'leri ölçüldü. Önceki çalışmalar göz önüne alınarak KGD'leri 150mg/dL üzerinde olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Deneysel diyabet oluşturulmasından 10 gün sonra sıçanların KGD'leri kontrol amaçlı olarak tekrar ölçüldü.

Fesleğen ekstratı natural kimyadan Basil Extract lot numarası VV-1121145 (TR-07-K-0470301) olarak hazır alınmıştır ve Fes ile Fesztz gruplarındaki hayvanlara intraperitoneal olarak verildi. Fesleğen emiliminin değişken olabileceğinden dolayı oral besleme olarak değil de intraperitoneal olarak verildi.

Sıçanların kafeslerinin temizlenmesi günlük olarak yapıldı ve bu sırada kafeslerin ıslaklığı ve günlük tükettikleri su şişesi sayısı takip edilerek poliüri, polidipsi belirtilerinin varlığı araştırıldı.

### **3.3. Sekiz Kollu Labirent Testi Uygulanması**

Bu test için kullanılan radyal labirent aparatı eşit aralıklı şeffaf pleksiglas sekiz koldan oluşmaktadır. Bu kolların her biri uzunlukları 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğindedirler ve 50 cm yüksekliğinde yan duvar ile çevrilidirler. Sekiz kolun birleştiği merkez ise 24 cm çapında sekizgendir ve her kolun girişinde şeffaf bir giyotin kapı vardır. Bu radyal labirent yerden 50 cm yüksekliktedir. Tepeye oda dışındaki bilgisayara bağlı kaydedici bir kamera yerleştirilmiştir. Kamera labirentin tümünü görebilecek yüksekliktedir.

Deneyin yapıldığı oda sessiz ve aydınlık bir oda olup 4 duvarında farklı renk ve şekilde olan görsel ipuçları yerleştirilmiştir. 8 kolun uçlarına da birer adet yemek kabı yerleştirilmiştir. Bu kap 3 cm çaplı, 1 cm derinliğindedir ve içine 40 gr- 60 gr kristalize şeker koyulmaktadır. Her hayvan testi bitirdiğinde bu kaplar alkol ile temizlenmiştir.

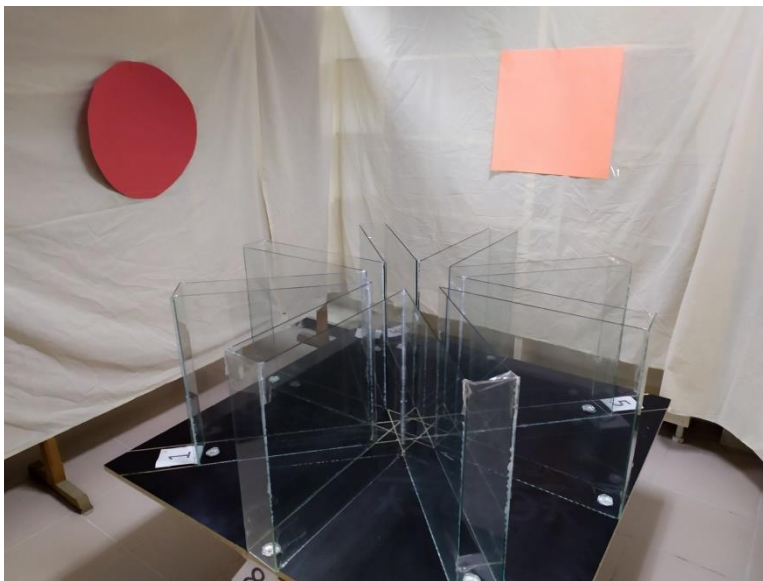
Prosedürler:

1. Sınırlı besleme prosedürü: Deney sürecinde tüm hayvanlar beslenme seviyesinin %80-90'ı seviyesinde oldu. Su ise sürekli ad libitum olarak verildi.
2. Test alanının eğitilmesi ve bu süreçteki performansları: Ratlar gruplar halinde günde 3 kez 10 dk 14 gün öğrenme aşaması yapıldı. Bu aşamada ratlar labirentin merkezine bırakılıp tüm kollara girmesine, tüm kollara gitmediyse de 10 dk süreyi labirentte geçirmesine izin verilerek yapıldı. Bu eğitim süreci tüm gruplara da yapıldı.

Performans değerlendirilmesi: 2 parametre labirent testinin performans kriteri olarak kabul edildi.

**Tablo 3.1** Maze testi uygulama takvimi

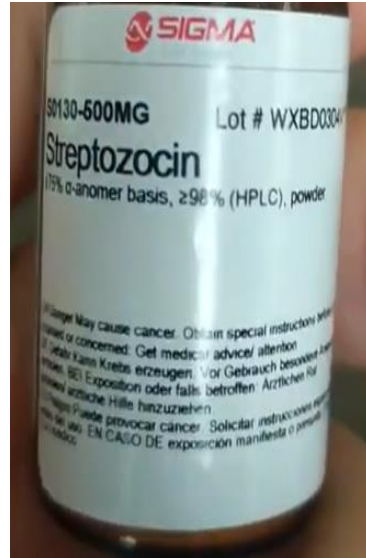
GÜN	DENEY GRUBU
PRETRAINING 1. GÜN	+
PRETRAINING 2. GÜN	+
PRETRAINING 3. GÜN	+
ARA	
TRAINING 1. GÜN	+
TRAINING 2. GÜN	+
TRAINING 3. GÜN	+
TRAINING 4. GÜN	+
TRAINING 5. GÜN	+
TRAINING 6. GÜN	+
TRAINING 7. GÜN	+
TRAINING 8. GÜN	+
TRAINING 9. GÜN	+
TRAINING 10. GÜN	+
TRAINING 11. GÜN	+
TRAINING 12. GÜN	+
TRAINING 13. GÜN	+
TRAINING 14. GÜN	+
ARA	
İŞLEM GÜNÜ 1. GÜN	+
3. GÜN TEST	+
7. GÜN TEST	+
14.GÜN TEST	+

**Şekil 3.1** Sekiz kollu labirent testi.

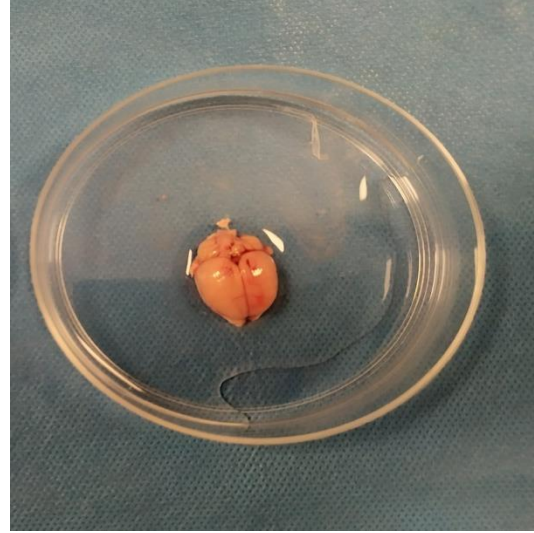
Test her gruba enjeksiyonlar öncesinde hergün, her hayvana da günde 3 kez olacak şekilde yapıldı. Bu süreç 14 gün sürdü ve enjeksiyonlar yapıldıktan sonra da 3 gün, günde 3 kez olacak şekilde yapıp değerlendirildi.

#### 3.4. Hayvanların Dekapite Edilmesi, Kranyotomi ve Boyama İşlemlerine Hazırlık

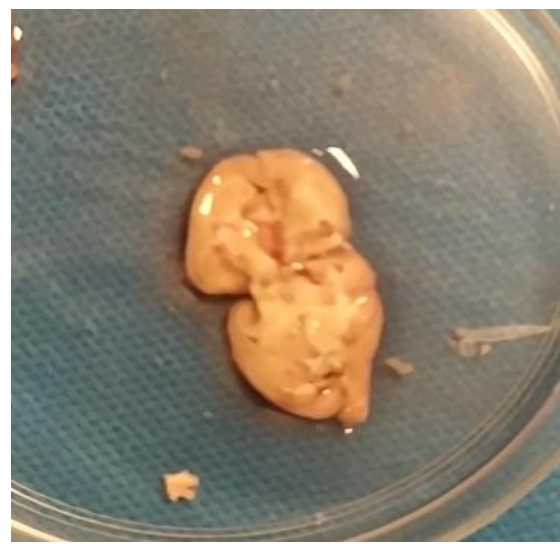
Ratların davranış testleri sonuçlandırıldıktan sonra intraperitoneal ksilazin/ketamin yapılarak anestezi yapıldı (Şekil 3.2). Sonrasında supin pozisyona alınan ratlara servikal dislokasyon yapıldı. Her gruptan bir hayvan seçilerek işlem yapıldı. Kafaları orta hattan derisinin kemiğe kadar kesilip serbestleştirildi (Şekil 3.4). Sonrasında pens ile kafa kemikleri minik boyutlarda dışa doğru çekip kırılarak beyne ulaşıldı. Beyin sapı seviyesinden kesilen beyinler serbestleştirildi (Şekil 3.5, şekil 36.6, şekil 3.7). Her gruptan birer hayvanın beyni histolojik çalışma için işleme alındı.



Şekil 3.2 Anestezide kullanılan maddeler Şekil 3.3 Streptozotosin



**Şekil 3.4** Deneysel hayvanları cerrahi işlem pozisyonu **Şekil 3.5** Beyin üstten görünüm



**Şekil 3.6** Beyin alttan görünüm

**Şekil 3.7** Beyin ikiye ayrılmış görünüm

### 3.4.1. Kesitlerin Hazırlanması ve Boyanması

Serbestleştirilen beyinler yuvarlak taşıyıcılara yere paralel olacak şekilde yerleştirilip tespit edildi. Kesitler numaralandırılmış lamaların üzerine alınıp zembile sırasıyla yerleştirildi. Bu zembiller sırasıyla ksilen dolu kaplarda 5er dakika bekletilip alkol karışımlarının olduğu kaplara alındılar. Bu kaplarda sırasıyla %100, %90, %70 ve %50 oranında alkol vardı. Alkol kaplarından sonra musluk suyuna bırakılarak alkolden arındırıldı. Daha sonra bu zembiller kresil viyole boyasında 5 dk boyanıp tekrar suyun altına berrak bir renk alana değin bırakıldı. Sonrasında bu kesitler lamel ile kapatılıp ışık mikroskobu altında incelemeye hazır hale getirildi.

### 3.4.2. Hematoksilen Eozin (HE) Boyama

Hematoksilen ve eozin ile boyanmış doku anatomide patolojik teşhisin önemli bir kısmıdır (Feldman and Wolfe 2014). HE prosedürü hücrenel bileşenleri kolaylıkla ayırt etmek için hücrenin bölümlerini farklı renklerle boyar. Boyama birçok farklı işlemden oluştuğu için boyama sonuçları da bu işlemlerin uygun bir şekilde yapılmasına bağlıdır (Feldman and Wolfe 2014). Bu boyama prosedürü fiksasyon, dehidrasyon, temizleme ve infiltrasyon, mikrotomi, HE boyama olarak uygulanmaktadır (Feldman and Wolfe 2014). Standart doku takibi genel olarak oda ısısında yapılmaktadır, sadece parafin durağında ısı derecelerinde değişiklik yapılmaktadır (Feldman and Wolfe 2014). İşlem yapılacak olan doku 3 mm kalınlığında ve en fazla 20x 20 mm genişliğindedir (Feldman and Wolfe 2014). Parafin içindeki infiltrasyon süresi toplamda 2 saati geçmemelidir. Boyamada kullanılacak olan su musluk suyu olabilir ama dikkatli kullanılmalıdır. HE prosedüründe ksilen ile kesitler 20 dk boyunca deparafinize edilip %100, %96 ve %75 etanol havuzlarından her birinde 2dk hidrate edildi. Sonrasında musluk suyu ile yıkayıp Hematoksilen solüsyonunda 1 dk boyandı. Boyama sonrasında yine suda yıkayıp bu sefer Eozin solüsyonunda 30 sn boyandı. Sonrasında yine su ile yıkayıp %75 etanolde 30 sn, %96 etanolde 1 dk, %100 etanolde 2 dk dehidrate edildi. Dokular Ksilen ile en az 20 dk şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

### 3.4.3. Apoptozis İçin TUNNEL Uygulama

Tunnel uygulaması için kullanılan apoptoz tarama kitinin katalog numarası A049 'dur. Kiti içeriği tablo 3.2 de görülmektedir.

