



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN SIÇAN
HİPOKAMPUSUNUN IŞIK, ELEKTRON MİKROSKOBİK VE
STEREOLOJİK TEKNİKLER KULLANILARAK
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Eda DENİZCİ
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

SAMSUN-2023



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN SIÇAN
HİPOKAMPUSUNUN IŞIK, ELEKTRON MİKROSKOBİK VE
STEREOLOJİK TEKNİKLER KULLANILARAK
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Eda DENİZCİ
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Süleyman KAPLAN**

SAMSUN-2023

BEYAN

Sunulan alışmamız, PYO.TIP.1904.22.015 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ‘‘1904 Lisansüstü Tezleri Destekleme Programı’’ kapsamında desteklenmiştir.

‘‘Deneyssel Diyabet Oluşturulan Sıçan Hipokampusunun Işık, Elektron Mikroskopik ve Stereolojik Teknikler Kullanılarak Araştırılması’’ başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı bir davranışının olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını beyan ederim.

Dr. Eda Denizci

ÖZET

Amaç:

Çalışmamızda, periferik sinir hasarı ve diyabetin, hipokampus dokusu üzerine olası patolojik etkilerinin araştırılması ve *Garcinia kola* ile kurkumin fitokimyasal maddelerinin iyileştirici etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:

Çalışmamızda; 10-14 haftalık, 250-300 gram ağırlığında 35 adet erkek *Wistar albino* türü sıçanlar, her biri 7 adet hayvan içeren 5 gruba ayrıldı. Bu gruplardan kontrol ve sham grubu dışındaki gruplarda diyabet modeli oluşturmak için, tek doz Streptozotosin intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kontrol grubuna hiçbir işlem uygulanmazken, kontrol grubu dışındaki tüm gruplara siyatik sinir transeksiyonu uygulandı. Antioksidan gruplarımızdan birine *Garcinia kola*, diğerine kurkumin verildi. Doksan günlük deney süresi sonunda her grupta 6 hayvan kalmak üzere, beş gruptaki tüm hayvanlara kardiyak perfüzyon uygulandı. Elde edilen beyin dokularının hipokampus bölgesinden alınan kesitler; stereolojik, histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelerde kullanıldı. Stereolojik analizlerde hipokampus tabakaları hacimlerinin tüm hipokampus hacmine oranları gruplar arasında karşılaştırıldı. Histopatolojik değerlendirmeler için alınan kesitler ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik yöntemlerle incelendi. İmmünohistokimyasal araştırmalarda S100, Caspaz 3 ve SOX 2 antikorları kullanıldı.

Bulgular:

Stereolojik analizlerde, hipokampusun dört tabakasına ait hacim oranında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi. Sadece stratum lucidum tabakası hacim oranında artış görüldü. Siyatik sinir hasarı ve diyabetin farklı derece ve şekilde patolojik değişikliklere neden olduğu gözlemlendi. Verilen antioksidanlardan kurkuminin histopatolojik değişimler üzerinde iyileştirici etkisi olduğu, *Garcinia kola*'nın daha az koruyucu etki gösterdiği belirlendi.

Tartışma ve Sonuç:

Siyatik sinir hasarı ve diyabet stratum lucidum dışında tabakaların hacim oranlarını değiştirmezen sadece bu tabakanın hacim oranında artış görüldü. Sham ve diyabet grubundaki histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular, *Garcinia kola* ve kurkumin verilen gruplarda kısmi iyileşme ve değişimler gösterdi.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Siyatik sinir hasarı, diyabet, hipokampus, *Garcinia kola*, kurkumin



ABSTRACT

Objective: In our study, it was aimed to investigate the possible pathological effects of peripheral nerve damage and diabetes on the hippocampus tissue and to determine whether the phytochemicals of *Garcinia kola* and curcumin have curative effects.

Materials and Methods:

In our study, 35 male Wistar albino rats, 10-14 weeks old, weighing 250-300 grams, were divided into 5 groups, each containing 7 animals. A single dose of streptozotocin was injected intraperitoneally to create a diabetes model in groups other than the control and sham groups. While no procedure was applied to the control group, sciatic nerve transection was applied to all groups except the control group. Antioxidant groups were given *Garcinia kola* and curcumin. At the end of the ninety-day experiment period, cardiac perfusion was applied to all animals in five groups, with 6 animals remaining in each group. Sections taken from the hippocampus region of the obtained brain tissues; were used in stereological, histopathological and immunohistochemical evaluations. In stereological analyses, the ratios of the volumes of the hippocampus layers to the whole hippocampus volume were compared between the groups. Sections taken for histopathological evaluations were examined by light microscopic and electron microscopic methods. S100, Caspase 3 and SOX 2 antibodies were used in immunohistochemical studies.

Results:

In stereological analysis, no statistically significant difference was observed in the volume ratio of the four layers of the hippocampus. Only the volume ratio of stratum lucidum layer increased. It was observed that sciatic nerve damage and diabetes both cause pathological changes in different degrees and forms. It was determined that curcumin, one of the antioxidants given, had a healing effect on histopathological changes, and *Garcinia kola* had a less protective effect.

Discussion and Conclusion:

While sciatic nerve damage and diabetes did not change the volume ratio of the layers, except for the stratum lucidum, only the volume ratio of this layer increased. Histopathological and immunohistochemical findings in the sham and diabetes groups showed partial improvement and changes in the *Garcinia kola* and curcumin groups.

KEYWORDS: Sciatic nerve damage, diabetes, hippocampus, *Garcinia kola*, curcumin



İÇİNDEKİLER

Sayfa

BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Tip 2 Diyabetes Mellitus	5
2.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	6
2.3. Tip 2 DM'nin Beyin Üzerindeki Etkileri	9
2.4. Deneysel Diyabet Modeli ve Streptozotosin	12
2.5. Diyabet Bulguları ve Komplikasyonları.....	12
2.6. Diyabet Tedavisi ve Önleyici Yaklaşımlar	14
2.7. Diyabette İlaç Tedavisi.....	17
2.8. Nöropatik Ağrı ve Hipokampus.....	19
2.9. Hipokampus Histolojisi ve Fonksiyonları	21
2.10. <i>Garcinia kola</i>	24
2.11. Kurkumin.....	26
2.12. Stereoloji.....	29
2.12.1. Stereolojik hacim hesabı.....	31
2.12.2.Bileşen hacmi ve hacim oranlarının hesaplanması	34
2.12.3. Nokta sayım yöntemi ile alan hesaplamasının hata katsayısının hesaplanması.....	34
2.13. İmmünohistokimyasal Belirteçler	34
2.13.1. S100 proteini.....	34
2.13.2. Kaspaz 3 Enzimi	38
2.13.3. SOX2 Geni.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Deney Hayvanları ve Grupların Oluşturulması.....	43
3.2. Diyabetes Mellitus Modeli Oluşturulması.....	44

3.3. Sitrat Tamponunda STZ'nin Hazırlanması	45
3.4. Cerrahi İşlemler	46
3.5. Ameliyat Sonrası Değerlendirme	47
3.6. Perfüzyon.....	47
3.7. Parafin Blokların Hazırlanması	48
3.8. Rezin Blokların Hazırlanması	49
3.8.1. Fosfat tamponu hazırlanması	49
3.8.2. Osmiyum tetraoksit (OsO ₄) hazırlanması	50
3.8.3. Tamponlu glutraldehit hazırlanması	50
3.8.4. Araldit hazırlanması.....	50
3.9. Parafin Bloklardan Kesit Alınması ve Boyanması.....	51
3.10. Rezin Bloklardan Kesit Alınması ve Boyanması	55
3.11. Elektron Mikroskopik Kesitlerin (İnce Kesitler) Alınması ve Görüntülenmesi	56
3.12. İmmünohistokimyasal Boyamalar.....	57
3.13. Stereolojik Analizlerin Yapılması	61
3.14. İstatistiksel Analiz	64
4. BULGULAR	65
4.1. Stereolojik Bulgular.....	65
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular	71
4.2.1. Kontrol grubuna ait bulgular.....	71
4.2.2. Sham grubuna ait bulgular.....	76
4.2.3. Diyabet grubuna ait bulgular	83
4.2.4. DM + <i>Garcinia kola</i> uygulanan grubuna ait bulgular	90
4.2.5. DM + kurkumin grubuna ait bulgular.....	95
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	101
4.3.1. Kontrol grubuna ait elektron mikroskopik bulgular	101
4.3.2. Sham grubuna ait elektron mikroskopik bulgular	104
4.3.3. Diyabet grubuna ait elektron mikroskopik bulgular	109
4.3.4. DM + <i>Garcinia kola</i> grubuna ait elektron mikroskopik bulgular.....	113
4.3.5. DM + kurkumin grubuna ait elektron mikroskopik bulgular	117
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	120
5. TARTIŞMA	129
5.1. Hipokampal Tabakaların Hacim Oranları.....	132

5.2. Hipokampusta Morfolojik ve Hücresel Düzeyde Değişiklikler	135
5.3. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi (S100)	145
5.4. Apoptozun Değerlendirilmesi.....	149
5.5. Hipokampal Nörogenezin Değerlendirilmesi.....	152
6. SONUÇLAR	156
7. KAYNAKLAR.....	160
8. EKLER.....	209



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
AH	: Alzheimer hastalığı
CA	: Cornu Ammonis
CCI	: Kronik konstriksiyon (sıkıştırma) hasarı
CRF	: Kortikotropin salgılatıcı hormon
DG	: Dentat girus
DM	: Diyabetes Mellitus
DK	: Değişim katsayısı
DKA	: Diyabetik ketoasidoz
EASD	: Avrupa Diyabet Araştırmaları Birliği
ER	: Endoplazmik retikulum
FDR	: Yanlış keşif oranı
GFP	: Glial fibriler protein
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
hESC	: İnsan embriyonik kök hücre
HK	: Hata katsayısı
hPSC	: İnsan pluripotent kök hücre
HT22	: İmmortal fare hipokampal nöral hücre hattı
ICV	: İntraserebroventriküler
IHC	: İmmünohistokimya
LTP	: Uzun süreli potansiyasyon (Long-term potentiation)
MDA	: Malondialdehit
MoCA	: Montreal bilişsel değerlendirme testi
NF-KB	: Nükleer faktör kappa B (Nuclear factor kappa B)
NPC	: Nöral progenitör hücre
OFR	: Serbest oksijen radikalleri (Free oxygen radicals)

Ort	: Ortalama
P(ref)	: Bileşen kesit alanına düşen nokta sayısı
P(y)	: Tüm yapının kesit alanları
RAGE	: İleri glikasyon son ürünleri reseptörü
SRÖ	: Sistematik rastgele örnekleme
SS	: Standart sapma
SSS	: Santral sinir sistemi
Str	: Stratum
STZ	: Streptozotosin
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TLR	: Toll benzeri reseptör
Vv(yref)	: Bileşen hacminin tam yapı hacmine oranı

TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Yapının toplam hacim hesaplaması.....	32
Şekil 2. Kesitin toplam yüzey alanının hesaplanması.....	33
Şekil 3. (A) Kontrol grubu, (B) Sham grubu ve (C) Diyabet grubu hipokampus dokularına ait Luxol fast blue red (Luxol fast blue + Cresyl violet) boyama örnekleri	54
Şekil 4. (D) Garcinia kola grubu ve (E) Kurkumin grubu hipokampus dokularına ait Luxol fast blue red (Luxol fast blue + Cresyl violet) boyama örnekleri.....	54
Şekil 5. Parafin bloğa gömülü kesitlerin alınmasında kullanılan mikrotom cihazı ...	54
Şekil 6. Yarı ince kesitlerin alınmasında kullanılan ultramikrotom cihazı.	55
Şekil 7. İnce kesitlerin görüntülenmesinde kullanılan taramalı elektron mikroskobu	56
Şekil 8. Parafin kesitlerin deparafinizasyonunda ve rezin blokların polimerizasyonu için kullanılan etüv.....	59
Şekil 9. Bilgisayar programı destekli kamera ataçmanlı ışık mikroskop görüntüleme sistemi	61
Şekil 10. Luxol fast blue red (Luxol fast blue ve cesyl violet boyaların kullanıldığı boyama protokolü) ile boyanan hipokampus dokusundan alınan kesitlerin ışık mikroskop görüntüsü ve noktalı alan ölçüm cetveli ile hipokampus tabakaları alan hesaplamalarına ait ekran görüntüsü.....	62
Şekil 11. 9 nolu hayvanın hipokampus dokusu kesit alanı hesaplama sonuçlarına ait excel tablosu örneği.....	63
Şekil 12. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum alveus tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	66
Şekil 13. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum oriens tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	67
Şekil 14. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum piramidale tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	68
Şekil 15. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum lusidum tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	69
Şekil 16. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum radiatum tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	70

Şekil 17. Kontrol grubuna ait hipokampustan alınan yarı ince kesitin genel görüntüsü verilmiştir	72
Şekil 18. Kontrol grubuna ait hipokampus dokusundan alınan yarı ince kesitin ışık mikroskopik görüntüsü verilmiştir	73
Şekil 19. Kontrol grubuna ait hipokampusun dentat girus bölgesindeki nöronlar (N) ve sinir lifleri görülmektedir	74
Şekil 20. (A, B) Kontrol grubuna ait hipokampusun dentat girus bölgesinde ve bu bölgeye yakın alanlarda bulunan nöronlar (N), hücresel uzantılar görülmektedir.....	75
Şekil 21. Sham grubuna ait hipokampus dokusunun genel yapısı görülmektedir	77
Şekil 22. Sham grubuna ait hipokampusun dentat girus bölgesindeki granüler nöronlar görülmektedir.....	78
Şekil 23. (A, B) Sham grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinde piramidal nöronlar (N) görülmektedir.....	79
Şekil 24. (A, B) Sham grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesindeki piramidal nöronlar (N) ve onların aksonal uzantıları (Ax) görülmektedir.....	80
Şekil 25. (A, B) Sham grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesindeki piramidal nöronların (N), akson uzantılarının (Ax) ve nöroglia hücrelerinin (Ng) normal morfolojide olduğu görülmektedir.....	81
Şekil 26. (A, B) Sham grubuna ait dentat girus bölgesindeki granüler nöronlar (N) gözlenmektedir. Dokudaki damarların (V) normal morfolojide olduğu izlenmektedir	82
Şekil 27. DM grubuna ait Cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinin genel yapısı görülmektedir.....	84
Şekil 28. DM grubuna ait Cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinin genel görüntüsü görülmektedir	84
Şekil 29. (A, B) DM grubuna ait hipokampus bölgesindeki nöronlar (N), akson uzantıları (Ax) ve nöroglia hücreleri (Ng) görülmektedir.....	85
Şekil 30. (A, B) DM grubuna ait hipokampusun cornu ammonis bölgesindeki oval çekirdekli nöronlar (N) ve akson uzantıları (Ax) görülmektedir	86
Şekil 31. (A, B) DM grubuna ait hipokampusun cornu ammonis bölgesindeki nöronlar (N) ve aksonal uzantıları (Ax) görülmektedir	87

Şekil 32. DM grubuna ait dentat girus (DG) bölgesindeki granüler nöronlar (N), transvers ve longitudinal düzlemde kesilen aksonlar (Ax) gözlenmektedir	88
Şekil 33. (A, B) DM grubu hipokampus dokusuna ait yarı ince kesitte damar (V) duvarı yapısının bozulduğu görülmektedir	89
Şekil 34. DM+GK grubuna ait hipokampus bölgesindeki nöronların (N) ve nöroglia hücrelerinin (Ng) çoğunun sağlıklı yapıda olduğu görülmektedir	91
Şekil 35. DM+GK grubuna ait hipokampusun dentat girus (DG) bölgesindeki granüler nöronların (N) normal morfolojide oldukları gözlenmektedir.....	92
Şekil 36. (A, B) DM+GK grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinde bulunan nöronlar (N), aksonal uzantıları (Ax) ve nöroglia hücreleri (Ng) görülmektedir	93
Şekil 37. (A, B) DM+GK grubuna ait hipokampusun dentat girus (DG) bölgesinde bulunan nöronlar (N) ve akson uzantıları (Ax) gözlenmektedir	94
Şekil 38. DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinin genel yapısı görülmektedir.....	96
Şekil 39. (A, B) DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerine ait nöronlar (N) ve hücresel uzantıları görülmektedir	97
Şekil 40. DM+Cur grubuna ait hipokampusun dentat girus (DG) bölgesindeki granüler nöronlar görülmektedir	98
Şekil 41. (A, B) DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesindeki nöronlar (N) ve akson yapıları (Ax) görülmektedir.....	99
Şekil 42. (A, B) DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesine ait yarı ince kesit görüntüleri verilmiştir.....	100
Şekil 43. (A, B) Kontrol grubuna ait hipokampus bölgesinde bulunan nöron (N) ve nöroglia hücre (Ng) yapısı görülmektedir.....	102
Şekil 44. (A, B, C) Kontrol grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesindeki sağlıklı piramidal nöronlar (N) görülmektedir	103
Şekil 45. (A, B) Sham grubuna ait hipokampus bölgesindeki nöronlar (N) görülmektedir	105
Şekil 46. (A, B) Sham grubuna ait hipokampus bölgesindeki büyük ve küçük çaplı nöronların (N) sağlıklı olduğu izlenmektedir.....	106

Şekil 47. (A, B) Sham grubuna ait dokuda damar (V) yapısının ve çevre doku ile olan bütünlüğünün korunduğu görülmektedir.....	107
Şekil 48. (A, B) Sham grubu hipokampusunun CA bölgesinden alınan kesitte farklı çaptaki sağlıklı nöronlar (N) görülmektedir.....	108
Şekil 49. DM grubuna ait hipokampus bölgesinden elde edilen mikrografta sağlıklı bir nöron (N) yapısı izlenmektedir.....	109
Şekil 50. (A, B) DM grubuna ait hipokampus bölgesindeki nöron (N) ve nöroglia hücreleri (Ng) görülmektedir.	110
Şekil 51. (A, B) DM grubu hipokampus dokusuna ait mikrograf verilmiştir.....	111
Şekil 52. (A, B) DM grubuna ait hipokampusun dentat girus bölgesinden elde edilen mikrograf görülmektedir	112
Şekil 53. (A, B, C) DM+GK grubuna ait mikrografta dentat girus bölgesindeki granüler nöronlar görülmektedir	114
Şekil 54. (A, B, C) DM+GK grubuna ait mikrografta dentat girus bölgesindeki nöronlar (N) ve çevresindeki aksonlar (Ax) görülmektedir.....	115
Şekil 55. DM+GK grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinden elde edilen mikrografta nöronların (N) oval çekirdekleri görülmektedir	116
Şekil 56. DM+GK grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesine ait mikrografta piramidal nöron (N) ve çevresinde longitudinal düzlemde uzanan sinir lifleri görülmektedir	116
Şekil 57. DM+GK grubuna ait hipokampus dokusuna ait mikrografta damar (V) duvarının sağlıklı yapıya sahip olduğu görülmektedir.....	117
Şekil 58. (A, B, C) DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinde bulunan nöronları (N) gösteren mikrograf verilmiştir	118
Şekil 59. (A, B) DM+Cur grubuna ait dokuda farklı boyutlarda damarlar (V) görülmektedir.....	119
Şekil 60. DM+Cur grubuna ait sağlıklı bir nöron (N) gözlenmektedir.....	120
Şekil 61. Tüm gruplara ait hipokampusun dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgelerinde anti-S100 (+) boyanan hücreler ve sinir lifleri (ok başı) görülmektedir	124

Şekil 62. Tüm gruplara ait hipokampusun dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgelerinde anti-kaspaz 3 (+) boyanan hücre çekirdekleri (ok başı) gözlenmektedir 126

Şekil 63. Tüm gruplara ait hipokampusun dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgelerinde anti-SOX-2 (+) boyanan hücreler (ok başı) görülmektedir..... 128

Tablo 1. Doku takibi protokolü..... 49

Tablo 2. Deparafinizasyon protokolü 58

Tablo 3. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü 60

Tablo 4. Hipokampusun stratum alveus tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort.± SS, HK ve DK değerleri..... 66

Tablo 5. Hipokampusun stratum oriens tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort ± SS, HK ve DK değerleri..... 67

Tablo 6. Hipokampusun stratum pyramidale tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort ± SS, HK ve DK değerleri 68

Tablo 7. Hipokampusun stratum lusidum tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort± SS, HK ve DK değerleri 69

Tablo 8. Hipokampusun stratum radiatum tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort ± SS, HK ve DK değerleri 70

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 2 diyabetes mellitus (DM), yaşla birlikte prevalansı artan, yaygın şekilde görülen metabolik bozukluklardan biridir (1). Dünya çapında tahminen 500 milyon yetişkin birey, diyabet vakalarının %90'ından fazlasını oluşturan Tip 2 DM ile yaşamaktadır (2). Tip 2 DM, insülin etkisi ve sekresyonunda bozulma ile ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize bir grup metabolik bozukluktan oluşmaktadır (3).

DM, beyin de dahil olmak üzere birçok organda patolojik etkiler oluşturur (4). Diyabetik ensefalopati, diyabetin kronik komplikasyonlarından birisidir. Diyabetin, beyin dejenerasyonuna yol açtığı, Alzheimer hastalığı ve serebrovasküler hastalıkların gelişimi açısından önemli bir risk faktörü olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (5, 6). Amerikan Diyabet Derneği verileri, diyabetin neden olduğu en ciddi komplikasyonlardan birinin, yaşam kalitesini düşüren bilişsel gerileme olduğunu göstermektedir (7). Prediyabetik ve diyabetik insanların sayılarında görülen artış, diyabet ilişkili bozuklukların serebral yapı ve fonksiyon üzerindeki etkilerinin daha ayrıntılı incelenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (8). Çalışmamızda, diyabetin bilişsel işlev merkezi olan hipokampusta oluşturduğu hacimsel ve histopatolojik değişiklikler farklı bilimsel teknikler kullanılarak araştırıldı. Ayrıca, hipokampusta görülmesi beklenen patolojilerin bitki kaynaklı antioksidan maddeler kullanılması sonrasındaki değişimleri farklı deney grupları oluşturularak incelendi.

Diyabetin bilişsel işlevlerde gerileme ve sonuçta demans gelişimine yol açan önemli bir metabolik hastalık olduğu bilinmektedir. Uzun süre diyabeti kötü kontrol edilen yaşlı bireylerde, glisemik regülasyonun kötü olduğu ve bu durumun önemli vasküler hastalıklara yol açtığı gözlenmiştir (1). Öte yandan, hipokampal hacim ile glisemik kontrol arasında ters ilişki olduğu ve HbA_{1c} değerinin hipokampus hacim değeri üzerinde önemli bir belirleyici etken olduğu gösterilmiştir (9). Normal aralıkta olsa da yüksek plazma glukoz seviyeleri, hipokampus atrofisi ve nörodejeneratif süreçler ile ilişkilendirilmiştir (10). Manyetik rezonans görüntüleme ve bilgisayarlı tomografi ile yapılan nörogörüntüleme çalışmalarında diyabet hastalarında, kontrol grubuna göre hipokampus hacminin azaldığı gösterilmiştir (11, 12).

Kırkklı yaşlardan itibaren glukoz kontrolünün iyi yapılması, hipokampus ve dolayısıyla bilişsel sağlığı korumak için önemlidir (1). Tez çalışmamızda siyatik sinir hasarı ve sinir hasarı ile birlikte diyabetin hipokampus tabakaları hacim oranlarına etkisi stereolojik yöntemlerle değerlendirildi. Elde edilen verilerden yola çıkarak, çalışmamızda, DM'nin hipokampustaki olası yıkıcı etkilerine karşın tedavi seçeneği olarak iki antioksidan ajan kullanıldı. Hipokampusta hacimsel ve histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

Çalışmamızda kullanılan antioksidanlardan biri, *Garcinia kola Heckel*, Guttiferaceae ailesinden olup kola bitter, bitter kola, erkek kola, yalancı kola gibi isimlerle anılan ve genellikle lokal olarak tüketilen bir bitkidir (13). Kolaviron, *Garcinia kola* da bulunan bir biflavonoid bileşiktir (14). Kolavironun farklı dozlarda, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu bilinmektedir (15). Bu maddenin diyabetik bireylerde beyin dokusunda hasar yaratan oksidatif ve inflamatuvar mekanizmaları önleyebileceği savunulmaktadır. Öte yandan, kolavironun herhangi bir yan etkisinin olduğuna dair bir bilgi yoktur (16-21).

Tip 2 DM önlenmesi ve yönetiminde kullanımını araştıracağımız bir diğer tıbbi bitki ise kurkumindir. Çin ve Hindistan'da geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan kurkuma kökünden elde edilen fitokimyasal doğal bir bileşendir (22). Meta-analiz bir çalışmada, Asyalı diyabet ve prediyabet hastaları üzerinde kurkuminin faydalı etkilerinin olduğu belirlenmiştir (23). Kurkuminin, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ve farmakolojik açıdan güvenilir olması sebebiyle (24) çalışmamızda, antidiyabetik etkisi nöron düzeyinde araştırıldı.

Çalışmamızdaki bir diğer inceleme konusu olan siyatik sinir hasarı ve bunun hipokampus üzerinde etkileri tüm çalışma grubu hayvanlarında araştırıldı. Periferik sinir hasarının diyabetle birlikte görüldüğünde hipokampus üzerinde etkisi ve antioksidan maddelerle tedavi sonrası oluşan değişimler tüm gruplarda irdelenecektir.

Farklı çalışmalarda, kronik nöropatinin gelişmesiyle birlikte, kortikal ve subkortikal alanlarda yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir (25-27). Siyatik sinir hasarı oluşturulan kronik ağrılı hayvanlarla yapılan deneylerde, hipokampusta moleküler, sinaptik değişikliklerle birlikte hipokampus hacminde azalma olduğu gözlenmiştir (28). Bununla birlikte, kronik ağrı durumunda ortaya

ıkan değişikliklerin tersine çevrilmesinin tedavi edici olabileceği düşünülmektedir (28).

Dişabet ve siyatik sinir hasarının hipokampusu etkilerinin tedavisi için belirlediğimiz antioksidan maddelerden biri olan *Garcinia kola*'nın farklı stres durumlarında tıbbi özelliklerine ilişkin yapılan çalışmalar değerlendirilecektir.

Streptozotosin ile dişabet modeli oluşturulan sıçanlarla yapılan bir çalışmada, eksizyon yarası iyileşmesinde topikal uygulanan *Garcinia* hidroksil biflavonol (GB1), epitelizasyon süresini ve yara boyutlarını azaltarak yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği gözlenmiştir (29). Çalışmamızda siyatik sinir hasarı oluşturulan hayvanlara *Garcinia kola* verildiğinde, merkezi sinir sisteminde oluşması muhtemel stresin azalabileceği, hipokampus bölgesinde olumlu yansımaların olabileceği araştırıldı.

Tedavi edici özelliğinin olabileceğini düşündüğümüz ikinci tıbbi özellikteki madde olan kurkuminle ilgili çalışmalar incelendi. Çalışmalarda, siyatik sinir (30-32) yaralanmasından sonra kurkumin uygulamasının, periferik sinirin onarımı ile sinirin fonksiyonel anlamda iyileşmesini sağlayabileceği gösterilmiştir (33). Kurkumin uygulamasının, periferik sinir hasarı onarımında görevli destek hücreler olan Schwann hücrelerinin çoğalmasını, farklılaşmasını ve farklı alanlara gn uyarabileceği belirlenmiştir (34, 35). Bir diğer araştırmada ise sağlıklı sıçanlarda siyatik sinir bası hasarında kurkumin uygulamasının, sinir onarımını ve fonksiyonel iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir (30, 32).

Çalışmamızın diğer bir bölümünü ise dişabet ve siyatik sinir hasarına bağlı hipokampus dokusunda oluşan metabolik ve histopatolojik değişikliklerin altında yatan moleküler mekanizmaların değerlendirilmesidir. Bunun için üç primer antikor belirlendi.

Bunlardan ilki anti-S100'dr. S-100 proteinleri küçük moleküler ağırlığı olan, asidik yapıda, Ca^{+2} bağlayıcı sitozolik proteinlerdir. Bu protein grubu hücre çoğalması, protein fosforilasyonu, enzim aktivasyonu, enerji metabolizması, hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu, kalsiyum homeostazı, inflamatuvar yanıt ve hücre ölümü gibi hücre içi ve hücre dışı çeşitli görevlerde rol oynar. Doku onarımı veya kontrolsüz iltihaplanma gibi farklı olaylarda görev alabilirler (36, 37). Çalışmamızda, DM'nin nöronal ve glial gelişim üzerindeki etkileri, hipokampustaki S-100 immünohistokimyasal aktivasyonu incelenerek ele alındı.

Histopatolojik ve metabolik değerlendirmeler için analiz edilen bir diğer antikor ise anti-kaspaz 3 antikorudur. Kaspaz 3, kaspaz enzim grubu içerisinde yer alan ve apoptoz surecinin ana yürütücüsü olan sistein proteaz türü bir enzimdir (38, 39). Apoptoz, programlı şekilde, hücrelerin parçalanması ve inflamatuvar yanıt oluşmadan gerçekleşen bir hücre ölümü tipidir (40). Kaspaz enzimlerinin aşırı aktivasyonu veya yeterli çalışmamasının birçok hastalığı yol açtığı düşünülmektedir. Örneğin kaspazların fazla aktive olması nörodejeneratif hastalıklara, yeterince çalışmamaları ise kanser gelişimine zemin hazırlayabilir (41). Dolayısıyla, bu çalışmada, diyabetin hipokampus dokusu üzerinde olası nörodejeneratif etkisi ve nöronlarda apoptoz olaylarının değerlendirilmesi için immünohistokimyasal (IHC) analizlerde anti-kaspaz 3 antikoru kullanılacaktır.

IHC değerlendirmelerimizde kullanılan diğer antikor ise anti-SOX2'dir. SOX2 antikoru ile nöral kök hücre olduğu düşünülen hücreler gösterilmektedir. Daha önce, nöral kök hücrelerin kimliklerinin doğrulanmasında, SOX2 primer antikoru kullanılmıştır (42). Hipokampus, ğrenme ve hafıza oluşumu gibi önemli işlevlerinin (43) yanı sıra, yetişkin dönemde beyin dokusunda nöron proliferasyonunun görüldüğü merkezlerden biridir (44, 45). Nroenezin bilişsel işlevler üzerinde düzenleyici bir rol oynadığı bilinmektedir (46-50). Ayrıca, hipokampal nroenezde görülen değişimlerin, nörodejeneratif hastalıklarda görülen bilişsel eksikliklerin nedenlerden biri olabileceği düşünülmektedir (51, 52). Dünyada yaygın şekilde görülen DM gibi metabolik hastalıkların (53, 54) patoloji oluşum mekanizmalarının aydınlatılması açısından, hipokampal nöroenez ve nöral plastisite üzerinde etkili olan faktörlerin tespit edilmesi önem arz etmektedir (55-57). Bu amaçla, DM'nin ve komplikasyon rneği olarak siyatik sinir hasarının, hipokampal nöroenez üzerindeki etkilerini ve bu patolojilerin olası yıkıcı etkilerine karşı kullandığımız antioksidanların nöroprotektif ya da nroenezi uyarıcı etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Nörodejeneratif süreci doğru değerlendirebilmek amaçıyla immünohistokimyasal (IHC) analizlerde nöral kök hücre belirteci olarak tanımlanan SOX2 tercih edilmiştir.

Yukarıda bahsedilen bilgiler ışığında, çalışmamızda diyabetin hipokampus dokusunda yaratabileceği nöropatolojik sonuçları detaylı olarak incelemek için ışık mikroskopik, elektron mikroskopik, immünohistokimyasal ve stereolojik yöntemler kullanıldı. Elektron mikroskopik görüntüler, nöronlarda meydana gelen patolojinin

hücre ve organel düzeyinde değerlendirilmesi açısından önemliydi. Rezin bloklardan elde edilen yarı ince kesitlerde yapılan toluidin boyama ve parafin bloklardan elde edilen ince kesitlerde yapılan IHC boyama ile gruplar histopatolojik yönden değerlendirildi. İmmünohistokimyasal analizlerde, diyabet ve antioksidan maddelerin etkisi ile hipokampus dokusunda oluşan hücresel süreçler incelendi. Öte yandan, stereolojik yöntemlerle, tüm hayvanlarda hipokampal tabakaların hacimsel oranları elde edildi, hacim oranları hesaplamaları gruplar bazında karşılaştırıldı.

Pandemi kapsamına alınan ve karmaşık bir etiyolojiye sahip olan, hastalar üzerinde oluşturduğu etkiler ve tedavi protokolleri açısından geniş bir etkiye sahip Tip 2 DM, birçok yönüyle araştırılmış olsa da halen birçok hücresel, genetik ve moleküler etki mekanizmasına ilişkin yeterli bilgi bulunmamaktadır. Birçok insanı farklı şekil ve derecede etkileyen, hayat kalitesini düşüren, kontrol edilemediği takdirde birçok komplikasyona neden olabilen ve ölümcül sonuçları ortaya çıkartan diyabetin, her doku özelindeki etkisinin farklı bilimsel metotlarla araştırılması ve altta yatan mekanizmaların açıklanması gerekmektedir. Bunun yanı sıra, diyabete bağlı gelişebilecek periferik nöropati gibi komplikasyonlar sonucunda, santral sinir sisteminde oluşabilecek nörodejeneratif süreçlerin değerlendirilmesi zaruridir. Diyabet ve sinir hasarı gibi komplikasyonlarından hipokampus gibi önemli beyin bölgelerinin nasıl etkilendiği moleküler, hücresel ve doku düzeylerinde ele alınmalıdır. Bu patolojilere karşın belirlenecek yeni tıbbi bitkilerle tedavi seçeneklerinin geliştirilerek hastalığın daha kontrollü bir biçimde seyrinin sağlanması ve komplikasyonlarının en aza indirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, Tip 2 DM'nin ve periferik nöropatinin bilişsel fonksiyonlar üzerinde yarattığı etkilerden yola çıkarak hipokampus dokusunu ve antioksidan özellikleri olan tıbbi bitkilerin hipokampustaki olası iyileştirici etkilerini farklı bilimsel metotlar ve histolojik yöntemlerle araştırdık. Çalışmamızın bu alanda literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tip 2 Diyabetes Mellitus

Diyabet yaygın görülen ciddi bir metabolik bozukluktur (4, 58). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de diyabetli hasta sayısı gün geçtikçe artmakta ve toplum sağlığını tehdit etmektedir. Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması (TURDEP)

2015 yılı verilerine göre Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun 2030 yılında ulaşılacağı tahmin edilen diyabet prevalansına 2015 yılı itibariyle ulaşılmıştır (59, 60). Diyabet tanısı almış hastalar, glikoz tolerans bozukluğu olan ve açlık glikozu bozulmuş insanlar birlikte düşünüldüğünde, diyabet toplumun % 25-30'unu etkileyen bir hastalıktır (60). Tip 2 DM görülme sıklığının salgın hastalıklara benzer olduğu bildirilmiştir (61, 62). Diyabet için predispozan faktörlerden, santral veya android tip obezite olarak tanımlanan, özellikle bel çevresinde yağlanmanın artması şeklinde görülen obezitenin, tip 2 DM hastalığının gelişmesinde ana sebeplerden biri olduğu görülmektedir (63, 64).

Tip 2 DM, karmaşık bir etiyolojiye sahiptir; genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkan metabolik ve endokrin bir bozukluktur. Pankreas beta hücrelerinde insülin sekresyonunda ve periferik dokularda insülin işlevselliğinde farklı derecelerde fonksiyonel bozukluklar görülür (65). DM hastalığı, lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmalarında görülen değişimlerle birlikte hiperglisemi tablosu ile karakterizedir (66). Tip 2 DM hastalığının patogenezinde yer alan insülin direnci, insülin salgısının görece azalması ile birlikte hem açlık hem tokluk plazma glikoz değerinin yüksek seyretmesine neden olur (67). İnsülin direnci tablosu oluşmaya başlarken önce pankreas beta hücreleri, insülin etkisinin yeterince oluşmamasına karşılık fazla miktarda insülin salgılamaya başlar. Bu dönemde, hiperglisemi, kan glikoz miktarına göre insülin sekresyonu az olduğunda ortaya çıkmaktadır (65). Tip 2 diyabetin hiperglisemiye ek olarak, polidipsi ve vücut ağırlığı artışında azalma gibi belirtileri vardır (68, 69). İnsülin eksikliği sonucunda, glikoz metabolizması bozularak, insüline duyarlı dokularda, nöropati, retinopati, nefropati gibi ciddi komplikasyonlar görülebilmektedir (70, 71).

2.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Dünya genelinde 2030 yılında erişkin diyabetli hasta sayısının 578 milyon, 2045 yılında ise 700 milyon olması öngörülmüyor (72). Dünya genelinde diyabet hastalarının % 63 'ünün 20-60 yaş aralığında ve çalışma çağında olduğu görülmüştür (73). 20- 79 yaş arası diyabetli hasta sayısının 2030 yılına kadar tüm dünyada artması beklenmektedir (73). 2021 verilerine göre, dünyada 65 yaş üstü toplumun %20'sinin diyabet hastası olduğu belirlenmiştir (74). Diğer taraftan, 2019 yılında dünya genelinde meydana gelen 4,2 milyon insanın ölümünden diyabetin sorumlu olduğu

bilinmektedir (75). DM'nin yol açtığı sağlık sorunlarının yanı sıra, tedavi masrafları açısından değerlendirildiğinde toplumsal ekonomiye olumsuz etkisi olduğu bilinmektedir. 2019 yılında gerçekleşen erişkin hastaların sağlık harcamalarının %10'u diyabet hastalığından kaynaklanan nedenlere aittir. Toplumda diyabet kaynaklı sağlık harcamalarının 2045 yılına kadar artış göstermesi beklenmektedir (76).

Diyabet kliniği oluşmadan önceki dönemde meydana gelen değişimleri ifade edecek şekilde prediyabet olarak tanımlanan insülin direnci sendromu (IRS), tip 2 DM hastalığına neden olmaktadır. IRS, dokuların insülinin etkilerine yanıt oluşturamaması durumudur. İnsülin direnci tablosu diyabetin yanı sıra vasküler hastalıklar ve obeziteye yol açmaktadır (77).

İnsülin direnci ve çeşitli metabolik bozukluğa yol açan (78) obezite tip 2 DM gelişiminde en önemli risk faktörüdür (vücut kitle indeksi $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) (79, 80). Vücut kitle indeksi (VKI) ile diyabet tanı yaşı arasında ters orantı olduğu görülmüştür (81). Obezitenin hücrenin otonom mekanizmaları ve organlar arası etkileşimi olumsuz etkileyerek insülin direnci ve tip 2 DM oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir. Fiziksel inaktivite tip 2 DM gelişiminde başka bir risk faktörüdür. Kuipio İskemik Kalp Hastalığı Risk Faktörü Çalışmasında haftada en az kırk dakika yürüyen katılımcılarda diyabet riskinin %34, haftada en az 2-3 saat yürüyen katılımcılarda riskin %56 oranında azaldığı görülmüştür (82, 83). Fiziksel aktivite, iskelet kas hücrelerine kan akışını ve glikoz alımını artırır (84). Orta yoğunlukta egzersizin, glikoz alımını % 40 oranında arttırdığı belirlenmiştir (85). Egzersizin yağ yakımını artırması ve insülin direnci oluşumuna yol açan karın içi yağ miktarını azaltması diyabet gelişim riskini azaltmaktadır (86). Egzersizin diğer metabolik etkileri, glikoz alımını iyileştirmesi, insülin duyarlılığını artırması yanında, diyabetin predispozan faktörlerinden inflamasyonu ve oksidatif stresi düşürmesidir (84).

Diyabet patogeneğinde yer alan insülin direnci karaciğer, kas gibi organlarda insülin etkisine cevapsızlık oluşması durumu olmakla birlikte hastalık başlamadan önce gelişir ve yaygınlaşır. İnsülin direnci gelişiminde genetik ve çevresel faktörler etkilidir. İnsülin reseptörü ve insülin reseptörü substratı (IRS-1) gen polimorfizmleri insülin etkisini doğrudan etkiler. Bunun yanında adrenerjik reseptör geni ve visseral ayrılma ile ilişkili protein (UCP) gibi genlerin polimorfizmleri obezite ve insülin direncini arttırmaktadır. Glikolipotoksisite ve inflamatuvar mediatörlerin insülin direnci

gelişiminde önemli etkileri vardır. Özellikle adiposit kaynaklı biyoaktif maddeler (adipokinler) olan TNF (tümör nekroz faktörü) -alfa, leptin, resistin, serbest yağ asitleri ve adiponektin insülin direnci gelişiminde rol oynamaktadır (87). Genel obeziteden ziyade özellikle abdominal bölgede görülen obezite, insülin direnci, hiperinsülinemi sendromları, hipertansiyon, dislipidemi, diyabet ve bilişsel bozuklukların gelişimine neden olan metabolik süreçlerde önemli rol oynamaktadır (88-90). Bel bölgesi visseral yağ birikimi abdominal bilgisayarlı tomografi ile yapılan ölçümlerle yüksek doğrulukla ve hassasiyetle saptanabilir (91). Bu ölçümler sonucunda sağlıklı bireylerde görülen bel bölgesi visseral yağ oranı artışının insülin direnci ve tip 2 DM hastalığı oluşumuyla ilişkili olduğu görülmüştür (92, 93). Visseral yağ artışına neden olan faktörleri; aşırı yemek yemek, özellikle fazla miktar basit şeker alımı, sigara içmek, alkol kullanımı, sinir ve endokrin sistem bozuklukları, yeterli düzeyde egzersiz yapılmaması, genetik nedenler, yaşlanma olarak sıralayabiliriz (87).

Pankreas, karaciğer, iskelet kası, yağ dokusu, gastrointestinal kanal arasında uyumun bozulmasına neden olan proinflamatuvar sitokinler ve peptit hormonlar, beta hücre işlev bozukluğuna, insülin duyarlılığının bozulmasına neden olmaktadır.

Tip 2 DM, genetik, metabolik ve çevresel faktörlerin karşılıklı etkileşimi sonucunda ortaya çıkan klinik tablodur. Tip 2 DM'nin etyolojisinde, etnik köken ve aile öyküsü gibi genetik risk faktörlerinin yanı sıra obezite, fiziksel inaktivite ve sağlıklı beslenme gibi çevresel risk faktörleri de yer almaktadır (94, 95). Tip 2 DM, gelişiminde birden fazla genin rol oynadığı ve çevresel faktörlerin bu gen bölgeleri üzerinde farklı derecelerde etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır. Yaşam tarzındaki değişiklikler ile birlikte diyabet hastalarının sayısı giderek artmaktadır. Ailede diyabet öyküsü olması, diyabet gelişimi açısından önemli bir risk faktörüdür (87). Diyabet gelişiminde, genetik faktörlerin önemli olduğunun bir başka göstergesi, genetik uyumun daha yüksek olduğu monozigotik ikizler arasında diyabet görülme benzerliğinin, dizigotik ikizlere göre daha yüksek olmasıdır. Sonuçta glikozun düzenleyici sistemi içindeki metabolizmal moleküllerdeki genetik anormallik diyabet patogenezi oluşturmaktadır (87).

Küresel ölçekte bakıldığında tip 2 DM prevelansının Japonlar, Hispanikler ve Yerli Amerikalılar gibi etnik gruplar arasında yüksek olduğu görülmüştür (96-98). Asyalılarda, Beyaz Amerikalılara kıyasla tip 2 DM'nin daha yüksek oranda görüldüğü

(99, 100) ve tip 2 DM açısından en riskli etnik grubun Birleşik Krallık'ta yaşayan siyah ırk olduğu tespit edilmiştir (101, 102).

Dimas ve ark. (103) yaptığı çalışmayla, çeşitli mekanizmalarla diyabet oluşumuna neden olan genetik varyantları gruplandırmıştır (103). Bu çalışmalar sonucunda, diyabet etiyolojisinde birçok genetik varyasyonun rol oynadığı ortaya konulmuştur (104). Aynı zamanda bu diyabet ilişkili spesifik lokuslar dışında bazı duyarlı lokusların, çevresel faktörlerin uyarımı sonucunda diyabet gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir (105). Glikokinaz genleri, mitokondriyal genler ve insülin reseptör genlerindeki değişiklikler diyabetin ortaya çıkmasında etkili olan genetik faktörlerdendir. Bir genom araştırması KCNQ1 genindeki mutasyonun insülin sekresyonuyla ilişkili anormalliğe ve sonuçta diyabete yol açabileceğini göstermiştir. Diyabetle ilişkili genetik anormalliklerin yaklaşık % 30'unun tespit edildiği bildirilmiştir (87).

2.3. Tip 2 DM'nin Beyin Üzerindeki Etkileri

Tip 2 DM'in uzun süredir devam ettiği hastalarda, beyin dokusunun etkilendiği ve bilişsel bozuklukların geliştiği yönünde veriler bulunmaktadır (58, 106-108). Hipokampus dokusu, diyabet nedeniyle, hacimsel azalma ve fonksiyonel bozulmaya uğrayan en önemli beyin bölgesidir (9). Bu alanın etkilenmesi, demans ve Alzheimer Hastalığı gibi hastalıkların görülme riskinde artışa neden olmaktadır (109, 110). Diyabetin hipokampus üzerindeki etkisi sadece hacim azalması ile sınırlı kalmamaktadır; aynı zamanda hipokampal hücre proliferasyonu, farklılaşması ve nörogenez gibi süreçleri de olumsuz şekilde etkilemektedir (111-113). Diyabetin erken ve geç dönemlerinde hipokampusun dentat girus alanındaki nörogenezde de azalmalar tespit edilmiştir (114).

Diyabet ve insülin direnci gibi metabolik bozuklukların merkezi sinir sistemi etkileri sonucunda oluşan en önemli klinik tablolardan biri Alzheimer hastalığıdır (AH). Son zamanlarda tip 2 DM ve yol açtığı düşünülen AH arasında, benzer patolojik mekanizmalar bulunmasından dolayı AH, özellikle beyni etkileyen diyabet türü veya "tip 3 diyabet" olarak tanımlanmıştır (115). Ayrıca, başka çalışmalarda daha önceki bilgileri destekler nitelikte, tip 2 DM'nin beyin dokusu üzerine etkilerinin, AH etkisi ile oluşan patolojiler ile benzer özellikte olduğu görülmüştür. Geroldi ve arkadaşlarının (116) yaptığı çalışmada diyabet ve AH'de karşılaştığımız bilişsel bozulmanın insülin

direnci ile bağlantılı olduğu görülmüştür (116). Literatürde; insülin direnci, inflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyonun diyabet ve AH'de ortak görülen patogeneze mekanizmaları olduğuna dair veri bulunmaktadır (117).

Tip 2 DM tablosu oluşmadan önce glikoz metabolizmasında bozuklukların oluşmaya başladığı dönemde bile sinir iletimi, öğrenme yeteneği ve hafıza oluşumu ile ilişkili bilişsel mekanizmaların etkilendiği görülmüştür. Glikoz metabolizmasındaki bozuklukların, dokuların mikrovasküler yapılarında dejenerasyonlar oluşturduğu, benzer şekilde hipokampusun mikro yapısında bozulmaya ve hacminde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (118, 119). Hem AH hem de DM'de, nöron ölümlerinde artışın nedeninin, ileri glikasyonun son ürünlerinin (AGE'ler) oksidatif stres oluşturması olduğu tespit edilmiştir (120, 121).

Tip 2 DM'nin beyin dokusu üzerindeki bu patolojik etkilerinin yanı sıra, yetişkin nörojenizde önemli bir süreç olan nöral göç üzerinde de önemli etkilerinin olduğu görülmüştür (122). Benzer şekilde, AH'de nörodejenerasyonun yanı sıra nörojeniz sürecinde de bozulmanın olduğu görülmüştür (123). Nörojeniz süreci, hafıza, öğrenme ve yaralanma sonucu iyileşme süreçlerinde önemli rol oynamaktadır ve bu sürecin, ömür boyu devam ettiği tespit edilmiştir (123).

Redoks aracılı translayon sonrası modifikasyon (124) olarak tanımlanan nitroaktif stres, hem diyabet hem de AH patofizyolojisinde etkili olan bir başka faktördür. Yapısal, metabolik ve apoptotik proteinlerin anormal S-nitrozilasyonu ile nitroaktif stres ve sonucunda çeşitli patolojiler oluşmaktadır (125). Hipergliseminin olumsuz etkilerini protein S nitrozilasyonunda değişiklikler yoluyla oluşturduğu ve AH ile ilişkili bilişsel bozukluğa yol açtığı düşünülmektedir. Benzer şekilde, diyabette görülen demans ve bilişsel bozukluklar üzerinde, anormal S-nitrozilasyonunun rolü olduğu düşünülmektedir (117).