**Tablo 3.2** Tunnel apoptozis kiti içeriği

Materyal	Miktar	Yoğunluk	Depolama	Süre
TdT reaksiyon tampon	8 mL	1X solüsyon	-20°C Işıktan koruyunuz	Bilgilendirildiği şekilde depolandığı takdirde 1 sene kullanılabilir
TdT enzim	100 µL	15 U/MI		
Biotin- 11- Dntp	50 µL	50X solüsyon		
HRP- Streptavidin	50 µL	100X solüsyon		
DAB stok solüsyon	150 µL	33X solüsyon		
DAB diluent	5 µL	1X solüsyon		
DNase I	10 µL	2 U/µL		
DNase I tampon	1 mL	1X solüsyon		

DNA'nın internukleozomal bölünmesi apoptozisin ayırt edici özelliğidir ve bu apoptotik hücrelerde DNA bölünmesi terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) ile

dUTP etiketleme yöntemi denilen Tunnel yöntemi aracılığıyla tespit edilir. Tunnel uygulaması apoptotik hücreler için oldukça seçicidir fakat nekrotik hücrelerin, radyoterapi gibi ışınlama tedavisi alan hücrelerinden kaynaklanan DNA ipliği kırılmaları olan hücrelerin tespiti için de seçicidir. Bu uygulamada TdT enzimi işaretli dUTP'nin bölünmüş DNA fragmanlarının 3 uçlarına eklenmesini katalize eder. İşaretli olan dUTP floresans veya kolorimetrik saptama için ikincil reaktifler kullanılarak saptanabilir. Alternatif olarak da flüoresan boya konjuge dUTP parçalanmış DNA'nın doğrudan tespitinde kullanılabilir.

### Deney protokolü

1. Taze dondurulmuş doku kesitlerinin hazırlanması
  - 1.1. PBS içinde hücreleri veya dokuları iki kez yıkayın.
  - 1.2. Hücreleri veya dokuları %4 formaldehit içinde PBS içinde 30 dk süreyle 4°C de sabitleyin.
  - 1.3. PBS içinde iki kez yıkayın.
  - 1.4. %0,2 Triton X-100 içeren PBS içerisinde oda ısısında 30 dk süreyle geçirgen hale getirin.
  - 1.5. PBS içinde iki kez yıkayın.
2. Parafin doku kesitlerinin hazırlanması
  - 2.1. Coplin kavanozlarında doku kesitleri tablo 3'de gösterildiği gibi oda ısısında parafinden arındırılıp, tekrar hidratlanır.

**Tablo 3.3** Doku parafinden arındırma prosedürü.

Xylenes	Xylenes	100% EtOH	100% EtOH	95% EtOH	85% EtOH	75% EtOH	1X PBS	1X PBS
5 dk	5 dk	5 dk	5 dk	5 dk	3 dk	3 dk	5 dk	5 dk

2.2. Proteinaz K solüsyonunu PBS içinde 20 µg/mL de hazırlayıp kullandıktan sonra kalan stok solüsyonunu -20 °C 'de saklayın.

2.3. Dokuları oda ısısında 30 dk boyunca 20 µg/mL proteinaz K solüsyonununun 100 µL ile geçirgen hale getirilir. Proteinaz K inkübasyon süresi ve sıcaklığı doku tipine göre optimize edilmelidir.

2.4. Dokuları PBS içinde iki kez 5 dk yıkayıp durulayın.

3. Pozitif kontrol preparatları

- 3.1 Deiyonize su ile dokuyu yıkayın.
- 3.2 50 µL DNase I tampon ile 10 dk inkübe edin.
- 3.3 DNase I solüsyonunu tablo 3.4 e göre hazırlayıp, iyice karıştırın.

**Tablo 3.4** DNase I solüsyonu

İçerikler	Lamel sayısı		
	1	2	3
<b>DNase I</b>	1 µL	2 µL	3 µL
<b>DNase I Tampon</b>	49 µL	98 µL	147 µL
<b>Toplam hacim</b>	50 µL	100 µL	150 µL

3.4 DNase I tamponunu çıkarıp her örneğe 50 µL DNase I solüsyonu ekleyip 30 dk oda ısısında inkübe edin.

3.5 Deiyonize su ile dokuyu bir kere yıkayın.

#### 4. Tunnel reaksiyonu

4.1 Endojen peroksidazları inaktive etmek için örnekleri %2 hidrojen peroksit ile oda ısısında 5 dk inkübe edin.

4.2 PBS içinde durulayıp iki kez 5 dk yıkayın.

4.3 Örnekleri 100 µL TdT reaksiyon tamponu ile 10 dk inkübe edin.

4.4 Kullanmadan hemen önce TdT reaksiyon karışımını tablo 3.5 teki talimatlara göre hazırlayın.

**Tablo 3.5** TdT reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Örneklem sayısı				
	1	2	4	5	10
<b>TdT reaksiyon tampon</b>	47 µL	94 µL	188 µL	376 µL	470 µL
<b>TdT enzyme</b>	2 µL	4 µL	8 µL	16 µL	20 µL
<b>Biotin-11-dUTP</b>	1 µL	2 µL	4 µL	8 µL	10 µL
<b>Toplam Hacim</b>	50 µL	100 µL	200 µL	400 µL	500 µL



**4.5** TdT reaksiyon tamponunu çıkarıp her numuneye 50 µL TdT reaksiyon karışımı ekleyin ve solüsyonun tamamen yüzeye yayılmasına izin verin.

a) Yapışık hücreler veya doku bölümleri için, tamponu hücrelerin ve doku bölümlerinin üzerine eşit şekilde yayılması için parafin lamel ile örtün.

b) Negatif kontrol örnekleri için de TdT enzimini içermeyen TdT reaksiyon karışımından 50 µL ekleyin.

**4.6** Hücre boyaması için karanlık bir ortamda 37°C'de 60 dk süreyle inkübe edin.

a) Yapışık hücreler veya doku bölümleri için nemli bir odada inkübe edin.

b) Süspansiyon halindeki hücreler için hücreleri hafifçe vurarak her 15 dakikada bir reaksiyon tamponunda yeniden süspanse edin.

**4.7** Örnekleri 2X SSC'de 2 kez 10 dk inkübe ederek reaksiyonu durdurun.

**4.8** PBS içinde % 3 BSA içerisinde 2 kez 10 dk yıkayın.

**4.9** HRP- streptavidin boyama solüsyonunu tablo 3.6 daki talimatlara göre hazırlayın. Boyama tamponu; 0,6 M NaCl, 60mM sodyum sitrat, %0,1 Triton X-100, %1 BSA, pH:7,4

**Tablo 3.6** HRP- Streptavidin boyama solüsyonu

Reaksiyon Bileşenleri	Örnekleme Sayısı				
	1	2	4	5	10
<b>HRP-Streptavidin</b>	1 µL	2 µL	4 µL	5 µL	10 µL
<b>Boyama Tamponu</b>	99 µL	198 µL	396 µL	495 µL	990 µL
<b>Toplam Hacim</b>	100 µL	200 µL	400 µL	500 µL	1000 µL

**4.10** Her numuneye 100 µL HRP- Streptavidin boyama solüsyonu ekleyerek karanlık odada, oda ısısında 30 dk inkübe edin. Doku boyama oda ısısında 1 saat inkübasyon gerektirebilir.

**4.11** Örnekleri PBS içinde %3 BSA ile iki kez 5 dk yıkayın.

**4.12** DAB boyama solüsyonunu tablo 3.7 ye göre hazırlayın.

**Tablo 3.7** DAB boyama solüsyonu

Reaksiyon bileşenleri	Örnekleme Sayısı				
	1	2	4	5	10
<b>DAB stok solüsyonu</b>	3 µL	6 µL	12 µL	15 µL	30 µL
<b>DAB dilüenti</b>	97 µL	194 µL	388 µL	485 µL	970 µL
<b>Toplam Hacim</b>	100 µL	200 µL	400 µL	500 µL	1000 µL

**4.13** Her örneğe 100 µL DAB boyama solüsyonu ekleyip oda ısısında inkübe edin. İstenilen boyama seviyesine kadar renk değişimini izleyin ki bu süre 10- 60 dk kadardır. Sonrasında PBS ile durulayıp reaksiyonu durdurun.

**4.14** Örnekleri ışık mikroskobu için monte edin.

### 3.5. İstatistiksel Yöntemler

Sıçanların ağırlıklarının ve şeker düzeylerinin karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi. Hücre sayısı bakımından grupların karşılaştırılmasında ve 8 kollu radial maze testinin gruplar arası farklılığın değerlendirilmesinde ANOVA testi; farkı yaratan grubun belirlenmesinde Post Hoc Bonferroni testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versiyon 22.0 paket programında yapılmıştır. Analizlerde %95 güven aralığında anlamlılık değeri  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir.

#### 4. BULGULAR

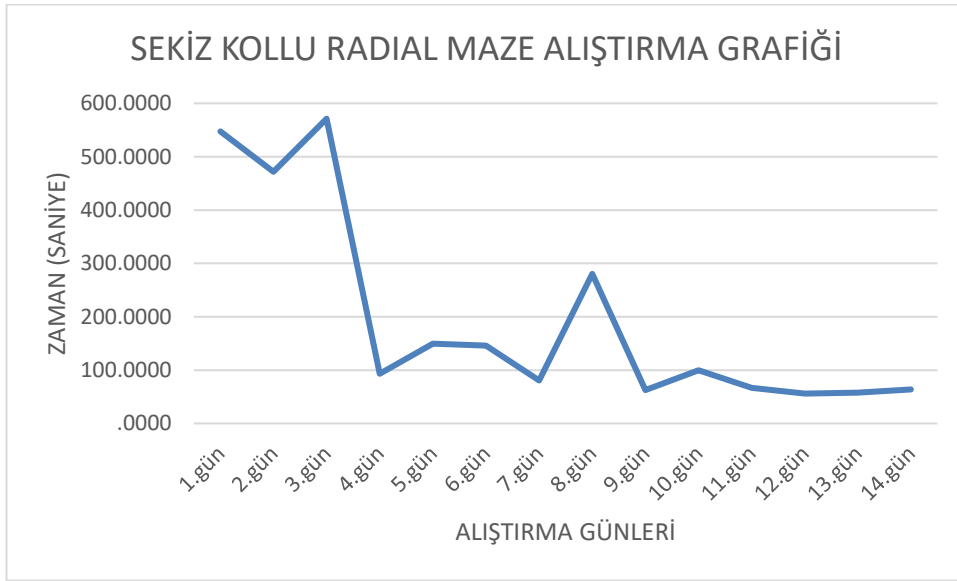
Davranış testi olarak sekiz kollu radial maze seçilmiştir. Bu test Hippocampus'taki hücresel değişikliklere davranış yansımalarını ölçen hassas bir testtir.

Sekiz kollu radial maze testindeki bir diğer bulgu da test bitirme zamanlarına göre grupların edinme- öğrenme zaman ve hata sayısıdır. Bu testte tüm gruplar 14 gün süreyle radial maze testine hazırlanmışlardır. Bu hazırlığın ilk günü ile son günü arasında testi bitirme zamanı ve yapılan hata sayısı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu veriler tablo 4.1, şekil 4.1 ve şekil 4.2 de gösterilmektedir.

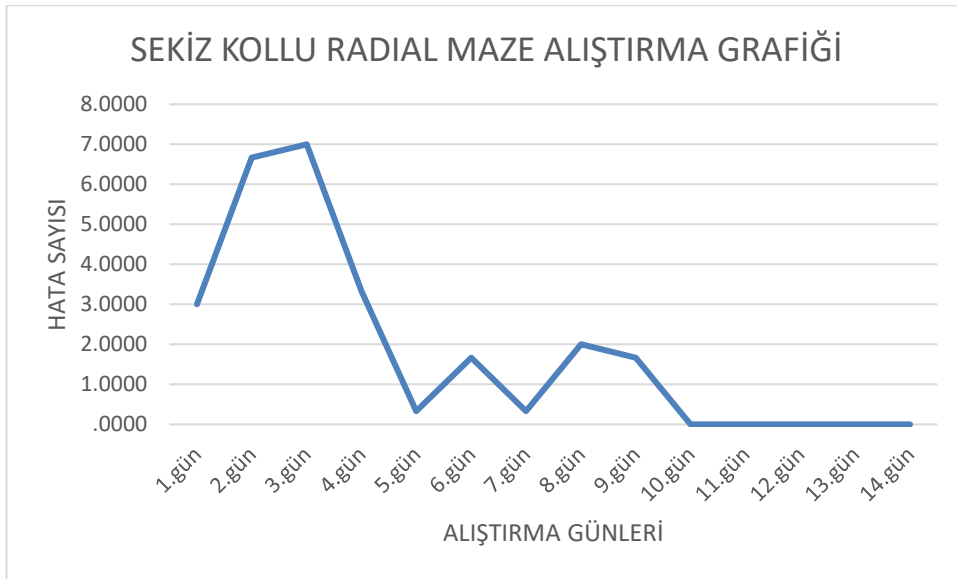
Bu testte hata sayısı STZ grubunda, kontrol ve Sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ( $P<0,05$ -ANOVA). Hata testi genellikle referans belleği (reference memory) bize davranış sonucu olarak verir. Referans bellek değişmeyen şartlara uyum sağlamak için gereken bellektir. Buradaki hata sayısı yine STZ' ye rağmen Fesleğen özütü verilen gruplarda, STZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ( $P<0,05$ -ANOVA). Yani STZ yüzünden bozulan referans bellek, istatistiksel olarak anlamlı derecede fesleğen özütü tarafından daha iyi hale getirilmiştir.

**Tablo 4.1** Testi bitirme zamanlarına göre edinme-öğrenme (acquisition) zaman ve hata tablosu. Gruplardaki tüm ratlar 14 gün radial maze testi için hazırlanmıştır (saniye ve sayı olarak verilmiştir).

Gün	Zaman (sn)	Hata
1.gün	547,3333	3,0000
2.gün	472,0000	6,6667
3.gün	571,3333	7,0000
4.gün	93,0000	3,3333
5.gün	149,6667	,3333
6.gün	145,6667	1,6667
7.gün	80,3333	,3333
8.gün	280,6667	2,0000
9.gün	62,3333	1,6667
10.gün	99,6667	,0000
11.gün	66,6667	,0000
12.gün	56,0000	,0000
13.gün	57,6667	,0000
14.gün	64,0000	,0000



**Şekil 4.1** Sekiz kollu radial maze zaman tastinde öğrenme grafiği



**Şekil 4-2** Sekiz kollu radial maze zaman testinde hata grafiği

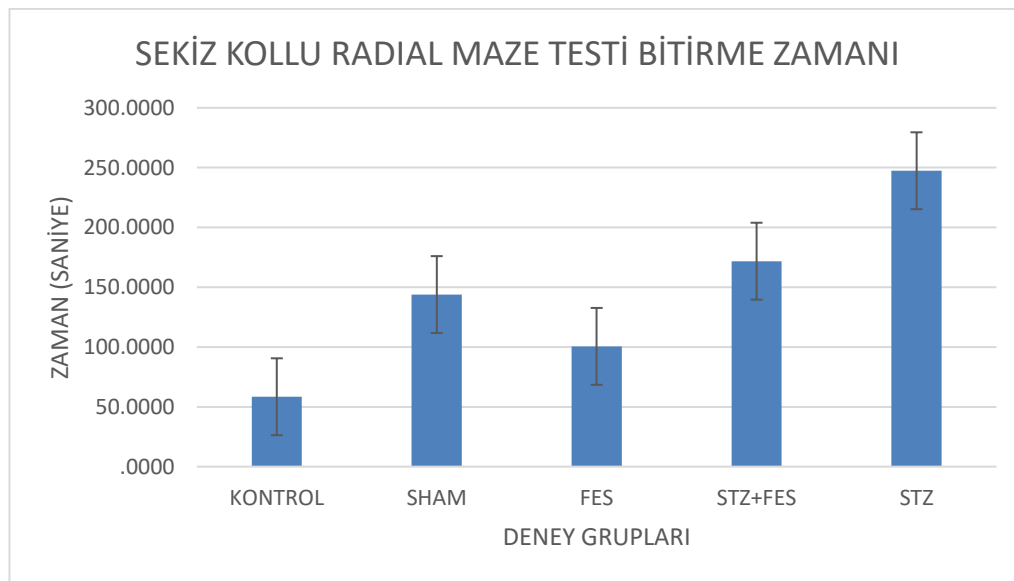
Yapmış olduğumuz testte gruplara baktığımızda testi bitirme zamanına göre STZ grubunda, kontrol ve Sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir zamanda uzama tesbit edilmiştir ( $P < 0,05$ -ANOVA). Zaman testi genellikle çalışan belleği (working memory) bize davranış sonucu olarak verir. Çalışan bellek değişen şartlara

uyum sağlamak için gereken bellektir. Buradaki uzama yine STZ' ye rağmen Fesleğen özütü verilen gruplarda, STZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede kısalmıştır ( $P<0,05$ -ANOVA). Yani STZ yüzünden bozulan çalışan bellek, istatistiksel olarak anlamlı derecede fesleğen özütü tarafından daha iyi hale getirilmiştir. Tablo 4.2 ve şekil 4.3'te bu veriler gösterilmektedir (Tablo 4.2, Şekil 4.3).

**Tablo 4.2** Sekiz Kollu Radial Maze testi bitirme zamanları

Grp	M (sn)	Sd
KONTROL	58,4259	39,44167
SHAM	143,8519	145,23766
FES	100,5309	75,37906
STZ+FES	171,7778	161,61768
STZ	247,3968	194,75489

Grp; grup, FES; fesleğen grubu, STZ; Streptozomisin grubu, STZ+FES; Streptozomisin ve Fesleğen grubu, m; ortalama, sn; saniye sd; standart sapma



**Şekil 4.3** Sekiz Kollu Radial Maze testi bitirme zaman grafiği

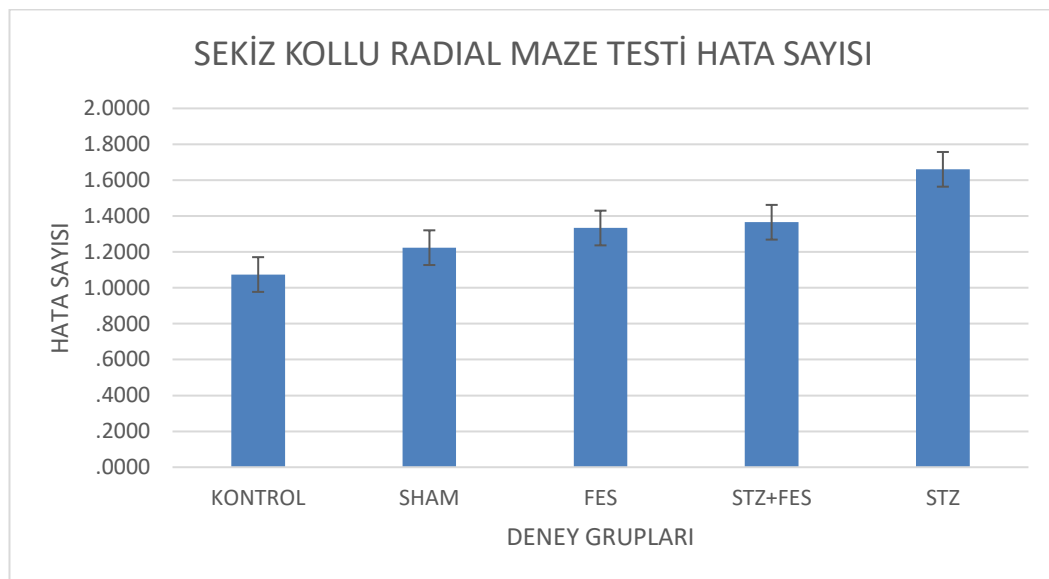
8 kollu maze testinde hata sayısına baktığımızda gruplara göre, STZ grubunda, kontrol ve Sham grubuna göre hata sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ( $P<0,05$ -ANOVA). Hata testi genellikle referans belleği (reference memory) bize davranış sonucu olarak verir. Referans bellek değişmeyen şartlara uyum sağlamak için gereken bellektir. Buradaki hata sayısı yine STZ' ye rağmen Fesleğen özütü verilen

gruplarda, STZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ( $P<0,05$ -ANOVA). Yani STZ yüzünden bozulan referans bellek, istatistiksel olarak anlamlı derecede fesleğen özütü tarafından daha iyi hale getirilmiştir. Bu veriler tablo 4.3 ve şekil 4.4'te gösterilmektedir (Tablo 4.3, Şekil 4.4).

**Tablo 4.3** Sekiz Kollu Radial Maze testi hata sayısı

Grp	Hata (n) ortalaması	Sd
KONTROL	1,0741	1,88930
SHAM	1,2237	1,47512
FES	1,3333	1,67106
STZ+FES	1,3654	1,59692
STZ	1,6604	1,97039

Grp; grup, FES; fesleğen grubu, STZ; Streptozomisin grubu, STZ+FES; Streptozomisin ve Fesleğen grubu, m; ortalama, n; hata sayısı sd; standart sapma



**Şekil 4.4** Sekiz Kollu Radial Maze testi hata grafiği

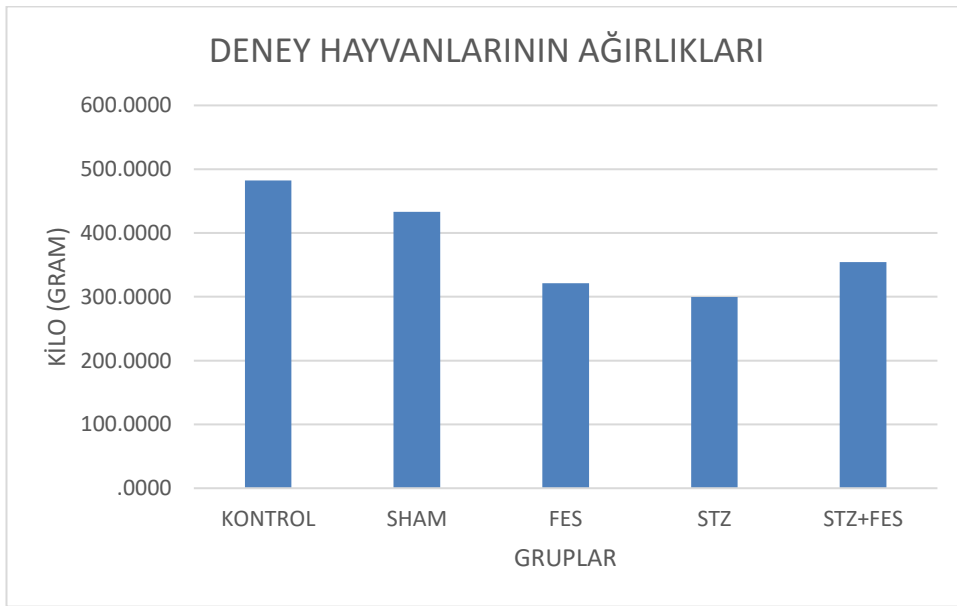
Çalışmamıza dahil ettiğimiz deney hayvanlarının test sonundaki vücut ağırlıklarına baktığımızda STZ grubunda en fazla kilo kaybının olduğu, bu gruba fesleğen eklenen STZ + FES grubunun ise kilo kaybını azalttığı görülmektedir ( $p<0,05$ -ManWhitney U). Bu veriler Tablo 4.4 ve şekil 4.5 'te gösterilmektedir (tablo 4.4, şekil 4.5). Yine deney sonundaki kan glikoz seviyelerine baktığımızda STZ grubunda en yüksek seviyeyi, Fesleğen eklenen grupta da anlamlı azalmayı görmekteyiz ( $p<0,05$ -

ManWhitney U). Bu veriler de tablo 4.5 ve şekil 4.6'da gösterilmektedir (Tablo 4.5, Şekil 4.6).