Bahsedilen patolojik durumların dışında, diyabette görülen hiperglisemi nöronal değişikliklere ve vasküler yapılarda oluşan hasara bağlı olarak diyabetik ensefalopati denen hastalığın oluşumuna neden olmaktadır (126, 127). Diyabetin öncelikle beyin disfonksiyonu olmak üzere çoklu sistem disfonksiyonuna neden olduğunu bildiren çalışmalar vardır (128). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında diyabetik sıçanların hipokampuslarında glikoz seviyelerinin üç kata kadar arttığı bildirilmiştir (129). Diyabetin, beyin dokusundaki

patogenezi incelendiğinde; hipergliseminin, beyinde meydana gelen anaerobik glikoliz reaksiyonu için daha fazla substrat sağladığı, sonuçta laktik asidoz, glial ve nöronal hücre hasarını arttırdığı görülür (70). Hiperglisemi, serbest oksijen radikalleri oluşumunu arttırarak, DNA'ya zarar vererek, proteinlerin ve hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonuna katkıda bulunarak nöronal hücre ölümüne yol açmaktadır (130, 131). Solunum zincirinde üretilen aşırı süperoksit ve bunun yol açtığı oksidatif stres, diyabetik komplikasyonların gelişimine yol açmaktadır (132). Oksidatif stres, aldoz redüktaz-poliol yolunu aktifleştirerek, AGE miktarında artışa ve diyabetik hasara neden olur (133, 134). AGE'lerin nöronlar üzerinde doğrudan toksik etkileri vardır. Diyabette doku hasarı patogenezinde, AGE/AGE reseptör ligandlarının etkileşimi sonucu oluşan hücresel değişimler rol oynar (135). Antioksidanlar ise tüm patogenetik süreci tersine çevirerek, süperoksit üretimini ve AGE oluşumunu önleyerek polioliol yolunun normal şekilde işlenmesini sağlar (132).

Hiperglisemi, önemli bir antioksidan olan GSH (glutasyon) seviyesini ve antioksidan enzim GSH-Px (glutasyon peroksidaz) seviyelerini azaltır (136). Birçok çalışmada, oksidatif stresin diyabet patogenezindeki rolü ve diyabette antioksidanların kullanımı araştırılmıştır (130, 137). Öte yandan diyabet patogenezinde, yüksek miktarda üretilen RAGE'ler, (ileri glikasyon son ürünleri reseptörü) serbest oksijen radikalleri (OFR) (138) sentezini arttırırken; artan oksidatif stres daha fazla sayıda RAGE üretimine yol açarak pozitif geri bildirim döngüsü oluşturur (139). Bu döngü sonucu aşırı miktarda artan OFR'ler, antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasına, diyabet patogenezinin ilerlemesine ve depresyon gibi davranışsal bozukluklar başta olmak üzere diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (140-145).

Diyabetin, beyinde yapısal ve nörokimyasal değişikliklerle, depresyon ve anksiyete ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (141, 145, 146). Diyabetik olmayan bireylere göre, diyabetik bireylerde depresyon ve anksiyete görülme olasılığı iki kat daha yüksektir (140, 147). Hiperglisemi, çeşitli mekanizmalar ile doku hasarına neden olarak psikiyatrik sorunların gelişimine yol açmaktadır. Prefrontal korteks ve hipokampus gibi bölgelerde, AGE sentezi artışı, oksidatif stres, nörotransmitter salgılanmasındaki değişimler, depresif ve anksiyöz davranışların ortaya çıkmasından sorumludur (141, 148).

2.4. Deneysel Diyabet Modeli ve Streptozotosin

Diyabetin beyin dokusu üzerindeki patolojik etkilerinin araştırılmasında, diyabetik hayvan modelleri önemli kaynaklardır (149). Diyabetik hayvan modelleri oluşturmak için kullanılan maddelerden biri olan streptozotosin (STZ), ucuz ve kolay erişilebilir olduğundan çalışmamız için seçilen diyabetojen maddedir. STZ, pankreas dokusu üzerinde toksik etkisi ve glikoz metabolizması ile insülin salgılanması üzerindeki negatif etkisi nedeniyle tip 1 ve tip 2 DM'i deneysel olarak oluşturmak için kullanılmaktadır (150, 151). STZ, *Streptomyces achromogenes* bakterileri tarafından üretilen bir glukozamin-nitrozoüre bileşiğidir. Bazı endokrin tümör tedavilerinde de kullanılmaktadır (151). STZ'nin tip 2 glikoz taşıyıcıları (GLUT2) üzerinden hücre içine alınarak etki ettiği düşünülmektedir (152). STZ, pankreas beta hücresi içine girdikten sonra DNA alkilasyonuna yol açarak hücre ölümüne neden olur (153). STZ'nin pankreas ve böbrek dokusu üzerindeki toksisitesi farklı çalışmalarda gösterilmiştir (154-158). STZ uygulaması akut sonuçları, glial fibriler asidik protein (GFAP) immünreaktivitesi ile değerlendirildiğinde astrositik yanıt oluştuğu, hipokampus bölgesinde GLUT2 ekspresyonunda artış ve insülin reseptörü (IR) ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür (159). Çalışmamızda, STZ kullanarak, diyabetin hipokampus dokusuna etkisini stereolojik, histopatolojik, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel yöntemlerle değerlendirdik.

2.5. Diyabet Bulguları ve Komplikasyonları

Diyabet, belirti ve semptomları; artan susuzluk, artan açlık, sık idrara çıkma, kilo kaybı, bulanık görme, yaraların yavaş iyileşmesi, sık enfeksiyon geçirme, ellerde ve ayaklarda uyuşma hissedilmesi, koltuk altlarında ve boyunda koyu renkli cilt bölgelerinin görülmesi, tükenmişlik duygusu hissedilmesi şeklinde sıralanabilir (160). Kan glikozu yükseldiği zaman dokulardan kana daha fazla su geçişi olması sebebiyle, diyabette ilk görülen semptomlardan biri susuzluktur. Böbrekler kandaki fazla glikoz ve sudan kurtulmak için daha fazla çalışır. Bu durum, poliüriye yol açar. Sık idrara çıkma sonucunda, dehidrasyon tablosu oluşunca kuru ağız belirtisi görülür. Bazen dehidratasyon kliniği ağır sonuçlara yol açabilir, mortalite riski yükselir (161). Diyabette glikozun hücre içine geçiş mekanizması bozulduğundan, hasta kendini yemek yese bile aç hisseder. Sık idrara çıkarak kan glikozu düşürülürken vücut enerji ve kalori de kaybeder. Kişide istemsiz kilo kaybı başlar. Vücut, hem kan glikozunu

kullanamadığından hem de dehidratasyon tablosu oluştuğundan halsizlik ve yorgunluk belirtileri oluşur. Kan glikozu yüksekliği, bulanık görmeye ve baş ağrısı hissedilmesine neden olabilir (161).

Diyabette kan glikozunun yüksek seyretmesi kan akışının yavaşlamasına ve yara yeri enfeksiyonlarının geç iyileşmesine neden olabilir (161). Diyabetin periferik sinirlerin beslenmesini etkilemesi sonucu el ve ayaklarda uyuşmalar oluşabilir (161). Diyabette görülen bir diğer nörolojik semptom, kan glikozunun aşırı düşmesi sonucu bilinç kaybı görülmesidir. Özellikle, öğün atlandığında, egzersiz yapıldığında, ilaç tedavisinin yüksek dozda uygulandığı durumlarda kan şekerinin çok fazla düşmesiyle hasta bayılabilir (161). Diyabetik hastalarda görülen bir başka semptom diş etlerinin beslenmesinde bozulmaya bağlı olarak kırmızı-hassas diş etlerinin oluşmasıdır. Ayrıca diş eti ve çene kemiklerinde enfeksiyonlar oluşabilir. Diş etlerinde çekilme ve hatta dişlerin kaybedilmesine varan komplikasyonlar gelişebilir (161).

Diyabetli kişilerin yaklaşık %90'ı tip 2 DM hastasıdır. Geri kalan diyabet hasta grubunu tip 1 DM ve gestasyonel diyabet hastaları oluşturmaktadır. Tip 2 diyabetli hastalarda semptomlar genellikle yavaş şekilde gelişir ve %25'inin diyabet tanısı almadığı düşünülmektedir (161). Tip 1 DM'de semptomlar genellikle birkaç haftalık sürede gelişip hızlı bir şekilde ilerler (162). Tip 2 DM'de ise genellikle başlangıç aşamasında semptom görülmez veya çok hafif şekilde görülür (162). Tip 2 diyabetin belirtilerinin ortaya çıkması genellikle yavaş bir şekilde gerçekleşir (160).

Diyabet riskini arttıran faktörler, diğer ciddi kronik hastalıkların da gelişiminde de rol oynamaktadır. Kan glikozunun kontrol altına alınması komplikasyonların ve komorbiditelerin oluşma riskini azaltabilir (160). Diyabette oluşan hiperglisemi tablosu, başta beyin, böbrekler, sinirler, kan damarları, gözler ve gastrointestinal sistem olmak üzere birçok dokuda sitotoksositeye yol açar (163). Tip 2 DM'de inme, kalp yetmezliği ve diğer kalp hastalıkları görülme oranı artmakla birlikte (164, 165), tip 2 DM'nin, AH ve vasküler demans gibi bilişsel gerileme ile seyreden hastalıklarla ilişkili olduğu görülmüştür (166, 167). Diyabette görülen hipoglisemi; kan glikozunun 70 mg/dl'nin altına düşmesi olup koma ve ölümlere neden olabilir (161). Hiperglisemi; kan glikozunun 180-200 mg/dl'nin üzerine çıkması olup, birçok dokuda ve özellikle kalp, böbrek, göz ve sinir dokularında patolojik değişikliklere yol açabilir (161).

Diyabete bağlı olarak nöropati geliştiğinde, öncelikle ayaklarda ve bacaklarda karıncalanma ve uyuşukluk şeklinde belirtiler görülür. İlerleyen dönemlerde ise sindirim sistemi, üriner sistem, kardiovasküler sisteme ait sinirler etkilenebilir (161). Diyabette görülen bir diğer komplikasyon kalp ve kan damarı hastalıklarıdır. Hastalarda kan glikozunun yüksek seyretmesi vasküler yapılara ve kalbe ait sinir sistemine zarar verebilir. Ayrıca kalp hastalıklarına neden olan risk faktörlerinden hipertansiyon ve hiperkolesterolemi gibi durumlar diyabetle birlikte daha sık görölmektedir. Diyabette hipertansiyon riski 2 kat artış göstermektedir. Bu durum kalp hastalığı ve felç geçirme riskini arttırmaktadır (161).

Diyabette etkilenen bir başka organ böbreklerdir. Böbrekler yüksek kan glikozunu atabilmek için daha fazla çalışmaktadır (161). Diyabete bağlı, sindirim sistemine ait sinirlerde hasar meydana gelirse bulantı, kusma, ishal veya kabızlık gibi sorunlar oluşabilir (160).

Diyabetin göz üzerinde etkileri genel olarak, gözlerde basınç artışı şeklinde beliren glokom oluşumu, göz lensinde bulanıklaşma, katarakt oluşumu ve retinopati oluşumudur (161). Diyabet retina kan damarlarına zarar vererek körlüğe kadar gidebilecek ciddi komplikasyonlara yol açabilir (160). Kan glikozunun yüksekliği, kulaklarda vasküler yapılara zarar vererek, işitme sorunlarına yol açabilir (161). Bunların yanı sıra, diyabetli bireylerde bakteriyel ve mantar enfeksiyonları sağlıklı insanlara göre daha sık görölmektedir (161). Diyabetli hastalarda çeşitli cilt sorunları görölmektedir. Enfeksiyonlar, kuru cilt ve dolaşım bozukluğuna bağlı olarak özellikle alt bacaklarda kaşıntı ile başlayabilir (161). Ayrıca insülin veya diğer oral antidiyabetik ilaçlara bağlı olarak alerjik reaksiyonlar saptanabilir (161). Diyabetik hastalarda karşılaştığımız diğer bir komplikasyon yara iyileşmesinde bozulmadır. Özellikle ayakta oluşan yaralar, ciddi enfeksiyonlara dönüşerek ayak parmağı, ayak ve bacak amputasyonuna kadar giden durumlara yol açabilir (160).

2.6. Diyabet Tedavisi ve Önleyici Yaklaşımlar

Diyabetin tedavisi ile kan glikoz seviyesinin normal düzeye indirilerek mikrovasküler, makrovasküler ve kardiyovasküler risklerin en aza indirilmesi hedeflenmektedir. Tedavi ile kilo kontrolü sağlanarak, kan basıncı ve lipid seviyeleri gibi risklerin azaltılması amaçlanmaktadır (162). Kişi diyabet tanısı alır almaz, hastalığı kontrol altına almak, komplikasyonları önlemek ve tedavinin başarılı

olmasını sağlayabilmek için hastalara gerekli eğitimin verilmesi önemlidir. Diyabet hastalarına ilaç tedavisi verilmeden önce; diyabeti ortaya çıkaran sebepler, tedavi yöntemleri, diyet ve egzersizin önemi, kişisel bakımla ilgili bilgiler, kan glikoz seviyelerinin takibi, tedaviye uyum gösterilmesi, ortaya çıkabilecek komplikasyonlar ve önlenmesi için yapılması gerekenlerle ilgili eğitim verilerek yeni hayat düzenini oluşturması sağlanmalıdır. Yaşam tarzında değişikliklerle ilgili ön koşullar ve hastanın uyumu diyabet tedavisinin temelini oluşturmaktadır (162).

Yaşadığımız dönemde sedanter yaşam alışkanlıklarının yaygınlaşması ile obezite ve buna paralel olarak diyabet görülme oranı artmaktadır. Tip 2 diyabetli hastalar değerlendirildiğinde %85-90 oranında fazla kilolu veya obez oldukları görülmektedir (168). Yaş grubu fark etmeksizin, diyabetik hastalarda beden ağırlığının azaltılması tedavi hedeflerinden birini oluşturmaktadır (169).

Diyabetin tedavisi ve yönetiminde verilecek eğitimde en önemli bölüm tıbbi beslenme tedavisidir. Diyabet tanısı alan hastalar zaman kaybedilmeden diyetisyene yönlendirilmelidir (170). Tıbbi beslenme tedavisi hem diyabet tedavisi yönetimi, hem de diyabet ile ilişkili komplikasyonların önlenmesi için gereklidir. Hastanın klinik durumu ve yaşam tarzına uygun, bireye özel beslenme tedavi programı uygulanması gerekir (171). Hastalara diyet programı düzenlenirken, hastanın sağlığı ile ilgili başka olumsuzluklara yol açılmaması için hızlı kilo kaybedilmesi istenmemektedir (168). Bu nedenle bireye uygun oluşturulan diyet programındaki toplam kaloriden 250-500 kilokalori daha az miktarda olacak şekilde orta dereceli kalori kısıtlaması yapılması önerilir (172). Kalori kısıtlaması sonucu haftada 400-800 gram kilo kaybı, diyabete bağlı komplikasyon gelişim riskini düşürmektedir. İnsülin direnci bulunan tip 2 DM'li hastada eğer orta dereceli kalori kısıtlaması uygulanıp kilo kaybedilirse, insülin direncinde iyileşme sağlanabilmektedir.

Diyabetli hastaların, önerilen egzersiz ve tıbbi beslenme programlarını uygulayarak %5-7 kilo kaybı sağlayabilecekleri bildirilmiştir (168). Tıbbi beslenme tedavisi uygulamasının asıl amacı metabolik ve hayat tarzı düzenlemesini sağlamaktır (173). Diyabetli bireylerde metabolik kontrolün sağlanması, kronik komplikasyonların önlenmesi, komplikasyon gelişme riskinin en aza indirilmesi ve diyabetik hastanın gelişebilecek akut hastalık, hipoglisemi gibi durumlara veya egzersiz gibi farklı koşullara adapte olabilmesinin sağlanması tıbbi beslenme tedavisinin asıl hedefleridir

(162). Tıbbi beslenme tedavisi eğer hasta tarafından düzenli şekilde uygulanırsa, HbA1c düzeyleri bakımından tip 1 DM hastalarında % 1, tip 2 DM hastalarında %1-2 değerinde azalma görülebilir (174). Ayrıca tıbbi beslenme tedavisinin, dislipidemi ve hipertansiyon gibi diyabete eşlik eden hastalıklar üzerinde de olumlu etkisi olduğu görülmüştür (162).

Diyette yer alması gereken karbonhidrat miktarı günlük enerjinin %55-60'ını karşılayacak şekilde olmalıdır (175). Diğer taraftan, diyabetli hastaların diyetlerinde posalı yiyeceklere yer verilmesinin, kan glikozunun düzenlenmesi ve insülin salınımı üzerinde yararlı etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Diyetteki posa, hepatik glikoz metabolizmasını etkileyerek ve öğünlerden sonraki glikoz dolaşımını azaltarak plazma glikoz seviyesini düzenlemektedir (168). Diğer yandan posa bakımından zengin besinlerin enerji oranları düşük olmasına rağmen, midede hacim oluşturarak tokluk hissi oluşturmakta ve bu sayede kilo verilmesine de yardımcı olmaktadır (168).

Tıbbi beslenme programlarında yer alan proteinler, tip 2 DM hastalarında belirgin şekilde insülin salgılanmasını arttırmaktadır (168).Diyette yer alması gereken günlük protein miktarı 0,8-1g/kg' dır (168). Eğer diyabetli hastalarda ek olarak kronik böbrek yetmezliği gelişmişse bu durumda erken dönemler için aynı oran devam ederken ileri evrelerde bu miktarın günlük 0,8 g/kg'a düşürülmesi gerekir. Bu önerinin böbrek fonksiyonlarında düzelme sağlayabildiği bildirilmiştir (172).

Diyabetli kişilerin diyetinde yer alan yağ günlük enerjinin %30'unu karşılayacak şekilde düzenlenmelidir (168). Diyabetli hastaların günlük kolesterol alımları 200 mg'ın altında olmalıdır (176). Diyabet hastalarına, tekli doymamış yağlardan zengin diyet önerilmektedir (168).

Diyabet hastaları için yapılan yaşam tarzı değişikliği planında fiziksel aktivitenin düzenlenmesi de yer almalıdır. Tüm diyabetli hastalar için, eğer komplikasyon gelişmişse bu durum göz önünde bulundurularak, uygun egzersiz programı oluşturulması gerekir (162). Diyabet gelişmeden önceki prediyabet döneminde düzenli fiziksel egzersiz yapılması hem insülin direncinin azaltılması hem de tip 2 DM gelişiminin önlenmesi bakımından önemlidir (162). Düzenli fiziksel egzersiz diyabetli hastalarda kan glikoz seviyesinin, kan basıncının ve lipid düzeylerinin normal seviyelere inmesine yardımcı olur (162). Egzersiz programı her hasta için özel olarak planlanmalıdır, ancak yarar görülebilmesi için haftada en az üç

gün, 20 ile 30 dakika egzersiz yapılması önerilmektedir (162). Bir başka öneri haftalık en az 150 dakika olacak şekilde orta seviyede egzersiz programı uygulanmasıdır. Egzersiz programıyla asıl amaçlanan hasta için submaksimal kalp hızına ulaşılmasıdır (162).

2.7. Diyabette İlaç Tedavisi

Dünya genelinde yetişkin nüfusta diyabetin görülme oranı Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 1980' de %4,7 iken bu oran 2018'de %8,5'e yükselmiştir (177). Gün geçtikçe diyabetik hasta sayısının arttığı ve diyabette beklenen yaşam süresinin azaldığı bilinmektedir. Diyabete bağlı gelişen, körlük, böbrek yetmezliği, miyokard enfarktüsü, amputasyonlar ve felç gibi komplikasyonlar yaşam kalitesini ciddi oranda düşürürken ayrıca beklenen yaşam süresinin kısılmasına neden olurlar (178). Diyabete bağlı gelişen mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar dünya genelinde sağlık hizmetlerinde önemli derecede yük oluşturmaktadır (179). Tüm kılavuzlar diyabetik hastaların takibinin üç ayda bir yapılmasını önermiştir (174, 180). Düzenli aralıklarla takip edilen tip 2 DM hastalarının, kan glikoz değerlerinin, HbA1c değerlerinin ve komplikasyon riskinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (181-183). Diyabetin tüm dokuları etkilediği, diyabete bağlı kardiovasküler morbidite ve mortalite, böbrek yetmezliği, körlük, amputasyon gibi komplikasyonlara yol açtığı ve bu klinik durumların en önde gelen nedeni olduğu iyi bilinmektedir. Bu tip ciddi sorunlara yol açan diyabetin tedavi planlarının doğru şekilde yapılması önemlidir (184, 185).

Glikoz kontrolü önemli ölçüde sağlanırsa, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişme riski %10 oranında azalırken, nefropati gelişme riskinin %21 azaldığı görülmüştür (186). Antidiyabetik tedavinin yanında hipertansiyon ve kan lipid değerleri yüksek bulunan hastalara bunun için gereken ek tedaviler verilerek mikrovasküler komplikasyonlar önenebilir (67).

Tip 2 DM tedavisinde; insülin sekresyonunu arttıran ilaçlar (sülfonilüreler, glinidler), insülin duyarlılığını arttıran ilaçlar (biguanidler, tiazolidinedionlar), glikozun emilimini önleyen ilaçlar (alfa glikozidaz inhibitörleri- akarboz), inkretin bazlı tedaviler (GLP-1 analogları, DPP4 inhibitörleri), SGLT (sodyum-glikoz transporter) inhibitörleri (dapagliflozin, kanagliflozin, empagliflozin), amilin analogları (pramlintid), insülin gibi ilaç grupları kullanılmaktadır (67).

Tip 2 DM tedavisinde, tüm gün etkili olan ve kan glikozunu normal seviyelere düşürebilen tek bir ilaç bulunmamaktadır (187). Birleşik Krallık Prospective Diabetes Study (UKPDS) çalışmasına göre, tip 2 DM hastalarının %50'sinde HbA1c istenilen değere ulaşılması için üç yıl içinde ilave ilaç tedavisine, hastaların %75'inde ise dokuz yılda çoklu ilaç tedavisine geçilmiştir (188).

Diyabetin ilerleyen dönemlerinde, diyet, egzersiz ve ilaç tedavisine hasta uyumunun azalması, geçirilen diğer hastalıklar, insülin direncini arttıran ilaçların kullanılması, hastanın tedavisinin değiştirilmesi-düzenlenmesinde gecikilmesi nedeniyle hastanın kan glikoz seviyesi kontrolü kötüleşmektedir (187).. İlaçların yeterince etkili olamamasını, pankreasta beta hücrelerinde belirgin yetersizlik görülmesi ve diyabetin farklı metabolik defektlerin sonucunda ortaya çıkması ile açıklayabiliriz (189). Diyabete yol açan tek bir metabolik bozukluğun tedavisi ile tip 2 DM hastalarında sınırlı düzeyde glisemik kontrol sağlanabilir. Bu nedenle etki mekanizmaları birbirinden farklı olan oral antidiyabetik ilaçların kullanımında, bir ilacın yerine diğer ilaç tercih edilerek yapılan tedavi düzenlemeleriyle iyi glisemi kontrolü sağlanamamaktadır (190, 191). Farklı mekanizmalarla etki gösteren ilaçlar kombine edilerek kullanılması ile ilaçların terapötik güçleri artmakta, daha düşük dozlarda kullanılarak daha az yan etki oluşturmaktadırlar. Ayrıca kombine ilaç tedavisi ile glisemi kontrolünün daha iyi sağlandığı görülmüştür (187).

Tip 2 DM tedavisinde erken dönemden ileri evrelere doğru basamaklı tedavi yaklaşımı uygulanır. Buna göre öncelikle diyet ve egzersiz uygulamaları, tekli oral antidiyabetik tedavi, tekli oral antidiyabetik ilaç dozunun artırılması, kombine tedavi denendikten sonra, son basamakta insülin tedaviye eklenir. Tip 2 DM tedavisinde basamaklı tedavi yaklaşımında, bir basamaktan diğerine geçilirken, zaman kaybı yaşanmakta ve bu sürede devam eden hiperglisemi, diyabete bağlı komplikasyon gelişimini ciddi oranda arttırmaktadır (187). Bu nedenle artık basamaklı tedavi yaklaşımı yerine kombinasyon tedavisinin erken dönemde başlanması şeklinde yeni bir tedavi anlayışı geliştirilmiştir (187).

Amerikan Diyabet Birliği (192) ve Avrupa Diyabet Araştırmaları Birliği (EASD), tip 2 DM hastalarının farmakoterapi takibinde HbA1c değerinin üç ayda bir kontrol edilmesi gerektiğini bildirmektedir (193).

Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği’de HbA1c için uygun değere ulaşılan kadar üç ayda bir, ulaşıldıktan sonraki dönemde 3-6 ayda bir HbA1c takibinin yapılması gerektiğini bildirmiştir (187). Tedavi düzenlenirken en çok dikkat edilmesi gereken konu, glisemik hedeflere ulaşamıyorsa veya bu seviyeler sürdürülemiyorsa yeni tedavi rejimlerine geçilmesidir (187).

2.8. Nöropatik Ağrı ve Hipokampus

Nöropatik ağrı oluşumu ile birlikte, hipokampusta yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin gerçekleştiğine dair birçok kanıt bulunmaktadır (194). Hipokampusta görülen uzun dönem potansiyasyon oluşumunda, periferik sinir hasarından sonra değişiklik olduğu görülmüştür. Hipokampusta sinaptik yapıda görülen nöroplastisitenin, periferik sinir hasarı sonucu gelişen nöropatiyle ilişkili olduğu söylenebilir (195). Başka bir çalışmada, devamlı hissedilen enflamatuvar ağrının hipokampusta morfogenetik yapıyı değiştirdiği gösterilmiştir (196).

Bağışıklık yanıtlarında görev aldığı düşünülen nükleer faktör kapp B (NF- κ B) transkripsiyon faktörünün öğrenme, hafıza (197-199) ve korku anılarının oluşumu (200) gibi bilişsel süreçlerin dışında, enflamatuvar ve nöropatik ağrının sinir sisteminde oluşturduğu etkilerde görev aldığı düşünülmektedir (201, 202). Chou ve ark. (194) yaptıkları çalışmada, hiperaljezi oluşumunda, hipokampustaki NF-KB (nükleer faktör kapp b) ekspresyonunun değiştiği görülmüştür. (194). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, CCI (kronik konstriksiyon hasarı) ile oluşturulan nöropatik ağrı ile, NF-KB p65 seviyesinin zamana bağlı olarak, hipokampusta kontralateral ve ipsilateral tarafta artış gösterdiği tespit edilmiştir. (194). Bu fonksiyonu dışında, NF- κ B’nin nöronal plastisite ve hafıza fonksiyonlarında görev aldığını gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır (203, 204).

Sağlıklı insanlarda yapılan farklı bir çalışmada, hafif termal ağrı oluşumuyla karşı taraf hipokampusun kan akışında artış tespit edilmiştir (205). Aynı çalışmada, hipokampusta artan kan akışının, anterior singulat korteks, amigdala, insula ve prefrontal korteks gibi bölgeler üzerinde de etkisinin olabileceği ileri sürülmektedir (205). Bu bölgelerin ağrı duyusu ile ilişkili, emosyonel ve mekânsal bilgileri düzenlediği düşünülmektedir (205).

Periferik sinir yaralanması sonucu, hipokampusta nörogenezdeki azalmada interlekin (IL)-1 (206) ve TNF (207) gibi proinflamatuvar sitokinlerin etkili olduğu

düşünülmektedir (206, 208). Diğer taraftan kronik ağrı durumunda, meydana gelen hafıza bozukluklarından TNF'nin aşırı üretilmesi sorumlu olabilir (28). Kronik nöropatik veya inflamatuvar ağrı modeli oluşturulan hayvanlardaki çalışmalarda, hipokampus nörogenezinin iyileştirilmesi ile, anksiyöz anıların silindiği, ağrı duyusunun azaldığı (209), zor çevresel şartlarla mücadele etme yeteneğinin arttığı (210) yönünde veriler elde edilmiştir.

Çalışmamızdaki gruplardan birinde uyguladığımız antioksidan madde olan *Garcinia kola*'nın, literatür taramalarımız sonucunda, periferik sinir hasarı üzerine etkisi ile ilgili fazla çalışma olmadığını tespit ettik. Bunun yerine *Garcinia kola*'nın, diyabetik patolojilerde ve diyabetik oksidatif stresin tedavisinde kullanılabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (211). Örneğin, diyabetik farelerle yapılan çalışmada, *Garcinia kola* tedavisi uygulanmasının, hayvanların beyin dokusundaki TNF, CD68, GFAP gibi inflamatuvar sitokin seviyesini düşürerek enflamasyonu baskıladığı ve bilişsel fonksiyonlarda iyileşme sağladığı görülmüştür (212). Farklı bir çalışmada diyabetik hayvanlara *Garcinia kola* tedavisi verilmesi sonucunda, beyinde TNF-a, FAS sitokin seviyesi, nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonun belirtilerinin azaldığı gösterilmiştir (213).

Buradan yola çıkarak periferik sinir hasarının da hipokampusta benzer inflamatuvar mekanizmalarla patolojiler oluşturabileceğini öngörmekteyiz. *Garcinia kola* tedavi uygulamasının, periferik sinir hasarının hipokampusta yol açabileceği patolojilere karşı da olumlu sonuçları olabileceğini düşünüyoruz. Bu amaçla *Garcinia kola*'nın siyatik sinir hasarı ve diyabetle birlikte olan siyatik sinir hasarı durumunda, hipokampustaki tedavi edici etkinliğini farklı bilimsel ve histolojik metodlarla araştıracağız.

Yaptığımız araştırmalarda, çalışmamızda hem siyatik sinir hasarı hem de diyabetin hipokampusa muhtemel olumsuz etkilerinin tedavisi için belirlediğimiz ikinci antioksidan madde kurkumindir.

Diğer taraftan, analjezik etkili olduğu bilinen, *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen fenolik bileşik kurkuminin hipokampus nörogenezini arttırabileceği yönünde görüşler de bildirilmiştir (214-217). CCI ile kronik nöropatik ağrı oluşturulan hayvanlarda yapılan deneylerde kurkuminin nöroprotektif etki göstererek, öğrenme ve hafıza alanında bilişsel bozuklukları ve ağrı ile ilişkili davranış bozukluklarını

düzeltiltiği yönünde veriler elde edilmiştir (218, 219). Ancak CCI ile ilişkili periferik nöropatide, kurkuminin hipokampus nörogenezini arttırarak, bilişsel işlevleri iyileştirdiğine dair kesin bir bilgi bulunmamaktadır (220).

Bu konuda belirsizliği çözebilmek adına çalışmamızda, transekte sinir hasarı oluşturulmuş diyabetik sıçanların hipokampus dokusunda, kurkuminin iyileştirici etkisi, histolojik, IHC ve stereolojik tekniklerle ayrıntılı olarak incelenmiştir. Ayrıca, kurkuminin, hipokampustaki nörogeneze etkisini immunohistokimyasal açıdan değerlendirebilmek için çalışmamızda, nöral kök hücre belirteci olarak anti-SOX2 antikorunu kullandık.

2.9. Hipokampus Histolojisi ve Fonksiyonları

Hipokampus anatomik olarak lateral ventrikül temporal hornu yakınında ve temporal lobun medial kısmında yer alan bilişsel fonksiyonlarla ilişkili önemli bir merkezidir (221, 222). Arşikorteks olarak da adlandırılan hipokampus bölgesi, gri cevher özelliğindedir (223). Hipokampusun 5-8 cm uzunlukta ve beynin ilk gelişmeye başlayan alanlarından birisidir (223). Limbik sistem denilen beyin bölgesi; hipokampus, amigdala, hipotalamus ve singulat girustan oluşmaktadır (224). Sıçan hipokampusu insan hipokampusunun %1'i kadardır (225). İnsanda hipokampus hacmi, neokorteks hacminin %0,9'unu oluşturmaktadır (226). İlk keşfedildiği dönemde, görünüşünün denizatına benzemesinden dolayı hipokampus (Yunanca: hippos=at, kampos=deniz) olarak adlandırılan bu yapı, daha sonraki dönemlerde dış yüzeyinin koç boynuzu gibi görüntüsü nedeniyle cornu ammonis olarak da adlandırılmıştır. Bu nedenle hipokampus bölümleri CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak adlandırılmaktadır (227).

Hipokampus histolojisi incelendiğinde birbiri ile bağlantılı yedi tabakadan oluştuğu görülür. Ventrikül yüzeyinden beynin lateral yüzeyine doğru hipokampus tabakaları; stratum alveus, stratum oriens, stratum pyramidalis, stratum lucidum, stratum radiatum, stratum lakünozum, stratum molekölare olarak adlandırılır (223):

Hipokampus fonksiyonları, yapısının kompleksliği ve beyinde birçok bölgeyle bağlantılı olması nedeniyle tamamen açıklanamamıştır. Bu nedenle, hipokampusun farklı işlevlerdeki rolünün belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır (224). İlk olarak 1948 yılında hipokampusun olfaktör bulbustan sinir lifleri aldığı düşünülerek, koku alma merkezi olduğu iddia edilmiştir (223). Sonraki dönemlerde hipokampus

gelişimiyle olfaktör bulbus gelişiminin korelasyon göstermediği, hatta koku yolları gelişmemiş insanlarda hipokampusun normal gelişim gösterdiği belirlenmiştir (224). İlerleyen yıllarda ise koku duyusunun, hipokampusla ve retiküler formasyon (formatio reticularis) ile anatomik ilişkisi ile birlikte; kokunun dikkat, hafıza ve zihinsel uyanıklık üzerine olan etkisi belirlenmiştir (228). Hipokampusun, olfaktör bulbus ve entorinal korteksten lifler alması, koku duyusunun hafıza ile bağlantısını göstermektedir.

Son çalışmalar hipokampusun tüm duyuşsal uyarılarla uyarılabileceğini göstermiştir (228). 1957 yılında Scoville ve Milner'in yaptığı çalışmada, ilk defa hipokampusun insan hafıza oluşumuyla ilişkili bir merkez olduğu gösterilmiştir (229). Hipokampusun iç ve çevresel bağlantıları ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır (230, 231). Hipokampusun limbik sistem, ventral talamus ve hipotalamus ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (232, 233). Limbik sistemle bağlantısı sayesinde hipokampus, hareketlerin şekillenerek davranışa dönüşmesini sağlamaktadır.

Hipokampus tüm duyulardan girdi alan merkez olduğu için bir geçiş güzergahı olduğu söylenebilir. Hipokampusun duyuşsal fonksiyonlar üzerinde kontrol edici etkisi olduğu görüşü ilk kez 1937'de James Papez tarafından ortaya atılmıştır (234). Duyusal uyarıların, başlangıç noktası olan singulat giristan, hipokampusu geçerek, hipotalamusa ulaştığı şeklinde öngörülen hayali iletim devresine, "Papez Devresi" denir. Papez devresine ait yapılar, duyguların oluşumu esnasında ortaya çıkan otonom (istemsiz) aktivitelerin düzenlenmesinde görev alırlar (224). Hipokampusun kısa süreli hafıza oluşumunda görev aldığı belirlenmiştir (235). Yeni bilgiler kısa süreli hafızada depolanır ve sonraki aşamada hipokampus sözel ve görsel uyarıların kalıcı hafızaya aktarılmasını sağlar. Sol taraf hipokampus sözel hafıza oluşumunda, sağ taraf hipokampus görsel hafıza oluşumunda görev alır (224).

Hipokampusun endokrin sistemle ilişkili görevlerinin olduğu da bildirilmiştir (236). Adrenal bezden salgılanan kortizol hormonunun hipokampusta reseptörlerinin olduğu belirlenmiştir (224). Kortizol hipokampusta belli sayıda reseptöre bağlandığında, negatif feedback etkiyle hipotalamustan salgılanan CRF (kortikotropin salgılatıcı hormon) inhibe olur (224). Adrenal bezlerin uyarımı sonlandırılarak kortizol salınımı azaltılır. Dolayısıyla amigdalanın oluşturduğu stres cevap, hipokampus tarafından kontrol edilir (224). Hipokampus normal şekilde fonksiyon gördüğü sürece,

stres cevapları sonlandırılabilir. Diğer taraftan uzun süre devam eden stres hipokampus fonksiyonlarını olumsuz etkilemektedir (224). Uzun süre devam eden stresin hipokampusta, dentritik uzantılarda büzülmeye ve nöron ölümlerine yol açtığı belirlenmiştir (224). Ayrıca uzun süren stres döneminde, hipokampusun dentat girus bölgesinde gerçekleşen nörogenezin durduğu, özellikle CA3 bölgesindeki dendritlerde büzülmenin olduğu belirlenmiştir (224). Hipokampusun stres durumlarında aktif hale geldiğini bildiren görüşlerde bulunmaktadır (237). Davranışların oluşumunun septum ve hipokampus tarafından engellenebildiği düşünülmektedir (224).

Endokrin fonksiyonları dışında hipokampusun; heyecan oluşumu ve kontrolü, visseral organ aktivitelerinin ve serebral korteksi etkileyen retiküler aktivitenin düzenlenmesi ile ilgili görevleri olduğu düşünülmektedir (223).

Hipokampus yapısı itibari ile düzgün konumlanmış nöronlardan oluştuğundan, nörofizyoloji çalışmaları için uygun bir beyin bölgesidir (224). Bu nedenle nörofizyolojik çalışmalar kapsamında, nöral plastisite olarak da tariflenen LTP (uzun süreli potansiyasyon- long term potentiation) ilk kez hipokampus bölgesinde gösterilmiştir. Bu nöral değişimin, hafıza oluşumunu sağladığı düşünülmektedir (229, 233). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, hafıza oluşumunda ve uzaysal konumlama ile ilgili süreçlerde hipokampusun görev aldığı belirlenmiştir (225, 240, 241).

2.10. *Garcinia kola*

Oksidatif durumlar, antioksidan sistemler tarafından dengede tutulur. Antioksidan sistemler; glutatyon, katalaz, süperoksit dismutaz gibi enzimler ve vitamin A, C, E gibi diyet ürünlerini içerebilir (242). Bu sebeple bitkilerden alınan antioksidanlar, oksidatif hasarın ve bunun sonucunda oluşabilecek birçok hastalığın önlenmesi bakımından önemlidir (243). Fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklere sahip olması ve nörodejenerasyonda bozulan enzimatik aktivitelerin düzenlenmesinde rol oynamaları sebebiyle nöroprotektif etkiye sahip oldukları düşünülmektedir (244, 245).

Fenolik bileşik yapısında olan *Garcinia kola*, *Guttiferae* ailesine ait bitter kola olarak bilinen, Orta ve Batı Afrika’da yetişen bir bitkidir (246). Afrika yağmur ormanı bitkisi *Garcinia kola* Heckel’in tohumlarına “Onie”, “Orogbo” ya da yoğun büzücü tadından dolayı erkek kola- acı kola (211, 247-249) denmektedir. Nijerya’da toplum tarafından yaygın şekilde tüketilen ve çeşitli hastalıklarda kullanılan bir bitkidir (243).

Garcinia kola yetiştiği yerlerde halk tarafından, larenjit, bronşit, diyare, karaciğer hastalıkları tedavisinde kullanılmaktadır (250). *Garcinia kola* tohumları, Batı Afrika geleneksel tıbbında, malarya (248) ve diyabetin de (211) içinde olduğu bir dizi hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Kanserde (251), hepatotoksistide (252), obezitede (253), diyabette (254) (211, 255-257) malarya enfeksiyonunda (258), nefrotoksistide (259), kardiovasküler hastalıklarda (21) ve nöropatide (260) antioksidatif ve terapötik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (251). Birçok çalışma, *Garcinia kola* tohumlarının antidiyabetik (211, 255-257), anti-inflamatuar (14, 259, 261, 262) ve nöroprotektif özelliklere (263, 264) sahip olduğunu göstermiştir.

Çok sayıdaki fenolik bileşikten özellikle kolavironun nöroprotektif etkisinin daha güçlü olduğu söylenebilir (3). Kolaviron, *Garcinia kola*’dan izole edilen biflavonoid kompleksidir aynı zamanda *Garcinia kola* tohumunun ana bileşenidir (3). Kolavironun (*Garcinia kola* özütü) beyin dokusunda glikoz alımını uyarıcı etkisi ve antioksidatif, pürinerjik, kolinerjik enzim aktivitelerini düzenleyici etkilerinin olduğu görülmüştür (3).

Garcinia kola tedavisi alan grupla, diyabetik kontrol grubunu karşılaştırıldığı bir çalışmada, tedavi alan grupta nöroinflamasyon göstergelerinin ve belirtilerinin şiddeti önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (213). Aynı çalışmada, *Garcinia kola*

ile tedavi edilen diyabetik hayvanların glisemisi ve vücut ağırlıklarının, diyabetik olmayan kontrollerin değerleriyle benzer olması ve toksisite belirtilerinin gözlenmemesi *Garcinia kola* tedavisinin iyi tolere edildiğinin kanıtıdır (213). Bu gözlemler, *Garcinia kola*'nın anti-inflamatuar (14, 261, 262, 265) ve nöroprotektif etkili olduğunu göstermektedir (263, 264).

Garcinia kola tohumlarının hipoglisemik özellikleri birçok çalışmada bildirilmiştir (211, 255, 256). Tedaviden sonra diyabetli hayvanların serumlarında glisemik indeks düzeylerinde önemli derecede düşüş olduğu görülmüştür (213). Sistemik glisemide azalmanın metabolik sendromun iyileşmesini desteklediği, test edilen dozda tedavi edilen diyabetik hayvanların kilo kontrolünün sağlanmasının, genel durumunu iyileştirdiği gibi durumlar gözlenmiştir (213).

Nörodejeneratif hastalıkların ana özelliklerinden birisi de kolinerjik disfonksiyondur ve kolinerjik enzimlerin aktivitesindeki artış ile karakterizedir (266). Glikoz ile inkübe edilmiş beyin dokusunda asetilkolinesteraz ve bütiril-kolinesteraz gibi kolinerjik enzimlerin aktivitesindeki artış, kolinerjik disfonksiyonun ve nörodejenerasyonun bir göstergesidir. Kolinerjik disfonksiyon aynı zamanda dokudaki oksidatif stresle ilişkilidir (245, 267, 268). Fenolik bileşiklerin özellikle kolavironun asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz aktiviteleri üzerinde inhibitör etkisinin olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (14, 269). Bu enzimler, birçok çalışmada AH gibi nörodejeneratif hastalıkların yönetim ve tedavisinde ana terapötik hedefi oluşturmaktadır (266, 270).

HT22 hücrelerinde (immortal fare hipokampal nöral hücre hattı) kolavironun sitotoksik etkisi araştırılmış ve güvenliği değerlendirilmiştir (3). Kolavironun HT22 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin olmadığı, sağlıklı nöronal hücreler için güvenli olduğunu göstermektedir (3). Diğer taraftan fenolik içeren doğal ürünlerin normal hücrelerde ise toksik etkisi olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (271, 272). Kolavironun, çözünürlük, absorpsiyon ve dağılım gibi farmakokinetik özelliklerinin iyi seviyede olduğu görülmüştür (3). Kolaviron, oksidatif dengesizliği azaltır, kolinerjik disfonksiyonu ve nükleotid hidrolize edici enzimatik aktiviteleri modüle eder. Sonuç olarak beynin ultrastrüktürel morfolojisini koruyarak nöroprotektif bir etki sağlar (3). Aynı zamanda beyin dokusuna glikoz alımını uyarmaktadır (3).

Kolavironun (*Garcinia kola* bileşeni) farmakolojik özellikleri itibariyle nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde iyi bir ilaç adayı olduğu düşünülmektedir (3).

2.11. Kurkumin

Tip 2 DM'nin oluşumunun önlenmesi ve tedavisinde, bitki ekstraktlarının yeri ve kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır (273, 274). Zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa* bitkisinin kök sapında bulunan kurkumin bu amaçla tip 2 DM tedavisinde denenen bitkilerden birisidir (275). *Curcuma longa* veya zerdeçal olarak bilinen bu bitki türü, turuncu yumrulu rizomları bulunan, özellikle Güney Doğu Asya'da yetiştirilen terapötik özellikleri olan bir bitkidir (275). Özellikle Çin ve Hindistan gibi ülkelerde, curcuma kökünden elde edilen doğal bir fitokimyasal bileşik olan kurkumin (22), kronik inflamasyondan, hiperlipidemiye, amenoreden, nörodejeneratif hastalıklara ve diyabet komplikasyonlarına kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (276).

Zencefilgillerden *Curcuma longa* bitki rizomlarından oluşan, baharat çeşidi zerdeçalın, polifenol yapıdaki kimyasal bileşeni olan kurkumin, hiperglisemi ve hiperlipidemiye azaltarak etkili olurken, anti-inflamatuar ve antioksidan özellikleriyle diyabet komplikasyonları oluşumunu önleyici etkisi vardır (277, 278). Birçok çalışmada, kurkuminin hücre içi yolları, enzimleri ve elementleri düzenleyen farklı hedeflerinin olduğu tespit edilmiştir (279, 280). Zerdeçalın, antiinflamatuar, antimikrobiyal, kardioprotektif, anti-neoplastik, nefroprotektif, hepatoprotektif, immünmodülatör, antioksidan, antiromatizmal ve hipoglisemik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (281-284).

Kurkumin, farmakolojik özellikleri açısından güvenilir olduğu savunulmaktadır (24). Kurkuminin, anti-bakteriyel, anti-diyabetik, antiviral ve anti-kanser etkilerinin olduğu gösterilmiştir (285, 286). Birçok etki mekanizmasına sahip olan kurkuminin etkilerinden biri de reaktif oksijen türlerini inhibe ederek enflamatuar hastalıkların tedavisinde etkili olabilmesidir (275).

Wang ve ark. (287) çalışmalarında, diyabetli deneklerin beyin dokusunda, TNF-a, siklooksijenaz-2 (Cox-2), NF-KB ve IL-6 gibi inflammatuar protein düzeylerinde önemli oranda artış olduğunu tespit etmişlerdir (287). NF-KB'nin, diyabet ve diyabetik ensefalopati gelişiminde rol oynadığı belirlenmiştir (287, 288). Apoptoz, inflamasyon, oksidatif stresle ilişkili genlerin transkripsiyonu NF-KB p65

yolu ile değişmektedir (289). NF-KB p65, merkezi sinir sisteminde TNF-a ve Cox-2 gibi inflamasyon mediatörlerinin yapımını arttırmaktadır (290). Aynı zamanda hiperglisemik ortamın, beyinde NF-KB p65 yolunu aktive edebileceği belirlenmiştir (291). Diyabetik deneklerle yapılan başka çalışmalarda, TNF-a (292), Cox-2 (293) ve NF-KB p65'in (294) serebral kortekste belirgin ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Buna karşın diyabetli hayvanlarda kurkuminin TNF-a seviyelerini azaltabileceği gösterilmiştir (295). Hiperglisemi, inflamasyonu aktive etmesinin yanında, oksidatif stresin şiddetlenmesine neden olmasıyla beyin dokusunda hasar oluşturabilmektedir (294). Sonuç olarak ROS, NF-KB p65 yolunu aktive edip, inflamasyonu arttırmaktadır (296).

Tip 2 DM'nin ve komplikasyonlarının oluşumunda etkili olan mekanizmalardan inflamasyona, kurkumin etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, IL-6, TNF, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1 gibi serum inflamatuvar faktörlerinin sayısını azalttığı, NF-KB sinyal yolunu baskıladığı şeklinde etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (297, 298). Kurkuminin MCP-1, IL-1, TNF, IL-6, COX2 gibi proinflamatuvar mediatörlerin inhibisyonu ile adipoz dokuda da yararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (299).

Başka bir çalışmada, kurkuminin, oksijen radikallerini azaltıcı özellikte antioksidanlara sahip olduğu gösterilmiştir (300). Kurkuminin diyabetik hayvanların beyin dokusunda, oksidatif stresi azaltarak nöron koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (301). Farklı çalışmalarla, oksidatif stresin ve NF-KB inflamatuvar sinyal yolunun demiyelinizasyona yol açtığı tespit edilmiştir (302, 303). Diyabetik hayvanlarda, canlı nöroglial hücrelerin ve Schwann hücrelerinin aktivasyonu ile remiyelinizasyonun gerçekleştiği belirlenmiştir (304). Diyabetin direkt etkisi, demiyelinizasyon oluşumu ve remiyelinizasyon sürecinde görülen nöroglial hücrelerin aktivasyonunu inhibe etmesidir (305). Diyabetik hayvanların beyin dokusunda gerçekleşen inflamasyon, oksidatif stres ve miyelin hasarlarına kurkumin etkisi araştırılmıştır. Kurkuminin diyabetik ensefalopatiji iyileştirmede etkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (295, 306).