**Tablo 4.4** Gruplardaki tüm rat'lar 14 gün radial maze testi için hazırlamıştır. Test sonucundaki ağırlıkları tabloda gram olarak verilmiştir.

Grup	Kilo (gram)
KONTROL	482,1667
SHAM	433,3333
FES	321,4444
STZ	299,7500
STZ+FES	354,2857

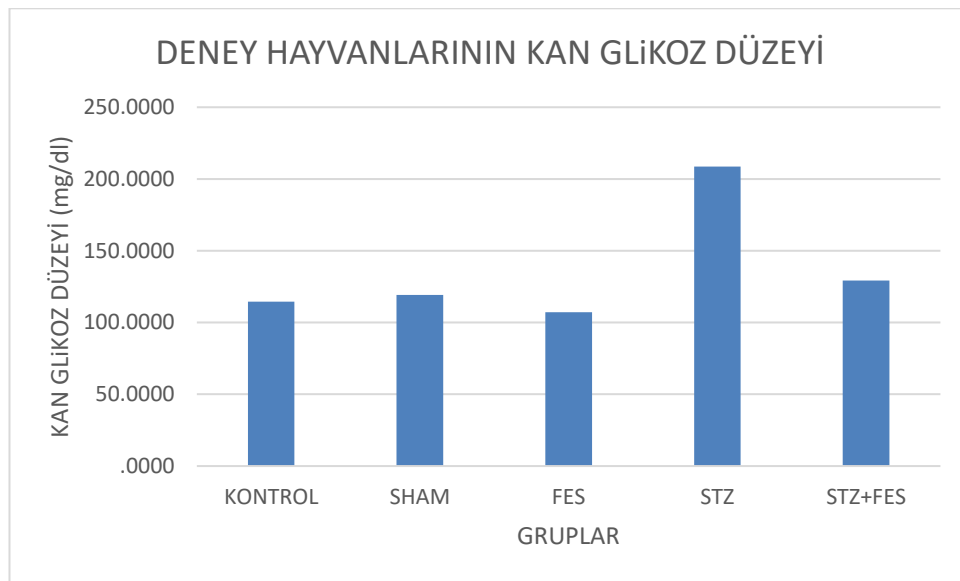
Grp; grup, FES; fesleğen grubu, STZ; Streptozomisin grubu, STZ+FES; Streptozomisin ve Fesleğen grubu.



**Şekil 4.5** Gruplardaki tüm ratların ağırlık grafiği

**Tablo 4.5** Grupların test sonu kan glikoz seviyeleri

Grup	Kan glikoz seviyesi (mg/dl)
KONTROL	114,5000
SHAM	119,1667
FES	107,1111
STZ	208,7500
STZ+FES	129,2857

**Şekil 4.6** Grupların test sonu kan glikoz seviyeleri

Not: Gruplardaki tüm hayvanların polidipsi ve poliüri durumları kafeslere bakılarak tespit edilmiştir. Kafeslerin ıslaklığına göre göreceli olarak stz grubundaki hayvanlarda polidipsi ve poliüri görülmüştür.

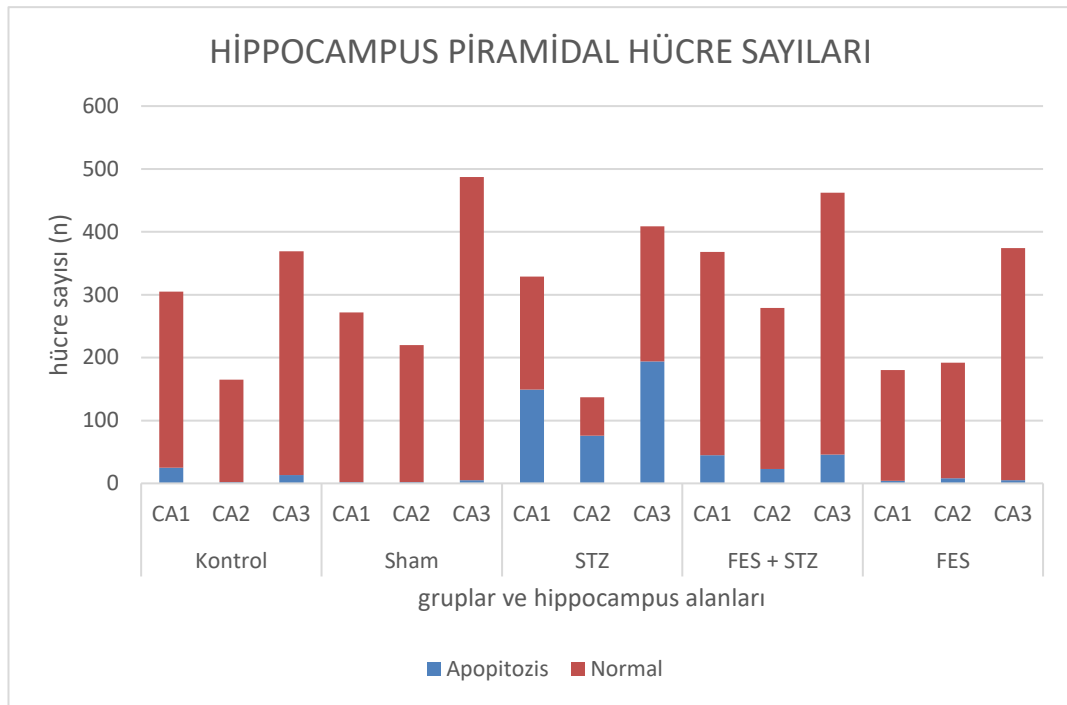
Davranış testleri sonrasında sıçanlar uygun şartlarda dekapite edildi beyinleri çıkartıldı. Fiksasyon işleminden sonra parafine gömüldü. 5 micronluk ince kesitler alındı. HE ile boyanan kesitlerde Hippocampus ve alanlarını 4x büyütmede tanımladık. Bu belirlediğimiz kesitlerin bir altındaki kesitlerde Tunnel yaparak 40x büyütmede apoptotik hücreleri belirledik ve saydık. Grupların CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki apoptotik hücreleri ve normal hücreleri sayıldığında STZ grubunda apoptozisin arttığı, STZ + FES grubunda ise bu apoptozisin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $P < 0,05$ -ANOVA). Bu veriler tablo 4.6, şekil 4.7 ve şekil 4.8' de gösterilmektedir (Tablo 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).



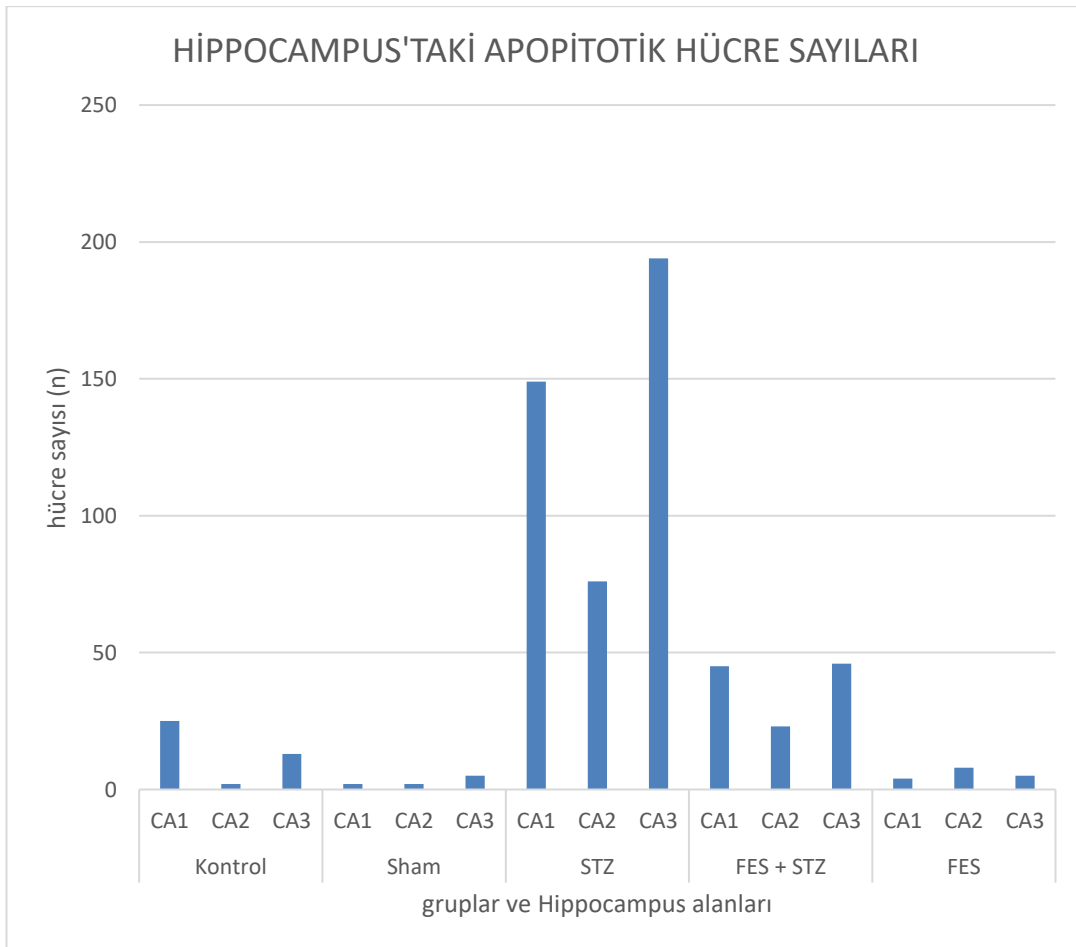
Dekapite edilen beyinler HE boyama ve Tunnel boyama sonrasında mikroskop altında fotoğraflandı. Bu fotoğraflarda STZ grubundaki apoptotik hücrelerin kontrol ve Sham grubuna göre yoğun olduğu, STZ+ FES grubunda ise apoptotik hücrelerin STZ grubuna göre yoğunluğunun azaldığı gösterildi. Fesleğen grubunda apoptotik hücre sayısının kontrol ve Sham gruplarına göre çok değişmediği gözlemlendi. Şekil 4.9, şekil 4.10 ve şekil 4.11'de tunnel boyama ile hippocampus hücreleri gösterilmektedir (Şekil 4.9, şekil 4.10 ve şekil 4.11).

**Tablo 4.6** Grupların Hippocampus CA1, CA2, CA3 alanlarındaki Apoptotik ve normal hücre sayıları

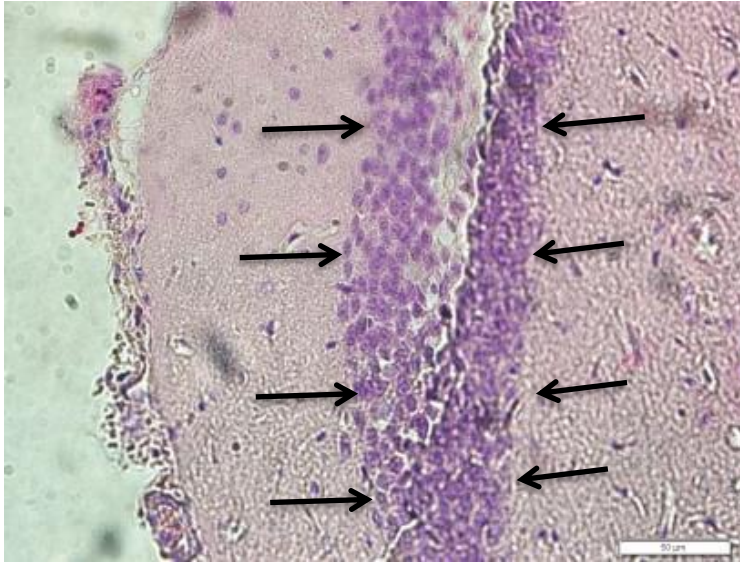
<b>GRUP</b>	<b>Hippocampus Alanları</b>	<b>Apoptozis</b>	<b>Normal</b>
KONTROL	CA1	25	280
	CA2	2	163
	CA3	13	356
SHAM	CA1	2	270
	CA2	2	218
	CA3	5	482
FES	CA1	149	180
	CA2	76	61
	CA3	194	215
STZ	CA1	45	323
	CA2	23	256
	CA3	46	416
STZ+FES	CA1	4	176
	CA2	8	184
	CA3	5	369



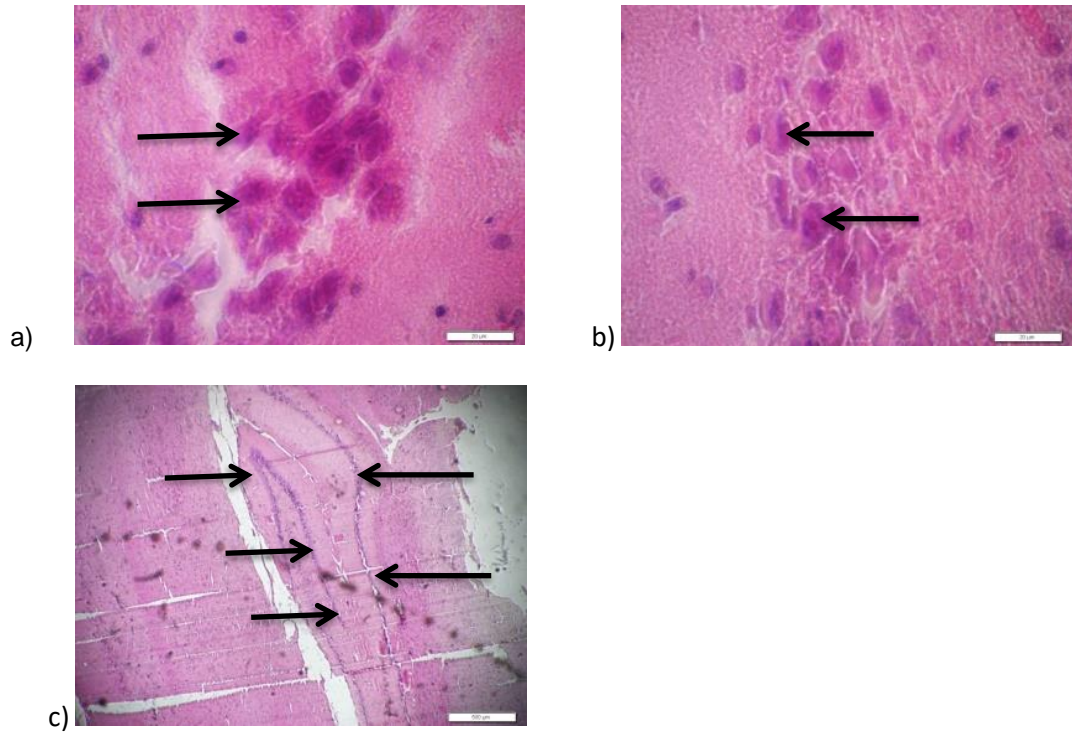
**Şekil 4.7** Grupların Hippocampus CA1, CA2, CA3 alanlarındaki Apoptotik ve normal hücre dağılımı



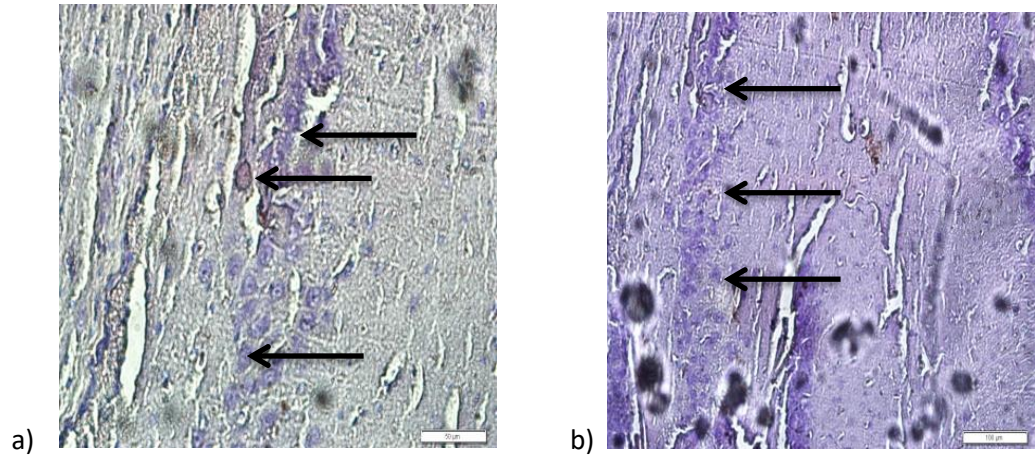
**Şekil 4.8** Grupların Hippocampus CA1, CA2, CA3 alanlarındaki hücre sayıları



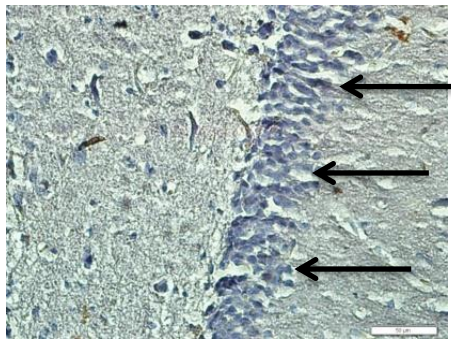
**Şekil 4.9** Sham grubunun TUNNEL boyaması; apoptotik hücreye rastlanmamıştır (20X)



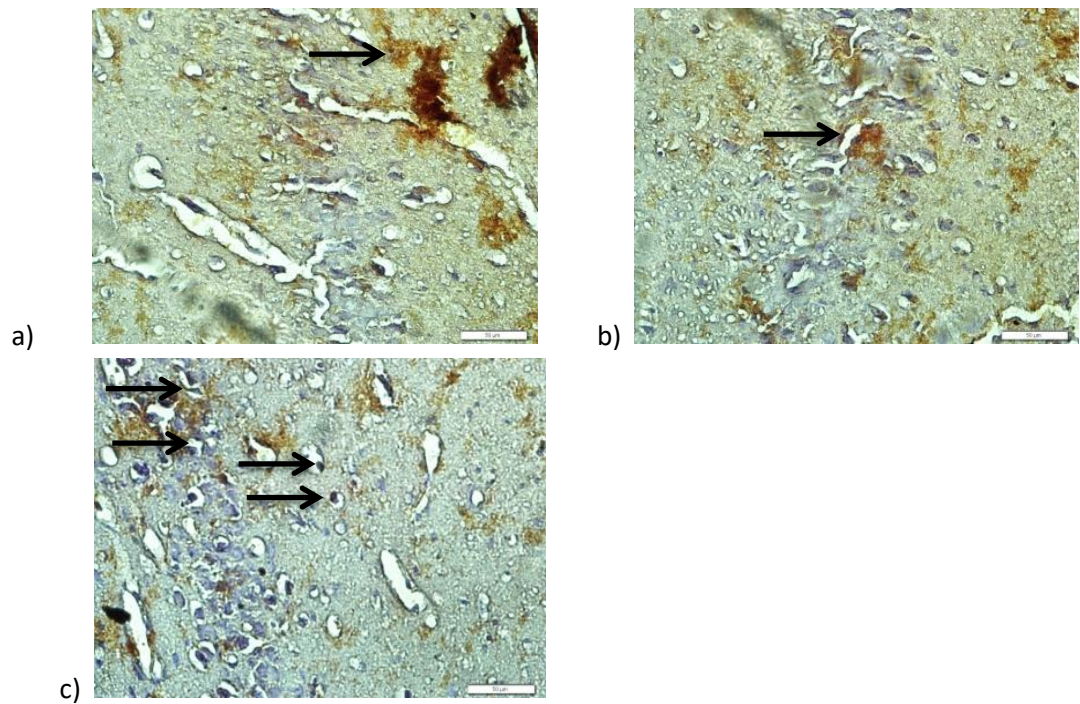
**Şekil 4.10** Kontrol grubunun HE boyaması; apoptotik hücreye rastlanmamıştır (a. 40X , b. 40X, c. 10X)



**Şekil 4.11** STZ+ FES grubunun Tunnel boyaması (40X)



**Şekil 4.12** FES grubunun Tunnel boyaması (20X)



**Şekil 4.13** STZ grubunun Tunnel boyaması (20X)

## 5. TARTIŞMA

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda yaşlı bireylerde Tip 1 DM ve Tip 2 DM hastalıklarında insülin direnci ile ilişkili ortak molekül ve hücresel özellikleri olması nedeniyle Alzheimer Hastalığı için Tip 3 DM terimi önerilmiştir (Kandimalla, Thirumala et al. 2017). DM ve Alzheimer hastaları ile ilgili son klinik ve temel çalışmalar daha önceden DM, insülin direnci ve Alzheimer Hastalığı arasında bildirilmemiş hücresel ve patolojik ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmalar insülinin Alzheimer Hastalığı'nın patolojisindeki etkilerini hücresel ve moleküler mekanizmalar yoluyla çözen çeşitli temel biyolojik çalışmalar ile de güçlendirilmiştir. Örnek verirse insülin nörofibriler yumakların oluşumunda önemli bir rolü olan tau fosforilasyonuna neden olan glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$  aktivasyonunda yer alır. İlginç olan da insülinin amiloid plaklarının oluşumunda da rolü olmasıdır.

İnsülin reseptörü (IR) nöronlarda fazla görüldüğü gibi özellikle Hippocampus, Hipotalamus, serebral korteks'te de fazla miktarda bulunur (Kandimalla, Thirumala et al. 2017). Özdemir ve arkadaşları santral sinir sisteminde astroglial hücre kültürü üzerinde insülin ve glukozun etkisini araştırmışlardır. İnsülin ve glukoz düzeylerinin çok kritik olduğu sonucuna varmışlardır. Hücre viablitesinin sadece optimal seviyede arttığını belirlemişlerdir. (Özdemir, Akça et al. 2012). Beyinde insülinin ve IGF sinyal mekanizmalarının bilişsel işlev için sinaptik plastisite oluşturulmasında rolü önemlidir. İnsülin IR ile bağlandıktan sonra çeşitli fosforilasyonlar ile çeşitli tirozin kalıntılarının aktivasyonu gerçekleşir. Bu fosfotirozin kalıntıları IRS 1 ve IRS 2 için fosfatidil inositol 3-kinaz (PI3K), Glikoz sentaz kinaz 3 beta (GSK3 $\beta$ ) sinyalleşmesi, enerji üretimi için mitokondrial düzenleme ve Wnt sinyalleşme kaskatları gibi birkaç sinyalleşme kaskatını başlatmak için önemlidir. PI3K insülinin metabolik etkilerinin neredeyse tamamıyla ilişkili olup Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfat (PIP2) yi Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat (PIP3) e dönüştürür. Daha sonra da PIP3 protein kinaz B (PKB) 'yi fosforile edip spesifik protein kinazlar tarafından aktive edilir. PKB, GSK3 $\beta$  fosforilasyonu da dahil olmak üzere birçok önemli hücresel göreve sahiptir. Bu yol hücre yüzeyindeki IR'ünü hücrenin içindeki glikojen metabolizması enzimleriyle birleştirir. İnsülinin glikojen sentezi üzerindeki etkisini taklit eden güçlü ve seçici GSK3 inhibitörü geliştirilmiştir ve bunlar insülin direnci ve Tip 2 DM tedavisinde kullanılırlar.