Kurkuminin kan glikozu seviyeleri üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmada, Alloksan ve STZ ile indüklenen sıçanlarda kurkuminin oral yoldan verilmesi ile (307, 308), kilo kaybı görülürken; glikoz ve HbA1c seviyelerini düşürdüğü, insülin

duyarlılığını arttırdığı ve hipoinsülinemiye durdurduğu belirlenmiştir (309). Yüksek yağlı diyetle beslenerek tip 2 DM ve insülin direnci oluşturulan sıçanlarda kurkuminin oral yolla verilmesi ile glikoz dengesinin sağlandığı görülmüştür (310).

Kurkumin, insülin direnci oluşumunun önemli nedenlerden biri olan serbest yağ asitleri ile oluşan lipotoksisiteyi azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca NF- κ B inhibisyonu ile IL-6, TNF- α ve iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) gibi inflamatuvar mediatörleri baskılayıp, nöroinflamasyonu azaltmıştır (311). Tip 2 DM tedavisinde, glisemi ve lipideminin düzenlenmesinde kurkumin etkili olabileceği düşünülmektedir (312).

Kurkumin (60 mg/kg; per oral) takviyesinin, diyabet hastalarında kognitif bozukluğu, kolinerjik aktivitenin bozulduğu diyabetik ensefalopatide, nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonu önemli oranda iyileştirdiği belirlenmiştir (295). Kurkumin takviyesi ile diyabet hastalarında görülen sinirsel iletimde yavaşlama ve santral sinir sistemi disfonksiyonunun iyileştiği gösterilmiştir (311, 313, 314).

Hayvan (315) ve insan deneylerinde (316-318), kurkuminin, yüksek dozlarda verilmesinde bile (12 g/gün oral) güvenli şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir. Ancak bazı durumlarda hamile ve emziren kadınlar, çocuklar, anemi veya karaciğer hastalığı olan hastalara kurkumin tedavisi verilmesi önerilmemektedir (275). Bununla birlikte kurkuminin oral verilmesinin mutajenik ve genotoksik olmadığı bildirilmiştir (319, 320). Kurkuminin, sitokrom P450 inhibitörü (321) gibi etki göstererek, antikoagülanlar, antibiyotikler, antidepresanlar, antikanser ilaçlar (322, 323) ile etkileşiminin olduğu bildirilmiştir. Kurkuminin hipoglisemik etkili olduğu tespit edilmiştir (324). Kurkuminin, tip 2 DM hastalarında glisemik, inflamatuvar, hepatik belirteçler üzerinde olumlu etkisinin olduğu gözlenmiştir (275).

Kurkuminin birçok faydalı etkisi yanında, toksik yan etkilerinin düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir (325). Kurkuminin, zayıf emilim, düşük biyoyararlanım, hızlı metabolize olup, vücuttan hızlıca atılması gibi bazı farmakokinetik dezavantajları da bulunmaktadır (326).

Kurkuminin diyabet ve komplikasyonlarını önlemede terapötik potansiyeli olduğu bildirilmiştir (275). İnsülin direnci, pankreas beta hücrelerinde apoptoz ve nekroz, hiperglisemi ve hiperlipidemi gibi diyabet patogeneğinde yer alan mekanizmaların kurkuminle düzeltilebileceği tespit edilmiştir (326). Diyabete bağlı

gelişen komplikasyonların önlenmesinde kurkuminin etkili olabileceği düşünülmektedir. Diyabetik mikroangiopati, nefropati, retinopatinin tedavisinde kurkumin kullanılması ile olumlu sonuçlar alındığı bilinmektedir. Ancak diyabet tedavisi ve diyabet komplikasyonlarının önlenmesinde kurkuminin etkinliğinin insan çalışmalarıyla doğrulanması gerekir (326). Kurkumin birçok sinyal molekülünü fonksiyonel olarak düzenleyerek etki oluşturur. Bu mekanizma karmaşık olduğu için tam olarak açıklanamamıştır (275).

Kurkuminin tedavi edici etkinliğinin yüksek, yan etkilerinin sınırlı olması ve güvenlik aralığının geniş olması diyabet tedavisi ve önlenmesinde kullanılabilecek önemli bir ajan olabileceğini göstermektedir (275). Yeni kurkumin formülasyonlarının geliştirilerek diyabet tedavisinde öncelikli sıralarda yer alması beklenmektedir (326).

2.12. Stereoloji

Stereoloji bir yapının, iki boyutlu görüntüleri kullanarak üç boyutlu özellikleri ile ilgili verilerin elde edilmesini sağlayan bilimsel yöntem sersini ifade etmektedir (327). İncelenen yapının iki boyutlu görüntülerinden; hacim, yüzey alanı, sayı, uzunluk gibi nicel veriler elde edilebilir (328). Stereolojik araştırmalarda incelenecek yapının şekli önemli değildir. Yapıların tıbbi aletlerle görüntülenmesi ya da histolojik yöntemlerle kesitlerinin alınması ile stereolojik incelemeler yapılabilir (327). Yapının içinden geçen her bir kesit, içeriğindeki bileşenlerin boyutu, şekli, hacmi, yönüne bağlı olarak farklı görünümde ve özellikte alanlar oluşturur (329, 330). Yapının içinde yer alan bileşenlerin özellikleri ve nicel veriler, ancak yapının düzlemsel kesitlerle incelenmesiyle elde edilebilir (331). Kesitler, yapının içinden geçerken yapıya ait bileşenler ile kesişmekte ve bileşenler de sayıları, büyüklükleri, alan ve hacimleriyle orantılı olarak kesitler üzerinde izdüşümler oluşturmaktadır (332). Yalnızca bu izdüşümlerden (2 boyutlu) yola çıkarak üç boyutlu yapılar hakkında yorum yapmak her zaman doğru sonuç vermeyebilir ve yanıltıcı olabilir (332). Yanlış sonuçlar alınmasına yol açacak nedenlerden biri, boyut azalması ilkesidir. Örneğin, üç boyutlu bir yapı iki boyutlu kesit düzlemleri ile örneklendiğinde iki boyutlu bir yüzey, iki boyutlu olan bir yüzey gene aynı kesit düzlemleri ile tek boyutlu bir çizgi veya eğri ya da tek boyutlu çizgi veya eğri sıfır boyutlu bir nokta olarak kesit alanında görülür. Bu yüzden kesitlerle yapılan morfometrik çalışmalar, uygun metodlar kullanılmadığında yanlış sonuçlar alınmasına yol açabilir (332).

Kesitler, kalınlığı olmayan ve katı yapı içinden geçen düzlemlerdir. Ancak biyolojik örneklerden kesit alındığında, kesit kalınlığı ne kadar küçük olsa da belli bir kalınlığa sahip olduklarından bu kesitler iki boyutlu olarak düşünülemezler. Bu yüzden biyolojik yapılardan alınan ışık ve elektron mikroskobik örneklerin kalınlıklarının dikkate alınarak hesaplama ve değerlendirmelerin yapılması gerekir (333). Mikroskobik incelemelerde birçok hata kaynağı bulunmaktadır. Gerekli düzeltmeler yapılmadığı takdirde hata kaynakları sonuçları etkileyerek yanlış sonuçların elde edilmesine neden olabilir (332). Yapılan kesitsel çalışmalarda, çeşitli ön kabuller yapılırken, elde edilen verilerin üç boyutlu yapı ile olan ilgisi tam ve doğru bir şekilde saptanamamaktadır. Hata kaynakları dikkate alınmadığı veya gözden kaçırıldığında, sonuçlarda da sistematik bir sapma görülecektir (332). Hata kaynakları dikkate alınmadığında bazen tesadüfi olarak doğru sonuçlar elde edilebilir. Ancak hata kaynaklarının etkisi gizli kalacağı ve sonuçların gerçeği ne derece yansıttığı kesin olarak bilinemeyeceğinden, çalışmanın güvenilir olduğu söylenemez (332).

Hata kaynaklarından etkilenmesi beklenen başka bir deyişle bu hataların dikkate alınmadığı çalışma yöntemlerine, stereoloji biliminde gerçek değerden sistematik şekilde sapan anlamında “tarafli” (biased) metodlar denir. Stereolojik yöntemler ise sistematik hata kaynaklarının etkisini ortadan kaldırıp, örneklem sayısı arttırıldıkça gerçek değere daha yüksek oranda yaklaşılmamasını sağlayan “tarafsız” (unbiased) metotlardır. Tarafsızlık, ön yargıda bulunulmadan, çalışmayı yürüten kişi değişse de sonuçların istatistiksel olarak değişmediği ve yöntem tekrarlandığında gerçek değere daha çok yaklaşıldığını ifade eder (327).

Stereolojik yöntemler yapının her noktasından eşit ihtimalle örnek alınmasını sağlayan “Sistematik Rastgele Örneklem” (SRÖ) ilkesine dayanır. Biyolojik örneklerde incelenen bileşene göre yapının tamamı çok büyük olduğundan alınan kesitlerin tamamının değerlendirilmesi mümkün olmamaktadır. Bu yüzden elde edilen kesitlerin arasından seçim yapılması ve bir kısmının değerlendirilmeye alınması gerekir. Seçim yapılırken yapının tamamının doğru şekilde değerlendirilmesi için yapının her noktası eşit ihtimalle örneklenmiş olması gerekir (332). Bu koşulun sağlanması için sadece kesitlerin rastgele olarak seçilmiş olması yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, SRÖ ile, ilk örneklem aralığından seçilen rastgele bir kesitten başlayarak sistematik şekilde sabit aralıklarla yapının tamamının örneklenmesi gerekir (332).

Örneklem yapılırken, “sistematik” ifadesi önceden belirlenen örneklem aralığını, “rastgele” özelliği ise ilk aralıkta randomize şekilde seçilen bir kesitten başlanarak örneklem alınmasını ifade eder (332). Bu yöntem istatistiksel açıdan bakıldığında, yapının her bölümüne eşit örneklem şansı vermektedir. Böylece yapının homojen olarak değerlendirilmesi sağlanırken, gerçek değerlere yaklaşma ihtimali de o oranda artar (334). Çalışmanın her safhasında, sistematik rastgele örnekleme kurallarına uyulması çalışmanın doğruluğu ve tarafsızlığı açısından önemlidir (327). Belirli kurallar çerçevesinde uygulanan sistematik rastgele örnekleme yönteminin güvenilirliği yüksektir (327).

Sistematik rastgele örnekleme metoduyla, yalnızca örneklem üzerinde sayım yapılırken (335), tüm yapının değerlendirilmesinde örneklemle eşit seçilme hakkı verildiğinden tarafsız bir çalışma yapılmış olunacaktır. Ayrıca zaman ve iş gücünden kayıp azaltılırken, ekonomik anlamda kazanç sağlanmış olunacaktır (336-338). Çalışmanın etkin olduğu, az sayıda çalışan ve örnek sayısı ile doğru sonuçların elde edilmesi ile ifade edilir (327).

Stereolojik yöntemlerde, tanecik sayımı, alan hesaplamaları, hacim oranları gibi hesaplamalarda temel prensibin sistematik rastgele örnekleme uygulamasının olduğu ifade edilebilir (332). Stereolojik yöntemlerle yapılan çalışmalarda sonuçların gerçek değere en yakın olmasını sağlamak için önemli olan yöntemin kurallarına tam olarak ve çalışmanın her aşamasında uyulmasıdır (332). Stereoloji yöntem bilimi, tarafsız ve etkin özellikteki metotları ile yanlış sonuçlar alınmasına ve değerlendirmeler yapılmasına yol açan sorunları ortadan kaldıran, sistematik kurallardan oluşan bir yöntem bilim dalıdır (332). Etkinlik ve tarafsızlık özelliklerinden dolayı kullanıldığı çalışmaların güvenilirliğini arttıran ve bilimsel metotlara uygun olmasını sağlayan stereolojik metotlar birçok çalışmada kullanılmaktadır (332). Stereolojik teknikler sayısal sonuçlar elde edilmesini sağladığından, biyoloji, tıp, ekoloji, veterinerlik, matematik, mühendislik gibi alanlarda tarafsız ve etkin bir bilimsel yöntem olarak tercih edilmektedir (327).

2.12.1. Stereolojik hacim hesabı

Morfometrik çalışmalarda, organın veya organ bileşenlerinin hacimlerinin ve bunların birbirlerine oranlarının hesaplanması için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (339). Çoğunlukla ilgilenilen organlar çevrelerindeki yapılardan izole

edilemediğinden, yapıların hacimlerinin hesaplanabilmesi için Cavalieri prensibi olarak bilinen, ilk kez İtalyan matematikçi Bonaventura Cavalieri tarafından 17. yüzyılda keşfedilen hacim hesaplama metodu kullanılmaktadır (333, 334). Bu metoda göre incelenecek yapı, belirli sayıda dilime ayrılıp, her bir dilimin hacmi ayrı ayrı hesaplandıktan sonra toplamalarının alınması yapının toplam hacmini vermektedir (339). Aslında ilk olarak ünlü astronom Johannes Kepler tarafından ortaya atılan bu fikir daha sonraki dönemlerde Cavalieri tarafından geliştirilmiş ve Cavalieri prensibi ortaya konulmuştur (333, 334, 340). Bu prensibe göre öncelikle çalışılacak yapı, eşit aralıklı ve birbirlerine paralel kesilerle dilimlere ayrılır. Sonrasında her dilimin aynı yöne bakan yüzey alanı uygun yöntemlerle hesaplanır. Tüm dilimlerin toplam yüzey alanı değeri ortalama dilim kalınlığı ile çarpıldığında yapının toplam hacim değeri bulunmuş olunur (339). Yapılan işlemin matematiksel formülü aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$V_{ref} = \sum a_i \cdot \bar{t}$$

Şekil 1. Yapının toplam hacim hesaplaması

Bu formülde, V_{ref} ; referans hacmini, a_i ; i numaralı kesitteki yapı izdüşümünün yüzey alanını, $\bar{t}$ ise ortalama dilim kalınlığını ifade eder (339). Bu formülle mikroskobik veya makroskobik büyüklükteki herhangi bir yapının çevre dokularla ilişkisinden bağımsız olarak hacimleri hesaplanabilmektedir (334, 341).

Cavalieri prensibi ile hacim hesaplaması yapılırken ilk olarak kesit görüntülerinin yüzey alanlarının (a_i) hesaplanması gerekir. Bu amaçla bilgisayar destekli görüntü analiz cihazları ile kesit alanları doğrudan ölçülebilir (339). Bunun dışında alan ölçümleri yapılabilmesi için başka yöntemler de kullanılmaktadır. Benzer doğruluk oranıyla kesit alanlarının hesaplanmasında en sık kullanılan stereolojik yöntem “noktalı alan ölçüm cetveli” dir (339). Noktalı alan ölçüm cetveli, birbirinden eşit uzaklıkta bulunan sistematik noktalar dizgesidir (her bir artı işaretinin kollarının kesişim yeri bir nokta olarak belirtilir) (339). Her bir nokta ise dört nokta arasında kalan bir birim cetvel alanını temsil etmektedir. Bir birim cetvel alanı “P(a)” ile ifade edilir (339).

Noktalar arası mesafesi bilinen bir noktalı alan ölçüm cetveli, herhangi bir yapının kesit görüntüsü üzerine rastgele bir şekilde bırakıldığında, kesit alanı üzerinde yer alan nokta sayısı kesit alanı ile doğru orantılıdır. Diğer bir ifade ile sayılan nokta sayısı (P_i) ne kadar fazla ise, kesit alanı o kadar büyük olacaktır (339). Noktaların her biri, bir birim alanı ($P(a)$) temsil ettiğinden, nokta sayısı ile birim alanın çarpımı, incelenen kesitin toplam yüzey alan ölçüsünü verir (334, 342).

$$a_i = P_i \cdot P_{(a)}$$

Şekil 2. Kesitin toplam yüzey alanının hesaplanması

Bu hesaplama yöntemi basit bir şekilde uygulanabilmesi ile birlikte istatistiksel açıdan güvenilir sonuçlar vermektedir (339). Noktalı alan ölçüm cetvelleri ile yapılan ölçümler, görüntü analiz sistemleri ile yapılan ölçümler ile karşılaştırıldığında aynı derecede güvenilir ve doğru sonuçlar verdiği görülmüştür (334, 343). Bu yöntemde öncelikle büyütme derecesi belirlenmesi gerekir (339). Sonrasında mikroskop görüntüsü, monitör görüntüsü veya herhangi görüntü üzerine uygulanan noktalı alan ölçüm cetveli ile yüzey alanı hesaplaması yapılabilir (339). Burada sadece noktalar arası uzaklığın büyütme derecesine göre doku düzeyinde gerçek uzunluğunun bilinmesi gerekir (339).

Noktalı alan ölçüm cetveli ile yapılacak işlemler için noktaların sıklığının belirlenmesi ölçümün doğruluğu açısından önemlidir. Noktaların sıklığının artırılması ölçümün doğruluğunu artırmakla birlikte, yapılacak işin etkinliği açısından kabul edilebilir bir hata payı içerisinde en seyrek nokta dizgesinden oluşan cetvelin kullanımı uygun olacaktır (339).

Toplam hacmin hesaplanmasında, kesitlerde ölçümü yapılacak olan bölgelerin izdüşümlerinin toplam alanı hesaplanarak, kesitlerin ortalama kalınlık değerleriyle çarpılması gerekir. Böylece yapının toplam hacmi tarafsız şekilde hesaplanmış olunacaktır (339). Özellikle mikroskobik çalışmalar yapılırken belirlenen SRÖ kuralı uyarınca alınan kesitlerin kalınlığı yerine, her bir aralıkta yer alan tüm kesitlerin kalınlığı hesaplanmalıdır. Yani burada sadece örnekleme alınan kesit kalınlığı değil, her bir örneklem aralığında yer alan toplam kesitlerin yani örneklem dışında bulunan kesitlerin kalınlığı da dikkate alınarak toplam hacim hesaplaması yapılması gerekir (339).

2.12.2. Bileşen hacmi ve hacim oranlarının hesaplanması

Yapının bir bileşeninin, yapının tamamına oranını belirlemek için noktalı alan ölçüm cetveli ile yapılacak sayımla bileşen ve toplam hacimdeki noktaların hesaplanması gerekir. Yani bileşen kesit alanları ($P(\text{ref})$) ve tüm yapının kesit alanlarına ($P(y)$) düşen noktaların sayımı yapılarak birbirlerine oranı hesaplanır (339). Bu değerlerin birbirine oranı ($P(y)/P(\text{ref})$), bize bileşenin hacminin tüm yapı hacmine oranını da ($V(y)/V(\text{ref})$) verecektir. Bileşenin, tüm yapı içinde kapladığı hacim orantısal olarak hesaplanmış olur. Benzer şekilde bileşenlerin birbirlerine göre hacim oranları da hesaplanabilir (333, 344, 345).

2.12.3. Nokta sayım yöntemi ile alan hesaplamasının hata katsayısının hesaplanması

Nokta sayım yöntemi ile hacim ve hacim oranı hesaplamalarında, örneklemin toplam değişkenlik miktarı (hata katsayısı, HK) hesaplanmalıdır. Hata katsayısı burada çalışmada kullanılan sistematik rastgele örneklemin ne kadarlık bir değişkenlik gösterdiğini ifade eder (339). İdeal olan hata katsayı değerinin %5 ve altında olmasıdır. Bu değer %5 ve altında olması değişkenliğin az ve örneklem stratejisinin uygun olduğu anlamına gelir (334, 343, 346).

Hata katsayısı veya bir başka ifade ile sistematik rastgele örnekleminin değişkenlik miktarı %5 üzerinde ise, % NOISE değerine bakılır. Bu değer noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığının uygun olup olmadığı hakkında bilgi verir (339). Eğer bu değer %25 ve altında ise noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığı incelenecek yapı için uygundur. Ancak, her denek için kullanılan kesit sayısının yetersiz olduğu anlamına gelir (339). Böyle bir durumda kesit sayısı artırılarak hata kat sayısı azaltılabilir. % NOISE değeri %25 üzerinde olduğunda noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığının incelenecek yapı için yetersiz olduğu anlamına gelir. Bu durumda noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığının artırılması ile hata katsayısı azaltılır ve istenen seviyeye getirilir (343, 347).

2.13. İmmünohistokimyasal Belirteçler

2.13.1. S100 proteini

S100 proteinleri küçük moleküler ağırlığı olan, asidik yapıda, kalsiyum bağlayıcı sitozolik proteinlerdir (348). S100 proteinleri, hücre çoğalması, protein fosforilasyonu, Ca homeostazı, iltihaplanma, enerji metabolizması, hücre farklılaşması

ve hücre ölümü gibi hücre içi ve hücre dışı çeşitli görevlerde rol alırlar (36). S100 proteinleri, serum, idrar, balgam, serebrospinal sıvı ve sinoviyal sıvıda bulunmakta (349) ve bazı hastalıkların seyrinin takip edilmesinde S100 proteinleri bir belirteç olarak kullanılmaktadır (350). S100 Proteinleri “Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP)” molekülleri olarak fonksiyon görürler (351). DAMP molekülleri, hızlı inflamatuvar yanıt, hücre ölümü ve doku hasarı gibi süreçlerle ilişkilidir (352). DAMP molekülleri bir strese maruz kalan veya hasarlanan hücrelerden sinyal molekülü olarak salgılanmakta ve inflamatuvar cevabın oluşmasını sağlamaktadır (36).

S100 proteinleri, doku onarımı veya kontrolsüz iltihaplanma gibi farklı olaylarda rol alabilirler. Bunun yanı sıra, merkezi sinir sistemi hastalıkları, inflamatuvar bozukluklar, kardiyomiyopati, kanser gibi çeşitli hastalıklarda S100 protein sentezinin değiştiği görülmüştür (36). Çeşitli S100 proteini alt tiplerinin farklı hastalıklarda arttığı tespit edilmiştir. Örneğin; S100 A8/9 alt tip proteinlerinin obezite, gut, diyabet gibi inflamatuvar hastalıklarda inflamasyon olan bölgelerde yükselmiş olduğu görülür. Ayrıca AH’nın, hücre dışı S100B seviyesi ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (36). S100 proteinleri hücre tipi ve hücre siklusuna göre farklı yapı gösteren, hücre içi ve hücre dışı fonksiyonları olan proteinlerdir (37). S100 proteinleri, RAGE veya TLR 4 (Toll benzeri reseptör 4) gibi reseptörlere bağlanarak inflamatuvar olayları başlatır (353). Bunun yanı sıra transkripsiyon regülasyonu ve DNA onarımı gibi çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev alırlar (354).

S100 protein ailesi üyesi olan S100B, homodimer yapıda bir protein olup; astrositler, bazı nöronlar, Schwann hücreleri, dentritik hücreler, lenfositler, adipositler, kondrositler ve melanositlerde bulunur (355). Dolayısıyla tahmin ettiğimiz üzere, sinir sisteminde yaygın bulunması nedeniyle, literatürde beyin dokusunda S100 proteinleri ile yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda genellikle S100B protein alt grubu kullanılmıştır. S100B proteini, hücre içinde başka proteinlerle etkileşerek, hücre iskeleti düzenlenmesi, enzim aktivasyonları, protein degradasyonu, kalsiyum homeostazı, inflamatuvar yanıt, hücre farklılaşması ve proliferasyonunda rol alır (37). S100B, Ca reseptör proteini gibi davranarak, hücre içi Ca seviyelerini değiştiren faktörler ve hücresel yanıt oluşturan proteinler arasında bağlantı sağlar (66).

Nöronlar ve glial hücreleri arasındaki etkileşimin, nöron canlılığının devamı açısından önemli olduğu bilinmektedir. Bir başka deyişle astrositlerin beyin

dokusunda homeostazın sürdürülmesinde çok önemli bir rolü vardır (356). Beyin dokusunda kimyasal veya mekanik bir sebeple kalıcı hasar olduğu zaman astrositler bu duruma çeşitli reaksiyonlarla yanıt verir (357). Astrositik hücrelerin belirteci olarak hücre içi bir glikoprotein olan S100B kullanılmaktadır (358).

Büyük oranda astrositik hücrelerde bulunan S100B'nin nöronlar üzerinde parakrin trofik etkiler oluşturan, Ca bağlayıcı bir protein olduğu düşünülmektedir (359, 360). S100B proteininin nöron sitoplazmalarındaki serbest Ca seviyesini yükseltmek, nörit gelişimini indüklemek yanında nöronların canlılığının devamını desteklemek gibi görevleri de bulunmaktadır (361, 362).

Beyin hasarının meydana geldiği çeşitli durumlarda, serumda S100B seviyesinin arttığı görülmüştür. S100B seviyesindeki bu artışın nedeninin hasarlı hücrelerden salınımından mı yoksa S100B'nin patolojik koşullarda sentezinin artışıyla mı ilişkili olduğu bilinmemektedir (363). S100B'nin serum seviyelerinin klinikte kullanılabileceği ileri sürülmüştür (364).

STZ ile indüklenen diyabetik hayvanlarla yapılan çalışmada, beyin dokusunda hipokampus, korteks ve serebellum bölgelerinde S100B seviyesinin önemli oranda arttığı tespit edilmiştir (356).

STZ kaynaklı diyabet modeli oluşturulan farklı bir çalışmada, beyinde birçok bölgede glial reaktivasyon gerçekleştiği görülmüştür (356). STZ kaynaklı diyabete bağlı glial hücrelerin aktivasyonu poliol yolu aktivasyonu, protein glikasyonu, kalsiyum metabolizmasındaki bozulmalar ve oksidatif stres gibi mekanizmalarla gerçekleşebilir (58). Astrositler oksidatif strese karşı S100B protein seviyelerini yükselterek karşılık vermektedirler. Ayrıca, bu veriler lipid peroksidasyon seviyesi ile glial hücre belirteçlerinin birbiri ile korele olduğu hipotezini desteklemektedir (356). Reaktif oksijen türleri birikimi, astrosit aktivitesini artırarak trofik faktör sentezini uyarmakta böylece nöronların zararlı etkilere korunması desteklenmektedir (356).

Beyin dokusunda S100B değerlerinin ölçüldüğü başka bir çalışmada, STZ diyabetik sıçanlarda bilişsel işlevlerin nasıl etkilendiğini tespit etmek için iki hafta boyunca sıçanların hipokampus dokusunda görülen değişiklikler incelenmiştir (66). STZ enjeksiyonundan üç gün sonra hipokampus bölgesinde astrositik hücrelerde S100B seviyesinin arttığı görüldü. Ayrıca S100B pozitif hücrelerin sayısında iki kat artış gözlenmiştir (66). STZ enjeksiyonundan dört hafta sonra yapılan incelemede ise

S100B sentezleyen hücre sayısında anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır (365). 4-6 haftalık sürede STZ diyabetli hayvanda, hipokampus dahil (356, 366) beyin dokusunda S100B seviyesinde ciddi oranda artış görülürken, S100B mRNA seviyeleri azalmıştır (366). Bahsedilen bu örnek çalışma, beyin dokusunda oluşan hasara bağlı olarak, astrosit hücrelerinde S100B salınımının arttığı hipotezini destekler niteliktedir.

S100B proteini travmatik beyin hasarının iyi bir belirteci olduğu tespit edilmişse de (363, 367, 368) diğer beyin hasarı durumlarında hassas bir belirteç olup olmadığı henüz kesinlik kazanmamıştır (364). Buradan yola çıkarak, diyabet ve DKA (diyabetik ketoasidoz) ile bağlantılı olarak gelişen beyin hasarlarında serum S100B seviyesinin biyolojik bir belirteç olarak kullanılması ile ilgili çalışmalarda, tedavi edilmemiş DKA sırasında S100B değerinin hem sağlıklı kontrol fareleri hem de hiperglisemik farelere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir (364). NF tedavisinden 24 saat ve 72 saat sonra yapılan ölçümlerde S100B değerlerinin düşük seviyede devam ettiği görülmüştür (364). S100B'nin ana kaynağının beyindeki astrosit hücreleri olması nedeniyle serum S100B seviyesinin ölçümünün beyin hasarının önemli bir göstergesi olabileceği ileri sürülmektedir (363, 367, 368). Ancak yapılan bu çalışma verileri değerlendirildiğinde diyabetik beyin hasarında serum S100B seviyesinin güvenilir bir belirteç olmadığı yönünde görüş bildirilmiştir. Benzer iki farklı çalışmada, tip 2 diyabetli erişkinler ve kontrol grubu karşılaştırıldığında S100B seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (369, 370).

S100B'nin, beyin dokusunda hem hücre içi, hem de hücre dışı ortamı regüle edici rolü vardır (355). S100B'nin ana ligandı-bağlanma noktası, RAGE'dir (371-373). S100B düşük konsantrasyonlarda RAGE'ye bağlandığı zaman nöroproteksiyon yönünde etki gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda bu reseptöre bağlanmasının inflamasyon gibi zararlı etkilerinin olduğu gözlenmiştir (355).

STZ'nin intraserebroventriküler (ICV) uygulanması astrosit hücre reaksiyonunun oluşmasına yol açar. S100B, akut ve kronik dönemde beyin hasarının astrositik bir göstergesi olarak tanımlanmıştır (367). STZ *in vivo* toksisitesinin değerlendirildiği çalışmada, STZ (3 mg/kg) ICV ortama bilateral olarak infüze edilmiş ve 48 saat sonra hipokampus bölgesinde S100B seviyeleri ölçülmüştür (152). Hipokampus bölgesinde S100B seviyesi ELISA ve Western yöntemiyle

değerlendirildiğinde değişim olmadığı görülmüştür (152). S100B proteinin etki mekanizması hala tam olarak açıklanamamıştır (374).

Görüldüğü üzere literatürde, STZ diyabetik hayvanlarla yapılan çalışmalarda beyin dokusu ve hipokampus hasarında S100 ekspresyonu, salgılanması ve seviyesi ile ilgili farklı görüşler bulunmaktadır. Sunduğumuz tez çalışmasında, bu konuya açıklık getirmeye çalıştık. Bunun yanı sıra, S100 proteinin, nöronlar üzerinde ve astrositlerdeki birçok görevi nedeniyle, çalışmamızda, siyatik sinir transeksiyonu sonrası diyabetli sıçanların hipokampusunda meydana gelen patolojik değişiklikler ile, kurkumin ve *Garcinia kola*'nın nöroprotektif etkinliğinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılabilmesi amacıyla IHC araştırmalarımızda anti-S100 antikorunu kullandık.

2.13.2. Kaspaz 3 Enzimi

İnflamatuvar bir yanıt oluşturmada, hücrelerin parçalanması yoluyla ve programlı şekilde gerçekleşen hücre ölümüne apoptoz denilmektedir (40). Apoptoz sürecini düzenleyen sistein proteaz enzimlerine kaspaz enzim ailesi denir (39). Kaspazlar, apoptoz sürecinde endonükleazları aktive ederler. DNA parçalanmasına yol açarak asıl apoptoz aktivasyonunu gerçekleştiren enzim kaspaz 3'tür (375). Kaspaz 3 aktivasyonu, hücre ölümünün işareti olduğu kabul edilmektedir (38, 376-378). Çalışmalarda, *in vivo* ortamda kaspaz 3 içermeyen B lenfositlerde, proliferasyonun arttığı, hücrelerin *in vitro* ortamda mitojenik madde ile uyarılmaları sonucunda hiperprolifere oldukları gösterilmiştir. Bu durum kaspaz 3'ün apoptotik süreçlerde görev aldığı görüşünü destekler niteliktedir (379).

Dokuların gelişim süreçlerinin normal ilerleyebilmesi ve işlevlerini yerine getirebilmesi için kaspaz aracılı apoptoz kaskadının doğru şekilde işleminin önemi büyüktür (380). Apoptoz mekanizması ve dolayısıyla kaspazlar hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengeyi sağlayarak, hücre sayılarının aşırı artışını engelleyerek, dokuların normal şekilde gelişmesi ve işlevlerini yerine getirmesine katkıda bulunmaktadır (381). Homozigot kaspaz 3 gen eksikliği olan farelerin gelişim süreci incelendiğinde, nöronal hasarların olduğu, boy kısalığı görüldüğü, hayatta kalma sürelerinin ise 3- 5 hafta kadar olduğu görülmüştür. Bu deney kaspaz 3'ün; normal gelişim, dokuların normal fonksiyonu ve yaşamın devamı için ne kadar önemli bir rol oynadığını kanıtlamaktadır (382, 383).

Çalışmalarda, kaspaz 3 enziminin apoptoz süreçlerinde rol alarak doku homeostazı sağlanması yanında, spesifik olarak hücre farklılaşması ve nöral gelişim süreçlerinde de etkili olduğu görülmüştür (380). Son çalışmalarla, kaspaz 3 aktivasyonu gösteren bazı hücrelerde canlılığın devam ettiği gösterilmiştir (384). Bu durum kaspaz 3'ün apoptotik süreçler dışında başka görevleri olabileceğini düşündürmektedir (39). Kanseri hücreleri ve farklılaşmamış dokulara ait hücrelerle yapılan çalışmalarda, hücre proliferasyonu, doku rejenerasyonu, hücre migrasyon ve invazyonu gibi süreçlerde kaspaz 3'ün aktif rol aldığı gösterilmiştir (385-388). Nöronal dokuda ise gelişim ve farklılaşma gibi süreçlerin dışında olgun nöronlarda gerçekleşen nöronal plastisite sürecinde kaspaz 3 aktivasyonu görülmüştür (389). Ayrıca farklı çalışmalarda; eritrositler, T lenfositler ve iskelet kası gibi hücrelerin farklılaşmasında kaspaz 3 aktivitesinin rol oynadığı belirlenmiştir (390-392).

Kaspaz enzimlerinin aktivasyonu veya yeterli çalışmamasının birçok hastalığı yol açtığı düşünülmektedir. Örneğin kaspazların fazla aktive olması nörodejeneratif hastalıklara, yeterince çalışmaması ise kanser gelişimine zemin hazırlayabilir (41).

Bir başka durum, bağışıklık hücrelerinde kaspazların aşırı aktivasyonu immün yanıtın yetersiz oluşmasına ve enfeksiyonlara yatkınlığa neden olurken, kaspazların hiperaktivasyonu ile mevcut enfeksiyon kliniği daha da kötüleşebilmektedir (41).

Kaspaz 3'ün hem homeostaz, hem de apoptoz sürecindeki rolünü göz önünde bulundurarak diyabet sonrası ve *Garcinia kola*, kurkumin ile tedavi sonrası dokuda meydana gelen morfolojik değişiklikleri, hücresel düzeyde immünohistokimyasal olarak, anti-kaspaz 3 antikoru ile değerlendirmeyi amaçladık.

2.13.3. SOX2 Geni

Embriyonik kök hücre bakımı, nöral projenitör hücrelerin farklılaşması, bağırsak endodermi gelişimi gibi farklı gelişim ve hücre süreçlerinde SOX2'nin görev aldığı tespit edilmiştir (393). SOX2, SRY ilişkili transkripsiyon faktörlerinin üyesi ve gelişim aşamalarında çeşitli hücre tiplerinde hücrenin sonraki dönemde canlılığı ve farklılaşmasını kontrol eden bir gen grubudur (394, 395). İlk gelişim dönemlerinde SOX2, blastokist iç hücre kitlesinde eksprese edilir (396, 397). SOX2, NANOG (398) ve OCT4 (399) ile birlikte çalışarak embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliklerinin devamını sağlar (393). Bunun yanı sıra, SOX2, OCT4, KLF4 ve c-MYC'nin birlikte ifadesi insan tarafından indüklenen pluripotent kök hücre (hiPSC) oluşumuna yol açabilir (400). SOX2 gen kutusu, pluripotent özelliğin düzenlenmesi yanında, sinir sistemi (401), duyu hücreleri ve ön bağırsak endodermi (402), iç kulak ve tat tomurcuğu (403-405) gibi bazı hücre tiplerinin gelişiminde rol oynar (393). Beyin, hipofiz bezi ve trakea dokusunda erişkin dönemde progenitör hücre gelişimi SOX2 aracılığıyla düzenlenir (406). Bu hücre gruplarının dışında, mide, ağız boşluğu, trakea, lens, serviks, anüs, testislerle ilişkili yetişkin epitel dokularında kök hücre gelişimi ve dokuda homeostazisinin SOX2 tarafından düzenlendiği tespit edilmiştir (407).

SOX2, nöral kök hücre belirteci olarak kullanılmaktadır. Bir çalışmada, hSOX2-23 ve NANOG eksprese eden hücrelerin hESC'lere (insan embriyonik kök hücre) ait farklılaşma öncesi özellikler gösterdiği belirlenmiştir (393). Bu çalışmada, GFP (glial fibriler protein) üreten hücrelerin tamamının SOX2 proteini eksprese ettiği hSOX2-23 immünfloresan boyama ile gösterilmiştir. hESC kültürleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, SOX2-GFP işaretleyicisinin, hESC'lerin farklılaşmamış halinin tespiti için kullanılabileceği belirlenmiştir (393).

hPSC (insan pluripotent kök hücrelerde) ana regülatör olan SOX2 gen lokusu aynı zamanda sinir sistemi onarımı için gerekli bir transkripsiyon faktörü olup, multipotent nöral projenitör hücrelerin (NPC) belirteci olarak tanımlanmıştır (401). NPC'de PAX6 ve SOX2 gen ekspresyonlarının en yüksek seviyeye ulaştığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (393). Bu çalışma, SOX2-GFP ifadesinin hESC'lerde nöral farklılaşma takibinde kullanılabileceğini göstermektedir (393).

Nöronal kök hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda, NPC doğru gelişim gösteren kök hücrelerin SOX1, SOX2, PAX6 ve NESTIN gen ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur (393). Literatürde, SOX2-GFP ekspresyonunun, NPC'lerin daha önceki hücre gruplarından ayırımında kullanılabileceği yönünde görüşler bulunmaktadır (393).

Embriyonik kök hücrelerle yapılan farklı bir çalışmada hipergliseminin bu hücreler üzerine etkisi araştırılmıştır. Embriyonik kök hücrelerin uzun süre yüksek miktarda glikoz içeren ortamda kalmasının, hücre içinde oksidatif stresi arttırdığı ve hücre proliferasyonunu engellediği SOX 2 ile yapılan deneyler sonucunda tespit edilmiştir (408). Yine farklı bir çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde, beyinde mikrovasküler yapı etrafında yoğun bulunan hareketsiz kök hücre çeşidi olan perisitlerin ve perisitlerden gelişen yeni kök hücrelerin sayısının azaldığı SOX 2'nin kullanıldığı immünohistokimyasal metodlarla tespit edilmiştir (409).

Literatürde hipokampal nörogenezle ilgili süreçlerin araştırıldığı farklı çalışmalarda nöral kök hücre belirteci olarak SOX2'nin kullanıldığını tespit ettik. Bu konuya ilişkin yapılan bir çalışmada, hipokampal nörogenez ve bilişsel işlevler arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir (410). Aynı çalışmada, hipokampus nörogenezi ve hipokampus ilişkili bilişsel aktivitelerde besin kısıtlaması veya aralıklı orucun etkileri araştırılmıştır. Bunun sonucunda, travmatik beyin hasarı sonrası bir ay süreli aralıklı oruç şeklindeki diyetle, hipokampusun subgranüler bölgesinde nörojenik nişte; daha bazofilik boyanan, mekik şekilli, morfolojik olarak nöral kök hücrelere benzeyen hücrelerin sayısının arttığı görülmüştür (42). Nöral kök hücre olduğu düşünülen bu hücrelerin kimliklerini doğrulamak için nöral kök hücre belirteci SOX2 ile immünfloresan boyama yapılmıştır (42). Tüm hücrelerin hem ki 67 hem de SOX 2 pozitif olması proliferen hücrelerin nöral kök hücre olduğunu göstermiştir. Sonuçta travmatik beyin hasarı sonrasında bir ay boyu uygulanan aralıklı oruç diyetinin, hipokampus nörogenezisini artırarak, bilişsel bozuklukların azaltılmasını sağlayabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir (42).

Çalışmamızda, siyatik sinir transeksiyonu sonrası diyabetli sıçanların hipokampusunda meydana gelen morfolojik değişikliklerin ve buna karşın kurkuminin, *Garcinia kola*'nın olası nöroprotektif etkinliğinin altında yatan

mekanizmaları aydınlatabilmek için IHC araştırmalarımızda nöral kök hücre belirteci olan anti-SOX2 antikorunu kullandık.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Grupların Oluşturulması

Sunulan çalışmamız, PYO.TIP.1904.22.015 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu “1904 Lisansüstü Tezleri Destekleme Programı” kapsamında desteklenmiştir.

Çalışmamızda, deneysel aşamaları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde yürütülen (22.10.2019 tarih ve 2019/49 numaralı Etik Kurul ve Hayvan Bakımı Onayı) çalışmanın kadavra beyin dokuları kullanılmıştır. Tüm deneylerde etik kurul protokollerine uygun hareket edilmiştir. Çalışmada kadavra beyin dokuları kullanılan sıçanlara aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

Sıçanlar çalışma boyunca paslanmaz çelik kafeslerde, 12 saat aydınlık -12 saat karanlık ortam koşulları altında, 22 $\pm$ 2°C sıcaklıkta ve %50-60 nem içeren oda şartlarında tutulmuştur. Hayvanların su ve yeme erişimleri serbest bırakılmıştır.

Bu çalışmada, 12 haftalık 250-300 gram ağırlığında 35 adet Wistar Albino türü erişkin erkek sıçan kullanılmıştır. Çalışmamızda rastgele seçilen sıçanlar, her grupta yedi tane olmak üzere, beş gruba ayrılmıştır:

Grup 1: Kontrol Grubu (Kont) (n = 7):

Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir cerrahi işlem yapılmamış deney sonuna kadar ayrı kafeslerde tutulan sıçanlar 90 gün sonunda sakrifiye edilmiştir.

Grup 2: Transeksiyon Grubu (Sham grubu) (n = 7):

Bu gruptaki sıçanlara, siyatik sinir diseksiyonu uygulanmış, siyatik sinir çentiğinin 2 cm distalinden 10 mm’lik sinir bloğu keskin mikro makasla kesilerek çıkarıldı ve sinir uçlarına ven grefti dikilerek birleştirilmiştir. Her sıçan ayrı kafeslerde tutularak 90 gün sonunda sakrifiye edilmiştir.

Grup 3: Transekte + Diyabetik Grup (DM) (n = 7):

Bu gruptaki sıçanlara 50 mg/kg streptozotosin (STZ) verilerek diyabet modeli oluşturulmuş, daha sonra, sham grubundaki cerrahi prosedür uygulanarak siyatik sinir transeksiyonu ve ven grefti işlemleri yapılmıştır.

Grup 4: Transekte + Diyabetik + *Garcinia Kola* Grubu (DM+GK) (n = 7):

Bu gruptaki sıçanlara 50 mg/kg STZ verilerek diyabet modeli oluşturulduktan sonra grup 2 ve 3'teki cerrahi prosedürler uygulanarak siyatik sinir transeksiyonu ve ven grefti yapılmış, bu gruptaki sıçanlara yedi gün boyunca sabah saat 09.00-10.00 arasında gavajla, 200 mg/kg/gün *Garcinia kola* verilmiştir (411).

Garcinia kola tohum halinde alındığından hayvanlara verilmeden önce kabukları çıkarılmakta, küçük parçalara ayrılmakta ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan tohum parçaları daha sonra toz haline getirilmiş, distile suda çözülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Sıçanlara *Garcinia kola* vermeye başlanmasıyla, kan glikoz değerleri, 15 günde bir olacak şekilde, sakrifiye edilinceye kadar takip edilmiştir.

Grup 5: Transekte + Diyabetik + Kurkumin Grubu (DM+Kur) (n = 7):

Bu gruptaki sıçanlara 50 mg/kg STZ verilerek diyabet modeli oluşturulduktan sonra grup 2 ve 3'teki cerrahi prosedürler uygulanarak siyatik sinir transeksiyonu ve ven grefti işlemleri yapılmıştır. Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca sabah saat 09.00-10.00 arasında gavajla, 300 mg/kg/gün kurkumin (Sigma-Aldrich, ABD) verilmiştir.

Kurkumin, sıçanlara verilmeden önce zeytinyağı içinde çözülmüştür (32). Sıçanlara kurkumin vermeye başlanmasıyla, kan glikoz değerleri, 15 günde bir olacak şekilde, sakrifiye edilinceye kadar takip edilmiştir.

3.2. Diyabetes Mellitus Modeli Oluşturulması

Deney hayvanlarında diyabet modeli oluşturmak için iki temel yöntem vardır. Bunlardan birincisi pankreas dokusunda bulunan Langerhans adacıklarının %90-95'inin cerrahi olarak çıkarılması ile beta hücre sayısının ve insülin salgısının azaltılması yöntemidir. İkinci yöntem, deney hayvanlarına alloxan veya STZ gibi ilaçların enjekte edilmesi ile beta hücre harabiyeti yaratılarak diyabet modeli oluşturulmasıdır. Uygulanması basit, erişimi kolay ve maliyeti düşük olduğu için STZ ile oluşturulan diyabet modeli daha çok tercih edilmektedir (412). Bu yüzden çalışmamızda, DM, DM+GK ve DM+Kur gruplarında STZ ile deneysel diyabet modeli oluşturulmuştur. Deneyden önce sıçanların 250-300 gram ağırlığa ulaşması beklenerek ayrı kafeslerde tutulmuştur. Sıçanlarda diyabet indüksiyonu için taze

hazırlanmış sitrat tamponunda (0,1 M, pH: 4,5) bulunan STZ (Sigma Chemical Company Ltd.) 50 mg/kg dozda, en az 4 saat (öğleden sonra enjekte edildiğinde) veya bir gece aç bırakılmış (sabah enjekte edildiğinde) sıçanlara intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. İntraperitoneal enjeksiyon yapıldığından emin olmak için enjektörde kan, idrar, dışkı bulunmamasına dikkat edilmiştir. Böylece enjektörün periton boşluğu yerine damar, bağırsak veya mesaneye girmedeği anlaşılmıştır (413). Diyabet olduğundan emin olunan hayvanlarda cerrahi işlemler uygulanmıştır.

STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra alınan kuyruk veni kan örneğinden kan glikoz düzeyleri, Accu-check glukometre (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ile ölçülmüştür. Kan alınmadan önce kuyruk kan akışı artırılması için kuyruk tabanı ısıtılarak ardından etanolle dezenfekte edilerek iğne ile delinen kuyruk veninden kan örneği alınmıştır. Açlık kan glikozu 250 mg/dl üzerinde ölçülen sıçanlar diyabetik kabul edilerek çalışmaya dahil edilmiştir. STZ'nin sabit dozda uygulanması sonucunda, sıçanların kan glikoz düzeylerinin farklı derecelerde yükselmesi nedeniyle tedavi süresince sıçanların açlık kan glikoz değerleri ve vücut ağırlıkları takip edilmiştir. Diyabetin devam ettiğinin gösterilebilmesi için, STZ enjeksiyonundan 3 ve 7 gün sonra aynı yöntemle kan glikoz değerleri ölçülmüş, sıçanlar kurban edilene kadar 15 gün arayla kan glikoz değerleri ölçümlerine devam edilmiştir. Sıçanların vücut ağırlıkları ise her hafta ölçülmüş ve diyabet indüksiyonu uygulandıktan sonra bazı sıçanların kilo kaybettiği görülmüştür. Deney süreci sonunda tüm sıçanlar kurban edilmiştir.

3.3. Sitrat Tamponunda STZ' nin Hazırlanması

Diyabet modeli oluşturulurken, sitrat tamponunda hazırlanan STZ çözeltisi, yarı ömrü kısa olduğu için, intraperitoneal enjeksiyon uygulanmadan hemen önce taze sitrat tamponunda çözülerek hazırlanmıştır. Sitrat tamponu (pH: 4,5), 0,1M sitrik asit ve 0,1M sodyum sitratın distile suya eklenmesi ile hazırlanmıştır. Her sıçanın ağırlığına göre ayrı ayrı belirlenen miktarda STZ, soğuk sitrat tamponunda çözülerek karışım hazırlandı. Tüm hayvanlara verilen STZ dozu 50 mg/kg'dır (414, 415).

STZ' nin hazırlanmasında, toz halindeki STZ' nin taze olmasına, saklama koşullarına ve sitrat tamponu içerisinde bekleme süresine dikkat edilmelidir. STZ solüsyonundan oda sıcaklığında nitrik oksit (NO) açığa çıktığı için solüsyon, 0°C'nin

altında bir sıcaklıkta ve fotoliz yoluyla kimyasal yapısının bozulmasını engellemek için karanlık bir ortamda saklanmıştır. Ayrıca, STZ' nin uygulama şekli ve dozu, STZ' nin etkinliği ve oluşturulmak istenen beta hücre harabiyeti etkisinin ortaya çıkması açısından önemlidir.

3.4. Cerrahi İşlemler

Tüm cerrahi değerlendirme ve işlemler, beyin ve sinir cerrahı Doç. Dr. Abdullah Marangoz tarafından, sıçanlar anestezi altında iken gerçekleştirilmiştir. Anestezi indüksiyonunda, 5 mg/kg ketamin (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 2 mg/kg ksilazin (Rompun®, Bayer, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Tüm cerrahi işlemlerde steril cerrahi aletler kullanıldı ve mikrocerrahi işlemler ameliyat mikroskobu altında gerçekleştirilmiştir.

Genel anestezi uygulamasından sonra kesi yapılacak alanlar (boyun ve kasık bölgeleri) elektrikli makasla tıraş edilerek %70 alkol içine konulan %0,5'lik klorheksidin solüsyonu ile temizlenmiştir. Parmak kısırtma yöntemi ile anestezi etkisi değerlendirilmiş ve tüm işlemler süresince sıçanların solunum hızları takip edilmiş ve anestezi etkisinin devamı için gerekli durumlarda ek doz ilaçlar uygulanmıştır.

Anestezi altındaki sıçanların eksternal juguler veninin çıkarılarak siyatik sinir kesisi uygulanan alana anastomoz edilmesi işlemi için, anterior fasiyal ven ve posterior fasiyal ven birleşiminden pektoral kasın delindiği noktaya kadar olan uzunluktaki damar ölçüldü. Boyun medyan hattın kesildiğinde venin, sternomastoid kası ve trapezius kası arasında bulunduğu görülmüştür. Yaklaşık 11,3 mm uzunluk ve 2,1 mm çapındaki ven grefti çıkarılmış ve eksternal juguler venin kesilen uçları sütüre edilerek kanama durdurulmuştur. Çıkarılan ven grefti serum fizyolojik ile yıkanmıştır.

Siyatik sinirin transekte edilmesi işleminde, sol uyluk yan yüzü, kalça ve diz eklemleri arasında çizginin orta kısmından cilt içinden kesi yapılmıştır. Gluteal kaslar geri çekilip, siyatik sinir açığa çıkarıldı ve siyatik sinir çentiğinin 2 cm distalinden 10 mm'lik bir sinir bloğu çıkarılmış ve serum fizyolojik ile yıkanan ven grefti, juguler venin iç çeperinde kapak olma ihtimaline karşın ters çevrilerek (416), transekte sinirin proksimal ve distalindeki 3 mm'lik epinöral kılıfa 10-0 atravmatik sütür naylonu (Ethicon EH 7438G, Ethicon, Norderstedt, Almanya) ile anastomoz edilmiştir. Cerrahi işlemlerinin sonunda kas ve cilt 4-0 dikiş naylonu ile dikilerek kapatılmış ve

enfeksiyonları önlemek için, ameliyatı takiben 3 gün süresince, sıçanlara sırasıyla 4 mg/kg, 2 mg/kg ve 1 mg/kg kas içi antibiyotik (Cefazolin sodyum Eqizolin IM/IV) enjeksiyonu yapılmıştır. Kesi-dikiş yerlerine antibakteriyel sprey (Pederipra, Hipra, Girona, İspanya) doğrudan uygulanmış ve cerrahi operasyonlar bittikten sonra, deney hayvanlarının her biri ayrı kafeslere yerleştirilmiştir.

3.5. Ameliyat Sonrası Değerlendirme

Ameliyattan sonra, operasyon bölgeleri, yara yeri enfeksiyon gelişimi, yara kenarlarının ayrılması, ağrı ve çeşitli rahatsızlık belirtileri, otofaji, fiziksel aktivite, sıçanın parestezi nedeniyle kendini yaralaması gibi komplikasyonların gelişimi açısından günlük olarak takip edilmiştir. Bu komplikasyonların gelişiminin önlenmesinde, cerrah gözetiminde medikal tedaviler uygulanmıştır. Bu komplikasyonların yanı sıra, bazı sıçanlarda diyabetik komplikasyon olarak önemli derecede kilo kayıpları gözlenmiştir. Kilo kayıplarının engellenebilmesi için sıçanlar *ad libitum* olarak beslenmiş ve deney hayvanları 90 günün sonunda sakrifiye edilmiştir.

3.6. Perfüzyon

Sıçanların sakrifiye edileceği gün vücut ağırlıkları ve kan glikoz seviyeleri ölçülmüştür. Sıçanların ortalama ağırlığının 280 ± 30 gram olduğu belirlenmiş ve sonrasında 5 mg/kg ketamin (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 2 mg/kg ksilazin (Rompun®, Bayer, İstanbul, Türkiye) ile intraperitoneal enjeksiyon yoluyla genel anestezi uygulanmıştır. Tüm solüsyonlar ve perfüzyon materyalleri bir gün önce hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

Derin anestezi altındaki sıçanlar, sırtları ameliyat masası üzerinde olacak şekilde yerleştirilmiş ve sonra diyafram altından başlanarak makas-neşter yardımıyla göğüs boşluğu açıldı ve kalbin sol ventrikül apeksine plastik bir kanülle girilerek önce serum fizyolojik ile ardından %10 formalin solüsyonu ile intrakardiyak perfüzyon uygulanmıştır. Solüsyonun serbest dolaştığını gözlemleyebilmek için sağ atriyuma neşterle küçük bir kesi yapılmıştır. Perfüzyon işlemi esnasında, formalin fiksasyonunun gerçekleştiğini gösteren düzensiz tetanik kasılmalar görülmüş ve perfüzyonun tamamlanmasına yakın bir zamanda ise spontan hareket gözlenmiştir. Perfüzyon sonrası kafatasları açılan sıçanların beyin dokuları disseke edilmiş ve

%2'lik paraformaldehit-%2'lik gluteraldehit karışım solüsyonunda fiksasyon için konulmuştur. Dokular fiksatif solüsyonu içinde daha sonra yapılacak histopatolojik incelemeler için +4°C'de saklanmıştır.

3.7. Parafin Blokların Hazırlanması

Deney hayvanlarına uygulanan cerrahi prosedürler ve perfüzyon işlemlerinin ardından çıkarılıp disseke edilen beyin dokuları fikse olmaları için %10'luk formaldehit (10 ml %40'luk formaldehit, 90 ml distile su) solüsyonuna konulmuştur. Her gruptan bir hayvanın beyin dokusu elektron mikroskopik analizler için ayrılmıştır. Bu hayvanlara ait beyin dokuları fiksasyon için %2 gluteraldehit+ %2 paraformaldehit karışımında bekletilmiştir. Her beyin dokusu beyincik kısmından ayrılarak, sagittal düzlemde ikiye bölünmüş ve histopatolojik, IHC ve stereolojik değerlendirmelerde beynin sağ hemisferi kullanıldı. Karışım solüsyonu içinde fikse olan beyin dokularının rutin doku takibi aşağıda verilen prosedüre uygun olarak yapıldı.

Çalışmamızda kullandığımız beyin dokularının rutin doku takibi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarların' da yapıldı. Bu işlem için laboratuvarında bulunan doku takip cihazı (Thermon Shandon Citadel 2000, ABD) kullanıldı. Doku takibi prosedürü tamamlanan beyin dokuları, oksipital lob kısmı aşağıda olacak şekilde koronal düzlemde, demir kalıplar içerisine konulan 58°C'deki parafine gömüldü. Doku parafin içine gömülürken hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.

Parafin bloklar, oda sıcaklığında, bir gece boyunca demir kalıplarda soğumaya bırakıldı. Böylece parafinin dokuya infiltrasyonu sağlandı. Çalışmada, objektif verilerin elde edilebilmesi için, parafin bloklar kör olarak etiketlendi. Bloklar ertesi gün kalıplardan çıkarılarak kesit almaya uygun hale getirildi.

Tablo 1. Doku takibi protokolü

Kimyasallar ve Derişimleri	Süre	Doku Takip İşlemi
%70 Alkol	1 saat	
%80 Alkol	1 saat	
%96 Alkol	1 saat	Dehidrasyon
%96 Alkol	1 saat	
%100 Alkol	2 saat	
%100 Alkol	2 saat	
Ksilen	45 dakika	Şeffaflandırma
Ksilen	45 dakika	
Ksilen	45 dakika	
Parafin (60°C)	1 saat 30 dakika	İnfiltrasyon
Parafin (60°C)	1 saat 30 dakika	

3.8. Rezin Blokların Hazırlanması

Perfüzyon işleminden sonra, fikse edilen dokulardan, her grup için bir tanesi ayrılarak, stereomikroskop yardımıyla sağ beyin hemisferlerindeki hipokampus bölgesinden 0,5 cm³ hacmindeki doku örnekleri disseke edildi. Elektron mikroskopik takip işlemine başlamadan önce takipte kullanılacak olan fosfat tamponu, osmiyum tetraoksit (tamponlu) ve gluteraldehit (%3'lük fosfat tamponlu) aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Takip işlemi esnasında kullanılan araldit tazeydi.

3.8.1. Fosfat tamponu hazırlanması

Toz halindeki dibazik sodyum fosfattan 3,561 gr, toz halindeki monobazik sodyum fosfattan 3,121 gr tartılmış ve maddeler iki ayrı behere konulmuştur. Her beherin üzerine 100 cc'ye tamamlayacak kadar distile su eklenmiştir. Her toz kendi beherinde karıştırılarak monobazik ve dibazik karışımı elde edilmiştir. Dibazik karışımından (bazik karışım) 38 ml, monobazik karışımından (asidik karışım) 12 ml alınarak bir beherde karıştırılmıştır. Böylece 50 ml 0,25 molar fosfat tamponu elde edilmiştir. Fosfat tamponu pH değeri pH metre ile kontrol edilerek 7,4 olması sağlanmıştır. pH 7.4 çıkmadığı durumda asidik veya bazik karışımından eklendi tekrar karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Karışımın pH'ı pH metre ile ölçülerek pH

7,4'e ayarlanmaya çalışıldı. Böylece 50 ml hacimde 0,25 molar fosfat tamponu elde edilmiştir. Hazırlanan 0,25 molarlık fosfat tamponu, gluteraldehit ve osmiyum tetraoksit hazırlanırken kullanılmış ve yıkama işlemi için 50 ml'lik 0,25 molar fosfat tamponu üzerine 50 ml distile su ilave edilerek (1/1 oranında) elde edilen 0,125 molarlık fosfat tamponu (100ml) kullanılmıştır.

3.8.2. Osmiyum tetraoksit (OsO₄) hazırlanması

Osmiyum takip işleminde kullanımdan bir gün önce hazırlanmış ve osmiyum hazırlanırken tüm cam malzemeler kullanılmadan önce distile su ile yıkanmıştır. Çalışmamız için 100 mg'lık osmiyum içeren kapsülün üzerindeki bant sıyrılarak, yapışkan madde giderilene kadar musluk suyunda yıkanmıştır. Kapsül 50-60°C'lik sıcaklıkta su bulunan beher içine bırakılmış ve kapsül içindeki kristal yaklaşık 10 sn'de çözünerek su damlası haline gelmiştir. Osmiyum tetraoksit (OsO₄) oda sıcaklığında donduğu için, kapsül çevrilerek osmiyumun kapsülün çeperine yayılarak kristalleşmesi ve çepere yapışması sağlanmıştır. Kapsülün kırılmasını kolaylaştırmak için çizilmiş ve saf sudan geçirilmiştir. Kapsül kahverenginde olan cam şişe içine atılarak kırılmıştır. Ardından kırılmış osmiyumun üzerine (solumamaya dikkat edilerek) sırasıyla 5 ml distile su ve 5 ml 0,25 M fosfat tamponu konulmuştur. Böylece 100 mg'lık osmiyum kapsülünden 10 ml hacimde %1'lik tamponlu osmiyum tetraoksit (OsO₄) çözeltisi elde edilmiştir. Kristalin çözünmesi için bu şekilde buzdolabında bir gece bekletilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.8.3. Tamponlu gluteraldehit hazırlanması

On iki ml hacimde %25'lik gluteraldehit (stok-hazır) üzerine 50 ml hacminde 0,25 M fosfat tamponundan ve 38 ml hacminde distile su eklenerek 100 ml hacimde tamponlu gluteraldehit elde edilmiştir.

3.8.4. Araldit hazırlanması

Elektron mikroskopik doku takibi işlemlerine başlandığında, dehidratasyon aşamasında dokuların gömme materyali olarak taze araldit hazırlanmıştır. Bunun için, 10 ml araldit CY 212, 10 ml DDSA (Dodenyl Succinic Anhydride) ve 0,4 ml BDMA (Dimetilbenzilamin) bir kap içine alınarak 15 dk boyunca sürekli karıştırılmıştır. Daha sonra dehidrasyon işlemleri devam ederken 1-2 saat karanlık bir ortamda bekletilerek

hava kabarcıklarının giderilmesi sağlandı. Böylece araldit kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Tamponlu (%4'lük) gluteraldehite konulan doku örnekleri bir saat buzdolabında bekletilerek fikse olması sağlanmıştır. Doku örnekleri 0,125 M fosfat tamponunda 15 dk bekletilerek yıkanmış ve yıkama işlemi dört kere tekrarlanmıştır. Hazırlanan tamponlu osmiyum (%1'lik) doku parçalarının üzerine dökülerek kapağı kapalı bir şekilde 1,5 saat karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra doku örneklerinin üzerindeki osmiyum tetraoksit 0,125 M fosfat tamponu ile dört defa yıkama yapılmış. Örnekler, yıkama işleminden sonra asetonla yapılan dehidratasyon işlemi için %50, %70, %95 ve iki ayrı kapta bulunan %100'lük aseton serilerinde 15'er dk süre ile bekletilmiştir. Propilen oksit aşamasında doku örnekleri iki aşamalı olarak 20'er dk süre ile saf propilen oksitte bekletilmiştir. Daha sonra dokular, aşamalı olarak konsantrasyonu arttırılan gömme materyali araldite alınmıştır. Bunun için dokular üç farklı oranda hazırlanan araldit + propilen oksit karışımlarının her birinde birer saat bekletilmiş, en son derişimdeki araldit + propilen oksit karışımından alınan doku parçaları saf araldite konularak bir saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Saf aralditin bir kısmı kapsüllere dökülerek, kapsülün içine doku örnekleri yerleştirilmiş olup daha sonra dokular desikatörde bir gece bekletilmiştir. Desikatörde bekleme sırasında etüv sıcaklığı 45°C'ye ayarlanmış ve desikatörden çıkarılan kapsüllerin içinde oluşan kabarcıklar giderilmiştir. Dokular blok içinde santralize edilmiş ve sonrasında kapsül 45°C'lik etüve konulmuştur. Etüvdeki dokular 45°C'de 30 dk bekletildikten sonra sırasıyla 50°C, 55°C, 60°C etüvde 30'ar dk ve 62-63°C'lik etüvde 48 saat bekletilerek polimerizasyon tamamlanmıştır. Takip işlemleri sonrasında dokular etüvden çıkarılarak, histopatolojik ve ultrastrüktürel değerlendirmeler için yarı ince (0,5 μ m) ve ince (70 nm) kesitler alındı.

3.9. Parafin Bloklardan Kesit Alınması ve Boyanması

Stereolojik ve IHC analizler için hazırlanan parafin bloklardan Leica RM2245 mikrotom (Leica, Nussloch, Almanya) kullanılarak, 4 μ m kalınlığında kesitler, stereolojik analizler için SRÖ metoduyla 1/50 örnekleme aralığında alındı. Alınan ilk kesit, 50 kesit arasından rastgele olarak belirlendi. Cresyl violet ve Luxol fast blue red

ile boyandı. Ayrıca, her gruba ait bir bloktan, SRÖ'ye uygun olarak 1/100 örneklem aralığında alınan 4 µm kalınlığındaki kesitlerde IHC boyamalar yapıldı.

Parafin kesitler, sıcaklığı yaklaşık 41°C olan benmari su havuzunda (Leica, Nussloch, Almanya) kesitlerdeki katlanmalar giderilinceye kadar bekletildi ve ardından temiz lamalar üzerine alındı. Benmari su havuzuna (Leica, Nussloch, Almanya) kesitlerin dökülmesinin önlenmesi için jelatinli (Gelatin, Emprove exp) sıcak su (500 ml sıcak su içine 4-5 kaşık ölçüsünde) eklendi. Sıcak su içinde jelatin çözülerek hazırlanan karışım, dokuların lamlara daha iyi yapışmasını sağladı ve dokuların lamdan dökülmesini önledi.

Kesitler, 4-5 saat aralığında 59°C'deki etüvde bekletilerek deparafinizasyon başlatıldı. Daha sonra ilk ksilene konulan kesitler 59°C'deki etüv içinde 2 saat ve oda sıcaklığındaki ikinci ksilende iki saat bekletilerek dokuya nüfus eden parafinin uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra, azalan derişimlerde (%100- %96- %80- %70'lik) alkol serilerinden geçirilerek, her birinde 15'er dk boyunca bekletildi. Distile suda yıkanan kesitler, Cresyl violet (C5042-10 gr, Sigma-Aldrich, Almanya) ve Luxol fast blue red (MBSN, pure ACROS, kod no: 212170250 Lot: A0307872) ile belirlenen boyama protokolüne göre boyandı. Boyama protokolü birkaç deneme kesitle pilot çalışmalar yapılarak belirlendi. Çalışmamızda kullandığımız Luxol fast blue red boyama protokolü ve boyaların hazırlanışı aşağıdaki gibidir:

Kullanılan Kimyasallar ve Derişimleri, Süreler

- %95'lik alkol: 1 kere daldırıp çıkarma
- Luxol fast blue boya: 6 saat (57°C etüvde)
- Distile su ile yıkama: 5 kere daldırıp çıkarma
- Lityum karbonat solüsyonu: 1 dk

(%0,05 lik 0,125 g LiCO₃ ve 250 ml distile su karışımı)

- %70'lik alkol: 1 kere daldırıp çıkarma
- Distile su ile yıkama: 5 kere daldırıp çıkarma
- Cresyl Violet boyama: 7 dakika (57°C etüvde)
- %95'lik alkol: 1 kere daldırıp çıkarma
- %100'lük alkol: 1 dakika

- Ksilen: 1 saat (oda sıcaklığında)

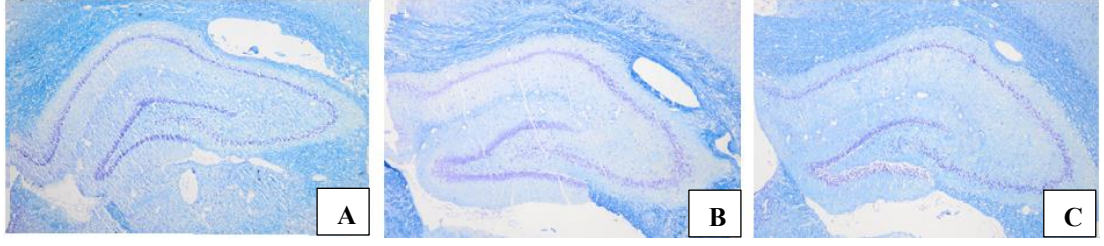
Kesitlerin boyanmasında kullanılan Cresyl violet (C5042-10 gr., Sigma-Aldrich, Almanya) boya kullanılmadan önce 57°C etüvde ısınması sağlandı. Boyada bekleme süresi, ışık mikroskopta inceleme yapılarak dokunun boyayı tutma derecesine göre ayarlandı. Boya tutulumu az olduğunda süre 10 dakikaya uzatıldı. Ksilenden alınan lamalar bekletilmeden entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlardan stereolojik inceleme için ışık mikroskobik düzeyde görüntüler alındı.

Luxol Fast Blue Boya Hazırlanışı:

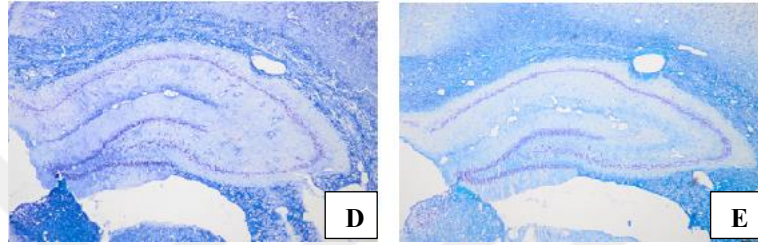
- 0,2 gr Luxol Fast Blue
- 200 ml %95 Etanol
- 1 ml %10'luk Asetik Asit (0,1 ml glasiyal asetik asit ile 0,9 ml distile su karışımı)

Cresyl Violet Boya Hazırlanışı

- 0,2 gr Cresyl violet
- 30 ml %10 asetik asit solüsyonu (0,1 ml glasiyal asetik asit ile 0,9 ml distile su karışımı)
- 200 ml Distile su



Şekil 3. (A) Kontrol grubu, (B) Sham grubu ve (C) Diyabet grubu hipokampus dokularına ait Luxol fast blue red (Luxol fast blue + Cresyl violet) boyama örnekleri



Şekil 4. (D) Garcinia kola grubu ve (E) Kurkumin grubu hipokampus dokularına ait Luxol fast blue red (Luxol fast blue + Cresyl violet) boyama örnekle



Şekil 5. Parafin bloğa gömülü kesitlerin alınmasında kullanılan mikrotom cihazı

3.10. Rezin Bloklardan Kesit Alınması ve Boyanması

Rezine gömülü hipokampusu ait bloklardan, ultramikrotom (Leica Ultra cut UCT of the Leica Microsystems GmbH of Germany) aracılığıyla 0,5 µm kalınlığında kesitler alındı (Şekil 6). Alınan kesitler, üzerine toluidine blue (%1'lik toluidine blue boya: 2 g sodyum borat + 1 g toluidine blue boya+ 100 ml distile su) boyası damlatılarak boyandı. Boyamadan sonra kesitte oluşan izler ve boya artefaktları minimize edilmeye ve ortadan kaldırılmaya çalışıldı. Kesitlerin histopatolojik yönden değerlendirilebilmesi için kamera ataçmanlı ışık mikroskopunda (Olympus, BX43, Center Valley, PA, ABD) x5'lik, x10'luk, x40'lık büyütmelede bilgisayar destekli cellSens Entry mikroskop yazılım programı (Olympus, Center Valley, PA, ABD) kullanılarak hipokampusun CA1, CA2, CA3 ve DG bölgelerinden görüntüler alındı.



Şekil 6. Yarı ince kesitlerin alınmasında kullanılan ultramikrotom cihazı.

3.11. Elektron Mikroskopik Kesitlerin (İnce Kesitler) Alınması ve Görüntülenmesi

Çalışmamızda diyabetin ve kullanılan antioksidanların (GK ve Kur) hipokampus dokusu üzerindeki etkilerinin ince yapı düzeyinde incelenebilmesi için deneyde kullandığımız Wistar albino cinsi erişkin erkek sıçanlardan her gruptan bir tane olmak üzere seçildi. Seçilen hayvanların hipokampus dokuları elektron mikroskop doku takibi yapılmak üzere ayrıldı. Elektron mikroskopik doku takibi tamamlanan hipokampus örneklerine ait rezin bloklardan önce 0,5 µm kalınlıkta yarı ince kesitler alındı. Kalan doku bloklarından 70 nm kalınlığında ince kesitler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknik Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (KİTAM) Görüntüleme ve Karakterizasyon Biriminde alınarak bakır gridlere yerleştirildi. Ardından burada bulunan otomatik kontrastlama sisteminde (Leica EM AC20, Leica Microsystems GmbH, Almanya) boyandı. Boyamanın ardından KİTAM'da bulunan elektron mikroskobu (JEOL JSM-7001F, JEOL Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılarak kesitlerin mikrografları çekildi (Şekil 7).

Boyama İşleminde Kullanılan Kimyasallar:

- %0,5'lik uranil asetat (-20°C'de boyama) : 45 dk
- Distile su (Yıkama)
- %3'lük kurşun sitrat (-20°C'de kontrastlama): 15 dk



Şekil 7. İnce kesitlerin görüntülenmesinde kullanılan taramalı elektron mikroskobu

3.12. İmmünohistokimyasal Boyamalar

Hipokampustaki değişiklikleri hücresel düzeyde inceleyebilmek için immünohistokimyasal analizler yapıldı. IHC analizler için anti-S100 (dilüsyon: 1/120, ab4066, Abcam, ABD), anti-kaspaz-3 (dilüsyon: 1/500, orb500767, Biorbyt, USA), anti-SOX2 (dilüsyon: 1/50, ab 93689 Abcam, ABD) primer antikorları kullanıldı.

S100 proteini hücre proliferasyonu, protein fosforilasyonu, farklılaşma, enerji metabolizması, Ca^{+2} homeostazı, inflamasyon ve hücre ölümü gibi birçok hücresel süreçte görev almaktadır. S100 proteinlerinin bu görevleri dışında hücre içinde transkripsiyonel regülasyon ve DNA onarımı gibi önemli işlevleri de bulunmaktadır (36). Özellikle hücre proliferasyonu ve apoptozunda rol oynaması gibi fonksiyonel özellikleri açısından anti-S100 antikorunun hipokampustaki ekspresyonları değerlendirildi.

Kaspaz 3, apoptotik süreçte rol alan sistein proteazlardan biridir ve kaspaz ailesine ait bir enzimdir. Kaspaz 3'ün görevi bir grup substratı parçalayarak endonükleazları aktive etmek ve apoptozda görülen DNA parçalanmasını sağlamaktır (380). Apoptoz, hücre çoğalması ve ölümünü dengeleyerek dokuların homeostazının korumasında ve normal fonksiyonlarını sürdürmelerinde önemli bir role sahiptir (380). Kaspaz 3'ün apoptotik süreçlerde rol oynaması ve anti-S100 antikorunun spesifik hücre farklılaşması, nöral gelişim süreçlerinde etkili olması açısından hipokampustaki ekspresyonları bu immün boyama ile değerlendirildi.

Anti-SOX2, farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin kendi kendini yenileme ve pluripotensini korumak için gerekli olan transkripsiyon faktörünü gösteren bir belirteçtir (393). SOX2, SRY ilişkili transkripsiyon faktörlerinin üyesi ve gelişim aşamalarında çeşitli hücre tiplerinde hücrenin sonraki dönemde canlılığı ve farklılaşmasını kontrol eden bir gen grubudur (394, 395). Nöronal kök hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda NPC'lere doğru gelişim gösteren kök hücrelerin SOX2 gen ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur. Ayrıca beyin, hipofiz bezi ve trakea dokusunda erişkin dönemde progenitör hücre gelişimi SOX2 aracılığıyla düzenlenir (406). hPSC'de ana regülatör bölge olan SOX2 gen lokusu aynı zamanda sinir sistemi onarımı için gerekli bir transkripsiyon faktörü olup, multipotent nöral projenitör hücre belirteci olarak tanımlanmıştır (401). Görev ve özellikleri itibari ile anti-SOX2

belirteci, diyabetin muhtemel dejeneratif etkisi ve çalışmamızda tedavi amaçlı deneneni antioksidanların iyileştirici etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla seçilmiştir. Değişen hipokampus doku ortamında, nöral kök hücrelerin sayısal durumu ve hipokampus bölgelerinde dağılımı araştırıldı. Erişkin dönemde kök hücre üretim merkezlerinden biri olan hipokampusun dentat girus bölgesinde, kök hücrelerin nöral progenitör hücrelere farklılaşma durumu ve hipokampus doku hasarında SOX2 gen aktivitesi değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal çalışmalar için, her gruba ait bir adet hipokampus dokusundan SRÖ metoduyla 4 mikrometre kalınlığında 1/100 örneklem aralığında alınan kesitler Tablo 3’ teki boyama protokolüne göre boyandı. Etüvde 59°C’de, 4-5 saat tutulan kesitlerden parafinin uzaklaştırılması sağlandı (**Şekil 8**). Dokuya nüfus eden parafinin uzaklaştırılması için Tablo 2’deki deparafinizasyon protokolü uygulandı.

Tablo 2. Deparafinizasyon protokolü

Kullanılan Malzemeler	Süreler ve Sıcaklıklar
Ksilen	1 saat- 59°C etüvde
Ksilen x2	15’er dakika – oda sıcaklığında
% 100 Alkol	5 dakika
% 96 Alkol	5 dakika
% 80 Alkol	5 dakika
Distile su x2	5 dakika



Şekil 8. Parafin kesitlerin deparafinizasyonunda ve rezin blokların polimerizasyonu için kullanılan etüv

İmmünohistokimyasal boyamalarda, primer antikorların dokudaki ekspresyonlarının saptanmasında Mouse and Rabbit Specific HRP/AEC (ABC) Detection IHC Kit (ab64252, Abcam, USA) kullanıldı. Mayer's hematoksilen boyası (Merck Kimyasalları, USA) ile zıt boyama yapıldı. Tüm kesitlerde kahverengi-kiremit kırmızısı boyanan alanlar “pozitif boyanma” olarak kabul edildi. Boyanma yoğunluğuna göre “zayıf, orta derecede ya da kuvvetli boyanma” olarak ifade edildi. İmmünohistokimyasal boyama protokolü Tablo 3’te verilmiştir.

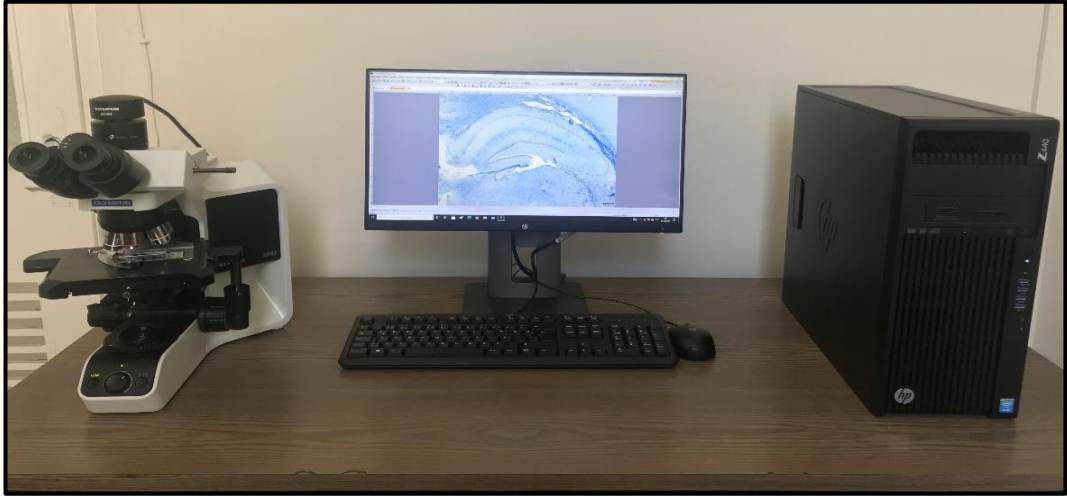
Tablo 3. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

Kullanılan Malzemeler	İşlem Süresi
%3'lük H ₂ O ₂	10 dakika
Fosfat tamponu x2	5'er dakika – yıkama
Sitrat tamponu (Thermo Fisher Scientific, İngiltere) (distile su ile 1/10 oranında seyreltilmiş)	2 dakika 45 saniye - 850 Watt mikrodalga fırında kaynatma
Sitrat tamponu (Thermo Fisher Scientific, İngiltere) (distile su ile 1/10 oranında seyreltilmiş)	17 dakika - 170 Watt mikrodalga fırında kaynatma
Sitrat tamponu (Thermo Fisher Scientific, İngiltere) (distile su ile 1/10 oranında seyreltilmiş)	30 dakika - oda sıcaklığında soğuyuncaya kadar bekletme
Protein blok	15 dakika – inkübasyon
Fosfat tamponu x4	5'er dakika – yıkama
Primer antikor (belirlenen dilüsyonlarda)	1 gece - +4°C'de inkübasyon
Fosfat tamponu x4	5'er dakika – yıkama
Biyotinli antikor	15 dakika - oda sıcaklığında inkübasyon
Fosfat tamponu x4	5'er dakika – yıkama
Streptavidin peroksidaz enzimi	15 dakika - oda sıcaklığında inkübasyon
Fosfat tamponu x4	5'er dakika – yıkama
AEC kromojen	12-13 dakika
Distile su	5 dakika - yıkama
Mayer's hematoksilin (Abcam, ABD)	10 saniye - boyama
Su bazlı kapatıcı	Kapama

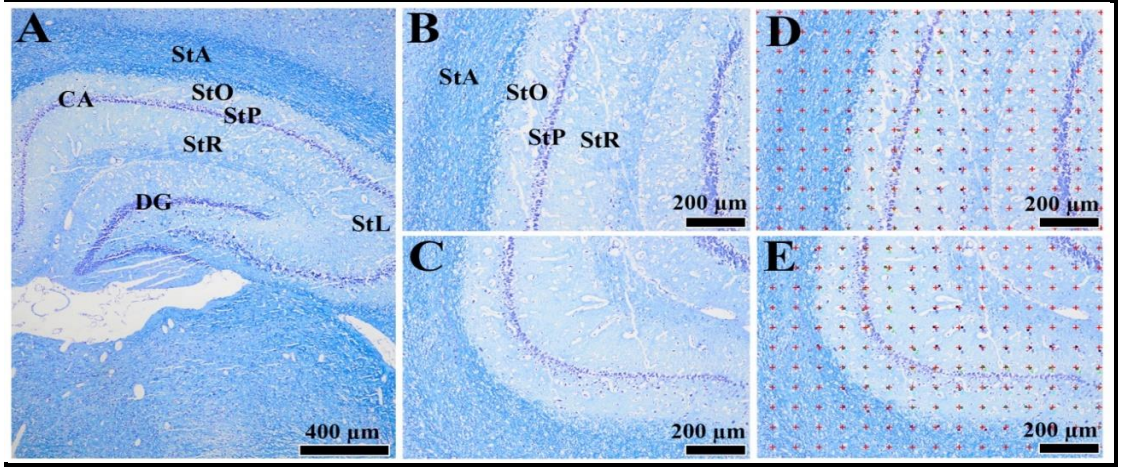
3.13. Stereolojik Analizlerin Yapılması

Tüm gruplara ait hipokampus dokularından alınan ve Luxol fast blue red ile boyanarak hazırlanan preparatlardan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan kamera ataçmanlı (Olympus, BX43, Center Valley, PA, USA) ışık mikroskopunda, bilgisayar destekli cellSens Entry yazılım programı (Olympus, Center Valley, PA, USA) yardımıyla stereolojik analiz için x10'luk büyütmede görüntüler elde edildi.

Hipokampus tabakalarının (stratum alveus, stratum oriens, stratum pramidale, stratum lucidum ve stratum radiatum) yüzey alanı ölçümünde Image J programı kullanıldı. Her bir tabaka için hata katsayısı (HK) $<5\%$ olacak şekilde noktalı alan ölçüm cetvelindeki (NAÖC) nokta sıklığı belirlendi ve Image J programıyla gerekli hesaplamalar yapıldı (Şekil 10).



Şekil 9. Bilgisayar programı destekli kamera ataçmanlı ışık mikroskop görüntüleme sistemi



Şekil 10. Luxol fast blue red (Luxol fast blue ve cesyl violet boyaların kullanıldığı boyama protokolü) ile boyanan hipokampus dokusundan alınan kesitlerin ışık mikroskop görüntüsü ve noktalı alan ölçüm cetveli ile hipokampus tabakaları alan hesaplamalarına ait ekran görüntüsü. (A) Hipokampus bölgesine ait stratum alveus (StA) (417), stratum oriens (StO) (418), stratum pyramidale (StP), stratum lucidum ve stratum radiatum (StR) tabakalarının görüntüsü. (B, C) Tabakaların lokalizasyonları belirlendikten sonra, (D, E) Image J programı kullanılarak her tabakanın hacmi noktalı alan ölçüm cetveli ile ölçüldü. Noktalı alan ölçüm cetveli ile analizleri yapılırken Image J programında her tabaka farklı bir numara ile işaretlendi. Cresyl violet - Luxol fast blue boyaması. CA: Cornu ammonis, DG: Dentat girus.

Tüm sıçanlara ait veriler elde edildiğinde, tabakaların toplam hipokampusu olan hacim oranları hesaplandı. Tüm gruplara ait değişim katsayılarının <%20 olması sağlandı. Tüm tabakalara ait ölçümleri içeren örnek excel tablosunu içeren görsel Şekil 11’de verilmiştir.

	1. Tabaka Str.Alveus	2. Tabaka Str.Oriens	3. Tabaka Str.Piramidale	4. Tabaka Str.Lucidum	5. Tabaka Str.Radiatum
Kesit alanı 1-resim no					
resim no: 1/ image 214345	10	11	6	0	14
resim no: 2/ image 214346	8	8	4	0	10
resim no: 3/ image 214347	8	8	5	0	16
resim no: 4/ image 214348	7	8	4	5	13
resim no: 5/ image 214349	17	22	6	2	0
resim no: 6/ image 214350	9	3	3	4	7
resim no: 7/ image 214351	3	3	1	2	3
Kesit alanı 2-resim no					
resim no: 1/ image 214356	12	12	8	0	15
resim no: 2/ image 214357	13	8	4	0	14
resim no: 3/ İmage 214358	8	7	3	0	15
resim no: 4/ image 214359	7	6	3	5	6

Şekil 11. 9 nolu hayvanın hipokampus dokusu kesit alanı hesaplama sonuçlarına ait excel tablosu örneği

3.14. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, GraphPad Prism (sürüm 8.0; GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Veriler, Shapiro-Wilk testi kullanılarak normallik açısından değerlendirildi. Veri kompozisyonuna bağlı olarak, grupların karşılaştırılmasında, normal dağılım gösteren veriler için One-way Anova (post-hoc, Tukey), normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal-Wallis testi uygulandı. İstatistiksel testlerde, FDR' yi (yanlış keşif oranı) (Q değeri %5 olarak alındı) kontrol ederek çoklu karşılaştırmaları düzeltmek için Benjamini, Krieger ve Yekutieli'nin iki aşamalı lineer prosedürü uygulandı (419) . Veriler, ortalama (Ort) $\pm$ standart sapma (SS) olarak ifade edildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak tanımlandı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, transekte edilen siyatik sinire ven grefti uygulanan erişkin erkek sıçanlarda hipokampus dokusu üzerinde deneysel STZ ile indüklenen diyabetin olası dejeneratif etkilerinin ve buna karşın *Garcinia kola* ve kurkuminin nöroprotektif etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, hipokampusun stratum alveus, stratum oriens, stratum pyramidale, stratum lusidum ve stratum radiatum tabakalarının tüm hipokampusu olan hacim oranları stereolojik olarak değerlendirildi. Ayrıca, hipokampustaki nöronlar, nöroglialar, hücrel uzantıları ile sinir lifleri ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerle histopatolojik açıdan değerlendirildi. Bunlara ilaveten tüm gruplardan elde edilen kesitlerde anti-SOX-2 (Abcam, ABD), anti-S-100 ve anti-Kaspaz 3 (Abcam, ABD) immün boyamaları yapıldı. İmmünohistokimyasal yöntemlerle boyanan kesitlerden elde edilen ışık mikroskopik görüntülerde, hipokampus bölgesindeki pozitiflikler niteliksel olarak değerlendirildi.

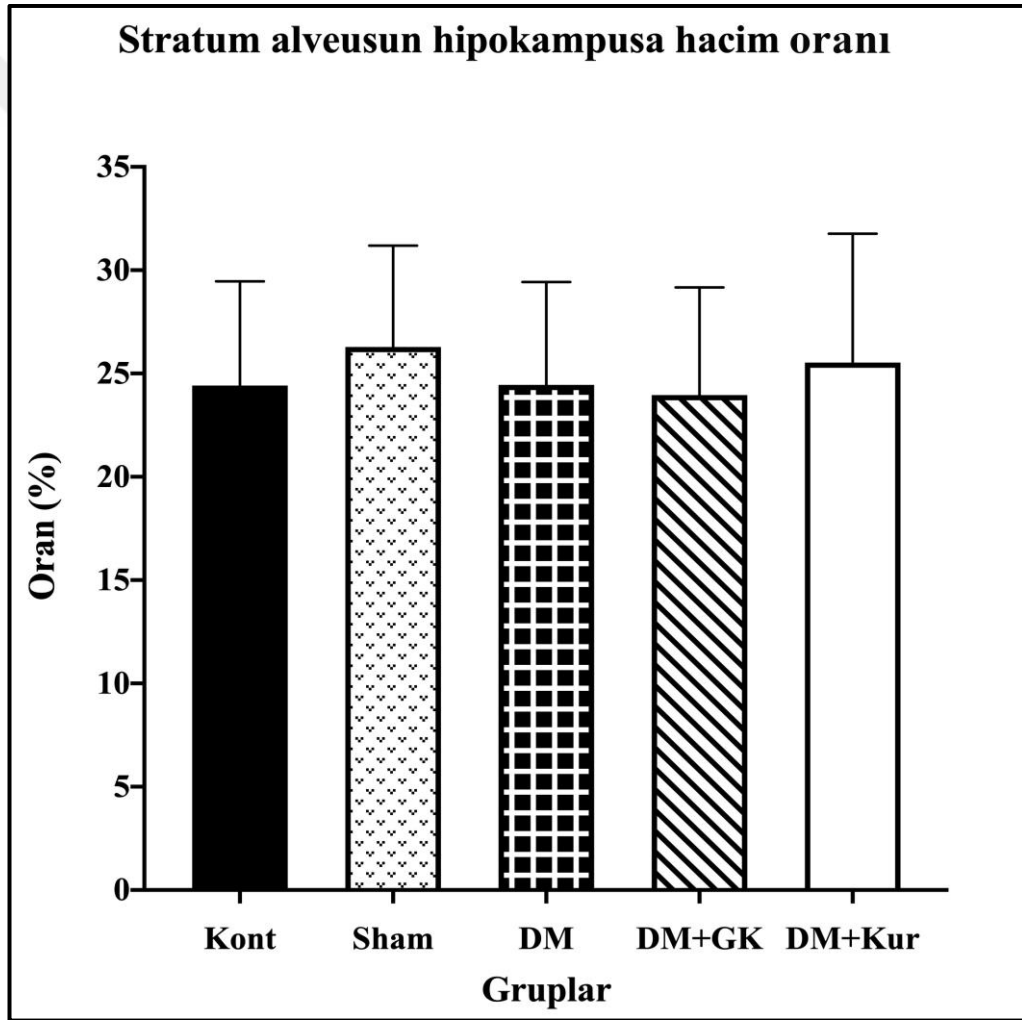
4.1. Stereolojik Bulgular

Hipokampusun stratum alveus, stratum oriens, stratum pyramidale, stratum lusidum ve stratum radiatum tabakalarının tüm hipokampus bölgesine olan hacim oranlarının stereolojik değerlendirilmesinde her hayvana ait hata katsayısı (HK) $\leq 0,05$ ve gruplara ait değişim katsayısı (DK) $\leq 0,2$ olarak kabul edildi.

Tüm gruplara ait stratum alveus, stratum oriens, stratum pyramidale ve stratum radiatum tabakalarının hacim oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Bununla birlikte, stratum lusidum tabakasının hacim oranları gruplar arasında karşılaştırıldığında, sham grubuna ait stratum lusidum hacim oranının, Kont grubuna göre arttığı gözlemlendi ($p=0,0203$). Ayrıca, Kont grubu ile karşılaştırıldığında, sham ve DM grubuna ait stratum lusidum hacim oranında anlamlı bir artış olduğu tespit edildi ($p=0,0068$). Benzer şekilde, DM+Kur grubuna ait stratum lusidum tabakasının hacim oranında, Kont grubuna göre anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,0392$) (**Tablo 7, Şekil 15**).