İnsülin nörotransmitter reseptörlerinin içselleştirilmesiyle sinaptik plastisiteyi düzenler(Kandimalla, Thirumala et al. 2017). Örnek verecek olursak AMPA reseptörlerinin içselleştirilmesiyle uzun süreli depresyona neden olur ve ayrıca GABA reseptörlerinin postsinaptik membranlara alınmasıyla GABA reseptör aracılı sinaptik

iletimi destekler. İnsülin ayrıca  $\beta$ - adrenerjik reseptörlerin ve AMPA reseptörün içselleştirilmesini kontrol eder ve dendritik sinaps proteini post sinaptik yoğunluk 95 proteininin translyasyonunu indükler. Bu gözlemler insülinin sadece nöronal sağkalım için glikoz metabolizması için değil aynı zamanda sinaptik plastisite durumunda sinaptik plastisite durumunda kuruluş için sinaptik iletim nörotransmisyonunun düzenlenmesinde rol oynadığını düşündürmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarla Tip 2 DM hastalarında farklı bilimsel patolojiler gösterildi fakat insülinin sinaps sayısı ve boyutu üzerine etkisi olup olmadığına dair çalışma henüz yoktur. Bu nedenle Tip 2 DM hastalığının anormal nöronal fonksiyon ile ilişkili olup olmadığını araştırmak önemli bir çalışma olacaktır. Hatta buna destek olan çalışmalar nöronal ve periferik insülin duyarlılığının Tip 2 DM hastalığında kusurlu olduğu hipotezini desteklemektedir.

Hiperglisemi göstermeyen insüline dirençli hastalarda nörodejenerasyon ve bilişsel düşüşü gösteren çok sayıda çalışma vardır, hiperglisemi aslında insülin etkisinin kaybı kadar önemlidir sonucuna varılır. Bu iki farklı durum arasındaki moleküler bağlantıda öncelikle Alzheimer Hastalığı'ndaki demans riskinin artmasından aslında nöronal insülin direncinin veya hiperinsülinemilerin nörotoksitesinin sorumlu olup olmadığını belirlemek gerekir. İlginç bir şekilde yapılan çalışmalarda yaş ilerlemesiyle Tip 2 DM hastalarının iskelet kası, karaciğer ve yağla sınırlamayan serebral korteks ve Hippocampus'ta IR varlığı hakkında bilgi verdiğini göstermiştir (Kandimalla, Thirumala et al. 2017).

Oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, ileri glikasyon açısından Tip 2 DM ve Alzheimer Hastalığı'nda son ürünlere bakıldığında bunları iki kenarı keskin bıçağa benzetilir. Yaşam için gerekli oldukları gibi kontrol edilmezlerse Tip 2 DM, Alzheimer Hastalığı ve Huntington Hastalığı gibi zararlı olabilirler. Oksidatif stres (OS) bu serbest radikallere karşı koymak için reaktif oksijen türlerinde (ROS) ve reaktif azot türlerinin (RNS) üretiminde ve inflamatuvar yanıtlarda bir dengesizlik olduğunda ortaya çıkar. Hem Alzheimer Hastalığı hem de Tip 2 DM hastaları OS ile indüklenen hastalık süreçlerinin prototipik örnekleridir ve bundan dolayı Alzheimer Hastalığı tipik diyabet olarak önerilmektedir. Serbest radikaller sürekli metabolizmanın fizyolojik yan ürünü olarak hücrelerde üretilir. Homeostazı korumak için, antioksidanlar, enzimlerin aktivasyonu ile üretilir, bu da hücre bütünlüğünün korunması ile apoptozisin ve hücre hasarının önlenmesiyle sonuçlanır. Serbest radikaller oksidatif güçlerine bağlı olarak aerobik metabolizmada üretilenler ve Alzheimer Hastalığı ile Tip 2 DM hastalığında görüldüğü gibi daha uzun reaktiviteye sahip olanlar gibi daha düşük reaktiviteye sahip olanlara bölünebilir. Düşük reaktif serbest radikaller genellikle küçük hücre hasarına neden olur ve nispeten daha etkin bir şekilde onarılabilir. OS mitokondri, sitoplazma ve

hücre zarları gibi farklı hücre bileşenlerinde çeşitli enzimatik kaskadları aktive ederek apoptozis ile hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olur. İnsan beynindeki lipid bakımından zengin membranlar oksidatif strese karşı özellikle savunmasızlardır. Diğer hücre hasarı modları amiloid  $\beta$  ve Tau gibi proteinlerdeki yapısal değişikliklerle de açıklanabilir (Kandimalla, Thirumala et al. 2017).

Hücrelerin güç merkezleri olarak kabul edilen mitokondriler ROS ve RNS üretiminde anahtar yapılardır. Mitokondriyal membran hücrenin sitoplazmasına girebilen bu ürünler için çok geçirgendirler. Ancak bu ürünlerin çoğu metabolizma sonucu üretilip kolay bir şekilde suya ve/ veya oksijene dönüştürülür. Bu da mitokondrilerin kendisinde veya sitoplazmaya girdikten sonra dismutaz enzimlerinin varlığında hücre hasarını önleyebilir. Bu koruyucu sisteme rağmen özellikle mitokondri işlevsiz ve ATP üretiminde daha az verimli olduğunda oksidatif dengesizlik ortaya çıkabilir ki bu da Alzheimer Hastalığı ve Tip 2 DM de görülen ROS üretiminin artmasına neden olur. Mitokondri yoluyla ROS üretimi birkaç enzimatik reaksiyondan kaynaklanabilir. Bu enzimler aerobik solunumun moleküler oksijeni süperoksit iyonuna veya hidrojen peroksite dönüştürür. Enzimler mitokondrinin veya mitokondriyal matriksin kendisinin dış veya iç zarlarında bulunabilir. Ayrıca amiloid  $\beta$ 'nin mitokondriyal fonksiyonun bozulmasında doğrudan bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Yakın tarihli bir çalışmada mitokondriyal lokalize amiloid  $\beta$ 'nin serbest radikallerin üretimini arttırdığı ve Alzheimer Hastalığı oluşturulan ratların beyinlerinde mitokondriyal disfonksiyona ve nöronal hasara neden olduğunu bildirilmiştir (Reddy and Beal 2008).

Amiloid  $\beta$  APP'nin proteolitik işlenmesi nedeniyle oluşur. Bu h1APP2 'ye çok benzerdir ve bu da Alzheimer Hastalığı'na benzer şekilde Tip 2 DM'a yol açan adacık hücre fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanır. Çalışmalar amiloid  $\beta$ 'nin hücrelerin mitokondriyal oksidatif hasara karşı sahip oldukları koruyucu mekanizmaları değiştirebileceğini göstermektedir. Mitokondriyal iç zardaki ayrılma proteinlerinin serbest radikal üretimini azalttığı gösterilmiştir. Bu mekanizma Alzheimer hastalarının beyinlerinde etkisiz görünmektedir ve amiloid  $\beta$  birikimi oksidatif strese yol açan hücre değişikliklerine katkıda bulunabilir. Hiperfosforile tau proteini Alzheimer Hastalığı'nın patolojisinin ayırt edici özelliklerinden biri olan nörofibriler yumaklara neden olur. Bu tau proteinleri ve h1APP'nin oksidatif strese yol açtığı mekanizma iyi anlaşılmamıştır, ancak bazı araştırmacılar bunların ikincil süreçler olduğuna inanmaktadır. Yapılan bir çalışma sonucunda bu tau proteinlerinin mitojen aktive edici protein kinaz ve PKB gibi hücresel yolları tetikleyerek OS ve hücre yapısında hasara yol açtığını bildirmişlerdir. Bu proteinlerin çoğu incelenmiş ve tau fosforilasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Lipinski 2001).

Pankreas adacık hücrelerinde azalan insülin üretimi veya bozulmuş insülin reseptörleri nedeniyle hiperglisemi, ROS oluşumuna ve hücre hasarına yol açan gelişmiş glikasyon son ürünlerinin birikmesine neden olur. Bu ürünlerin süperoksit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği, bunun sonucunda da beyinde lipit peroksidasyonu ve hücre hasarı ortaya çıktığı gösterilmiştir. Oksidatif stres ve hiperglisemi arasındaki bağlantı, Tip 2 DM'da meydana gelen serbest radikallerdeki artışın süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi değişen antioksidan seviyelerinden kaynaklanabilmesidir. Oksidatif strese neden olan proksidanlar ve antioksidanlarda ortaya çıkan bu dengesizlik Alzheimer Hastalığı'nda ve Tip 2 DM gibi hastalıklarda görülür (Kandimalla, Thirumala et al. 2017).

İnsan beyni peroksidize edilebilir çoklu doymamış yağ asitlerinin bolluğu ve antioksidanlar ile enzimlerin göreceli azlığı nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Tip 2 DM patolojisinde lipit profilinde değişikliklere neden olur, bu da hücrelerin lipit peroksidasyonuna daha yatkın olmasına neden olur. Alzheimer Hastalığı'nın patolojisinde de benzer süreçler gözlenmiştir. Lipit peroksidasyonu hücrelerde çoklu bağlara sahip çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle birleşmesi muhtemel olduğundan oksidatif stresin temel bir biyolojik belirteçidir. Bundan dolayı da lipit peroksidasyonu, Alzheimer Hastalığı ve Tip 2 DM dahil olmak üzere oksidatif stresle ilerleyen herhangi bir hastalık sürecinde artan ROS ve RNS seviyeleri ile ilişkilidir (Kandimalla, Thirumala et al. 2017).

Beyindeki insülinin rolü kas dokusu, yağ dokusu ve karaciğere kıyasla çok az tartışılmıştır. Son çalışmalarda beyindeki glikoz metabolizması gibi önemli insülin fonksiyonlarını göstermişlerdir. Nöronal plastisite, nörotrofik ve nöroendokrin fonksiyonların korunmasında GSK3β sinyalini düzenler. IGF / insülin sinyalleme sinin nöroprotektif fonksiyonu için anahtar molekül, pro- apoptotik mitokondriyal protein Bcl2 ilişkili apoptoz düzenleyici protein ve transkripsiyon faktörü FOXO gibi bilinen apoptoz düzenleyicilerinin doğrudan fosforilasyonu ile aracılık edilebilen PKB'dir. FOXO proapoptotik Bcl2 aile üyesi BIM-1, Aktive B'nin nükleer faktör kappa- hafif zincir-arttırıcısı sağkalım yanlısı Bcl2 aile üyeleri Bcl-XL, A1 ve c-IAP2 transkripsiyonunu kontrol eder ve cAMP tepkili element bağlayıcı protein, Bcl2 ve beyinden türetilen nörotrofik faktör nin ekspresyonunu kontrol eder. Hem IR hem de insülin beyinde bulunup insülin kan-beyin bariyeri boyunca aktif olarak taşınır ve beyinde lokal olarak da üretilebilir. IR'ler de sinapta nörotransmitter salınımını ve reseptör alımını düzenler ve böylece sinaptik/ nöronal plastisiteden sorumludur. IR'ler serebral korteks ve Hippocampus'te bol miktarda bulunurlar ve bundan dolayı öğrenme ve bellek işlemeden sorumlu olurlar, bu da bilişsel işlevlerden sorumludur. İntraserebroventriküler STZ çalışmaları IR'ler bozulduğunda sıçanlarda bilişsel



bozulma göstermiştir ve aksine insülinin i.c.v. enjeksiyonu sıçanlarda hafıza fonksiyonunu iyileştirir. Bu çalışmalara dayanarak insülinin Alzheimer Hastalığı'nın patolojisinin altında yatan hücre ve moleküler olaylar üzerindeki rolünü tamamlamıştır. Diyabette insülin, Alzheimer Hastalığı patolojisinin oluşumunda amiloid  $\beta$  ve tau metabolizmasını fosfolipaz C, PI3K ve MAP kinazlar gibi sinyalleme kaskadı aracılığıyla düzenler (Kandimalla, Thirumala et al. 2017).