Tablo 4. Hipokampusun stratum alveus tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort.± SS, HK ve DK değerleri

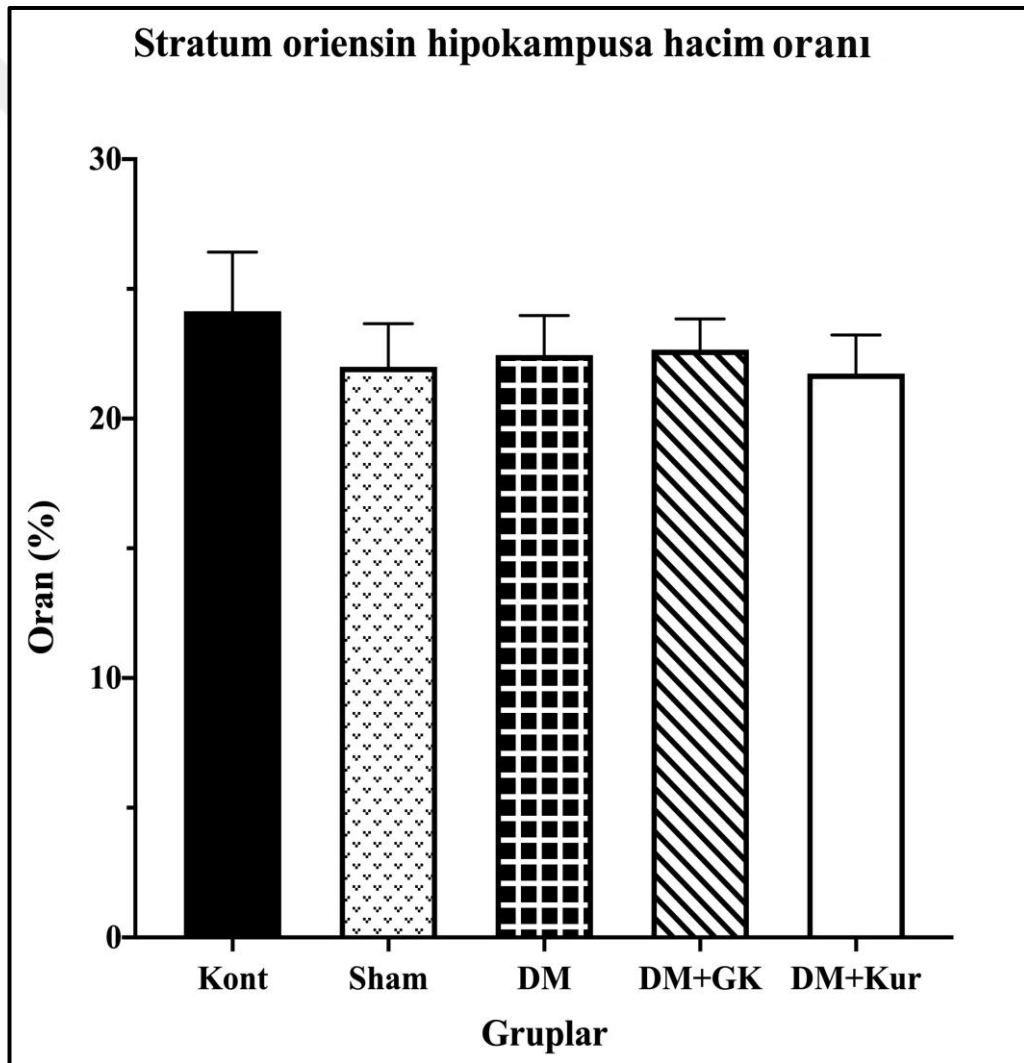
Gruplar	Ort.± SS	HK	DK
Kont	24,42 ± 5,04	0,041	0,185
Sham	26,28 ± 4,90	0,046	0,167
DM	24,45 ± 4,98	0,045	0,182
DM+GK	23,96 ± 5,21	0,045	0,195
DM+Kur	25,53 ± 6,23	0,043	0,219



Şekil 12. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum alveus tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 5. Hipokampusun stratum oriens tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort $\pm$ SS, HK ve DK değerleri

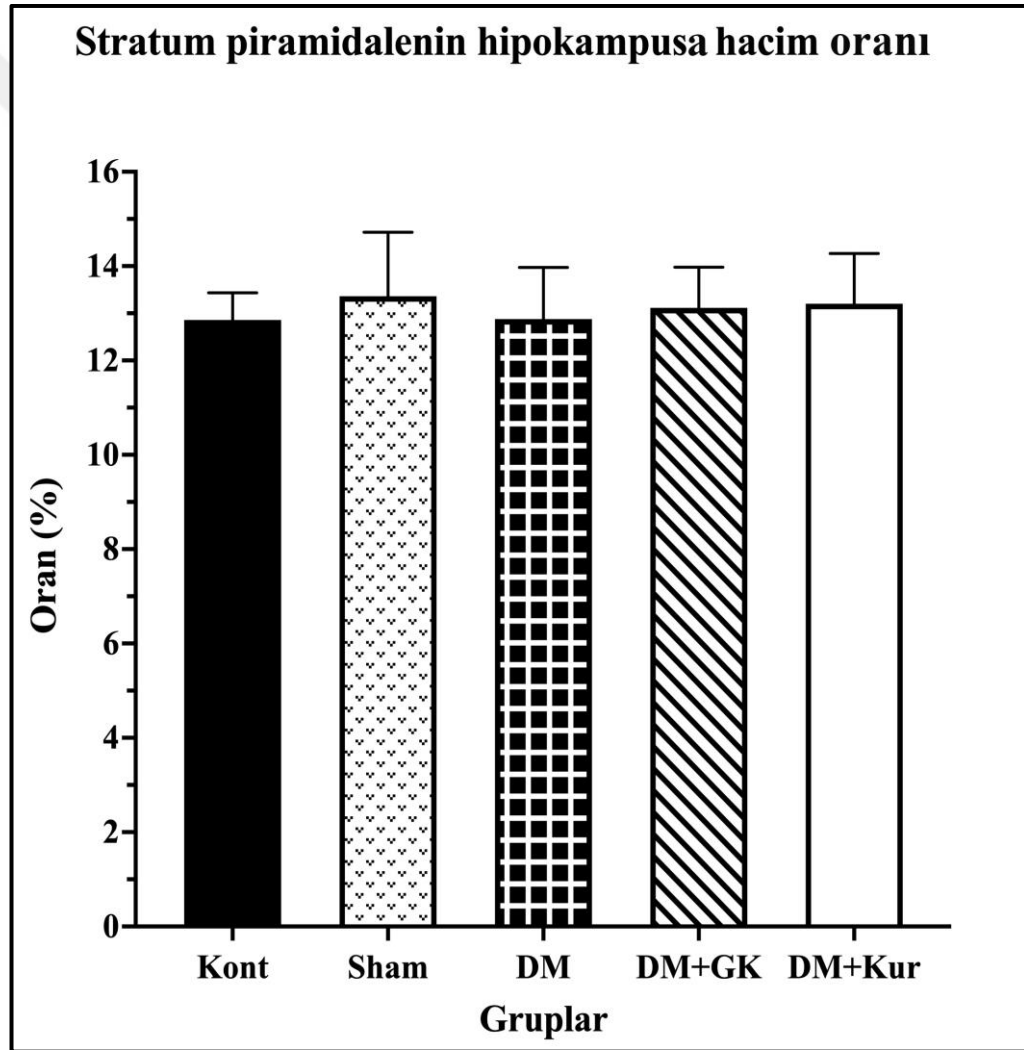
Gruplar	Ort $\pm$ SS	HK	DK
Kont	24,14 $\pm$ 2,27	0,043	0,084
Sham	22,00 $\pm$ 1,66	0,051	0,068
DM	22,45 $\pm$ 1,52	0,045	0,061
DM+GK	22,66 $\pm$ 1,18	0,045	0,047
DM+Kur	21,73 $\pm$ 1,49	0,046	0,061



Şekil 13. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum oriens tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 6. Hipokampusun stratum piramidale tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort $\pm$ SS, HK ve DK değerleri

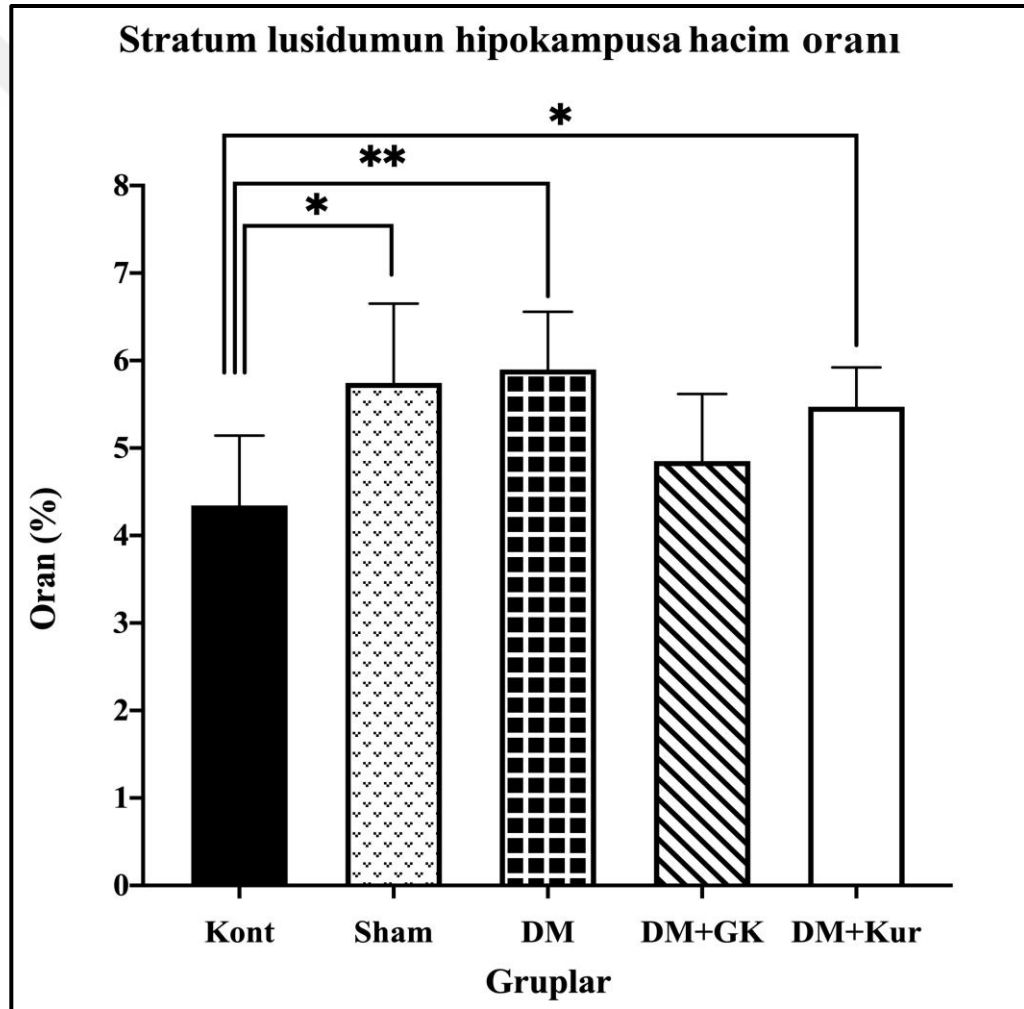
Gruplar	Ort $\pm$ SS	HK	DK
Kont	12,86 $\pm$ 0,57	0,058	0,04
Sham	13,36 $\pm$ 1,36	0,065	0,091
DM	12,88 $\pm$ 1,09	0,06	0,069
DM+GK	13,12 $\pm$ 0,86	0,059	0,054
DM+Kur	13,20 $\pm$ 1,06	0,059	0,066



Şekil 14. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum piramidale tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 7. Hipokampusun stratum lusidum tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort± SS, HK ve DK değerleri

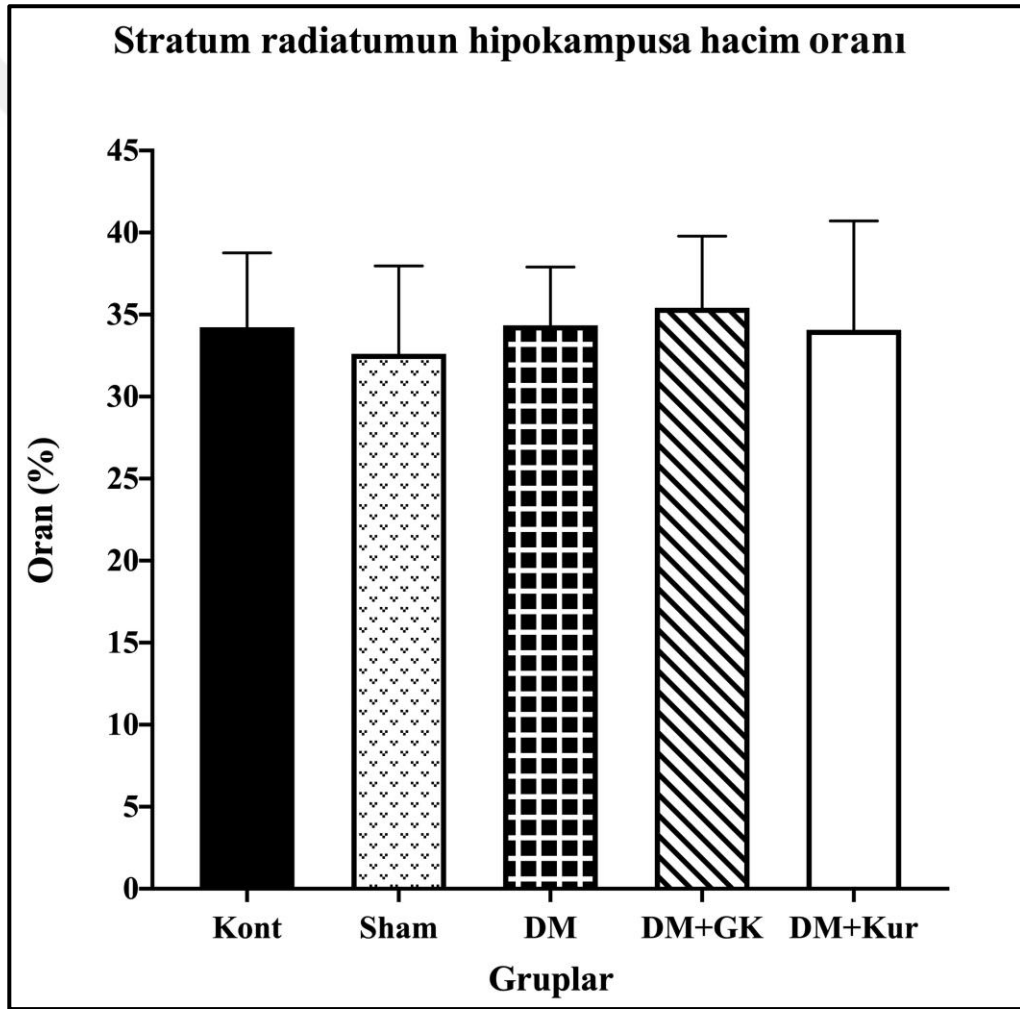
Gruplar	Ort ± SS	HK	DK
Kont	4,34 ± 0,79	0,1	0,16
Sham	5,74 ± 0,90	0,1	0,14
DM	5,89 ± 0,65	0,08	0,1
DM+GK	4,85 ± 0,76	0,09	0,14
DM+Kur	5,47 ± 0,44	0,09	0,07



Şekil 15. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum lusidum tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. Gruplar arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılıklar (*) ile, $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık (**) ile gösterilmektedir.

Tablo 8. Hipokampusun stratum radiatum tabakasının hacim oranı değerlerine ait Ort $\pm$ SS, HK ve DK değerleri

Gruplar	Ort $\pm$ SS	HK	DK
Kont	34,23 $\pm$ 4,53	0,036	0,12
Sham	32,61 $\pm$ 5,35	0,043	0,15
DM	34,35 $\pm$ 3,54	0,037	0,09
DM+GK	35,42 $\pm$ 4,36	0,037	0,11
DM+Kur	34,07 $\pm$ 6,63	0,038	0,17



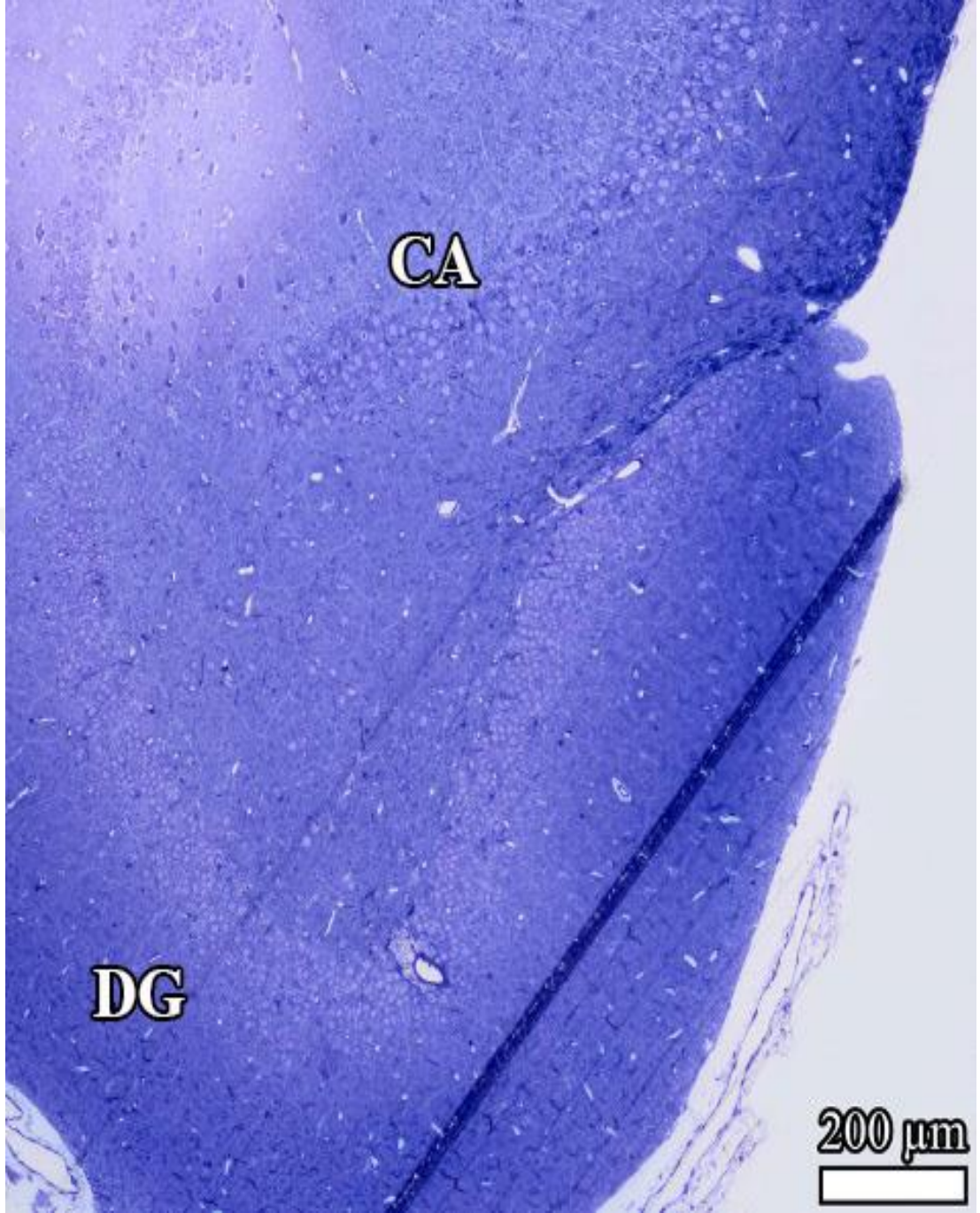
Şekil 16. Tüm gruplara ait hipokampusun stratum radiatum tabakasının hacim oranı değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

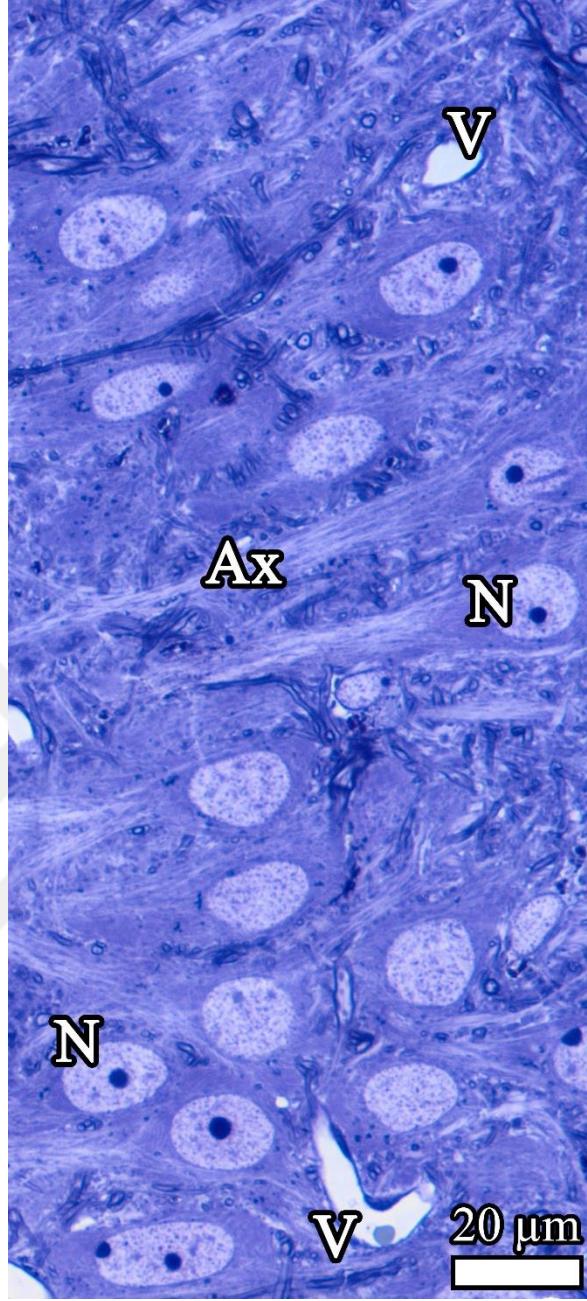
Tüm gruplara ait yarı ince kesitlerden elde edilen ışık mikroskopik görüntülerde, nöronların, nöroglial hücrelerinin, akson uzantılarının ve damarların morfolojileri incelenerek histopatolojik olarak değerlendirildi.

4.2.1. Kontrol grubuna ait bulgular

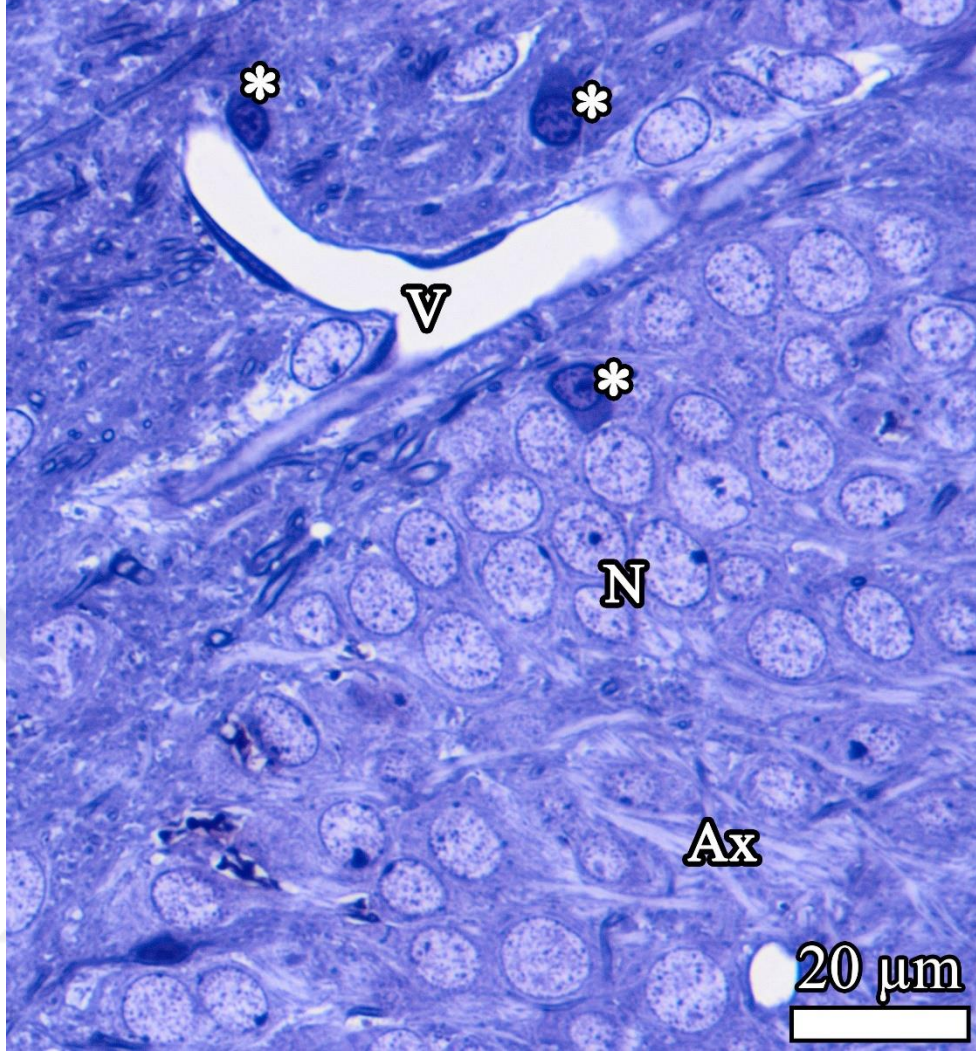
Kontrol grubuna ait hipokampus bölgesinden elde edilen genel ve büyük büyütmedeki görüntülerde, Cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinde bulunan nöronlar, nöroglia hücreleri ve kapillerlerin sağlıklı olduğu görüldü. Çekirdek ve çekirdekçik sınırları belirgin olan nöronların aksonal uzantılarının da normal morfolojide olduğu gözlemlendi. Dokuda aksonların longitudinal ve transvers düzlemde seyrettiği fark edildi. CA bölgesindeki nöronların oval biçimli ve ökromatik çekirdeğe sahip olan piramidal tipte nöronlar olduğu gözlemlendi. Bu bölgedeki piramidal nöronlar, birbirlerine paralel olacak biçimde dizilim göstermekteydi. Piramidal nöronlar arasındaki mesafe normaldi, bu hücreler arasında bazı alanlarda koyu boyanan nöronlar fark edildi. Bu hücrelerin fonksiyonunu ve yapısal özelliklerini yitiren yapılar olduğu düşünülmektedir. Kontrol grubuna ait hipokampus dokusunda bulunan kapillerlerin duvar yapılarının sağlıklı yapıda olduğu ve çevre doku ile bütünlüklerini korudukları gözlemlendi. DG bölgesinde küre biçimli çekirdeklere sahip nöronlar ve sinir lifleri incelendiğinde, normal yapıdaydılar. Bu bölgedeki granüler hücrelerin sık bir şekilde paketlenildiği gözlemlendi. Bu nöronların arasında bazı bölgelerde dejenerasyona uğradıkları düşünülen az sayıda koyu boyanan hücrelere rastlanıldı (Şekil 19).



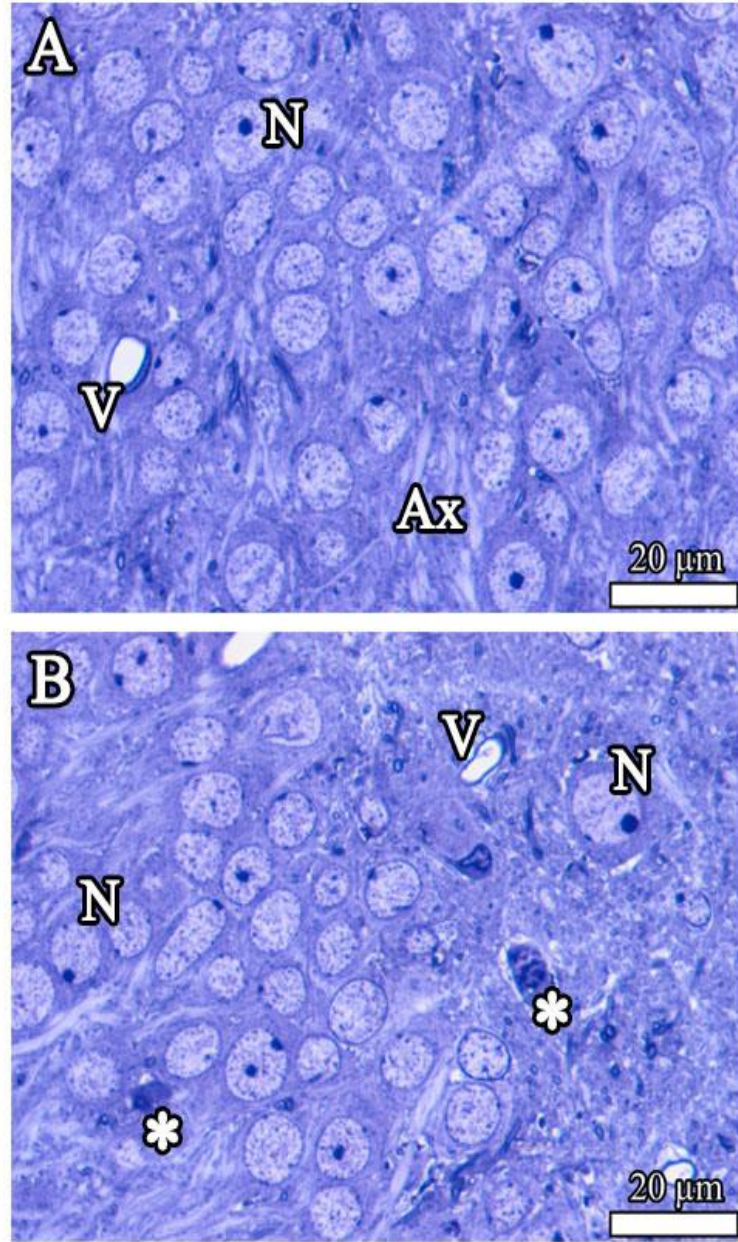
Şekil 17. Kontrol grubuna ait hipokampustan alınan yarı ince kesitin genel görüntüsü verilmiştir. Kontrol grubuna ait hipokampus bölgesinin genel yapısı görülmektedir. Cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinin normal morfolojide olduğu gözlenmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 μm'dir. Boyama: Toluidin mavisi



Şekil 18. Kontrol grubuna ait hipokampus dokusundan alınan yarı ince kesitin ışık mikroskopik görüntüsü verilmiştir. Kontrol grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinde bulunan piramidal nöronların (N) normal dizilim ve morfolojide olduğu görülmektedir. Çekirdek ve çekirdekçik sınırları belirgin olan nöronların akson uzantıları (Ax) longitudinal ve transvers düzlemdeki görüntüleri ayırt edilmektedir. Kesitteki damar (V) yapılarının sağlıklı olduğu izlenmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 μm 'dir. Boyama: Toluidin mavisi



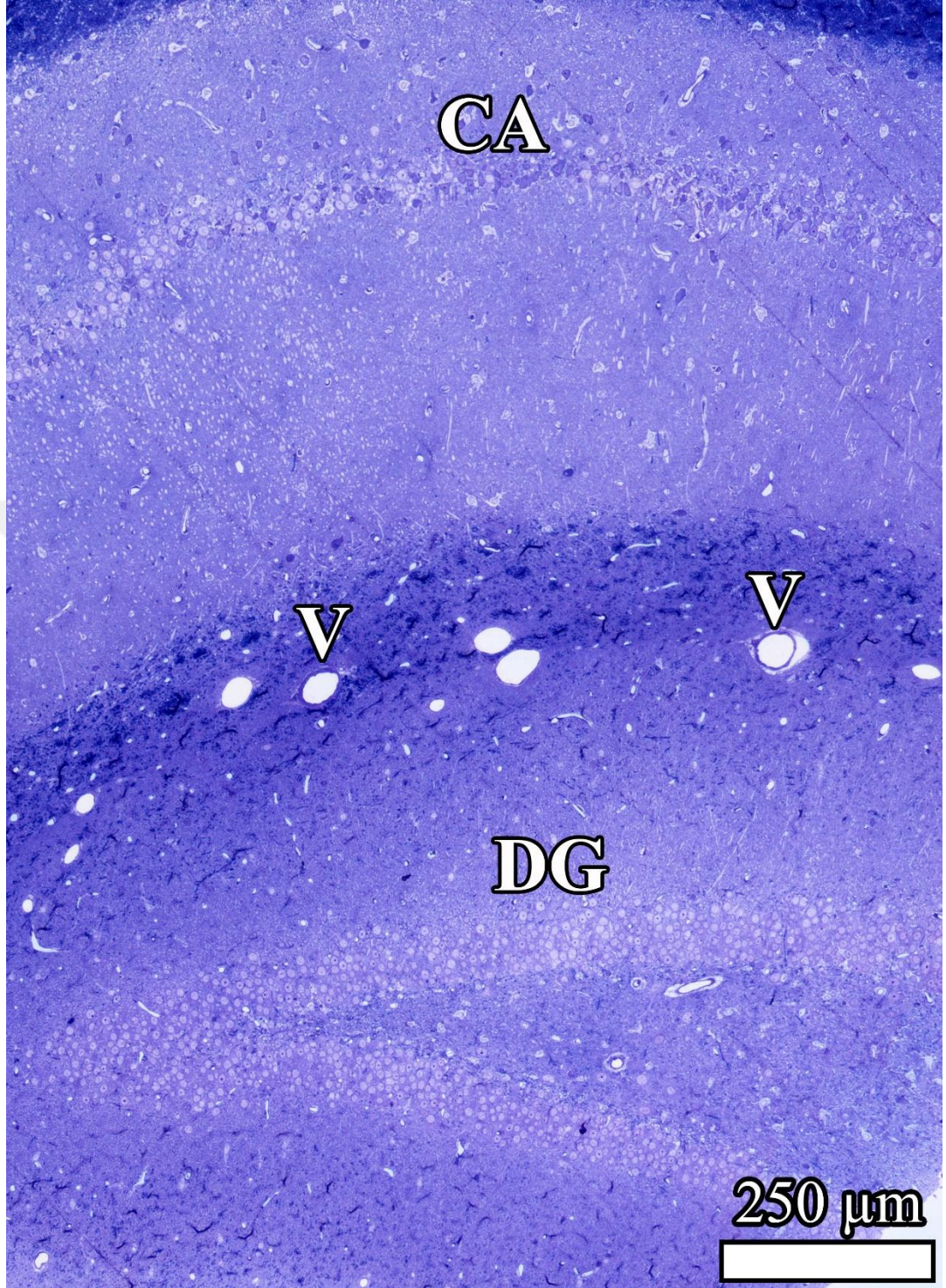
Şekil 19. Kontrol grubuna ait hipokampusun dentat girus bölgesindeki nöronlar (N) ve sinir lifleri görülmektedir. Granüler nöronların arasındaki mesafenin az olduğu ve çoğu hücrenin çekirdek sınırlarının belirgin olduğu ayırt edilmektedir. Hücreler arasında bazı alanlarda uzanan aksonlar (Ax) izlenmektedir. Normal yapıdaki nöronların yanı sıra bazı hücrelerin koyu boyandığı (*) görülmektedir. Bu hücrelerin dejenerasyona uğrayan yapılar olduğu düşünülmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 μm 'dir. Boyama: Toluidin mavisi. V: Damar



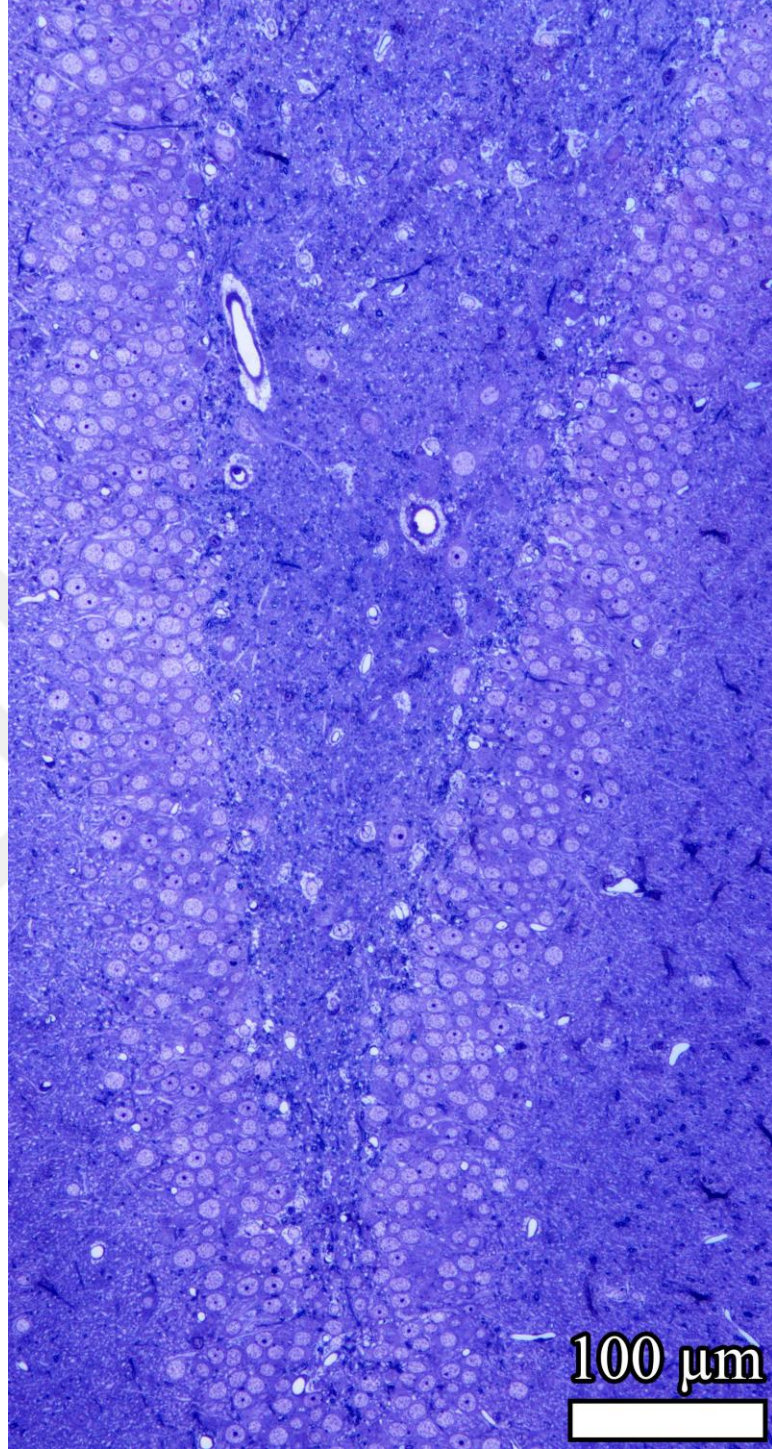
Şekil 20. (A, B) Kontrol grubuna ait hipokampusun dentat girus bölgesinde ve bu bölgeye yakın alanlarda bulunan nöronlar (N), hücresel uzantılar görülmektedir. (A) Hücreler arasında transvers ve longitudinal düzlemde seyir eden aksonlar (Ax) ayırt edilmektedir. (B) Dentat girusa yakın bölgede izlenen büyük çaplı çekirdeğe sahip nöronun (N) cornu ammonis bölgesine ait olduğu düşünülmektedir. Granüler nöronların normal morfolojide olduğu gözlenmektedir. Bu bölgede koyu boyanan (*) hücrelerin fonksiyonlarını kaybeden dejenere yapılar olduğu düşünülmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi. V: Damar.

4.2.2. Sham grubuna ait bulgular

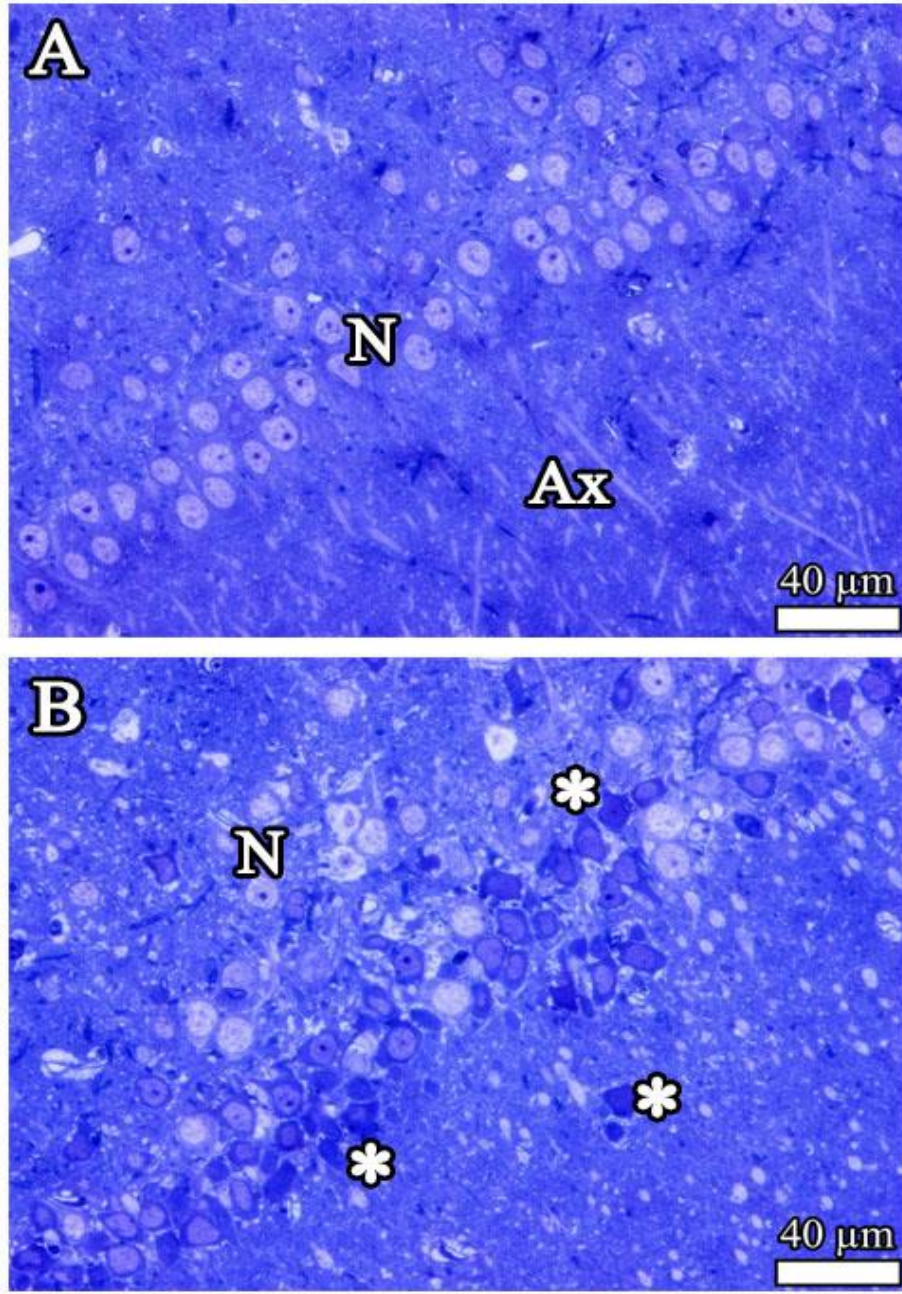
Sham grubuna ait hipokampus bölgesinden elde edilen genel ve büyük büyütmedeki görüntülerde, Cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinde bulunan nöronlar, nöroglia hücreleri ve kapillerlerin histolojik yapıları incelendi. CA bölgesinde bulunan piramidal nöronların çoğunun sağlıklı morfolojide olduğu; bununla birlikte, bazı hücrelerin ise koyu çekirdeğe sahip olduğu ve hücre sınırlarının düzensizleştiği görüldü. Bu hücrelerin dejenere yapılar olduğu ve ölüm sürecine girdikleri düşünülmektedir. CA bölgesindeki bazı alanlarda, hücreler arasındaki mesafenin arttığı gözlemlendi. Nöronların çevresinde transvers ve longitudinal düzlemde kesilmiş, sağlıklı yapıda miyelinli sinir lifleri bulunmaktadır. Dokuda bazı alanlarda, çevre doku ile bütünlüğü bozulan nöroglia hücreleri gözlenmekteydi. DG bölgesindeki granüler hücrelerin arasındaki mesafenin az olduğu ve hücrelerin düzgün dizilim gösterdiği ve sağlıklı yapıda oldukları gözlemlendi. Ayrıca, bazı nöroglia hücrelerinin koyu boyandığı fark edildi. Subgranüler bölgedeki nöroglia hücrelerinin bazılarının çevre doku ile bütünlüklerinin bozulduğu tespit edildi (**Şekil 21-26**).



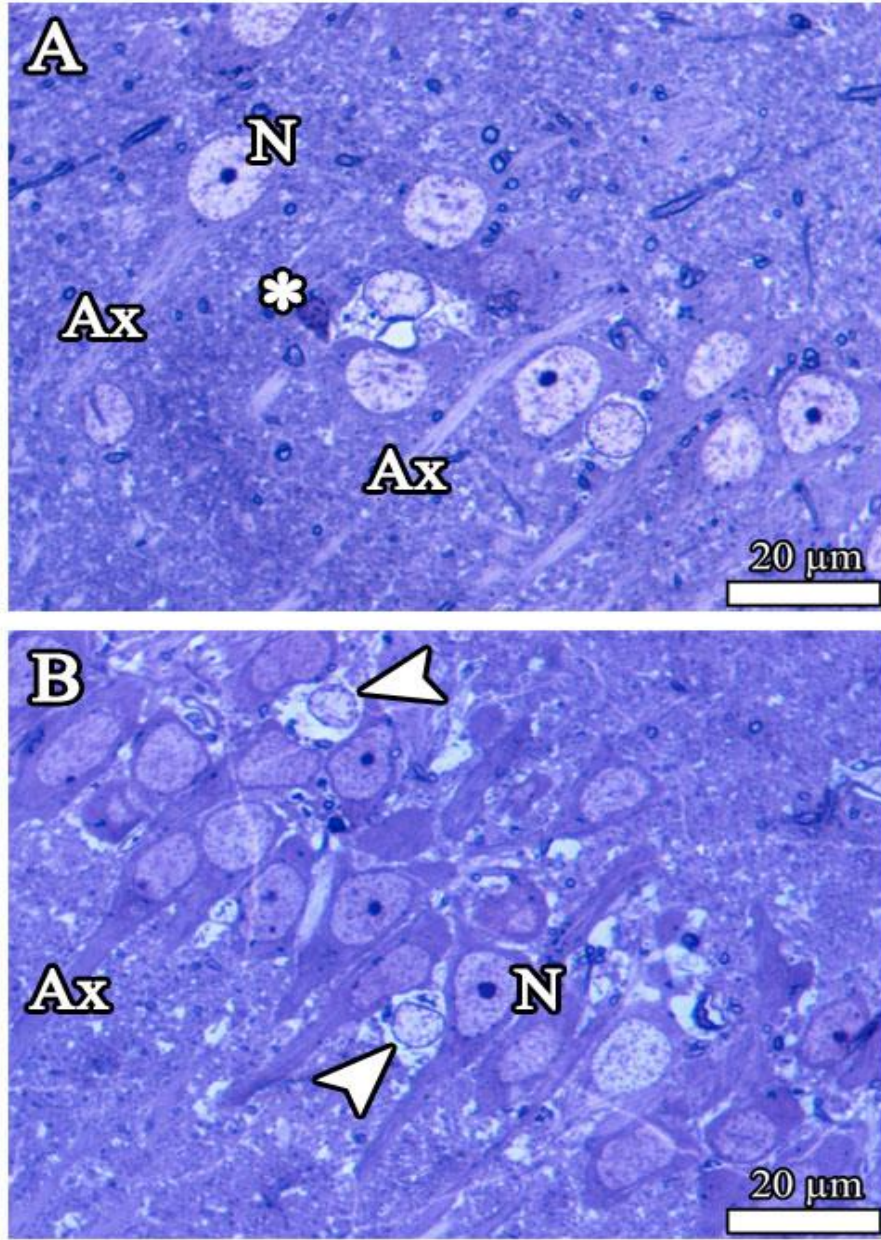
Şekil 21. Sham grubuna ait hipokampus dokusunun genel yapısı görülmektedir. Cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerindeki nöronların normal dizilim gösterdiği ancak, CA bölgesinde bulunan bazı nöronların koyu çekirdeğe sahip oldukları ayırt edilmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 μm 'dir. Boyama: Toluidin mavisi. V: Damar



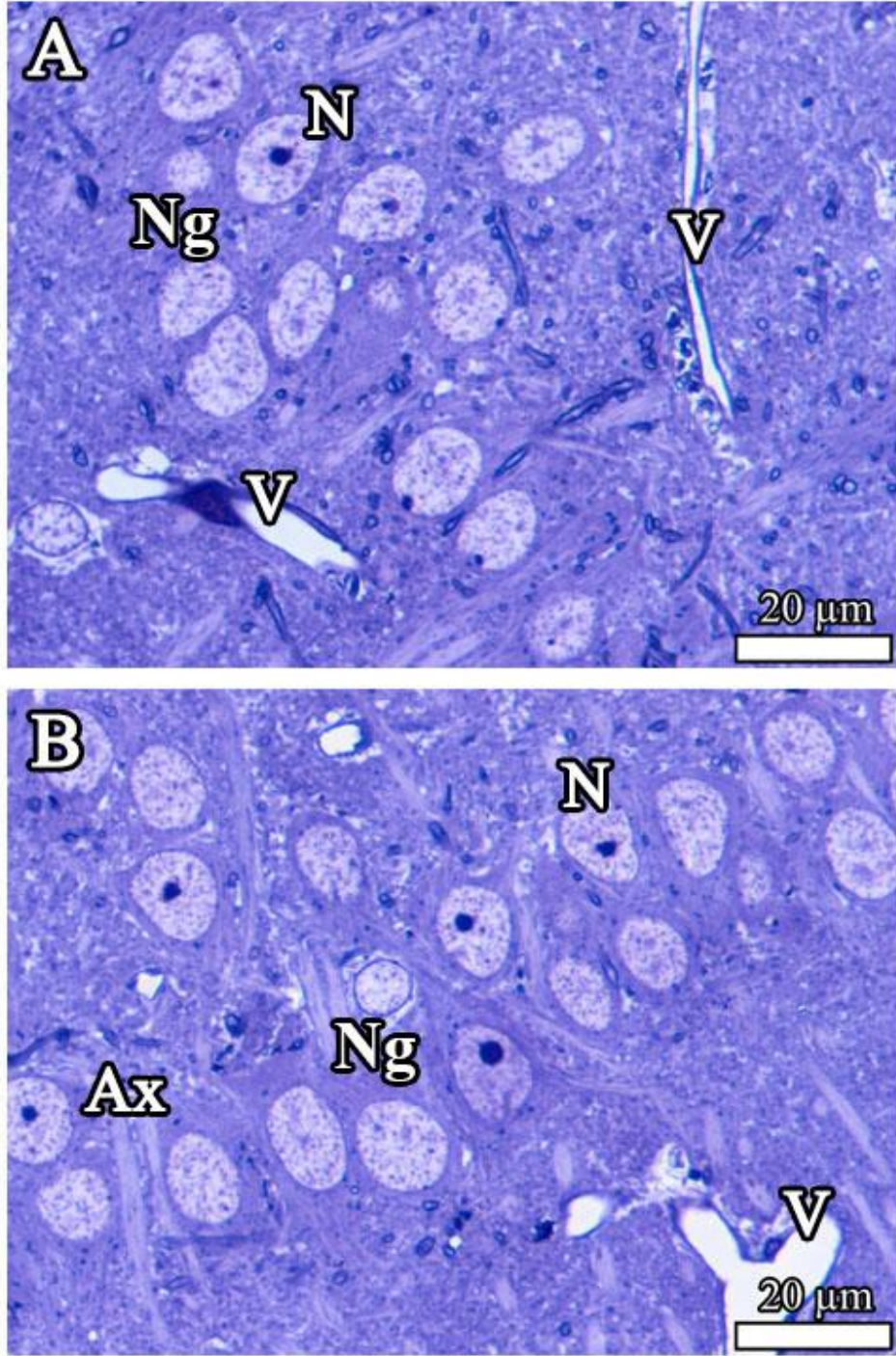
Şekil 22. Sham grubuna ait hipokampusun dentat girus bölgesindeki granüler nöronlar görülmektedir. Granüler nöronların arasındaki mesafenin az olduğu ve normal dizilim gösterdikleri fark edilmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 μm'dir. Boyama: Toluidin mavisi



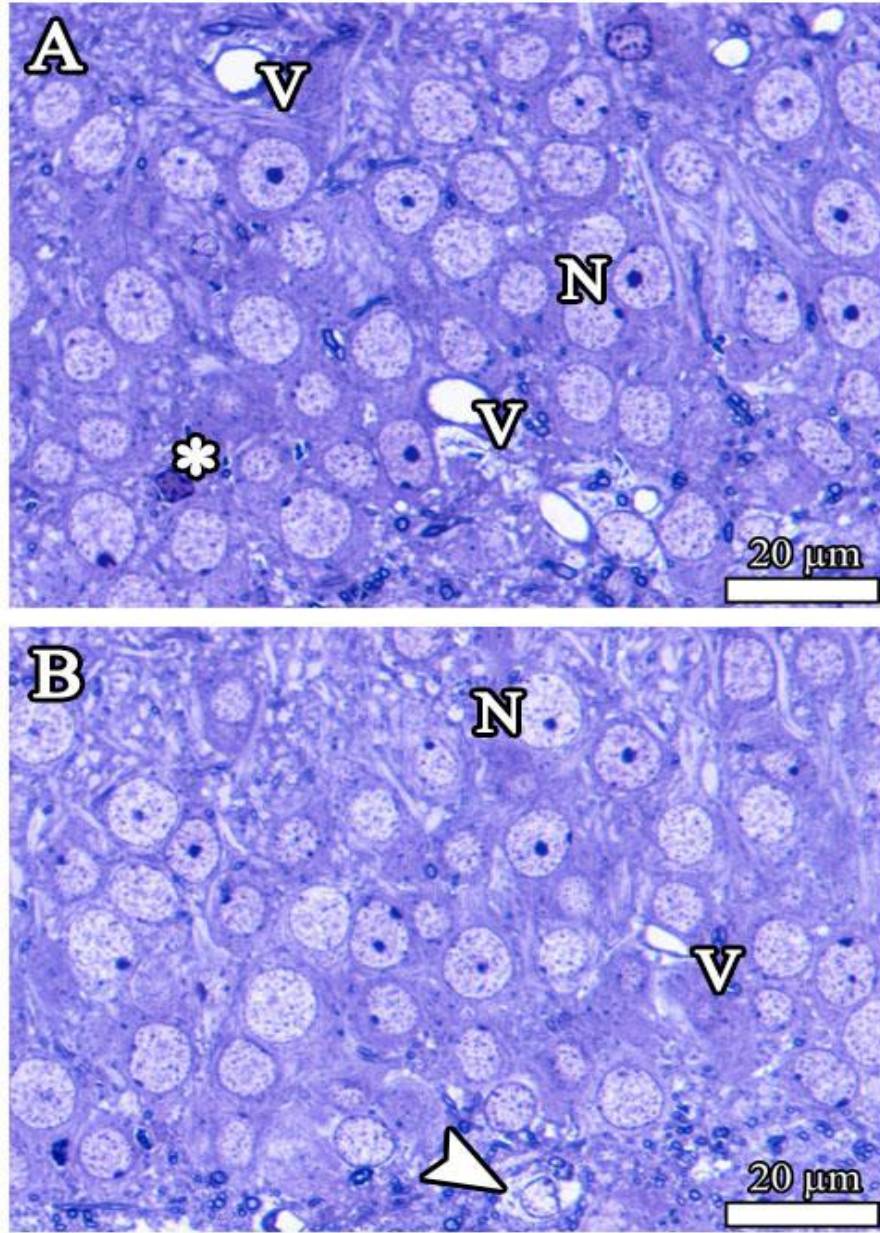
Şekil 23. (A, B) Sham grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinde piramidal nöronlar (N) görülmektedir. (A) Bu bölgedeki piramidal nöronların (N) ve akson uzantılarının (Ax) sağlıklı morfolojide olduğu görülmektedir. (B) CA bölgesindeki bazı piramidal nöronların sitoplazma ve çekirdeklerinin koyu boyandığı (*) ve hücre sınırlarının düzensizleştiği fark edilmektedir. Bu hücrelerin ölüm sürecine giren dejenere yapılar olduğu düşünülmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi



Şekil 24. (A, B) Sham grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesindeki piramidal nöronlar (N) ve onların aksonal uzantıları (Ax) görülmektedir. (A) Piramidal nöronların (N) oval çekirdekleri ökromatik olarak boyanmıştır. Kesitte koyu boyanmış nöroglia hücresi (*) fark edilmektedir. Hücreler arasındaki mesafenin arttığı gözlenmektedir. (B) CA bölgesindeki piramidal nöronların bazılarının akson uzantılarının (Ax) ve hücre perikaryonlarının koyu boyandığı görülmektedir. Çevre doku ile bütünlüğü bozulan nöroglia hücrelerin (ok başı) varlığı dikkat çekmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi.