Tau nöronal bir iskelet proteindir ve mikrotubul polimerizasyonu ve stabilizasyonundan sorumludur. GSK-3 $\beta$ , tau proteininin mikrotubullere bağlanmasından sorumludur. Bu işlem fosforilasyon yoluyla protein kinazlar tarafından düzenlenir. GSK-3 $\beta$  aktivitesi, insülin sinyal yolunun aşağı akış olayı olduğu için insülin veya insülin büyüme faktörü (IGF-1) tarafından aşağı regüle edilir. Hem IGF-1 hem de IGF-1 reseptörleri homologdur ve benzer hücre içi sinyal olaylarını tetikler. Hong ve arkadaşları, 1997 yılında insülin ve IGF-1 tarafından tau fosforilasyonunda bir azalma göstermişler ve insan nöron kültürlerinde GSK-3 $\beta$ 'nin fosfonositid 3- kinaz yoluyla inhibe edilmesiyle tau proteininin mikrotubullere bağlanmasını desteklemektedir. Normalde Akt sinyali GSK-3 $\beta$ 'nin fosforilasyonunu içerir ve glikojen sentezini inaktive eder. İnsülin direnci GSK-3 $\beta$ 'nin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açar. Tau proteininin fosforilasyon aktivitesi dışında insülin APP metabolizmasını düzenleyebilir ve A $\beta$ 'nin anabolizması ve katabolizmasını dengeler. Qiu ve arkadaşları insülinin Alzheimer hastalarının beyinlerinde A $\beta$ 'nin klerensinde insülin parçalayıcı enzimi etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Bu enzimler insülinin kendisi ve diğer peptidlerle birlikte hücre dışı A $\beta$ 'nin degradasyonunda rol oynayan ana metaloproteazdır (Qiu, et al 1998). İlginç bir şekilde de insülinin sıçan kortikal nöronlarının primer kültürlerinde ve vahşi tip APP'yi aşırı eksprese eden sıçan nöroblastom hücrelerinde hücre dışı A $\beta$ 1-40 ve A $\beta$ 1-42 seviyelerini çözümler APP $\alpha$  ile birlikte arttırdığı gösterilmiştir. İnsülin A $\beta$ 'nin insülin parçalayıcı enzim ile hücre dışı bozulmasını inhibe ederek ve A $\beta$ 1-40 ve A $\beta$ 1-42'nin hücre içi konsantrasyonlarını önemli ölçüde azaltan insülin uyarıcı A $\beta$  salgılanması yoluyla hücre dışı A $\beta$  konsantrasyonunu değiştirir.

Genel olarak bu sonuçlar insülinin Tau proteinini ve nöronlardaki A $\beta$  ve APP metabolizmasını düzenlemede önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu nedenle insülin sinyalinin disfonksiyonu Alzheimer hastalarının beyinlerinde plaklara yol açan patolojik olaylarda yer alabilir.

Tip 2 DM hastalığındaki insülin direnci mitokondriyal disfonksiyona neden olur ve bu da inflamasyon yanıtını tetikler. Bu koşullarda insülin direnci IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-18, Tümör nekroz faktör alfa,  $\alpha$ -1-antimiotripsin ve C reaktif protein gibi sitokin düzeylerini artırır. Benzer şekilde aynı enflamatuar mekanizma Alzheimer Hastalığı'nda da tetiklenir. Tip 2 DM hastalarının glikasyon son ürünleri için reseptörleri yukarı regüle

ederek A $\beta$  agregasyonunu ve serebrovasküler inflamasyonu teşvik ederek diyabetik Alzheimer sıçan modelinin nörodejenerasyonunu arttırdığı da bildirilmiştir. Öte yandan Alzheimer hastalarının plaklarında ve beyin omurilik sıvısında bulunan IL-6'ya karşı immün reaktivitenin yükseldiği bildirilmiştir.

Davranış testi olarak sekiz kollu radial maze seçilmiştir ve bu testler birçok STZ indüklenmiş Alzheimer modelinde de kullanılmıştır (Kosaraju, Madhunapantula et al. 2014). Önemli bir davranış testi olan maze testindeki sonuçlarımızda test bitirme süresi en kötü olarak STZ grubu olmuş, bu grupta kontrol ve Sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir zamanda uzama tesbit edilmiştir ( $P<0,05$ -ANOVA). Uzaysal öğrenme yeteneğini ölçmeye yönelik olarak bazı çalışmalarda da kullanılmıştır (Shin, Chung et al. 2016). STZ indüklenmiş ratlarda kısa süreli hafızanın ve uzaysal öğrenme yeteneğinin bozulduğu da bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Kim, Jung et al. 2016). Çalışmamızda da sonuçlar bunu desteklemektedir. Zaman testi genellikle çalışan belleği (working memory) bize davranış sonucu olarak verir. Çalışan bellek değişen şartlara uyum sağlamak için gereken bellektir. Buradaki uzama yine STZ' ye rağmen Fesleğen özütü verilen gruplarda, STZ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede kısalmıştır ( $P<0,05$ -ANOVA). Yani STZ yüzünden bozulan çalışan bellek, istatistiksel olarak anlamlı derecede fesleğen özütü tarafından daha iyi hale getirilmiştir. Fesleğen ile ilgili birçok çalışma vardır ve bunlar önemli sağlık sorunlarının tedavisinde büyük tıbbi değere sahiptir ve tüm dünyada kullanılmıştır (Antora and Salleh 2017). Hafıza üzerine olumlu etkileri olduğuna dair bizim çalışmamızı destekleyen çalışmalar da mevcuttur, bu çalışmalarda fesleğenin özellikle antioksidan aktivitesinden bahsedilmektedir (Sarahroodi, Esmaeili et al. 2012). Hatta fesleğenin olası iskemi durumlarında geri dönüşlerde önemli pozitif etkisi olduğuna dair çalışmalar da vardır (Bora, Arora et al. 2011).

Bellek için tarihte birçok bitkiler kullanılmıştır ve bunların da etkileri görülmektedir. Örneklersek Flavonoidleri içeren kakaonun bilişsel yetenekleri koruduğunu gösteren çalışmalar vardır(Nehlig 2013), Yine yeşil çay gibi bitkilerin öğrenme ve hafızada, NMDA bağlı ve NMDA bağımsız yollar ile bilişsel işlevlerde etkili olduğu da görülmüştür (Lardner 2014).

Çalışmamızda da görüldüğü gibi STZ yapılan rat gruplarında kilo kaybı ve kan glikozunda artış STZ ile indüklenen DM ratlarla yapılan çalışmalarda da görülmektedir(Liu, Song et al. 2016). STZ DM ile ilgili yapılan birçok çalışmada indükleyici olarak kullanılmakta ve ratlarda kilo kaybı ve kan glikoz değerlerinde artış yapmaktadır (Thomson, Al-Qattan et al. 2015; Liu, Song et al. 2016) . Bu çalışmada STZ yapılan ratlarda en fazla kilo kaybı görüldü ve STZ ile beraber fesleğen verilen

grupta ise bu kilo kaybının daha az olduğu görüldü. Bu çalışmaya benzer bitkisel tedavilerin yapıldığı çalışmalarda da yine STZ ile indüklemeye yapılmış ve bu aromatik bitkilerin etkileri gözlenmiştir (Wang, Teng et al. 2016). Fesleğenin kan glikoz düzeyini düşürücü özelliği farklı çalışmalarda da görülmektedir (Antora and Salleh 2017). Yine bazı çalışmalarda bitkisel tedavilerin STZ ile indüklenmiş ratlardaki kan glikoz seviyesi üzerine etkileri bizim çalışmamız ile paralel olarak STZ'nin kan glikoz seviyesini arttırdığı yönünde bulgular vardır (Taher, Zakaria et al. 2016).

STZ ve fesleğenin beyinde, özellikle hipokampusta apoptozise yönelik etkileri olduğunu yapılan davranış testleri ile görmekteyiz. Daha ayrıntılı bakıldığında CA3 bölgesinde nöronal atrofiyi azalttığına dair bizim çalışmamızla paralel çalışmalar da mevcuttur (Ayuob, Firgany et al. 2017). Bu etkilerinden dolayı fesleğenin depresyon tedavisinde de etkili olabileceğine dair çalışmalar vardır (Ayuob, Firgany et al. 2017). Çalışmamızda apoptozisin STZ grubunda anlamlı şekilde arttığı, Fesleğen eklenen grupta ise bunu düzeltici etkinin olduğu görülmektedir. Hipokampusteki nöron atrofisini ve apoptozisi azalttığını gösteren diğer çalışmalar da bizim çalışmamızı desteklemektedir (Ali, Abd El Wahab et al. 2017). Yine aynı çalışmada hipokampusun CA3 alanındaki hücreler bakıldığında fesleğenin piramidal hücreleri koruyucu davranış sergilediği görülmektedir (Ali, Abd El Wahab et al. 2017). Fesleğenin bir çalışmada, nörojenezisi ve astrosit sayısını arttırdığı da gözlenmiştir (Ali, Abd El Wahab et al. 2017).

Literatüre genel olarak bakıldığında nörodejeneratif hastalıklarda güçlü ve kesin bir tedavi henüz bulunamamıştır. Çalışmamızda fesleğenin Alzheimer Hastalığı'nda bir ilaç seçeneği olabileceği ortaya konmuştur. Fakat bunun için daha ileri moleküler ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇ

Alzheimer Hastalığı yaşa bağlı demansların en sık sebebidir. Bu hastalık progresif, dejeneratif yaygın bir santral sinir sistemi hastalığıdır. Nöron kaybı Hippocampus piramidal hücrelerinde daha belirgindir. Tedavisi için çeşitli ajanlar bilinmesine rağmen daha güçlü veya kesin bir tedavi henüz bulunamamıştır. Alzheimer Hastalığı, diyabetes mellitus hastalarının yarısından fazlasında görülmektedir. Bu iki hastalık arasındaki ana benzerlik insülin direnci ve inflamatuvar yolaklardır. Bu yüzden Alzheimer Hastalığı Tip 3 Diyabet olarak da isimlendirilmektedir. Fesleğen (*Ocimum Gratissimum*) antidiyabetik etkisi bilinmekte ve kullanılmaktadır. Fakat Alzheimer Hastalığı'ndaki davranışsal ve nöroprotektif etkisi henüz yeterli şekilde çalışılmamıştır.

Bizim çalışmamızda, STZ ile uzaysal öğrenmesi bozulan sıçanlarda fesleğen özütü ile beraber istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde öğrenme davranışı düzelmiştir ( $p<0,05$ ). Buna paralel olarak fesleğen, Hippocampus CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki apoptotik nöron kaybını, STZ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır ( $p<0,05$ ). Sonuçta, fesleğen özütü, Alzheimer Hastalığı'na benzer şekilde, STZ'nin sebep olduğu Hippocampus nöron kaybına karşı nöroprotektif etki göstermiş ve buna paralel uzaysal öğrenme davranışını korumuştur. Bu çalışma, fesleğen özütünün Alzheimer Hastalığı'nda kullanılması yönünde ileride yapılacak moleküler ve klinik çalışmalar için önemli bir kaynak olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

Adams, R. D. (1997). Principles of neurology, McGraw-Hill, **Health Professions Division**.

Ali, S., M. Abd El Wahab, et al. (2017). The antidepressant-like effect of *Ocimum basilicum* in an animal model of depression. **Biotechnic & Histochemistry** 92(6): 390-401.

Allan H. Ropper, R.H.B., *Principles of neurology*. 8 ed, ed. M. Emre. **Güneş Kitabevi**, Ankara, 2006.

Amaral, D. and R. Insausti (1990). The human nervous system, **San Diego: Academic**: 711-755.

Amoateng, P., E. Quansah, et al. (2018). Medicinal Plants Used in the Treatment of Mental and Neurological Disorders in Ghana. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**

Antora, R. A. and R. M. Salleh (2017). Antihyperglycemic effect of *Ocimum* plants: A short review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 7(8): 755-759.

Arıncı, K. and A. Elhan (2001). Anatomi. **Güneş Kitabevi**, Ankara, 2001.

Arriagada, P. V., J. H. Growdon, et al. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. **Neurology** 42(3 Pt 1): 631-639.

Ates, O., S. R. Cayli, et al. (2006). Neuroprotective effect of mexiletine in the central nervous system of diabetic rats. **Molecular And Cellular Biochemistry** 286(1-2): 125-131.

Ayuob, N. N., M. G. Abd El Wahab, et al. (2018). *Ocimum basilicum* improve chronic stress-induced neurodegenerative changes in mice hippocampus. **Metabolic Brain Disease** 33(3): 795-804.