Şekil 25. (A, B) Sham grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesindeki piramidal nöronların (N), akson uzantılarının (Ax) ve nöroglia hücrelerinin (Ng) normal morfolojide olduğu görülmektedir. Piramidal nöronlar arasındaki mesafenin kısmen arttığı fark edilmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi. V: Damar.

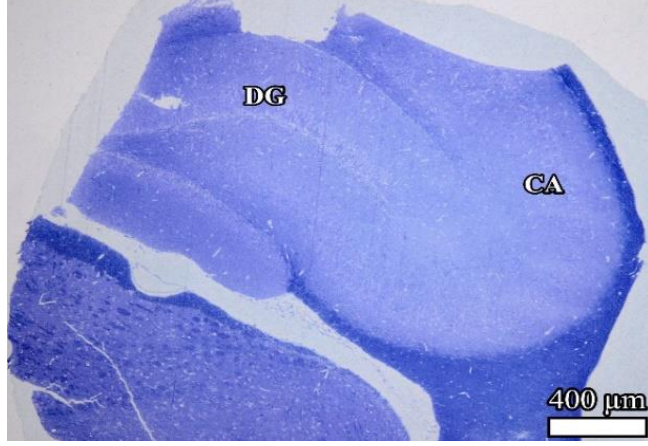


Şekil 26. (A, B) Sham grubuna ait dentat girus bölgesindeki granüler nöronlar (N) gözlenmektedir. Dokudaki damarların (V) normal morfolojide olduğu izlenmektedir. (A) Nöronların çevresinde transvers ve longitudinal düzlemde kesilmiş miyelinli sinir lifleri görülmektedir. Bazı nöroglia hücrelerinin (*) koyu boyandığı fark edilmektedir. (B) Subgranüler bölgede bulunan nöroglia hücrelerinin bazılarının (ok başı) çevre doku ile bütünlüğünün bozulduğu görülmektedir. Rezın bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi

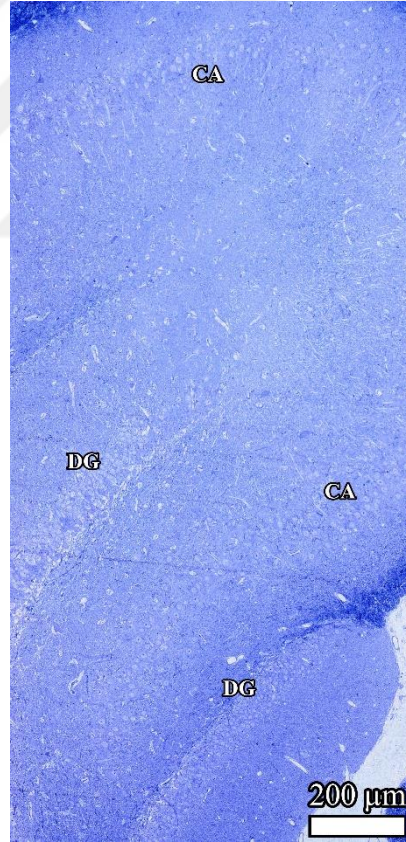
4.2.3. Diyabet grubuna ait bulgular

DM grubuna ait hipokampus bölgesinden elde edilen genel ve büyük büyütmedeki görüntülerde, cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinde bulunan nöronların, nöroglia hücrelerinin ve kapillerlerin histolojik yapısı incelendiğinde, nöronlar arasındaki mesafenin normale göre daha fazla olduğu ve hücre sınırlarının belirgin olmadığı gözlemlendi. CA bölgesindeki oval çekirdekli nöronlar arasındaki mesafenin arttığı, bazı hücrelerin boyutlarının büzüşmeden dolayı küçüldüğü, hücre ve uzantıların sınırlarının belirsizleştiği fark edildi. Bu bölgede bazı nöroglia hücrelerinin çevre doku ile bütünlüklerini koruyamadığı için, etraflarında farklı boyutta boşlukların varlığı dikkat çekiciydi. Piramidal nöronların çekirdeklerinde merkezi yerleşimli çekirdekçiklerin varlığı gözlemlendi. Ayrıca, bazı hücrelerin ve sinir liflerinin koyu boyandığı ve hücre sınırlarının belirsizleştiği görüldü. Koyu boyanan hücrelerin fonksiyonunu yitiren ve daha sonra hızla ortadan kaldırılacak yapılar olduğu düşünülmektedir.

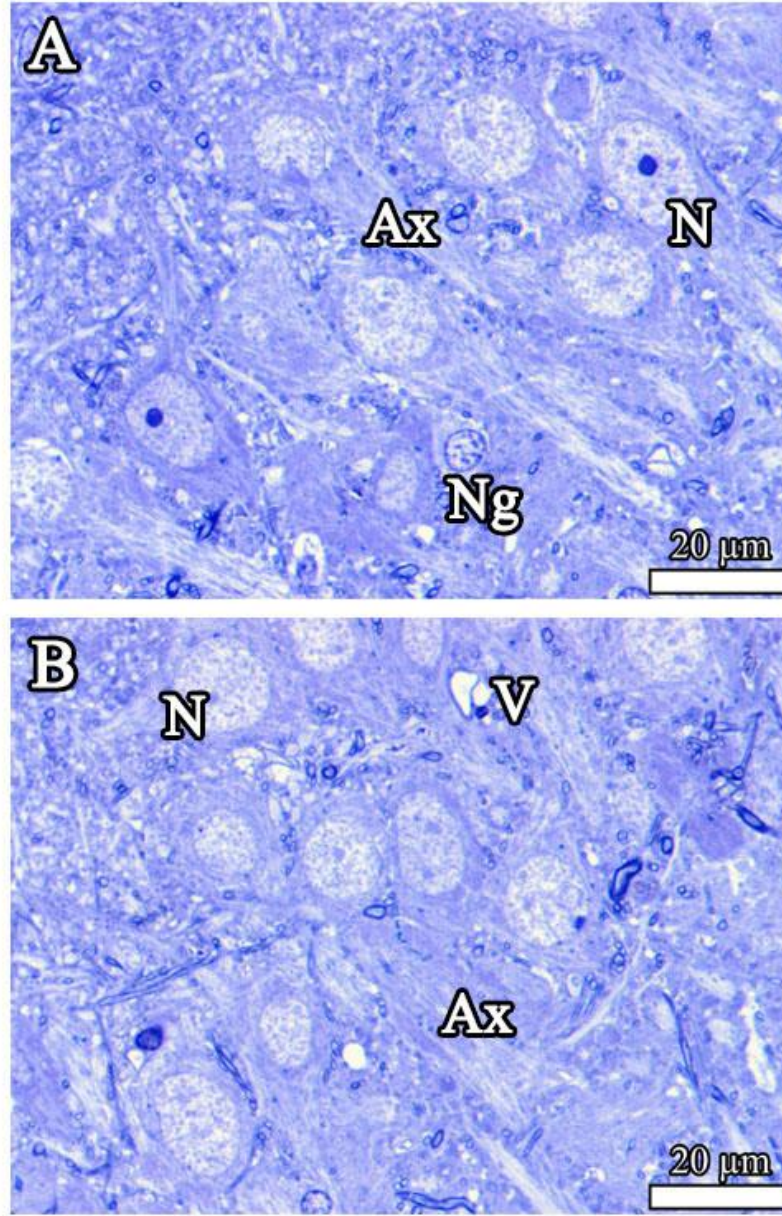
Bu grupta, CA bölgesinde çok sayıda nöronun piramidal şekillerini kaybettiği, çekirdeklerinin deforme olduğu ve nöronlar arasındaki mesafenin de önemli derecede arttığı gözlemlendi. Ayrıca, bu bölgede bazı hücre ve çekirdeklerin sınırlarının belirsizleştiği, bazı nöronların koyulaştığı gözlemlendi. DG kollarının iç kısmına bakan tarafında çok fazla sayıda hücreler arasında vakuollerin oluşması da dikkat çekiciydi. DG bölgesindeki granüler hücrelerdeki biçimsel deformasyonlar göze çarpan nitelikteydi. Granüler tabakadaki bazı alanlarda hücreler arası mesafenin arttığı fark edildi. Bu gruba ait damarlarda duvar yapısının bozulduğu ve endotel hücrelerin koyulaştığı izlendi. Ayrıca, dokudaki bazı damarların etrafında farklı büyüklükte vakuollerin oluştuğu gözlemlendi (**Şekil 33**).



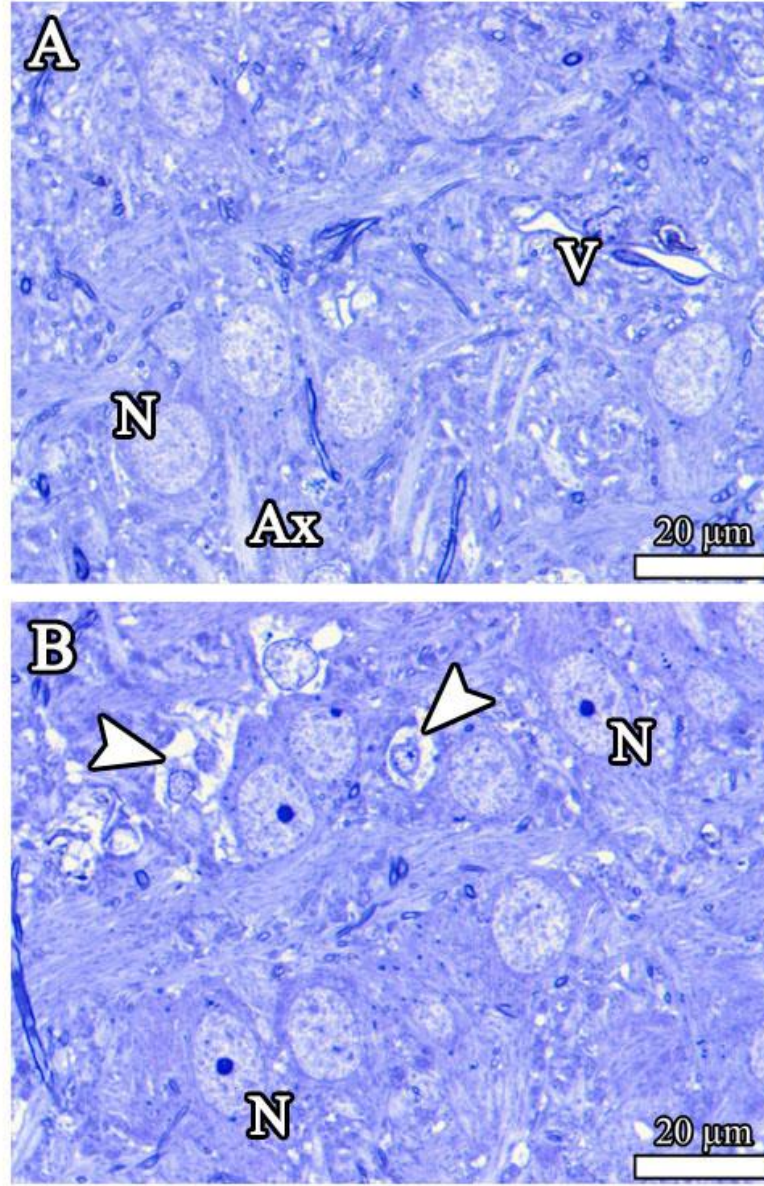
Şekil 27. DM grubuna ait Cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinin genel yapısı görülmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi



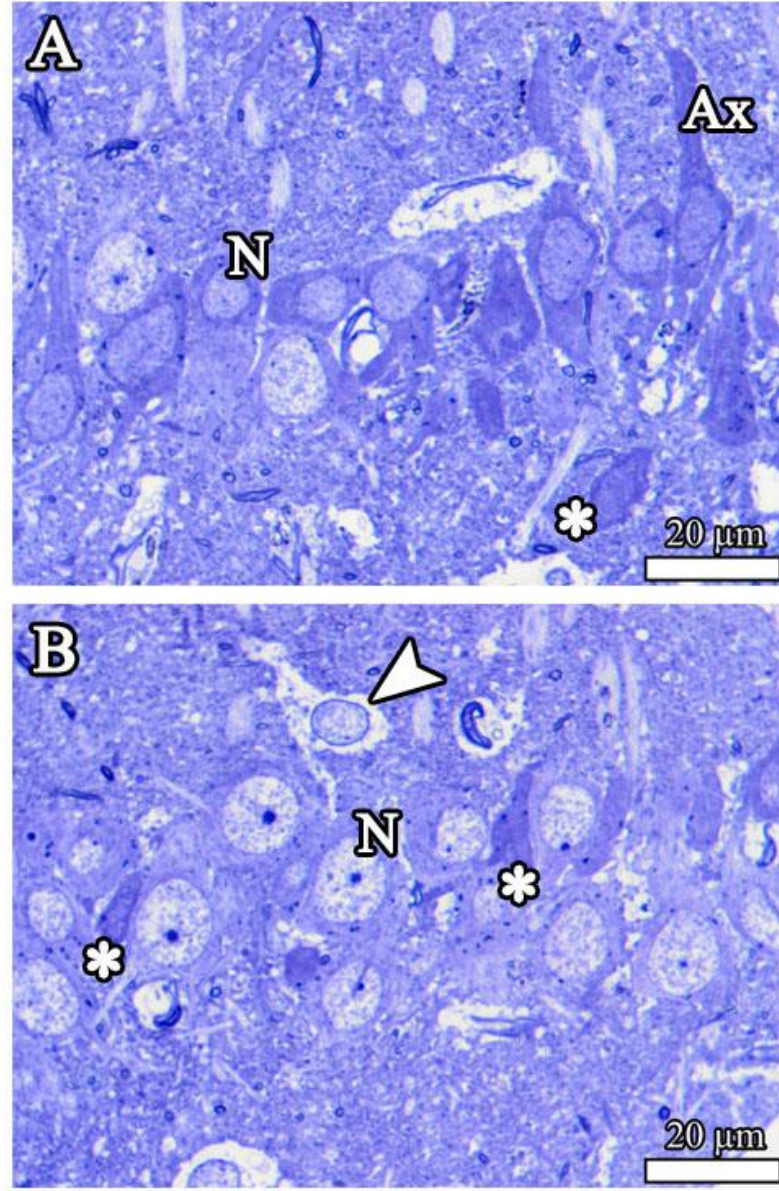
Şekil 28. DM grubuna ait Cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinin genel görüntüsü görülmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi



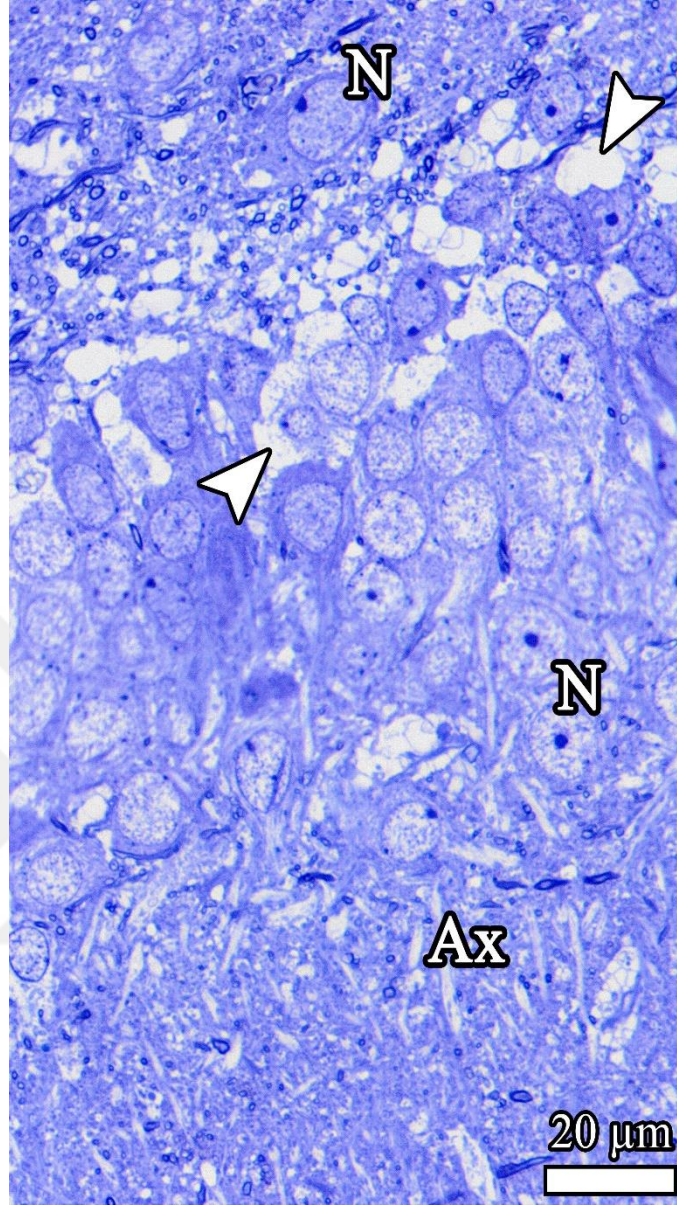
Şekil 29. (A, B) DM grubuna ait hipokampus bölgesindeki nöronlar (N), akson uzantıları (Ax) ve nöroglia hücreleri (Ng) görülmektedir. Nöronlar arasındaki mesafenin normale göre daha fazla olduğu ve çekirdeklerinin ökromatik boyandıkları ve hücre sınırlarının belirsizliği dikkat çekmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi. V: Damar



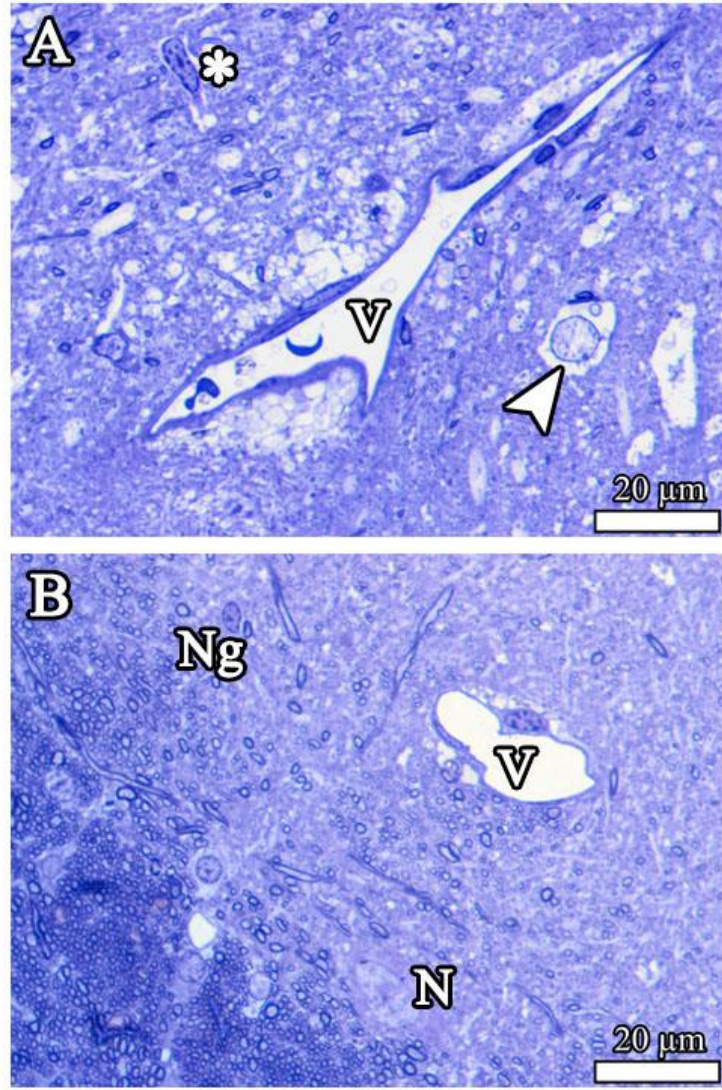
Şekil 30. (A, B) DM grubuna ait hipokampusun cornu ammonis bölgesindeki oval çekirdekli nöronlar (N) ve akson uzantıları (Ax) görülmektedir. Nöronlar arasındaki mesafenin arttığı, hücre boyutlarının büzüşmeden dolayı küçüldüğü, hücre ve uzantıların sınırlarının belirsizleştiği gözlenmektedir. Bazı glia hücrelerinin etrafında önemli denebilecek derecede boşlukların oluştuğu fark edilmektedir (ok başı). Merkezi yerleşimli çekirdekçikler bazı piramidal nöronların çekirdeklerinde gözlenmektedir. (B) Bazı nöroglia hücrelerinin (ok başı) çevre doku ile bütünlüklerini koruyamadıkları ve çekirdek sınırlarının bozulduğu fark edilmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi. V: Damar



Şekil 31. (A, B) DM grubuna ait hipokampusun cornu ammonis bölgesindeki nöronlar (N) ve aksonal uzantıları (Ax) görülmektedir. Bu bölgedeki bazı hücrelerin ve sinir liflerinin bir kısmının koyu boyandığı ve hücre sınırlarının kaybolduğu gözlenmektedir (*). (A) Koyu boyanan hücrelerin fonksiyonlarını yitiren hücreler olduğu, bu hücrelerin daha sonra hızla ortadan kaldırılacak yapılar olduğu düşünülmektedir. Piramidal şekillerini kaybeden nöronlar arasındaki mesafenin de önemli derecede arttığı gözlenmektedir. Çekirdeklerindeki deformasyon da dikkat çekmektedir. (B) Çevre doku ile bütünlüğü bozulan nöroglia hücreleri ayırt edilmektedir (ok başı). Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi.



Şekil 32. DM grubuna ait dentat girus (DG) bölgesindeki granüler nöronlar (N), transvers ve longitudinal düzlemde kesilen aksonlar (Ax) gözlenmektedir. DG bölgesindeki nöronların çoğunun sağlıklı yapıda olmadığı fark edilmektedir. Hücreler arasındaki mesafenin artmasının yanında, hücre ve çekirdek sınırlarının belirsizliği, ayrıca bazı granüler nöronların koyulaştığı gözlenmektedir. Dentat girus kollarının içi kısmına bakan tarafında çok fazla sayıda hücreler arasında vakuollerin oluşması da dikkat çekmektedir (ok başı). Granüler hücrelerdeki biçimsel deformasyonda dikkat çekmektedir. Granüler tabakadaki bazı alanlarda hücreler arası mesafenin arttığı görülmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi.

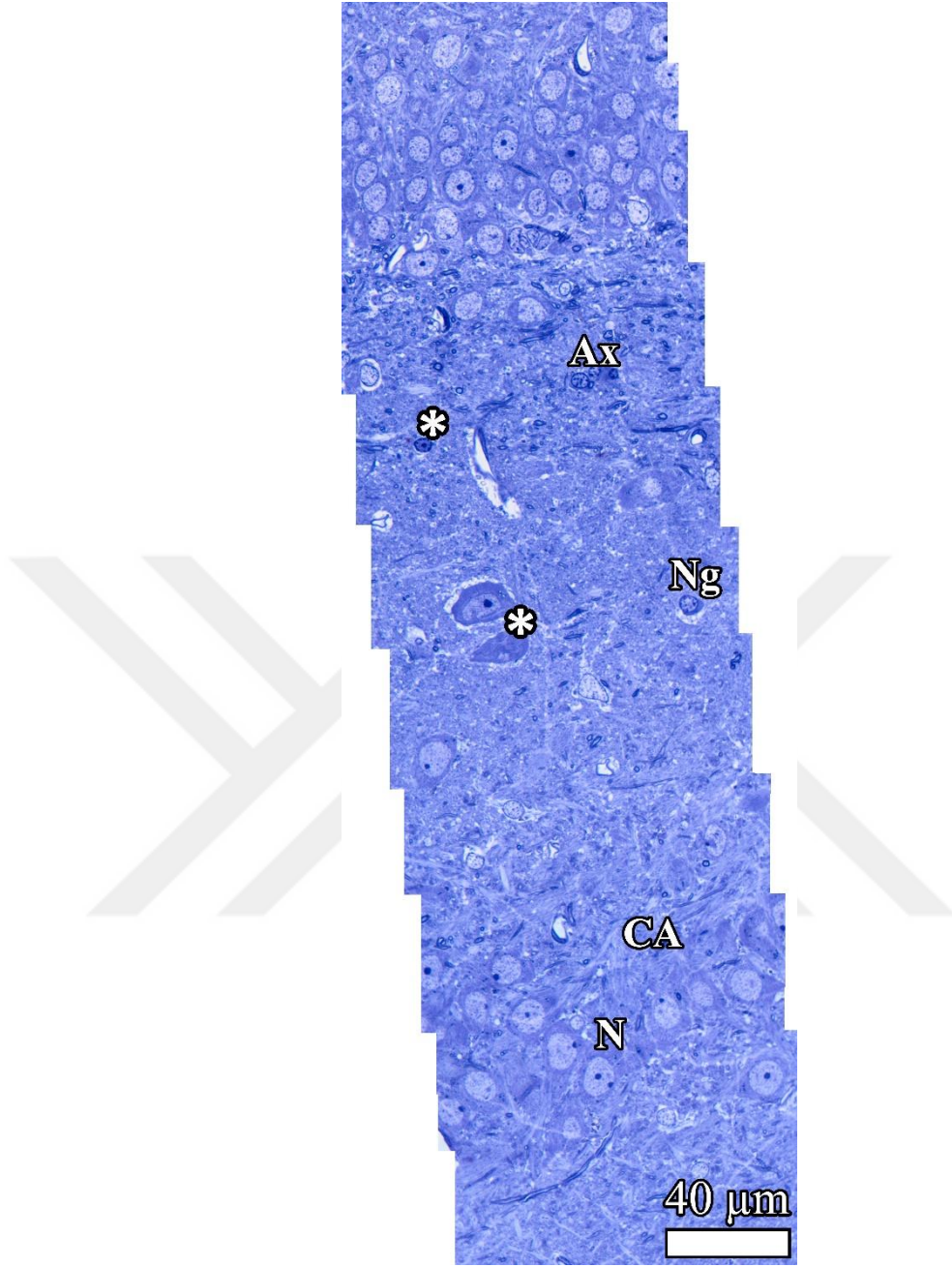


Şekil 33. (A, B) DM grubu hipokampus dokusuna ait yarı ince kesitte damar (V) duvarı yapısının bozulduğu görülmektedir. Damarın iç yüzünü astarlayan endotel hücrelerin koyulaştığı ve damar etrafında farklı büyüklükte vakuollerin oluştuğu fark edilmektedir. (A) Bazı hücrelerin (ok başı) çevre dokudan ayrıldığı görülmektedir. (B) Dokunun genelinde sinir liflerinin yoğun olduğu gözlenmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi. Ng: Nöroglia hücresi; Dejenere hücre: (*).

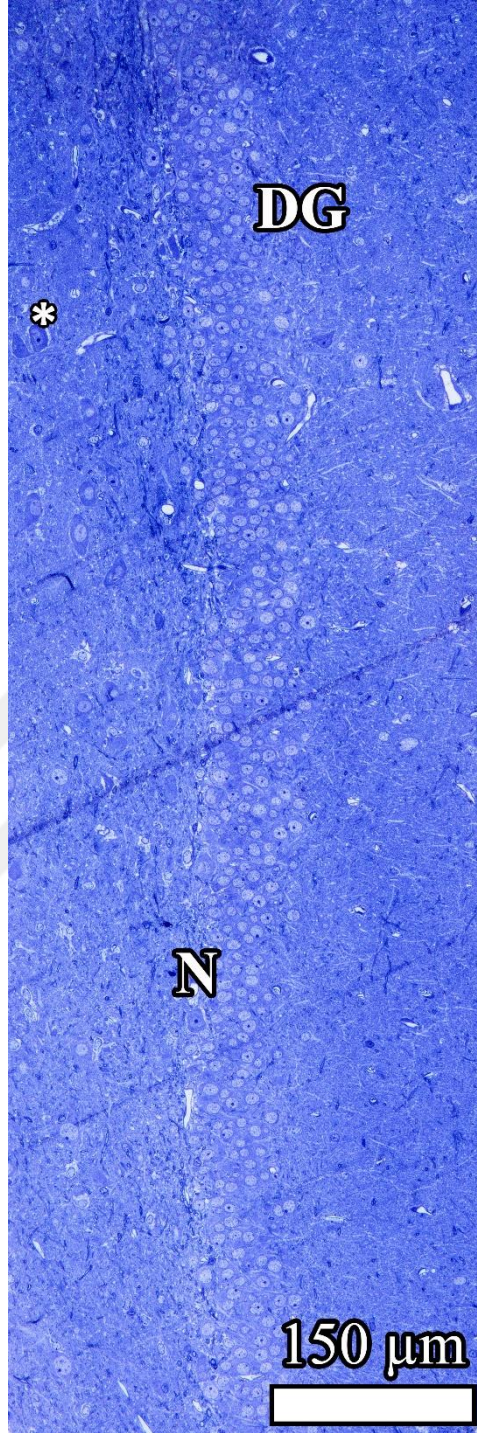
4.2.4. DM + *Garcinia kola* uygulanan grubuna ait bulgular

DM+GK grubuna ait hipokampus bölgesinden elde edilen genel ve büyük büyütmedeki görüntülerde, cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinin histolojik yapısı incelendiğinde, nöronların ve nöroglia hücrelerinin çoğunun sağlıklı yapıda olduğu görüldü. CA bölgesindeki piramidal nöronlar ve akson uzantıları normal dizilimdeydi. Bununla birlikte, nöronların bazı CA bölgelerinde dağınık yerleşimli olduğu ve nöronlar arasındaki mesafenin arttığı görüldü. Bazı piramidal nöronların çekirdekçiklerinin merkezi yerleşimli olduğu gözlenirken, bazılarının çekirdek zarına yakın yerleştiği fark edildi.

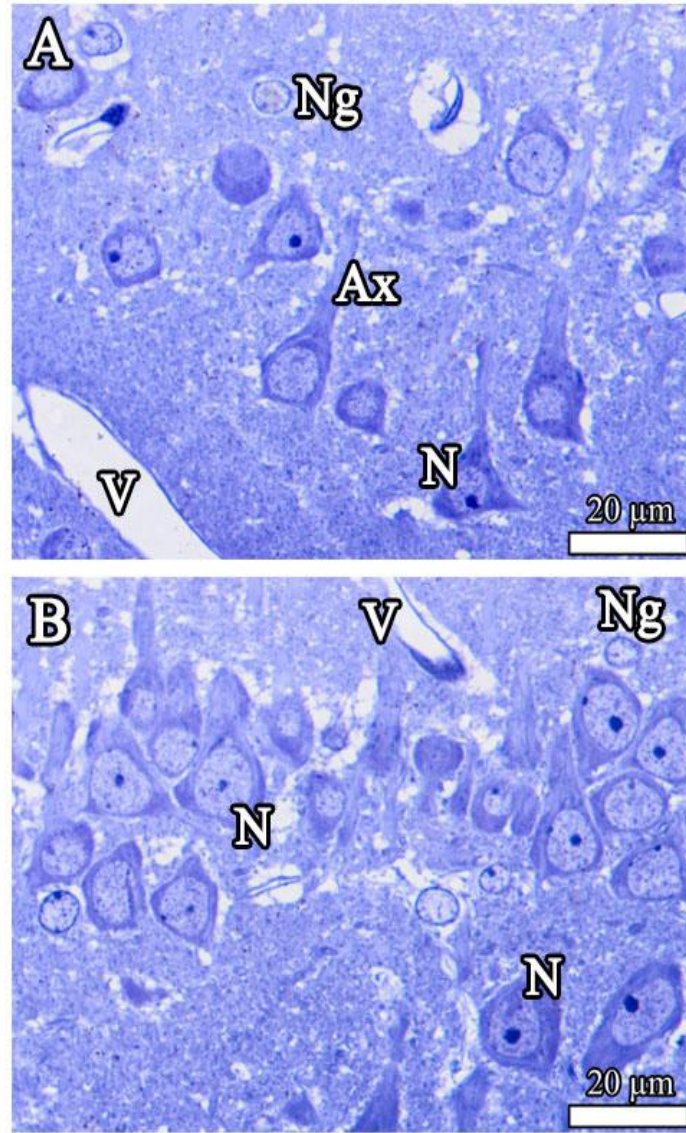
DG bölgesindeki granüler hücrelerin çoğunlukla sağlıklı morfolojide olduğu görülse de bu bölgenin polimorfik tabakasında bazı hücrelerin koyu boyanması, onların dejenerasyon sürecine girdiğini düşündürmektedir. Dokuda, longitudinal ve transvers düzlemde uzanan çok sayıda akson gözlenmekteydi. Dokudaki damarların bazı alanlarda çevre doku ile bütünlüğü yoktu. Bu grupta, perikaryon ve sitoplazmik uzantıları koyu boyanan bazı nöronlara rastlandı. DG'deki ökromatik boyanan granüler nöronların sıkı paketlenildiği ve az sayıda granüler hücrenin çevre doku ile bütünlüğünü koruyamadığı gözlemlendi (**Şekil 37**).



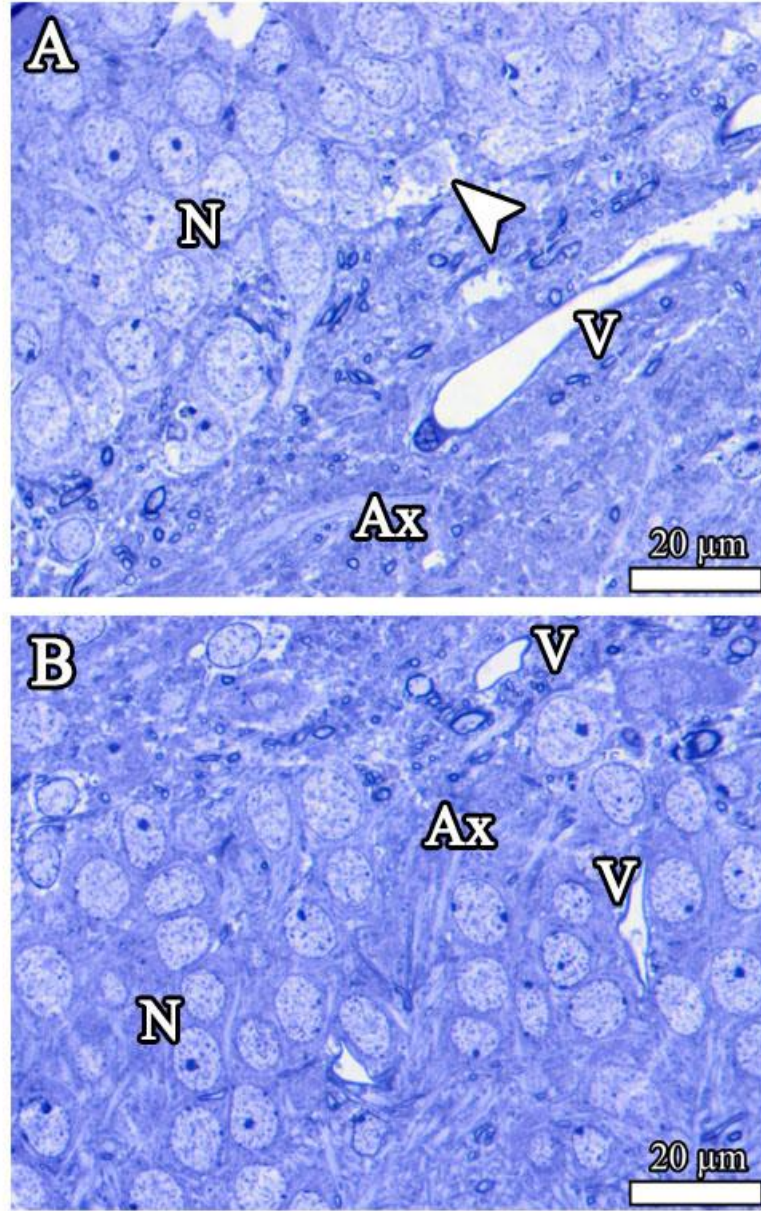
Şekil 34. DM+GK grubuna ait hipokampus bölgesindeki nöronların (N) ve nöroglia hücrelerinin (Ng) çoğunun sağlıklı yapıda olduğu görülmektedir. Cornu ammonis (CA) bölgesindeki piramidal nöronlar normal dizilim göstermektedir. Bununla birlikte DG'nin polimorfik tabakasında bazı koyu boyanan hücrelerin (*) dejenerasyon sürecine girdiği düşünülmektedir. Nöronların çevresinde transvers düzlemde uzanan aksonlar bulunmaktadır. Resin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 μm'dir. Boyama: Toluidin mavisi.



Şekil 35. DM+GK grubuna ait hipokampusun dentat girus (DG) bölgesindeki granüler nöronların (N) normal morfolojide oldukları gözlenmektedir. DG'nin polimorfik tabakasında koyu boyanan hücrelere (*) rastlanmaktadır. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi.



Şekil 36. (A, B) DM+GK grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinde bulunan nöronlar (N), aksonal uzantıları (Ax) ve nöroglia hücreleri (Ng) görülmektedir. Dokuda bulunan damarların (V) çevre doku ile bütünlüğünü bazı alanlarda koruyamadığı fark edilmektedir. Bazı nöronların perikaryon ve sitoplazmik uzantılarının koyu boyandığı gözlenmektedir. (A) Nöronların bazı CA bölgelerinde dağınık yerleşimli olduğu ve nöronlar arasındaki mesafenin arttığı görülmektedir. (B) Nöronların normal dizilim gösterdiği bölgelerde farklı çapta oldukları dikkat çekmektedir. Bazı piramidal nöronların çekirdekçiklerinin merkezi yerleşimli olduğu, bazılarının çekirdek zarına yakın yerleştiği görülmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi.

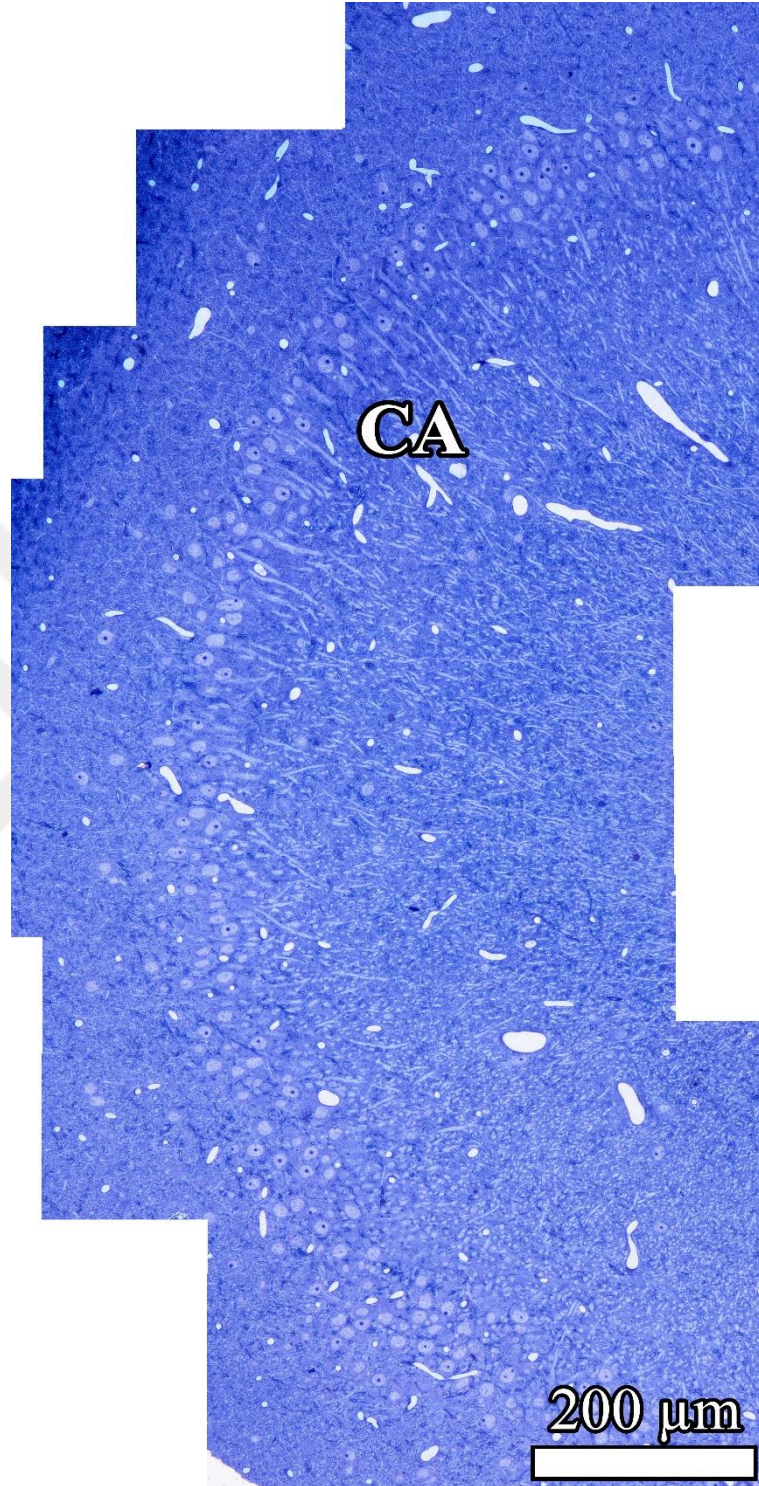


Şekil 37. (A, B) DM+GK grubuna ait hipokampusun dentat girus (DG) bölgesinde bulunan nöronlar (N) ve akson uzantıları (Ax) gözlenmektedir. Dokudaki damarların (V) duvar yapısının normal olduğu ve çevre doku ile bütünlüğünün korunduğu görülmektedir. (A) DG bölgesindeki granüler nöronların arasındaki mesafenin az olduğu ve az sayıda hücrenin çevre doku ile bütünlüğünün korunamadığı (ok başı) dikkat çekmektedir. (B) DG bölgesinde bulunan nöronların çekirdeklerinin ökromatik boyandığı ve nöronlar arasındaki mesafenin bazı bölgelerde arttığı fark edilmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi.

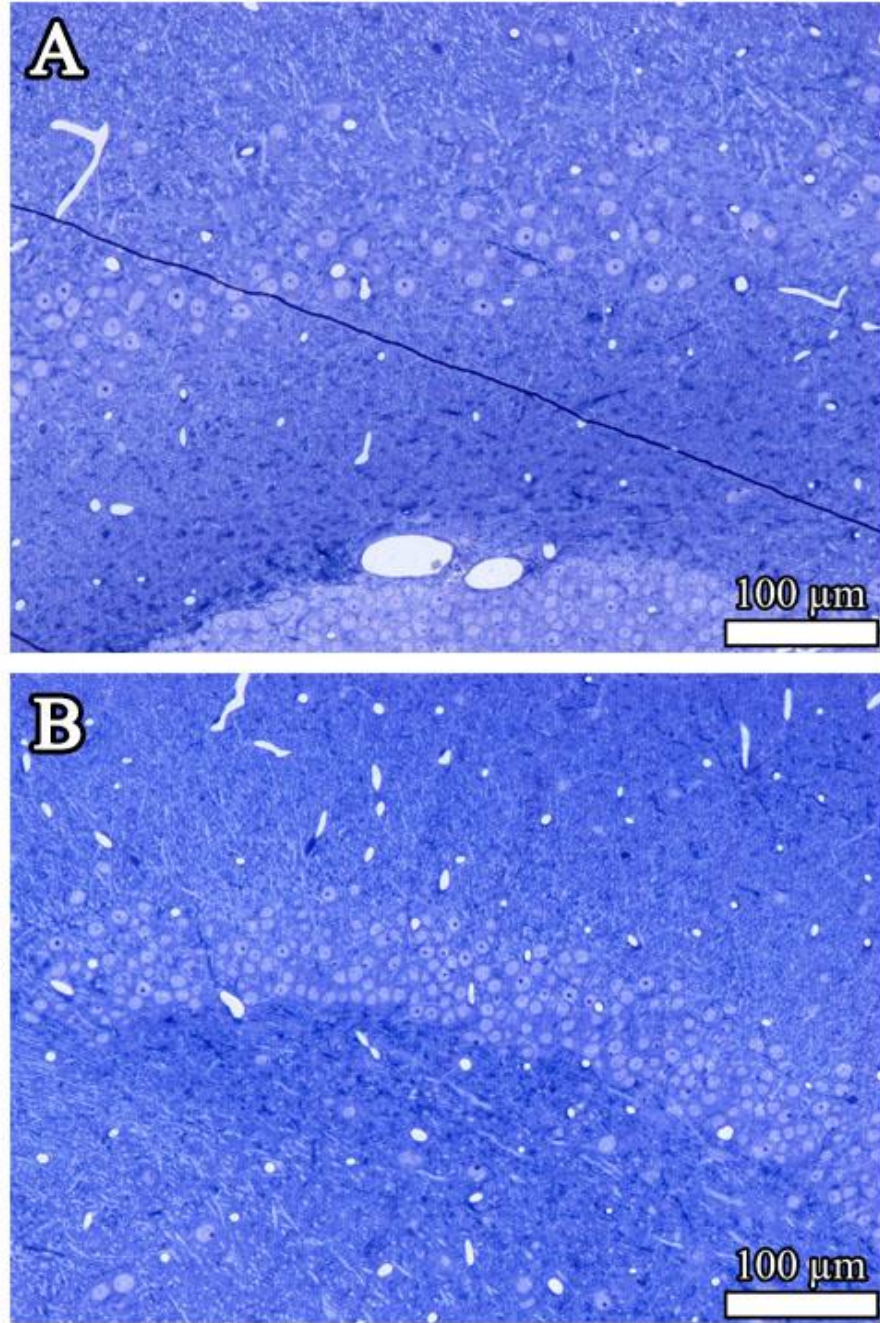
4.2.5. DM + kurkumin grubuna ait bulgular

DM+Cur grubuna ait hipokampus bölgesinden elde edilen genel ve büyük büyütmedeki görüntülerde, Cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerinde bulunan nöronlar, nöroglia hücreleri ve kapillerlerin morfolojik yapısı incelendi. CA bölgesindeki oval biçimli nöronların normal dizilim gösterdiği ve sağlıklı yapıda oldukları görüldü. Ayrıca, bu bölgedeki piramidal nöronların birbirine yakın yerleştiği, çekirdek ve çekirdekçik sınırlarının belirgin olduğu izlendi. DG bölgesindeki granüler nöronlar ve bu bölgeye yakın CA bölgesinde izlenen büyük çaplı nöronların normal morfolojide olduğu tespit edildi. Dokuda farklı düzlemlerde kesilen sinir lifleri ve çok sayıda damar yapısının olduğu gözlemlendi (**Şekil 40**).

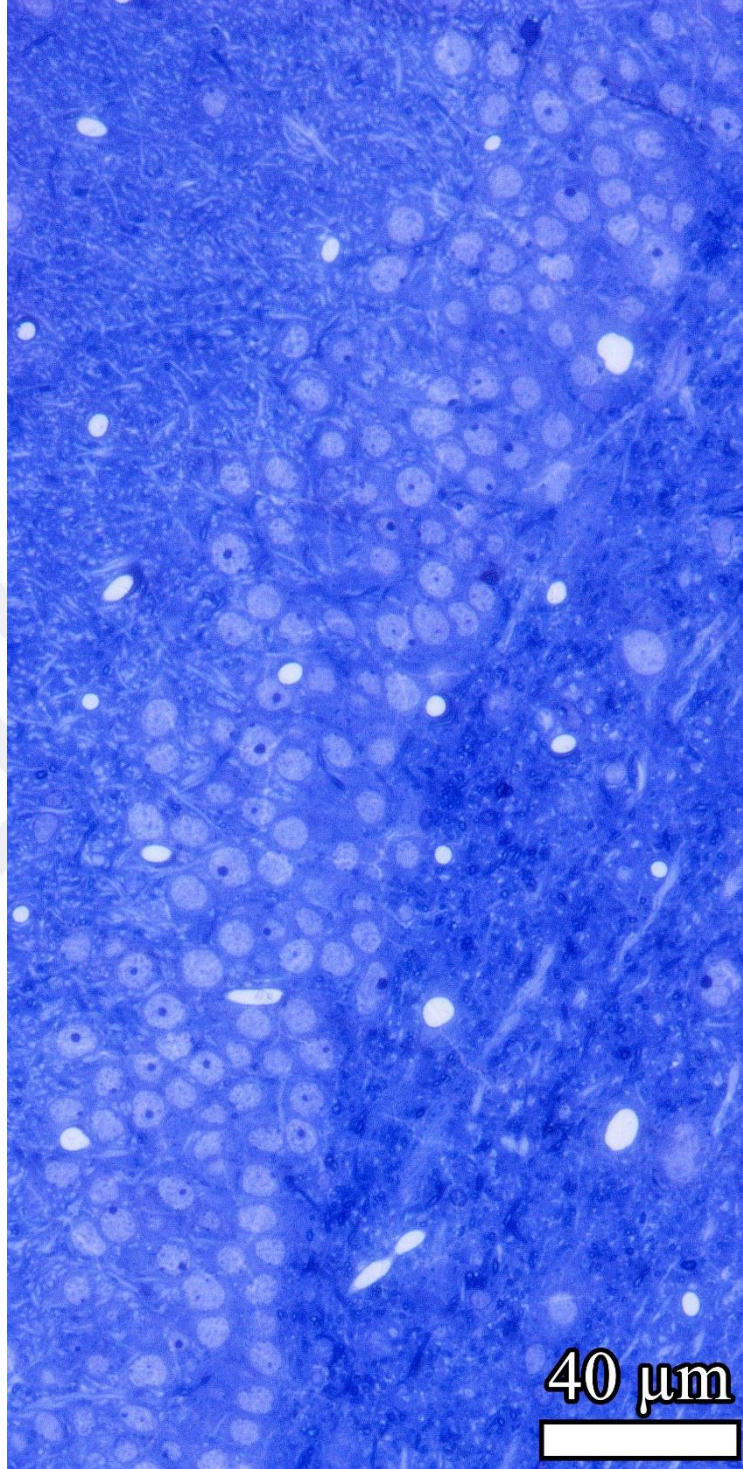




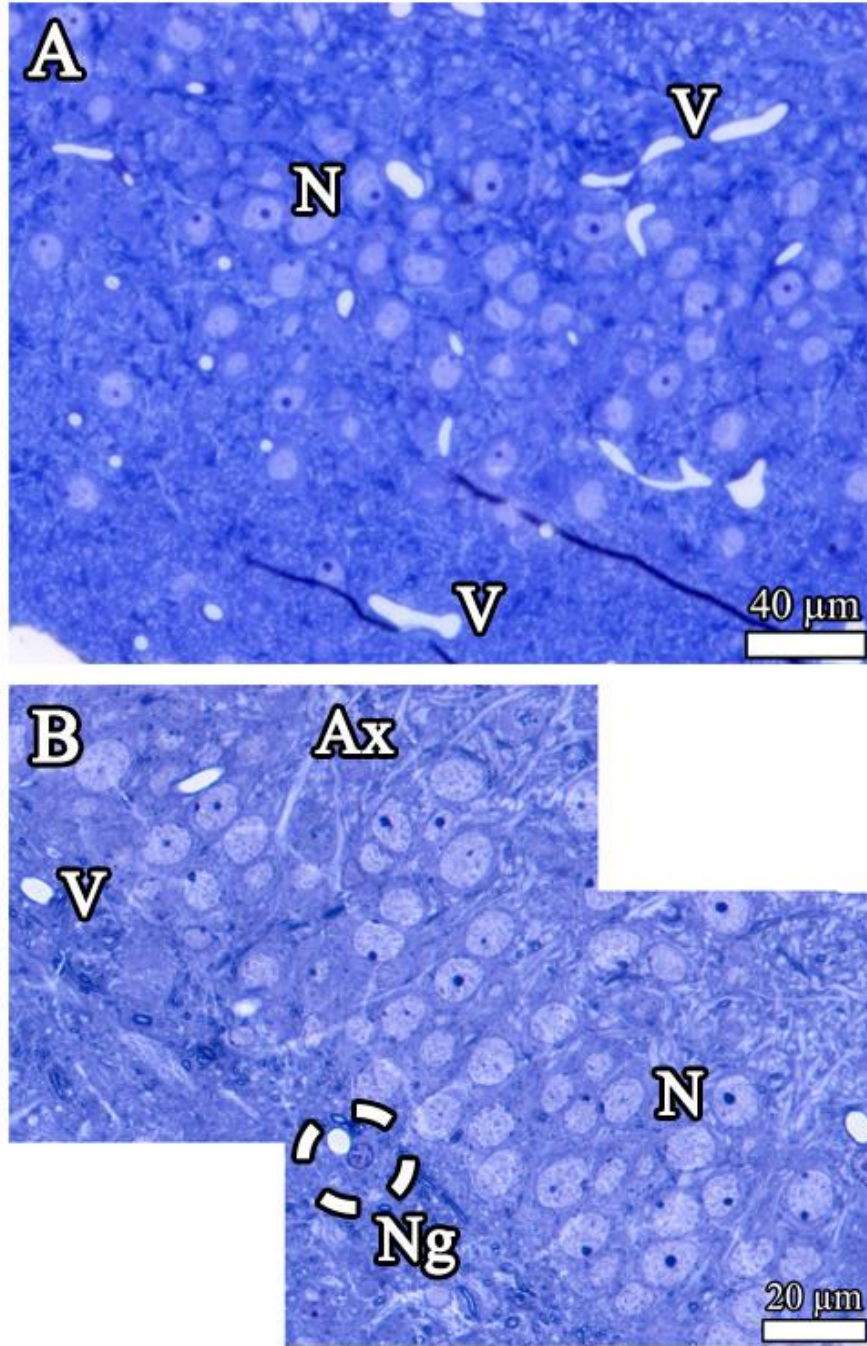
Şekil 38. DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinin genel yapısı görülmektedir. CA bölgesindeki nöronların normal dizilim gösterdiği ve sağlıklı yapıda olduğu gözlenmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 μm'dir. Boyama: Toluidin mavisi.



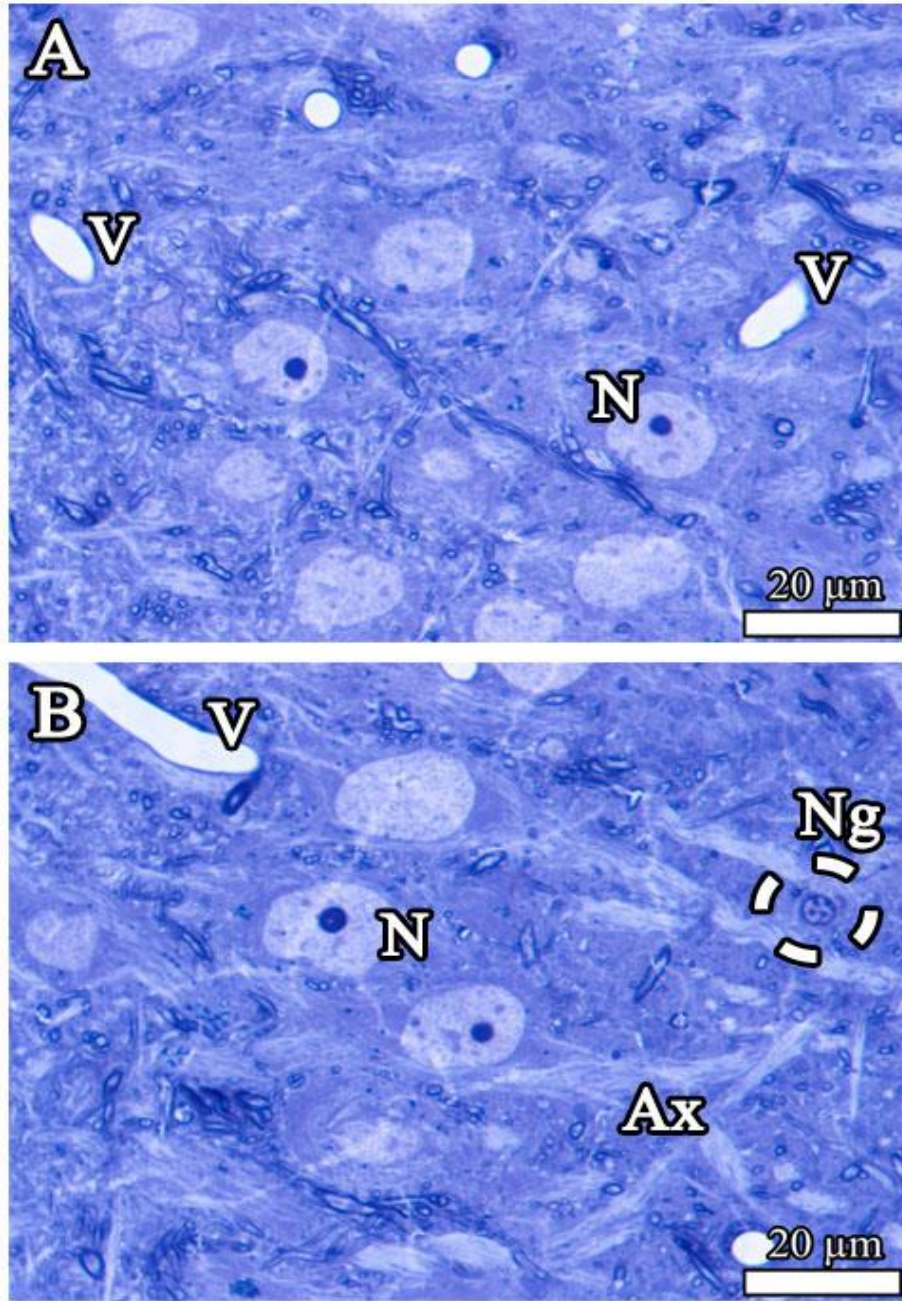
Şekil 39. (A, B) DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerine ait nöronlar (N) ve hücresel uzantıları görülmektedir. (A) CA bölgesindeki piramidal nöronlar arasındaki mesafenin az olduğu, hücrelerin, çekirdek ve çekirdekçik sınırlarının belirginliği fark edilmektedir. (B) Kesitte DG bölgesindeki granüler nöronlar ile bölgeye yakın CA bölgesinde izlenen büyük çaplı nöronların sağlıklı yapıda oldukları gözlenmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi.



Şekil 40. DM+Cur grubuna ait hipokampusun dentat girus (DG) bölgesindeki granüler nöronlar görülmektedir. Ayrıca DG' a yakın CA bölgesinde büyük çaplı nöronların olduğu fark edilmektedir. Kesitte yoğun olarak farklı düzlemlerde kesilen aksonlar ve çok sayıda damar yapısı görülmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 μm 'dir. Boyama: Toluidin mavisi.



Şekil 41. (A, B) DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesindeki nöronlar (N) ve akson yapıları (Ax) görülmektedir. Kesitte transvers ve longitudinal düzlemde uzanan aksonlar, nöronların etrafında görülmektedir. Nöronların, nörogliaların (Ng) ve aksonların normal morfolojide olduğu fark edilmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi. V: Damar.



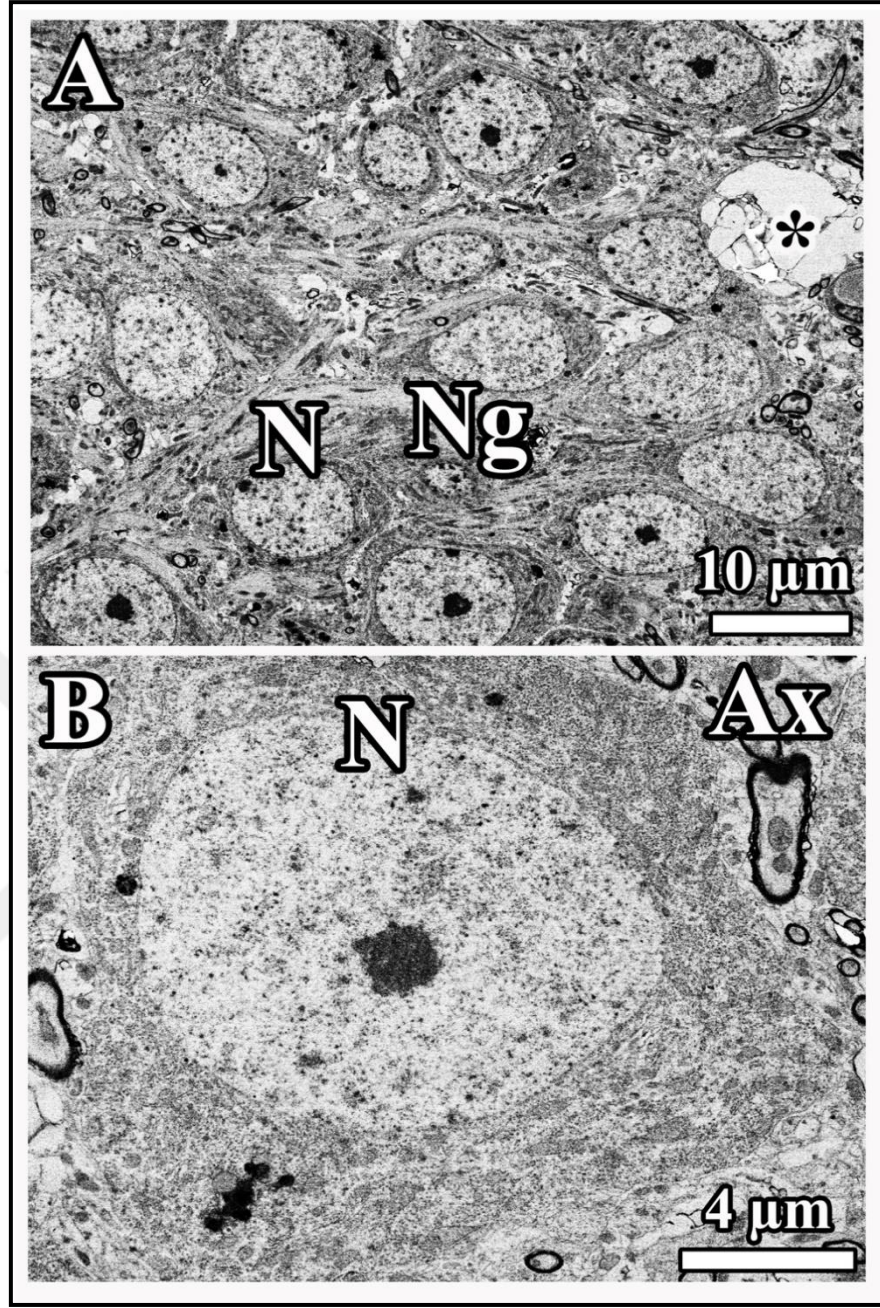
Şekil 42. (A, B) DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesine ait yarı ince kesit görüntüleri verilmiştir. Piramidal nöronların (N) oval çekirdeklere sahip oldukları ve çekirdek sınırlarının belirgin olduğu görülmektedir. Resimde aksonların (Ax) transvers ve longitudinal düzlemde seyrettikleri fark edilmektedirler. (B) Kesitte bulunan nöroglia hücre (Ng) çekirdeklerinin ökromatik boyandığı, çekirdek ve çekirdekçik sınırlarının düzgün olduğu gözlenmektedir. Rezin bloktan alınan kesit, kesit kalınlığı 0,5 µm'dir. Boyama: Toluidin mavisi. V: Damar.

4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular

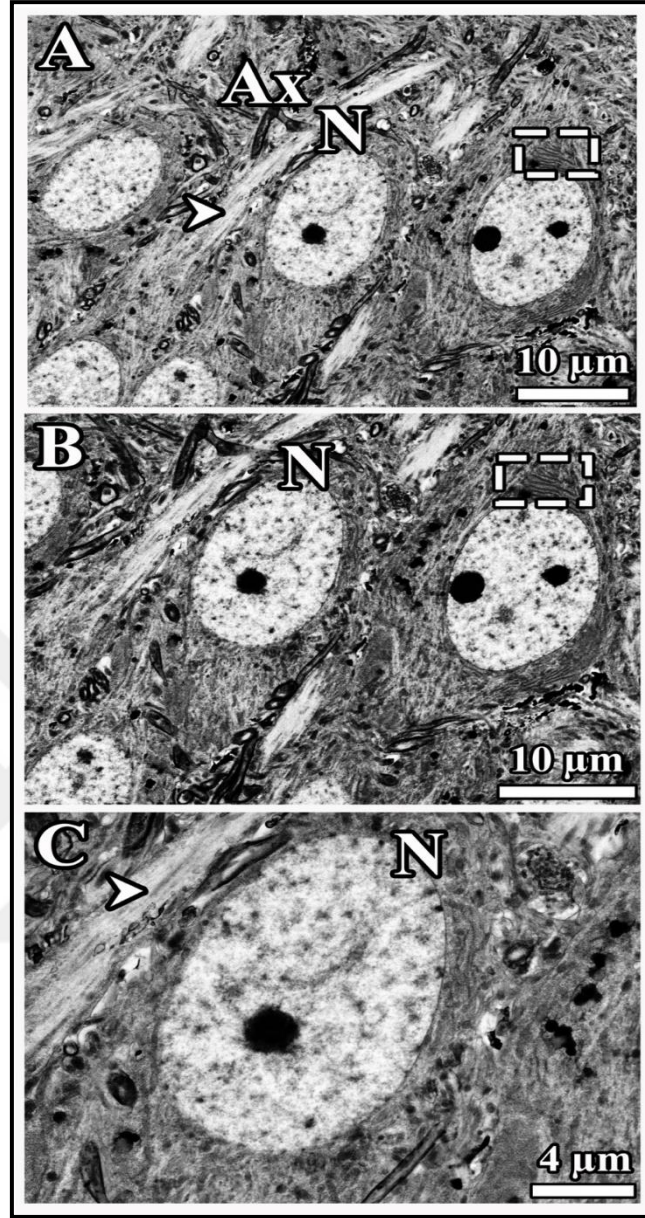
Tüm gruplara ait ince kesitlerden elde edilen elektron mikroskopik görüntülerde, nöronlar, nöroglial hücreleri, aksonal uzantıları ve damarlar morfolojileri ince yapı düzeyinde incelendi.

4.3.1. Kontrol grubuna ait elektron mikroskopik bulgular

Kontrol grubuna ait hipokampus bölgesinin mikrografları incelendiğinde, nöronların ultrastrüktürel yapılarının sağlıklı olduğu, çekirdek ve çekirdekçik sınırlarının belirgin olduğu gözlemlendi. Dokuda yoğun olarak transvers ve longitudinal düzlemde kesilen sinir lifleri normal morfolojideydi. Bazı alanlarda, doku takip prosedürlerinden kaynaklanan artefaktlara rastlanıldı. Bu grupta, hücre organelleri bakımından zengin olan nöronlar bulunmaktaydı. CA bölgesinde bulunan piramidal nöronların çekirdek ve çekirdekçik sınırlarının belirgin, çekirdek yapılarının oval biçimli ve ökromatik boyandığı gözlemlendi. Nöronların etrafında bulunan aksonlar, normal bir kılıf yapısına sahipti. CA ve DG bölgelerindeki nöronların organel yapıları korunmuş olup, granüllü endoplazmik retikulum keseleri kolayca ayırt edilebilmekteydi (**Şekil 44**).



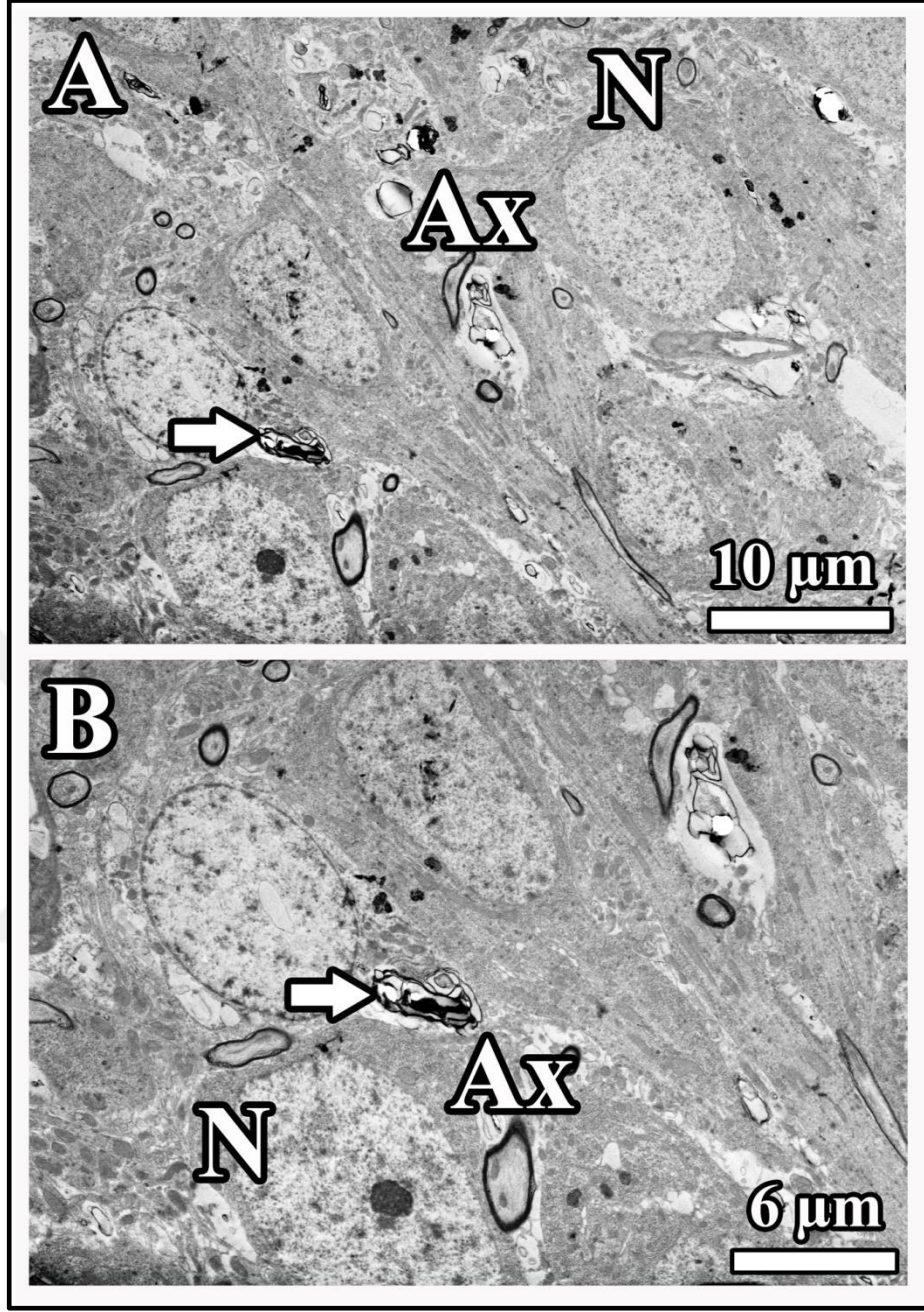
Şekil 43. (A, B) Kontrol grubuna ait hipokampus bölgesinde bulunan nöron (N) ve nöroglia hücre (Ng) yapısı görülmektedir. Nöronların sağlıklı yapıda olduğu, çekirdek ve çekirdekçiklerinin sınırlarının belirginliği dikkat çekmektedir. (A) Kesitte transvers ve longitudinal düzlemde kesilen sinir liflerinin varlığı görülmektedir. Bazı alanlarda doku takip prosedürlerinden kaynaklanan artefaktlara da (*) rastlanılmaktadır. (B) Hücre organelleri bakımından zengin olan nöronun etrafında gözlenen aksonlar (Ax) normal yapıdadır.



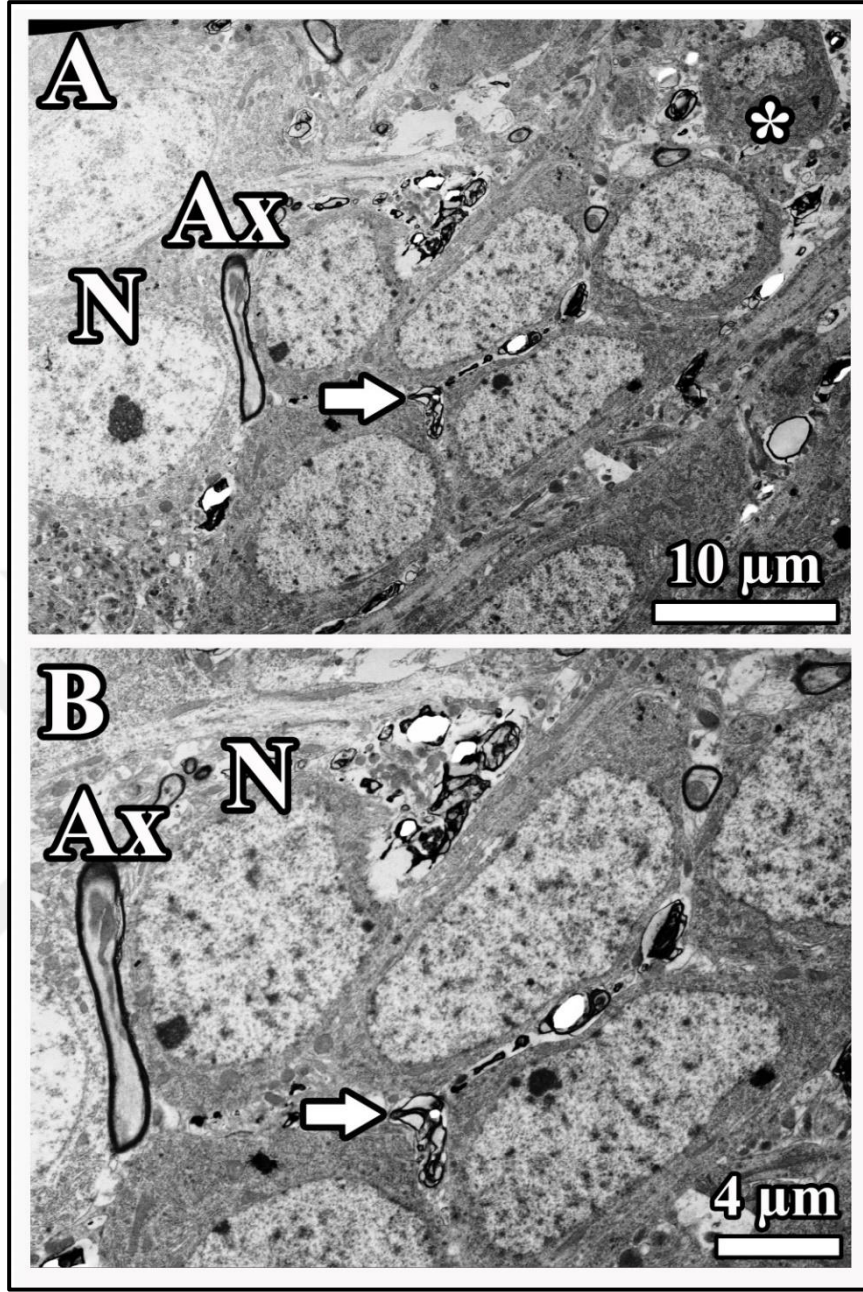
Şekil 44. (A, B, C) Kontrol grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesindeki sağlıklı piramidal nöronlar (N) görülmektedir. Nöronların çekirdek ve çekirdekçik sınırlarının belirgin, çekirdek yapılarının oval biçimli ve ökromatik olduğu fark edilmektedir. (A) Nöronların etrafında bulunan aksonların (Ax) normal bir kılıf yapısına sahip olduğu görülmektedir. (A, B) Nöronların organel yapıları korunmuş olup granüllü endoplazmik retikulum keseleri (kesikli çizgili dikdörtgen) ayırt edilebilmektedir. (A, B, C) Kesitte longitudinal düzlemde uzanan sinir lifleri (ok başı) sağlıklı yapıdaydı.

4.3.2. Sham grubuna ait elektron mikroskopik bulgular

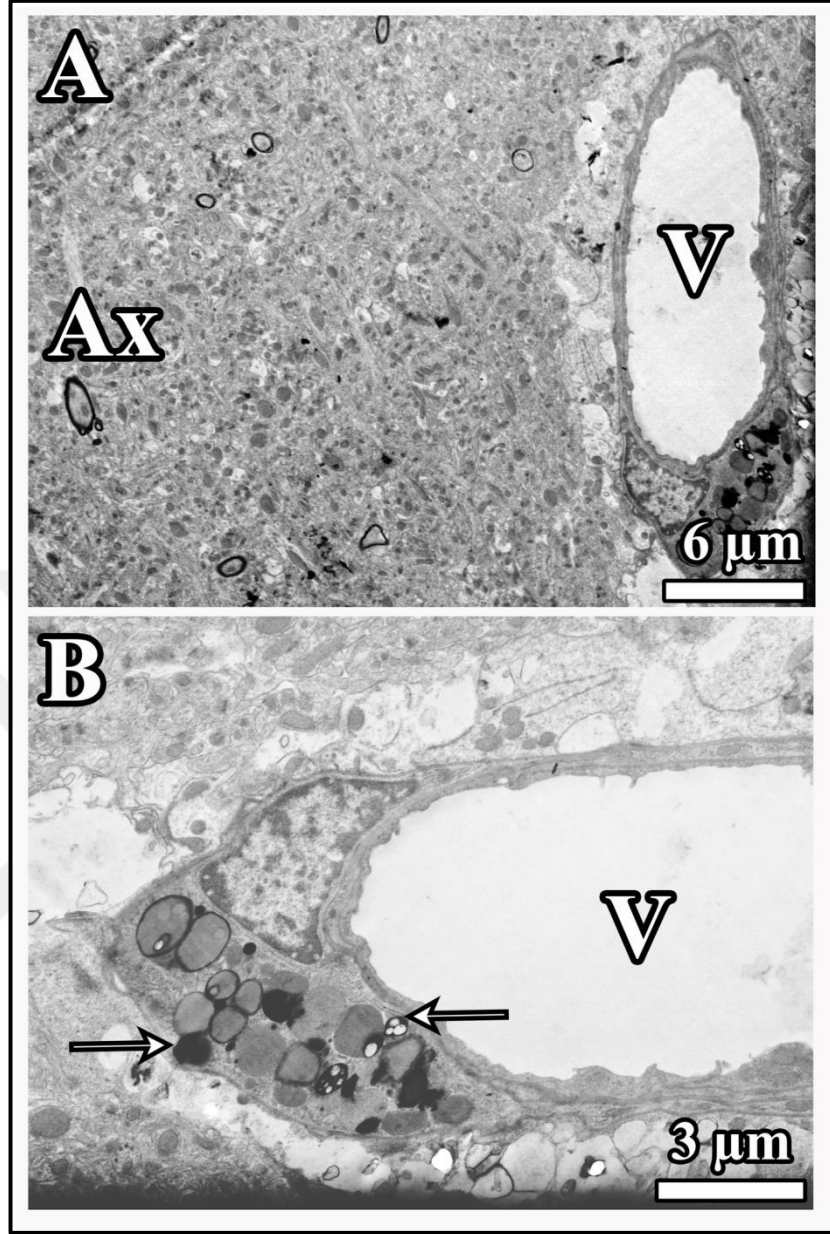
Sham grubuna ait hipokampus bölgesinin mikrografları incelendiğinde, büyük ve küçük çaplı nöronların sağlıklı yapıda olduğu ve çekirdeklerinin ökromatik boyandığı gözlemlendi. Ayrıca, çekirdek ve çekirdekçik sınırları kolayca ayırt edilmekteydi. Nöronların çevresinde transvers düzlemde kesilen çok sayıda aksona rastlandı. Bununla birlikte, bazı aksonların kollapş olduğu gözlemlendi. Çekirdekçığı merkezi yerleşimli olan sağlıklı nöronların yanı sıra bazı hücrelerin sitoplazmalarının koyulaştığı ve çekirdeğinin büzüştüğü görüldü. Dokuda damar yapısının ve çevre doku ile olan bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi. Dokudaki aksonların çoğunun transvers düzlemde kesildiği, çoğunlukla küçük çaplı oldukları fark edildi. Dokuda, damar duvarının etrafında yerleşmiş ve sitoplazmasında çok sayıda fagosite edilmiş maddeler bulunduran mikrogliya hücrelerine de rastlandı. Çoğu damar duvar yapısının normal morfolojide olduğu gözlemlendi. CA bölgesindeki hücreler arası mesafenin az olduğu ve nöronların düzgün dizilim gösterdiği fark edilmekteydi (**Şekil 48**).



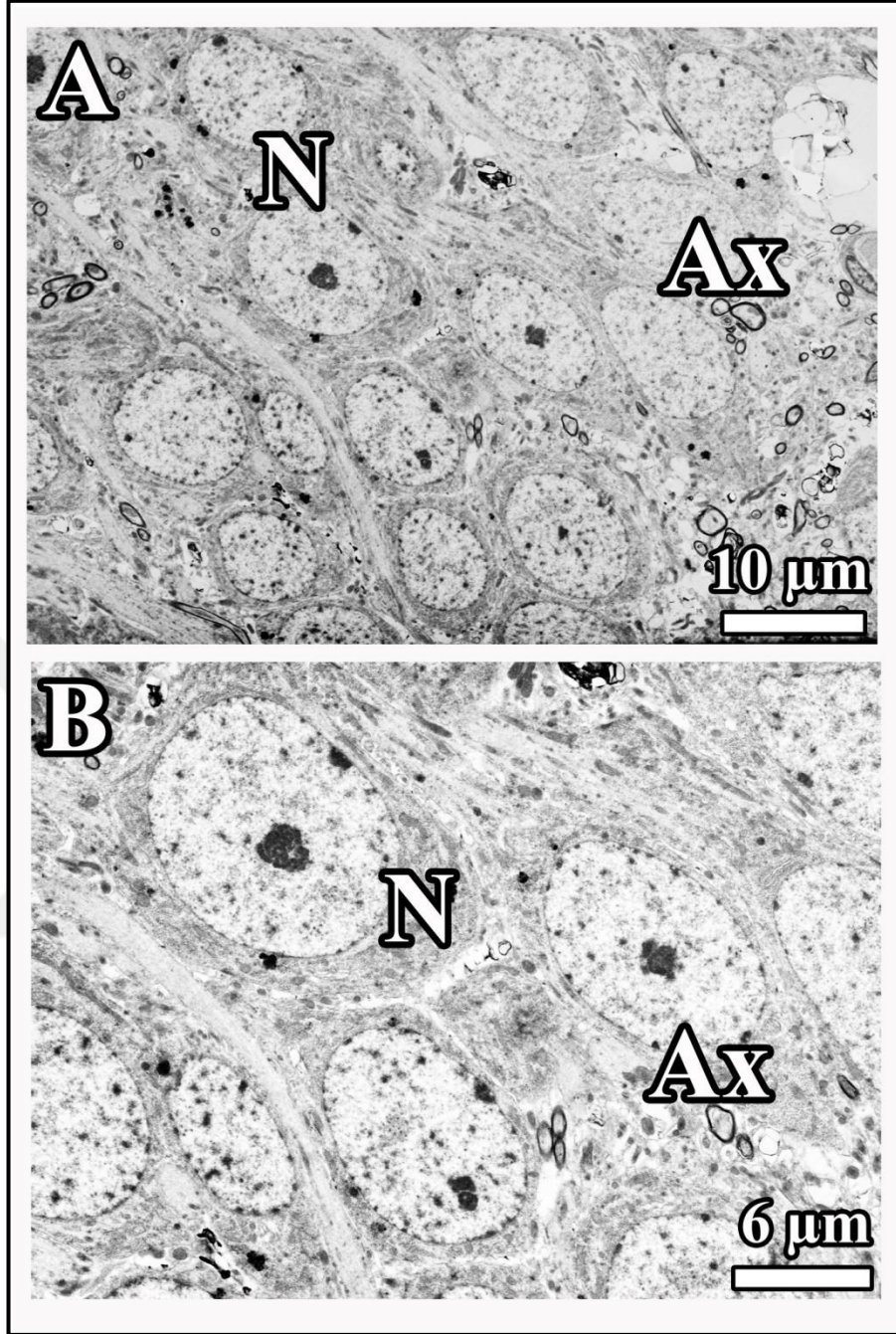
Şekil 45. (A, B) Sham grubuna ait hipokampus bölgesindeki nöronlar (N) görülmektedir. Sağlıklı yapıdaki hücrelerin çekirdeklerinin ökromatik boyandığı görülmektedir; çekirdek ve çekirdekçik sınırları kolayca ayırt edilebilmektedir. Nöronların çevresinde transvers düzlemde kesilen aksonlar (Ax) gözlenmektedir. Bazılarının miyelin kılıflarının bozulduğu fark edilmektedir (ok).



Şekil 46. (A, B) Sham grubuna ait hipokampus bölgesindeki büyük ve küçük çaplı nöronların (N) sağlıklı olduğu izlenmektedir. Nöronların etrafında çoğunlukla transvers düzlemde kesilen aksonlar (Ax) gözlenmektedir. Bazı aksonların kollapse olduğu (ok) ayırt edilmektedir. (A) Sağlıklı nöronların yanı sıra sitoplazmasının koyulaştığı ve çekirdeklerinin büzüştüğü bazı hücreler görülmektedir (*).



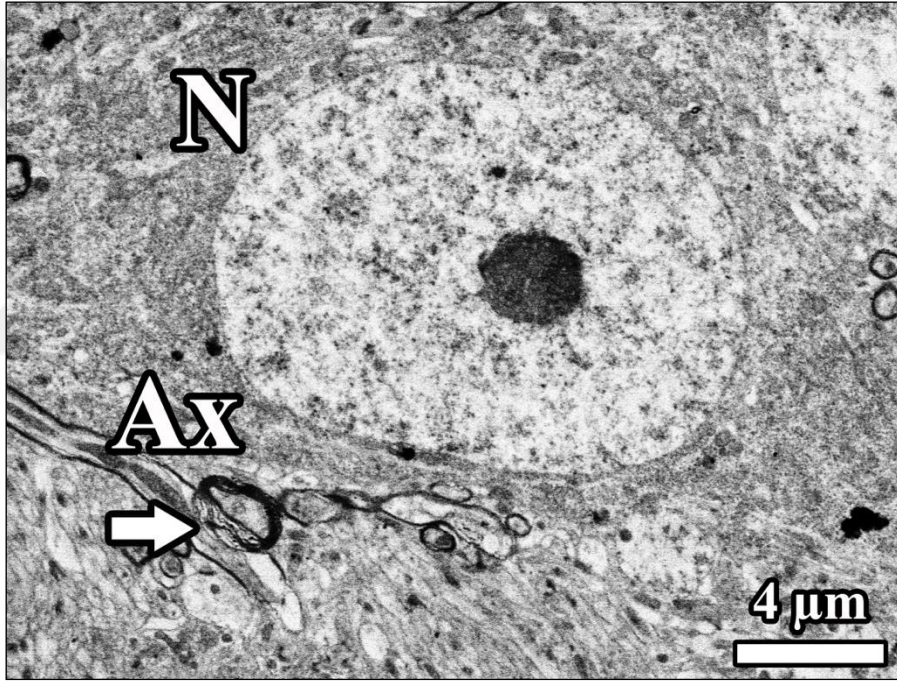
Şekil 47. (A, B) Sham grubuna ait dokuda damar (V) yapısının ve çevre doku ile olan bütünlüğünün korunduğu görülmektedir. (A) Dokuda küçük çaplı aksonların (Ax) varlığı dikkat çekmektedir. (B) Damar duvarının hemen etrafında yerleşmiş ve sitoplazmasında çok sayıda fagosit edilmiş maddeler bulunduran mikrogliya hücresi görülmektedir (oklar).



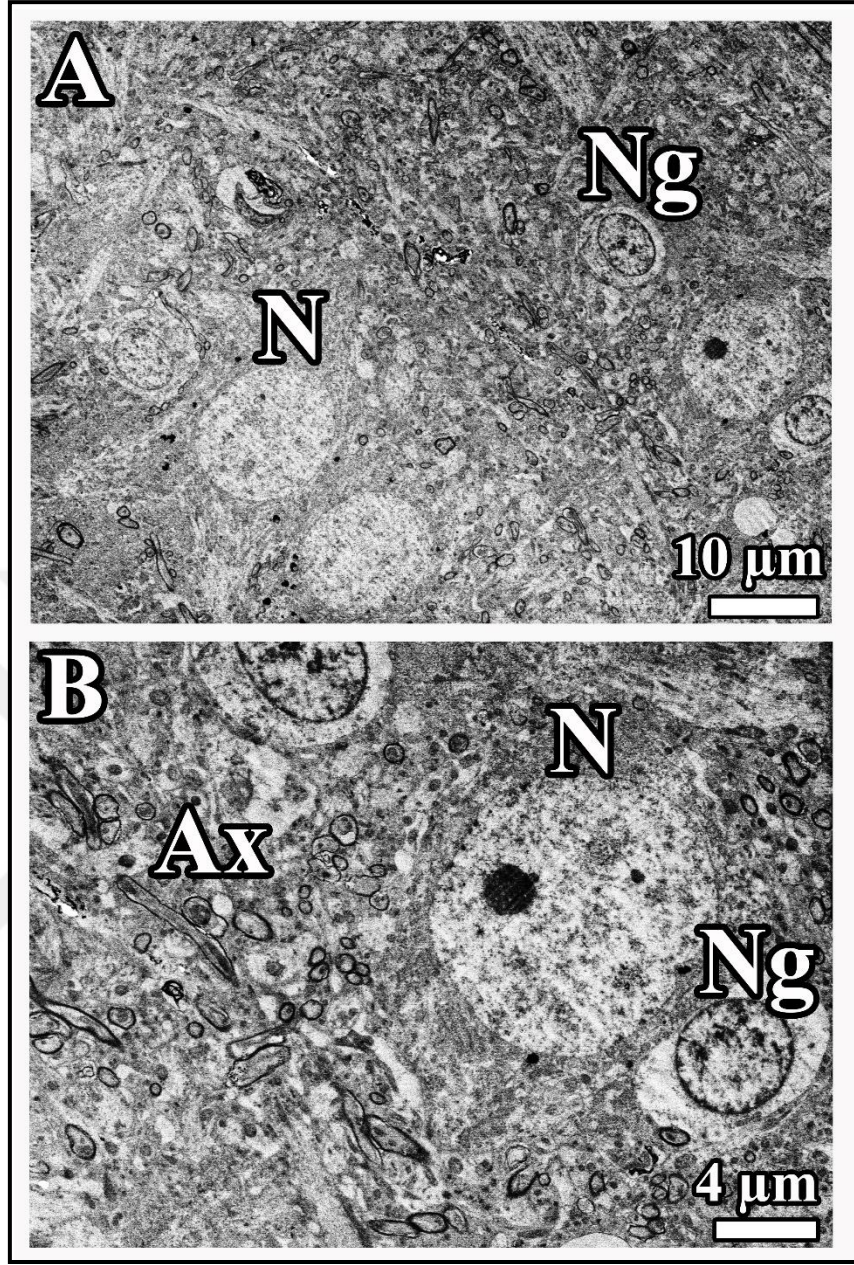
Şekil 48. (A, B) Sham grubu hipokampusunun CA bölgesinden alınan kesitte farklı çaptaki sağlıklı nöronlar (N) görülmektedir. Nöronların etrafında bulunan ve küçük çapta olan aksonların normal morfolojide olduğu gözlenmektedir (Ax). Hücreler arası mesafenin az olduğu ve nöronların düzgün dizilim gösterdiği ayırt edilmektedir.