Ayuob, N. N., A. E.-D. L. Firgany, et al. (2017). Can *Ocimum basilicum* relieve chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice? **Experimental And Molecular Pathology** 103(2): 153-161.

Barr ML and K. JA. (1988: 266-9.). The Human Nervous System. **JB Lippincott Comp.** Philadelphia,1988.

Berry M, B. L., Standring SM. Nervous System. Williams PL, Bannister and B. M. LH, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ (editors) (1995). *Gray's Anatomy.*, **Churchill Livingstone**, New York, 1995.

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

Bora, K. S., S. Arora, et al. (2011). Role of Ocimum basilicum L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. *Journal Of Ethnopharmacology* 137(3): 1360-1365.

Chung, S.-H. (2009). Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *BMB Reports* 42(8): 467-474.

Duyckaerts, C., M. Panchal, et al. (2009). Morphologic and molecular neuropathology of Alzheimer's disease. *Annales Pharmaceutiques Francaises*.

Erdem, A., M. G. Yaşargil, et al. (1993). Microsurgical anatomy of the hippocampal arteries. *Journal Of Neurosurgery* 79(2): 256-265.

Feldman, A. T. and D. Wolfe (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. Histopathology: Methods and Protocols. C. E. Day. **NY, Springer** New York: 31-43.

Fisher, A. (2008). Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5(3): 433-442.

Gilman, S. (1997). Alzheimer's disease. *Perspect Biol Med* 40(2): 230-245.

Gispen, W. H. and G.-J. Biessels (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends In Neurosciences* 23(11): 542-549.

Grossberg, G. T. (2002). The ABC of Alzheimer's disease: behavioral symptoms and their treatment. *Int Psychogeriatr* 14 Suppl 1: 27-49.

Gurd, J. M., L. Herzberg, et al. (2000). Dementia with Lewy Bodies: A Pure Case. *Brain and Cognition* 44(3): 307-323.

Hooper, N. (2005). Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein, **Portland Press Ltd.**, 2005.

Isaacson, R. L. (2002). Unsolved mysteries: the hippocampus. *Behavioral And Cognitive Neuroscience Reviews* 1(2): 87-107.

Kandimalla, R., V. Thirumala, et al. (2017). Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? A critical appraisal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1863(5): 1078-1089.

Kim, D.-Y., S.-Y. Jung, et al. (2016). Treadmill exercise ameliorates Alzheimer disease-associated memory loss through the Wnt signaling pathway in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal Of Exercise Rehabilitation* 12(4): 276.

Kolev, M. V., M. M. Ruseva, et al. (2009). Implication of complement system and its regulators in Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology* 7(1): 1-8.

Kosaraju, J., S. V. Madhunapantula, et al. (2014). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by *Pterocarpus marsupium* and *Eugenia jambolana* ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 267: 55-65.

Lardner, A. L. (2014). Neurobiological effects of the green tea constituent theanine and its potential role in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders. *Nutritional Neuroscience* 17(4): 145-155.

Linn, J. (2014). Neuroimaging of therapy-associated brain tissue abnormalities. *Curr Opin Neurol* 27(4): 380-389.

Lipinski, B. (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications* 15(4): 203-210.

Liu, C., J. Song, et al. (2016). Antidiabetic and antinephritic activities of aqueous extract of *Cordyceps militaris* fruit body in diet-streptozotocin-induced diabetic Sprague Dawley rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016.

Lopes, J., C. Oliveira, et al. (2009). Cell cycle re-entry in Alzheimer's disease: a major neuropathological characteristic? *Current Alzheimer Research* 6(3): 205-212.

Malve, H. O., S. B. Raut, et al. (2014). Effect of combination of *Phyllanthus emblica*, *Tinospora cordifolia*, and *Ocimum sanctum* on spatial learning and memory in rats. *Journal Of Ayurveda And Integrative Medicine* 5(4): 209.

Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430(7000): 631-639.

McKhann, G. M., D. S. Knopman, et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association

workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7(3): 263-269.

Mohandas, E., V. Rajmohan, et al. (2009). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian Journal Of Psychiatry* 51(1): 55.

Moser, E. and M.-B. Moser (2014). Mapping your every move. Cerebrum: the Dana forum on brain science, **Dana Foundation**,2014.

Nehlig, A. (2013). The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *British Journal Of Clinical Pharmacology* 75(3): 716-727.

Octave, J.-N. and N. Pierrot (2008). Alzheimer's disease: cellular and molecular aspects. *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine* 192(2): 323.

Özdemir, M. B., H. Akça, et al. (2012). Protective effect of insulin and glucose at different concentrations on penicillin-induced astrocyte death on the primer astroglial cell line. *Neural Regeneration Research* 7(24): 1895.

Özdemir, M. B., C. Erdogan, et al. (2013). Injection of specific amyloid-beta oligomers (beta1-40: beta1-42= 10: 1) into rat medial septum impairs memory retention without inducing hippocampal apoptosis. *Neurological Research* 35(8): 798-803.

Özkay, Ü. D., Y. Öztürk, et al. (2011). Yaşlanan dünyanın hastalığı: alzheimer hastalığı. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 18(1): 35-42.

Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., ... & Selkoe, D. J. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid  $\beta$ -protein by degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32730-32738.

Raisman, G., W. Cowan, et al. (1965). The extrinsic afferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain* 88(5): 963-996.

Reddy, P. H. and M. F. Beal (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* 14(2): 45-53.

Rowland, L. P. (2008). Merritt's Neurology. **Güneş Tıp Kitabevleri**. Ankara,2008.

Sahbaz, N., G. Sahin, et al. (2011). In vitro regeneration and analysis of total phenolics in *Ocimum basilicum* L.(sweet basil). *Planta Medica*, Georg Thieme Verlag Kg Rudigerstr 14, D-70469 Stuttgart, Germany.



Sarahroodi, S., S. Esmaeili, et al. (2012). The effects of green *Ocimum basilicum* hydroalcoholic extract on retention and retrieval of memory in mice. ***Ancient Science Of Life*** 31(4): 185.

Saransaari, P. and S. S. Oja (1997). Taurine release from the developing and ageing hippocampus: stimulation by agonists of ionotropic glutamate receptors. ***Mechanisms Of Ageing And Development*** 99(3): 219-232.

Shin, M.-S., K. J. Chung, et al. (2016). Effects of surgical and chemical castration on spatial learning ability in relation to cell proliferation and apoptosis in hippocampus. ***International Urology And Nephrology*** 48(4): 517-527.

Silvestrelli, G., A. Lanari, et al. (2006). Treatment of Alzheimer's disease: from pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. ***Mechanisms Of Ageing And Development*** 127(2): 148-157.

Songur, A., O. A. Özen, et al. (2001). Hipokampus. ***Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*** 21(5): 427-431.

Srivastava, P. and R. S. Yadav (2016). Efficacy of natural compounds in neurodegenerative disorders. ***The Benefits of Natural Products for Neurodegenerative Diseases, Springer***: 107-123.

Strange, B. A., M. P. Witter, et al. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. ***Nature Reviews Neuroscience*** 15(10): 655-669.

Suzuki, M., H. Hagino, et al. (2005). Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. ***Cerebral Cortex*** 15(2): 187-193.

Taher, M., T. M. F. S. T. Zakaria, et al. (2016). Hypoglycaemic activity of ethanolic extract of *Garcinia mangostana* Linn. in normoglycaemic and streptozotocin-induced diabetic rats. ***BMC Complementary and Alternative Medicine*** 16(1): 1-12.

Takada, J., M. A. Machado, et al. (2007). Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. ***Metabolism*** 56(7): 977-984.

Tanaka, Y., K. Meguro, et al. (2003). Decreased striatal D 2 receptor density associated with severe behavioral abnormality in Alzheimer's disease. ***Annals Of Nuclear Medicine*** 17(7): 567-573.

Tatu, L. and F. Vuillier (2014). Structure and vascularization of the human hippocampus. ***The Hippocampus in Clinical Neuroscience, Karger Publishers***. 34: 18-25.

Thomson, M., K. K. Al-Qattan, et al. (2015). Anti-diabetic and anti-oxidant potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16(1): 17.

Tuzcu, M. and G. Baydas (2006). Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *European Journal Of Pharmacology* 537(1-3): 106-110.

Wang, J., L. Teng, et al. (2016). Studies on the antidiabetic and antinephritic activities of *Paecilomyces hepiali* water extract in diet-streptozotocin-induced diabetic Sprague Dawley rats. *Journal of Diabetes Research* 2016.

Watanabe, T., K. Iwasaki, et al. (2008). Spatial memory impairment without apoptosis induced by the combination of beta-amyloid oligomers and cerebral ischemia is related to decreased acetylcholine release in rats. *Journal Of Pharmacological Sciences* 106(1): 84-91.

Yonguc, G. N., M. B. Ozdemir, et al. (2014). Memory Function and Total Pyramidal Neuron Number of Hippocampus in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Journal of Neurological Sciences* 31(3).

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Danış AYGÜN, 16.02.1982 tarihinde Acıpayam'da doğmuştur. İlkokulu Güney Köy İlkokulunda, ortaokul ve lise öğrenimini Denizli'nin Acıpayam ilçesinde Acıpayam Anadolu Lisesinde tamamladı. 2000 yılında Acıpayam Anadolu Lisesinden mezun oldu ve aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp bölümüne başladı. 2007 yılında Tıp eğitimini tamamladı. 2007-2015 yılları arasında sağlık bakanlığına bağlı olarak Erzincan ve Adana illerinde çalıştı. 2010 yılında Şırnak'ta askeri hekimlik görevini yaptı. 2015 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı ve aynı bölümde doktora eğitimine başladı.


## 9. EKLER

### EK-1



Morphometric measurements of the students of Pamukkale University, Faculty of Dentistry and the effects on their success in applied courses **Aygün D**, Ekici S, Akyer Ş.P

## EK-2





Dear danış aygün,


We are pleased to inform you that your paper proposal "**Türkiye'deki Anatomi Yayınlarının Bibliyometrik Analizi**" has been accepted for a 15-minutes oral presentation by the organization committee of the **5th International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences** after reports from two reviewers. The congress will be online on December 18-19, 2020.

Your presentation abstract will be published in abstract book. Full paper will be published in a full paper book after two referees reports.

Looking forward to meeting you in congress.

Assoc. Prof. Dr. Ahmet Yılmaz & Assoc. Prof. Dr. Nouredin Karimi  
Co-Presidents of Congress Organization Committee



Contact  
E-mail: [hippocratescongress@gmail.com](mailto:hippocratescongress@gmail.com)  
Website: <https://hippocratescongress.com>

**Danış AYGÜN** Nuriye KURBETLİ, Şahika Pınar AKYER. Türkiye'deki Anatomi yayınlarının bibliyometrik analizi, **Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi Temel Tıp Bilimleri Tam Metin Kitabı, 2020.**

**EK-3**

*Usaysad Derg, 2020; 6(3):541-550 (Araştırma makalesi )*

**ANATOMİ EğİTİMİNDE SOSYAL MEDYA; BİBLİYOMETRİK ANALİZ**  
**SOCIAL MEDIA IN ANATOMY EDUCATION; BIBLIOMETRIC ANALYSIS**

Aygün D, Zeybek V. "Anatomi eğitiminde sosyal medya; bibliyometrik analiz" *Ulusallararası Sağlık Yönetimi ve Stratejileri Araştırma Dergisi*

EK-4



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu



Sayı :60758568-020/7215  
Konu :Başvurunuz hk.

30/01/2017

Sayın Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR

İlgi :05/01/2017 tarihli dilekçeniz.

"Sıçanlarda streptozotosin ile indüklenmiş deneysel Alzheimer hastalığının da Fesleğen özütünün (Ocimum Gratissimum) hipokampus nöron kaybında koruyucu etkisi ve uzaysal hafızaya davranış testlerine yansması" konulu PAUHADYEK-2017/01 no'lu çalışmanız 23.01.2017 tarih ve 2017/02 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasının Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna ve 40 adet sıçan kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Funda Fatma BÖLÜKBAŞI HATİP  
Başkan