4.3.3. Diyabet grubuna ait elektron mikroskopik bulgular

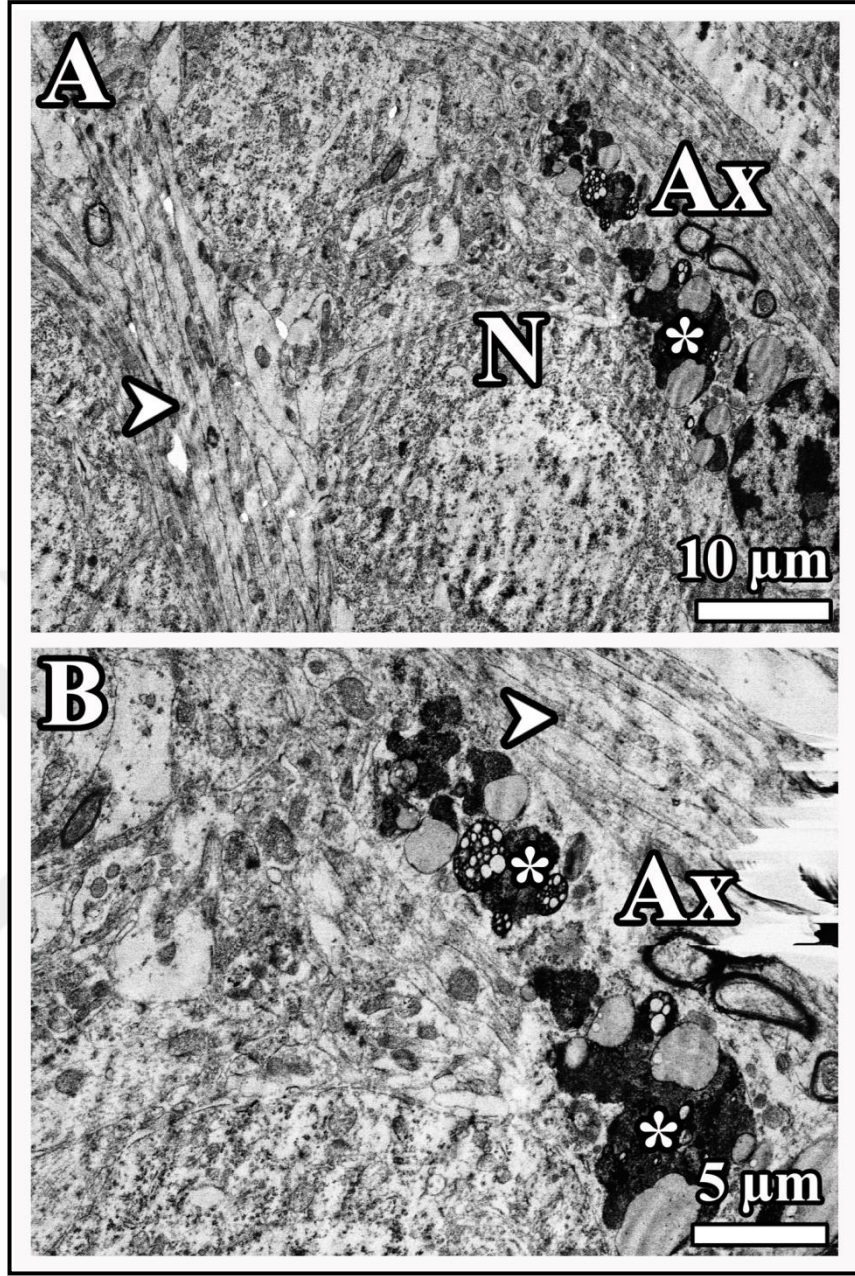
DM grubuna ait hipokampus bölgesinin mikrograflarında nöron ve nöroglia hücrelerinin ince yapısı incelendi. Hücrelerdeki çekirdekler sağlıklı yapıda görünmelerine karşın, hücre sınırlarının belirgin olmadığı gözlemlendi. Dokudaki nöronların, organel bakımından zengin olduğu ayrıca transvers düzlemde kesilen çok sayıda aksonun bulunduğu saptandı. Bazı nöronların hücre sınırlarının belirgin olmadığı görüldü. Bu gruba ait ince kesitlerde, içerisinde çok sayıda fagosite edilmiş maddeleri bulunduran mikrogliaların varlığı dikkat çekmekteydi. DG'de bulunan nöronların sağlıklı yapıda olmadığı, çekirdek sınırlarının çoğu nöronda deforme olduğu ayırt edildi (Şekil 52).



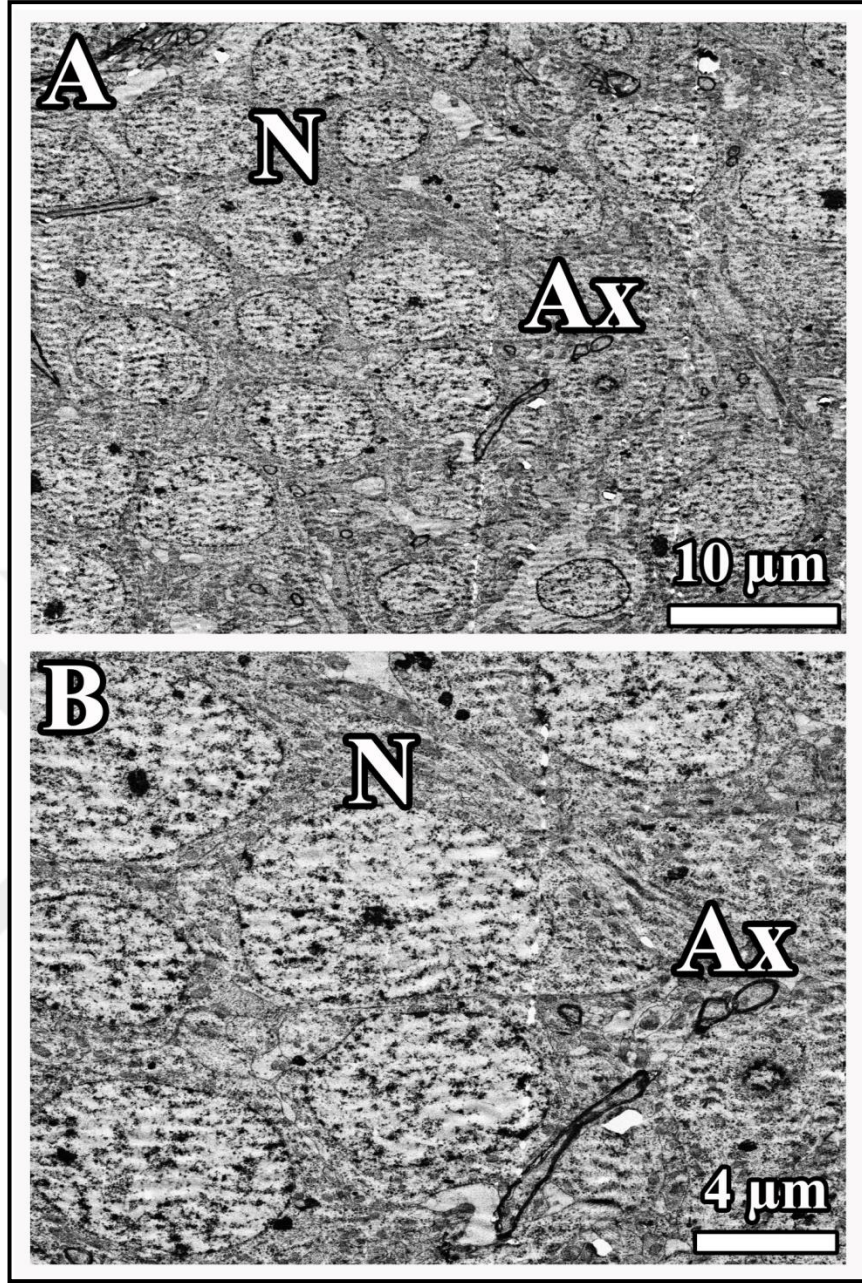
Şekil 49. DM grubuna ait hipokampus bölgesinden elde edilen mikrografta sağlıklı bir nöron (N) yapısı izlenmektedir. Bununla birlikte hücre sınırlarının belirgin olmadığı görülmektedir. Nöronun etrafında enine ve boyuna düzlemde kesilen aksonların (Ax) bazılarında yapısal bütünlüğün korunamadığı gözlenmektedir. Ökromatik boyanan çekirdekçiğe sahip nöronun çekirdekçiğinin merkezi yerleşimli olduğu izlenmektedir.



Şekil 50. (A, B) DM grubuna ait hipokampus bölgesindeki nöron (N) ve nöroglia hücreleri (Ng) görülmektedir. Hücrelerdeki çekirdekler sağlıklı yapıda görünmelerine karşın, hücre sınırlarının belirgin olmadığı gözlenmektedir. (B) Kesitte hücre organelleri bakımından zengin olan hücre ve transvers düzlemde kesilen çok sayıda akson (Ax) görülmektedir. Sinir hücrelerinin sitoplazmalarındaki organeller koyu boyanmıştır.



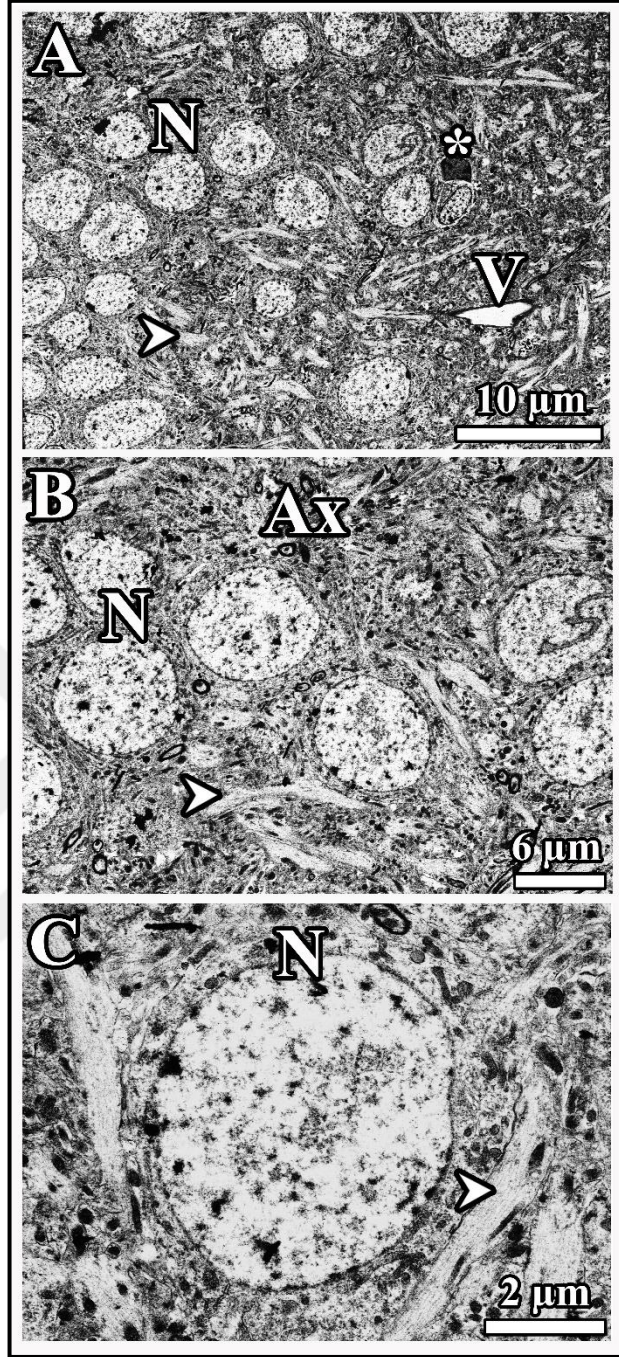
Şekil 51. (A, B) DM grubu hipokampus dokusuna ait mikrograf verilmiştir. Nöron (N) çekirdeğinin ökromatik yapıda olduğu ve hücre sınırlarının kolayca ayırt edilemediği gözlenmektedir. Çekirdek şeklinin önemli derecede deforme olduğu fark edilmektedir. Nöronun etrafında uzanan az sayıda transvers düzlemdeki aksonlar (Ax) ve yoğun olarak gözlenen longitudinal düzlemdeki sinir lifleri (ok başı) dikkat çekmektedir. İçerisinde çok sayıda fagosite edilmiş maddeleri bulunduran bir mikroglianin varlığı dikkat çekmektedir (*).



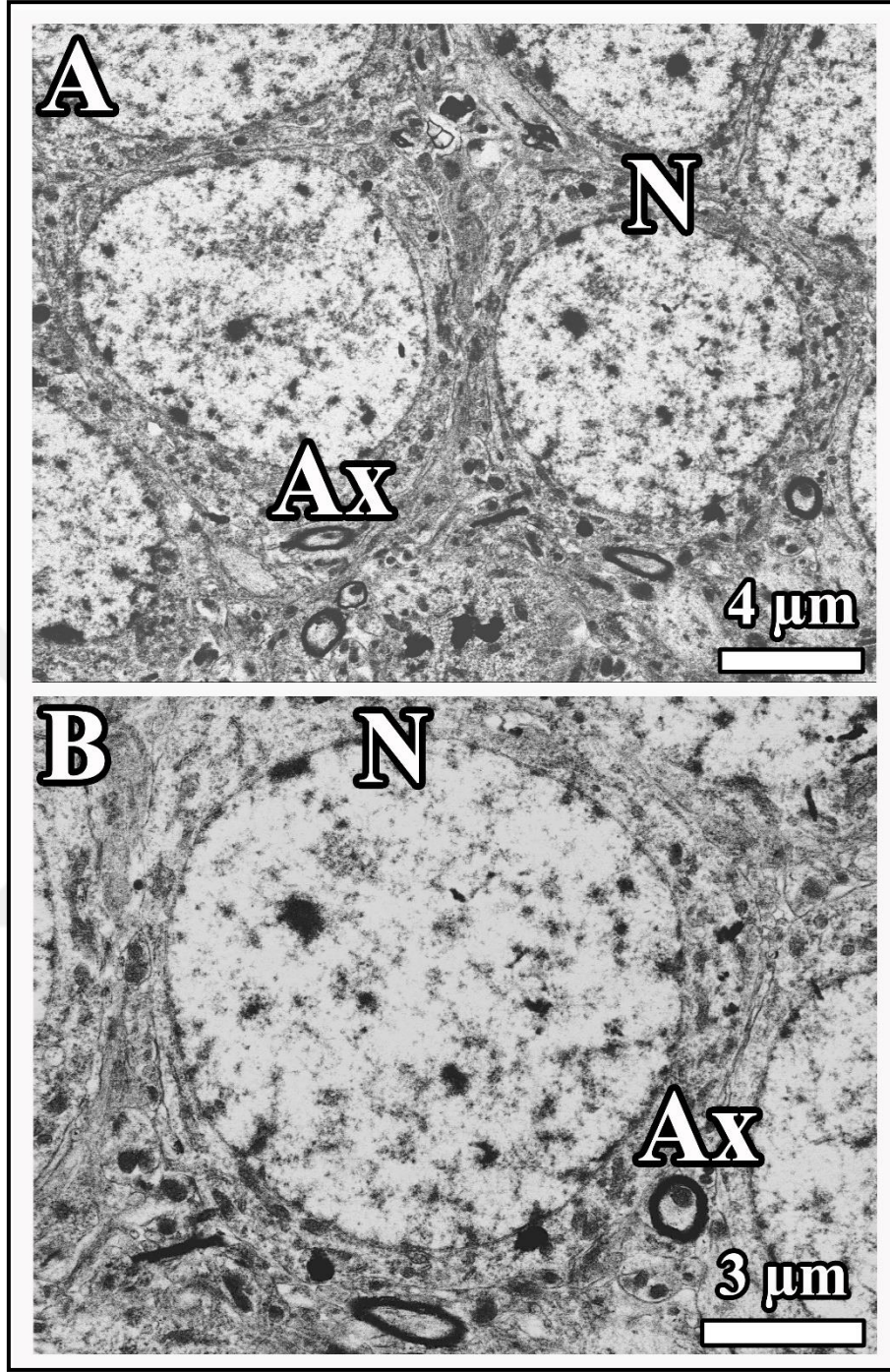
Şekil 52. (A, B) DM grubuna ait hipokampusun dentat girus bölgesinden elde edilen mikrograf görülmektedir. Küçük çaplı nöronların (N) normal morfolojide olmadığı, çekirdek sınırlarının deforme olduğu izlenmektedir. Nöron çekirdeklerindeki biçim bozuklukları yaygın biçimde fark edilmektedir. Farklı yönde kesilmiş aksonlar (Ax) nöronların etrafında gözlenmektedir.

4.3.4. DM + *Garcinia kola* grubuna ait elektron mikroskopik bulgular

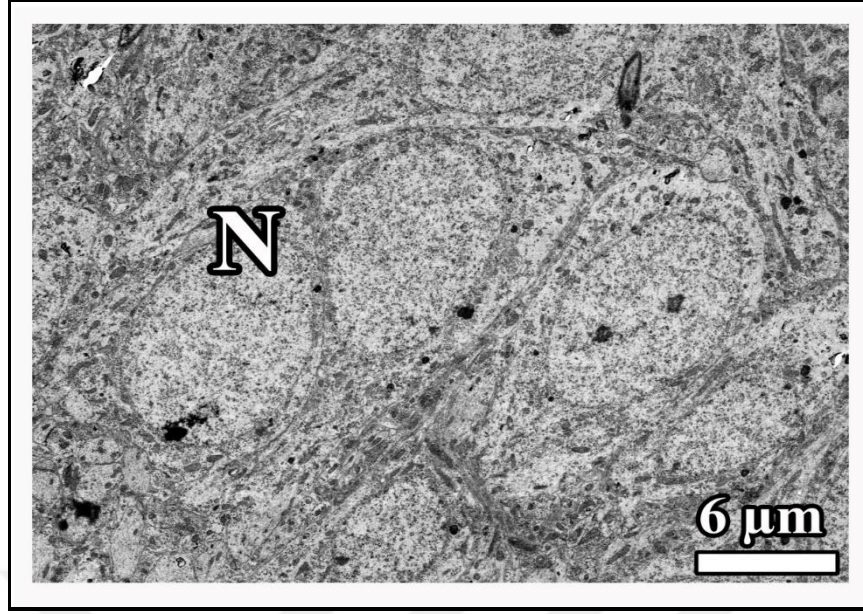
DM+GK grubuna ait dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgelerindeki nöronlar, nöroglia hücreleri ve sinir lifleri elektron mikroskopunda incelendiğinde, nöronların normal morfolojide olduğu ve çekirdeklerinin ökromatik özellik gösterdikleri gözlemlendi. Nöronların etrafında, bazı sinir liflerinin transvers, bazılarının ise longitudinal düzlemde uzandığı tespit edildi. Dokuda bazı hücrelerin koyu boyandığı ve çekirdek sınırlarının kaybolduğu gözlemlendi. Bu hücrelerin, ölüm sürecine giren hücreler olduğu düşünülmektedir. Bazı alanlarda, nöronlar arasındaki mesafenin arttığı gözlemlendi. Sağlıklı yapıdaki hücrelerin çekirdekçiklerinin eksantrik yerleşimli olduğu fark edildi. Bu grupta, organel bakımından zengin olan nöronların çekirdek membran bütünlüğünün korunması dikkat çekiciydi. Dokunun genelinde kalın miyelin kılıfa sahip aksonlar izlendi. Dokudaki damarlar incelendiğinde, sağlıklı duvar yapısına sahip oldukları ve çevre doku ile bütünlüklerinin korundukları görüldü (**Şekil 57**).



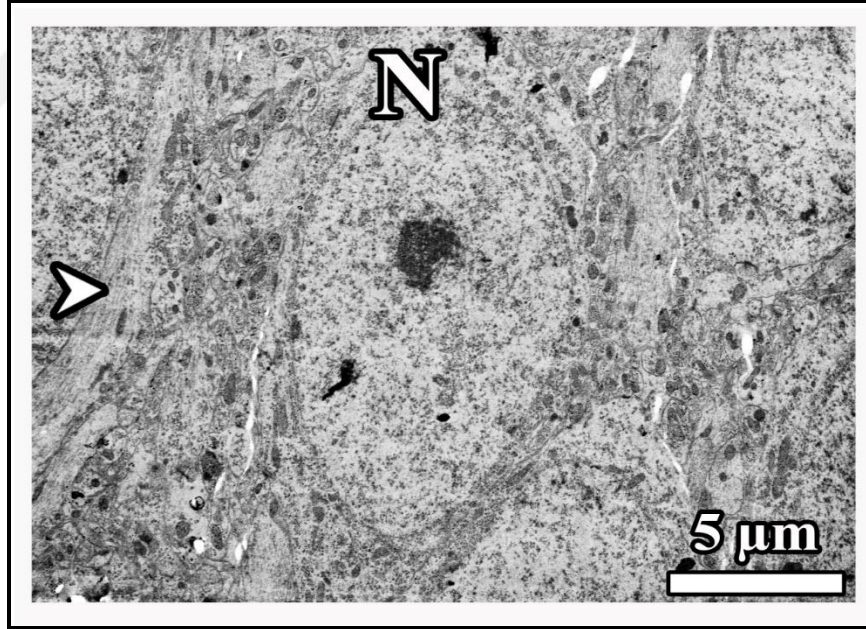
Şekil 53. (A, B, C) DM+GK grubuna ait mikrografta dentat girus bölgesindeki granüler nöronlar görülmektedir. Nöronların (N) normal morfolojide olduğu ve çekirdeklerinin ökromatik özellik gösterdikleri fark edilmektedir. Nöronların etrafında, bazı sinir liflerinin enine (Ax), bazılarının ise boyuna uzandığı (ok başı) dikkat çekmektedir. (A) Koyu boyanmış, çekirdek sınırı kaybolmuş olan hücrenin (*) ölüm sürecine giren hücre olduğu düşünülmektedir. (A, B) Bazı alanlarda, nöronlar arasındaki mesafenin arttığı gözlenmektedir. V: Damar.



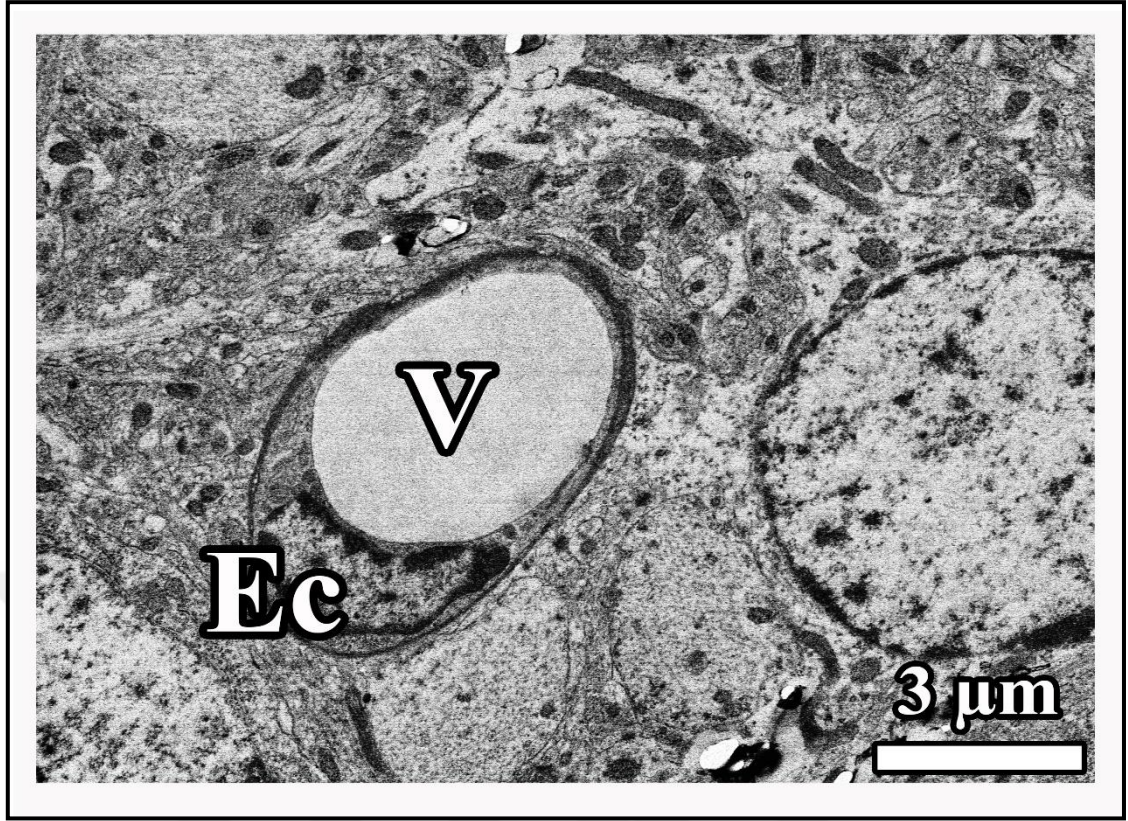
Şekil 54. (A, B, C) DM+GK grubuna ait mikrografta dentat girus bölgesindeki nöronlar (N) ve çevresindeki aksonlar (Ax) görülmektedir. (B) Organel bakımından zengin olan nöronların çekirdek membran bütünlüğünün korunduğu gözlenmektedir. Aksonların kalın bir miyelin kılıfa sahip olduğu fark edilmektedir.



Şekil 55. DM+GK grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinden elde edilen mikrografta nöronların (N) oval çekirdekleri görülmektedir. Sağlıklı yapıdaki nöronların arasındaki mesafenin az olduğu gözlenmektedir.



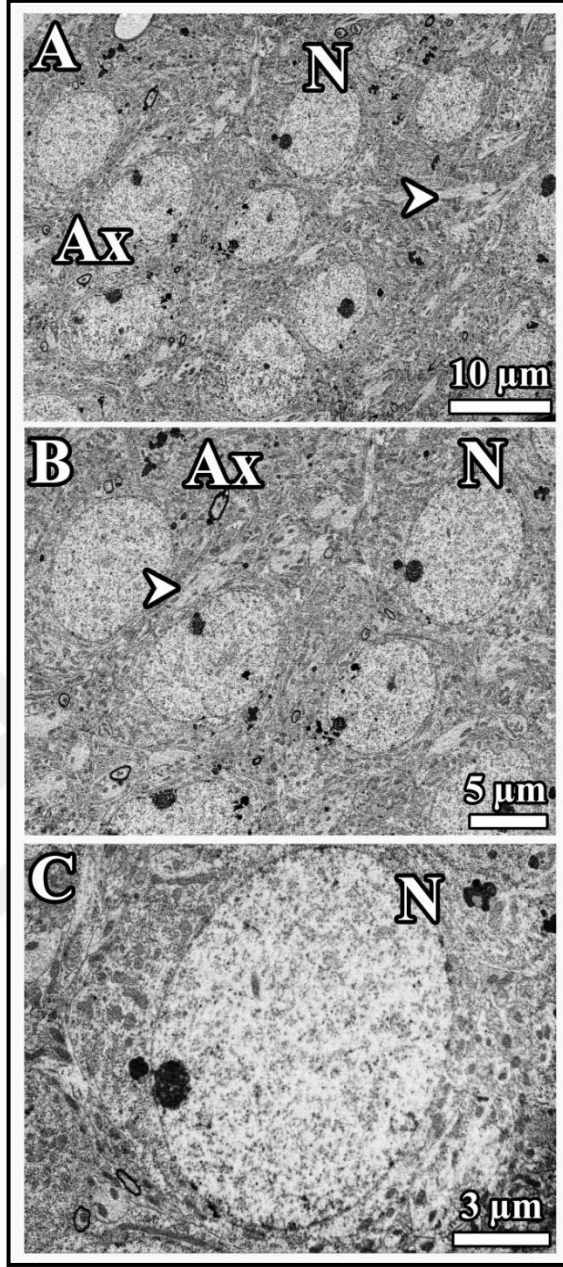
Şekil 56. DM+GK grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesine ait mikrografta piramidal nöron (N) ve çevresinde longitudinal düzlemde uzanan sinir lifleri görülmektedir. Çekirdekçiği belirgin olan bu nöronun organel bakımından zengin olduğu gözlenmektedir.



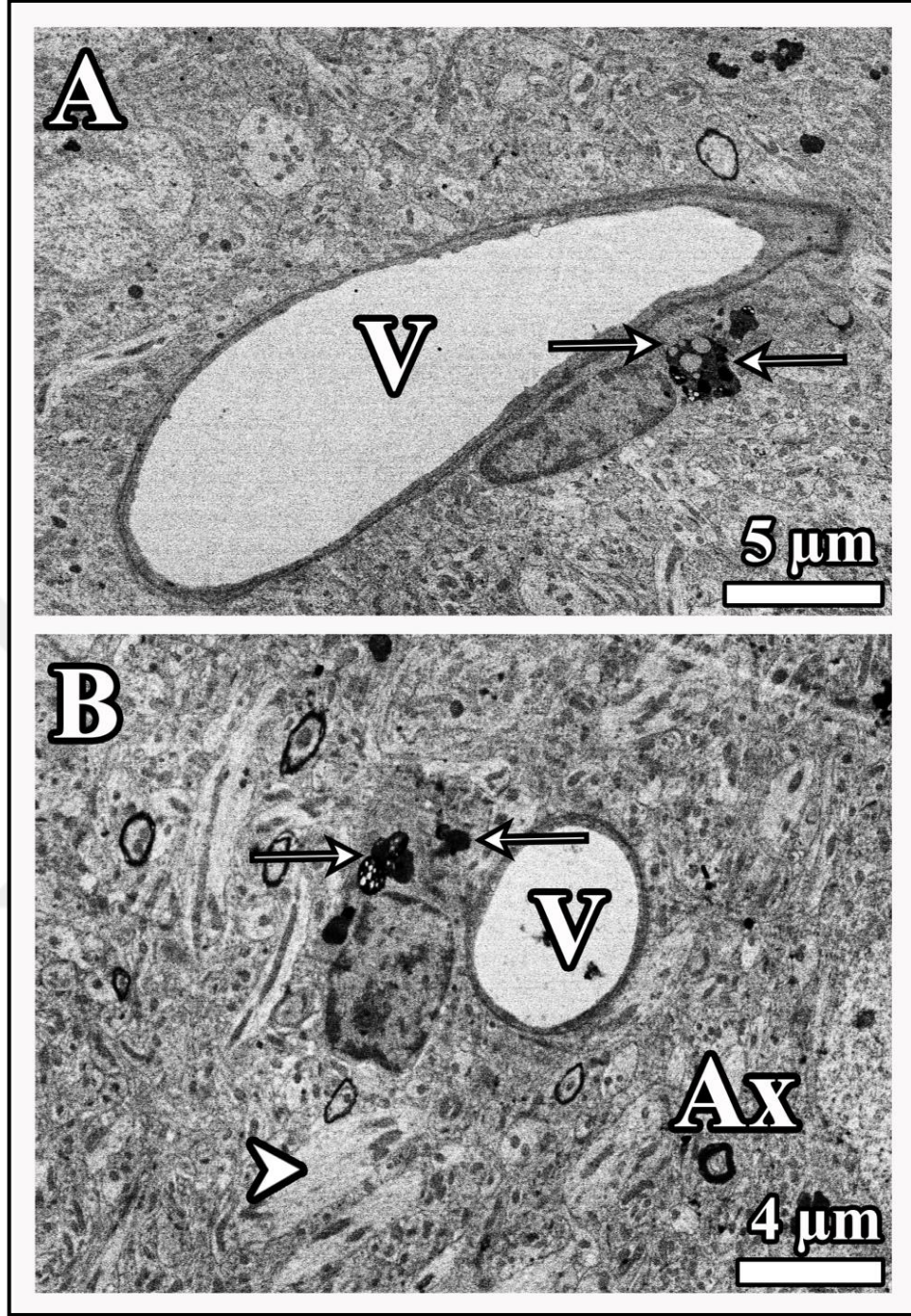
Şekil 57. DM+GK grubuna ait hipokampus dokusuna ait mikrografta damar (V) duvarının sağlıklı yapıya sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca damarın çevre doku ile bütünlüğünü koruduğu fark edilmektedir. Kesitte, zengin organel içeriğine sahip bir nöroglia hücresi sağ tarafta gözlenmektedir. Ec: Endotel hücresi.

4.3.5. DM + kurkumin grubuna ait elektron mikroskopik bulgular

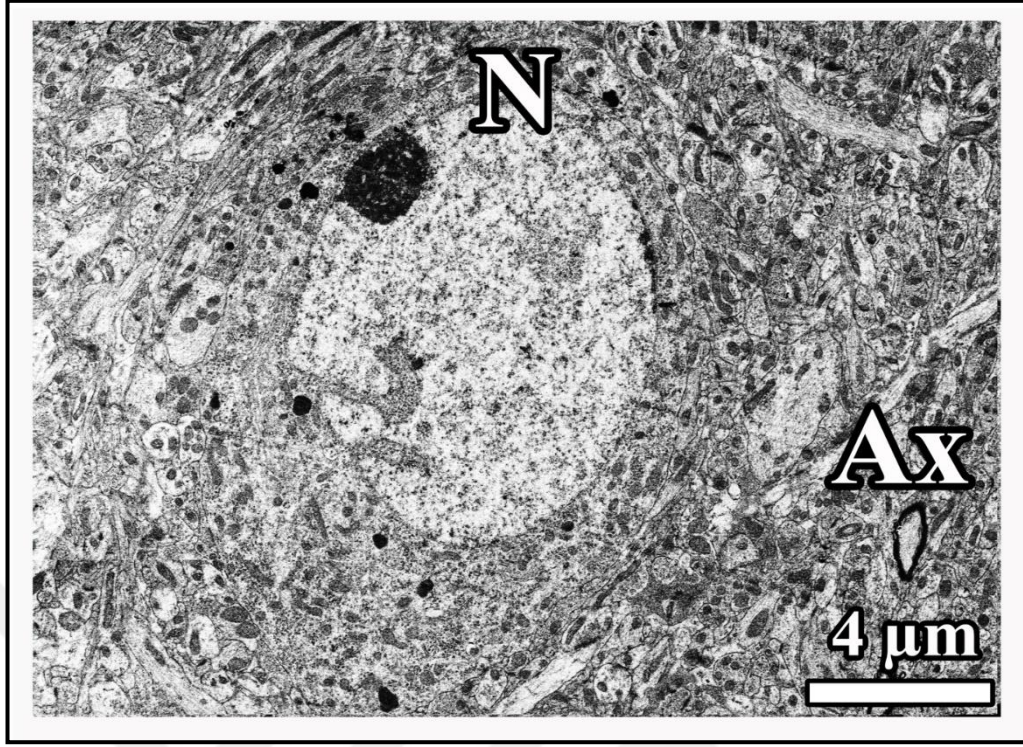
DM+Cur grubuna ait hipokampus bölgesini içeren mikrograflar incelendiğinde, nöronların ökromatik özellikteki çekirdeklerin sınırlarının belirgin olduğu; çekirdekçiklerinin çekirdek zarına yakın yerleşimli oldukları görüldü. Dokuda, nöronların etrafında transvers ve longitudinal düzlemde kesilen birçok miyelinli aksonlar bulunmaktaydı. Bu grupta, piramidal nöronların boyutlarının küçüldüğü, buna bağlı olarak nöronlar arasındaki mesafenin bazı bölgelerde arttığı tespit edildi. Nöronların sitoplazmasında mitokondrionlar çok sayıdaydı. Damar duvarındaki yapıların iyi korunduğu gözlemlendi. Dokuda perivasküler alanlarda makrofaj (mikroglia) hücreleri gözlemlendi. Dokuda, birçok nöronun çekirdekçığının çekirdek zarına yakın yerleşimli olduğu fark edildi.



Şekil 58. (A, B, C) DM+Cur grubuna ait hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinde bulunan nöronları (N) gösteren mikrograf verilmiştir. Ökromatik özellikteki çekirdeklerinin sınırları belirgin olan nöronların (N) çekirdekçiklerinin çekirdek zarına yakın yerleşimli oldukları görülmektedir. (A, B) Nöronların etrafında transvers ve longitudinal düzlemde kesilen miyelinli sinir lifleri (ok başı) bulunmaktadır. Piramidal nöronların boyutlarının küçüldüğü, bu nedenle nöronlar arasındaki mesafenin bazı alanlarda arttığı fark edilmektedir. (C) Nöronun sitoplazmasında çok sayıda mitokondrion görülmektedir. Ax: Akson.



Şekil 59. (A, B) DM+Cur grubuna ait dokuda farklı boyutlarda damarlar (V) görülmektedir. Damar duvarındaki yapıların iyi korunduğu gözlenmektedir. Sınırları iki ok ile gösterilen alanlarda perivasküler makrofaj (mikroglia) gözlenmektedir. (B) Dokuda küçük çaplı aksonların (Ax) sağlıklı yapıda olduğu dikkat çekmektedir. Bazı sinir liflerinin (ok başı) longitudinal düzlemde uzandığı fark edilmektedir.



Şekil 60. DM+Cur grubuna ait sağlıklı bir nöron (N) gözlenmektedir. Ökromatik olan nukleusun sınırlarının belirgin olduğu ayrıca organel bakımından sitoplazmasının zenginliği dikkat çekmektedir. Hücre çekirdeğinin büyük çapta ve çekirdek membranına yakın yerleştiği gözlenmektedir. Ax: Akson.

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Tüm gruplara ait kesitlerden elde edilen görüntülerde hipokampusun dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgesindeki anti-S100 pozitif boyanmalar değerlendirildiğinde, Kontrol grubuna ait DG’de granüler ve subgranüler tabakadaki hücrelerin bazılarında ve sinir liflerinde anti-S100 (+) kuvvetli boyanmalar gözlemlendi. CA bölgesindeki piramidal nöronlarda, anti-S100 (+) boyanan bazı hücreler ve hücresel uzantıları fark edildi.

Sham grubuna ait DG bölgesinde granüler ve subgranüler tabakadaki bazı hücrelerin kuvvetli pozitif boyandığı gözlemlendi. Ayrıca, DG’nin polimorfik tabakasındaki bazı büyük çaplı nöronların sitoplazmaları kuvvetli anti-S100 pozitif boyandı. CA bölgesinde ise az sayıda nöroglia hücresinde kuvvetli pozitif boyanmanın olduğu fark edildi.

DM grubunun DG ve CA bölgelerindeki bazı hücrelerin anti-S100 ekspresyonunun kuvvetli olduğu gözlemlendi.

DM+GK grubundaki anti-S100 (+) boyanmalar değerlendirildiğinde, DG bölgesinde az sayıda hücrenin pozitif boyandığı, CA bölgesinde ise anti-S100 (+) reaksiyonların sinir hücrelerinin gövdelerinde izlenmezken, az sayıda nöroglia hücrelerinde olduğu fark edildi.

DM+Cur grubuna ait anti-S100 (+) boyanmalar incelendiğinde ise DG'nin granüler ve polimorfik tabakasında orta derecede pozitif boyanma gözlemlendi. Ayrıca, bu grubun CA bölgesindeki nöronların perikaryonlarında ekspresyon görülmezken, hücresel uzantıların ve nörogliaların pozitif boyanması dikkat çekiciydi (**Şekil 61**).

Tüm gruplara ait kesitlerden elde edilen görüntülerde hipokampusun dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgesindeki anti-kaspaz 3 pozitif boyanmalar değerlendirildiğinde, Kontrol grubuna ait DG bölgesinin granüler ve subgranüler tabakasında pozitif boyanan hücreler görüldü. Ayrıca, bu grubun CA bölgesindeki nöronlarda da anti-kaspaz 3 ekspresyonunun yoğun olduğu gözlemlendi.

Sham grubuna ait DG bölgesinin subgranüler ve granüler tabakasındaki granüler nöronlarda pozitif boyanmanın kuvvetli olduğu ve hücresel uzantılarında da anti-kaspaz 3 pozitif reaksiyonu ayırt edilmekteydi.

DM grubuna ait DG bölgesindeki bazı hücrelerin ve bu bölgeye yakın yerleşimli bazı nöronların, anti-kaspaz 3 açısından kuvvetli reaksiyon verdiği görüldü. Anti-kaspaz 3 aktivitesinin, özellikle hücre çekirdeklerinde belirgin olduğu fark edildi. DM grubuna ait CA bölgesinde piramidal nöronların ve nöroglia hücrelerinin pozitif reaksiyon verdiği ve çekirdeklerinin kuvvetli boyandığı izlendi. Bununla birlikte, CA bölgesindeki nöronların sitoplazmasında pozitif boyanma gözlemlenmedi.

DM+GK grubuna ait anti-kaspaz 3 pozitif boyanmalar değerlendirildiğinde, anti-kaspaz 3 reaksiyonu, DG'nin hilus bölgesindeki bazı hücrelerde kuvvetliydi. DG'nin moleküler tabakasında da pozitif boyanmanın olduğu gözlemlendi. Ayrıca, bu bölgedeki granüler ve polimorfik tabakada az sayıda hücrenin çekirdeğinde anti-kaspaz 3 pozitif boyanma izlendi.

DM+Cur grubuna ait DG'nin granüler tabakasında kuvvetli anti-kaspaz 3 (+) boyanma dikkat çekiciydi. Bunun yanı sıra, CA bölgesindeki piramidal nöronlarda ve nöroglia hücrelerinde kuvvetli pozitif boyanmalar gözlemlendi (**Şekil 62**).

Tüm gruplara ait kesitlerden elde edilen görüntülerde hipokampusun dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgesindeki anti-SOX-2 pozitif boyanmalar

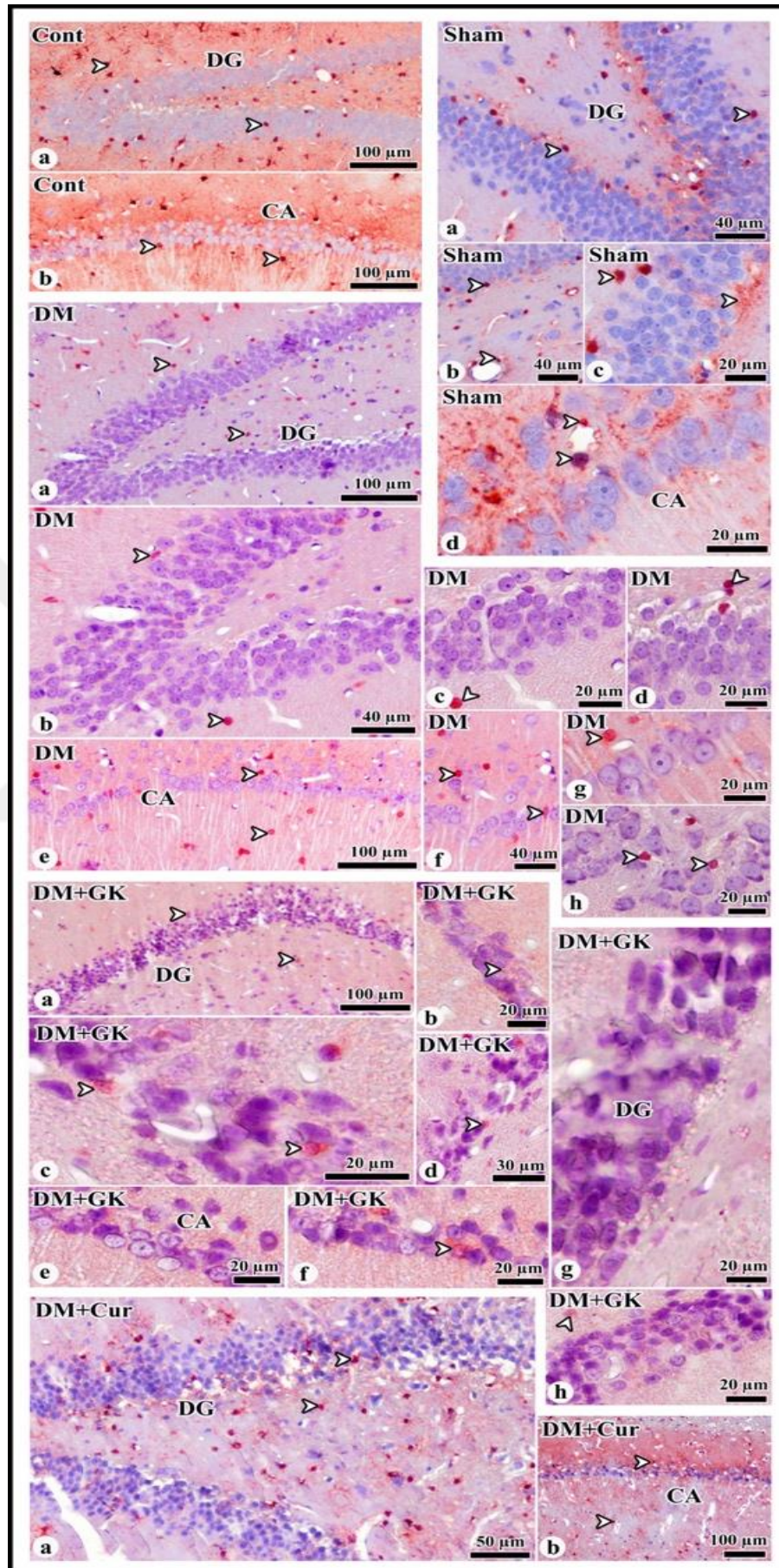
değerlendirildiğinde, Kontrol grubuna ait DG bölgesinin granüler ve subgranüler tabakasında çok az sayıda hücrenin pozitif boyandığı gözlemlendi. Kontrol grubuna ait CA bölgesindeki görüntülerde, az sayıda küçük çaptaki piramidal nöronlarda, anti-SOX-2 pozitif boyanma görüldü.

Sham grubuna ait anti-SOX-2 boyanmalar değerlendirildiğinde ise DG'nin subgranüler tabakasında çok az sayıda hücrenin anti-SOX-2 (+) boyandığı gözlemlendi. Bununla birlikte, DG'nin granüler ve polimorfik tabakalarında ise pozitif boyanmalara rastlandı. Sham grubuna ait CA bölgesindeki anti-SOX-2 (+) reaksiyonlar incelendiğinde, az sayıda hücrenin zayıf boyandığı fark edildi.

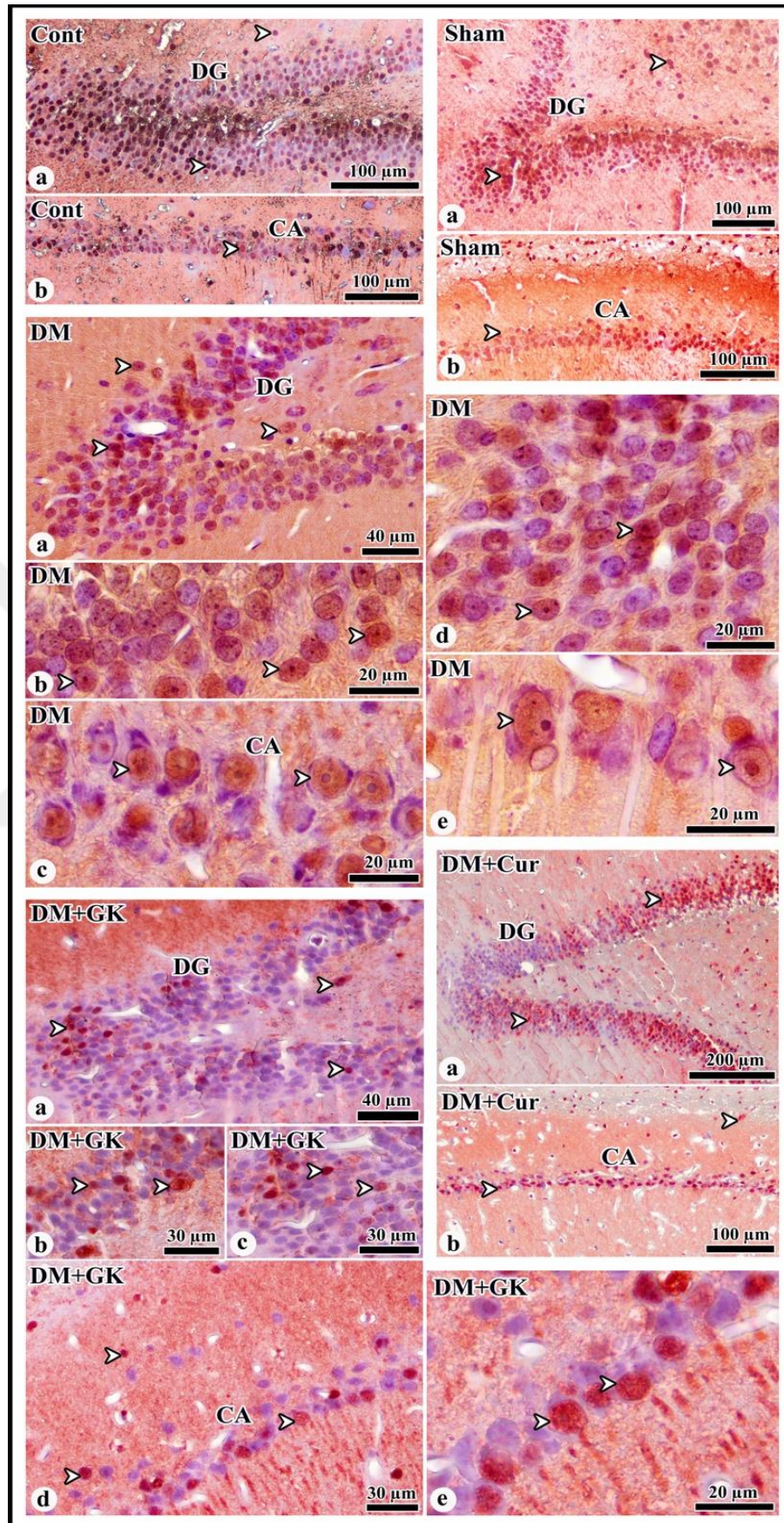
DM grubuna ait DG bölgesindeki moleküler ve polimorfik tabakada çok az sayıda nöroglia hücrelerinin anti-SOX-2 pozitif boyandığı gözlemlendi. DM grubuna ait CA bölgesindeki nöronların çoğunda pozitif boyanma görülmezken; bazı bölgelerde az sayıda nöroglia hücrelerinin zayıf pozitif boyandığı görüldü. Dokudaki damarlarda endotel hücrelerinde zayıf boyanmaların olması dikkat çekiciydi.

DM+GK grubundaki DG'nin granüler ve subgranüler tabakalarında, hücrelerde orta yoğunlukta pozitif boyanmalar görüldü. Bunun yanı sıra, DG'ye yakın CA bölgesindeki büyük çaplı piramidal nöronlarda, anti-SOX-2 pozitif boyanmalar izlendi. DM+GK grubuna ait CA bölgesinde ve bu bölgeye yakın stratum alveusta ise çok az sayıda hücrenin pozitif olduğu gözlemlendi.

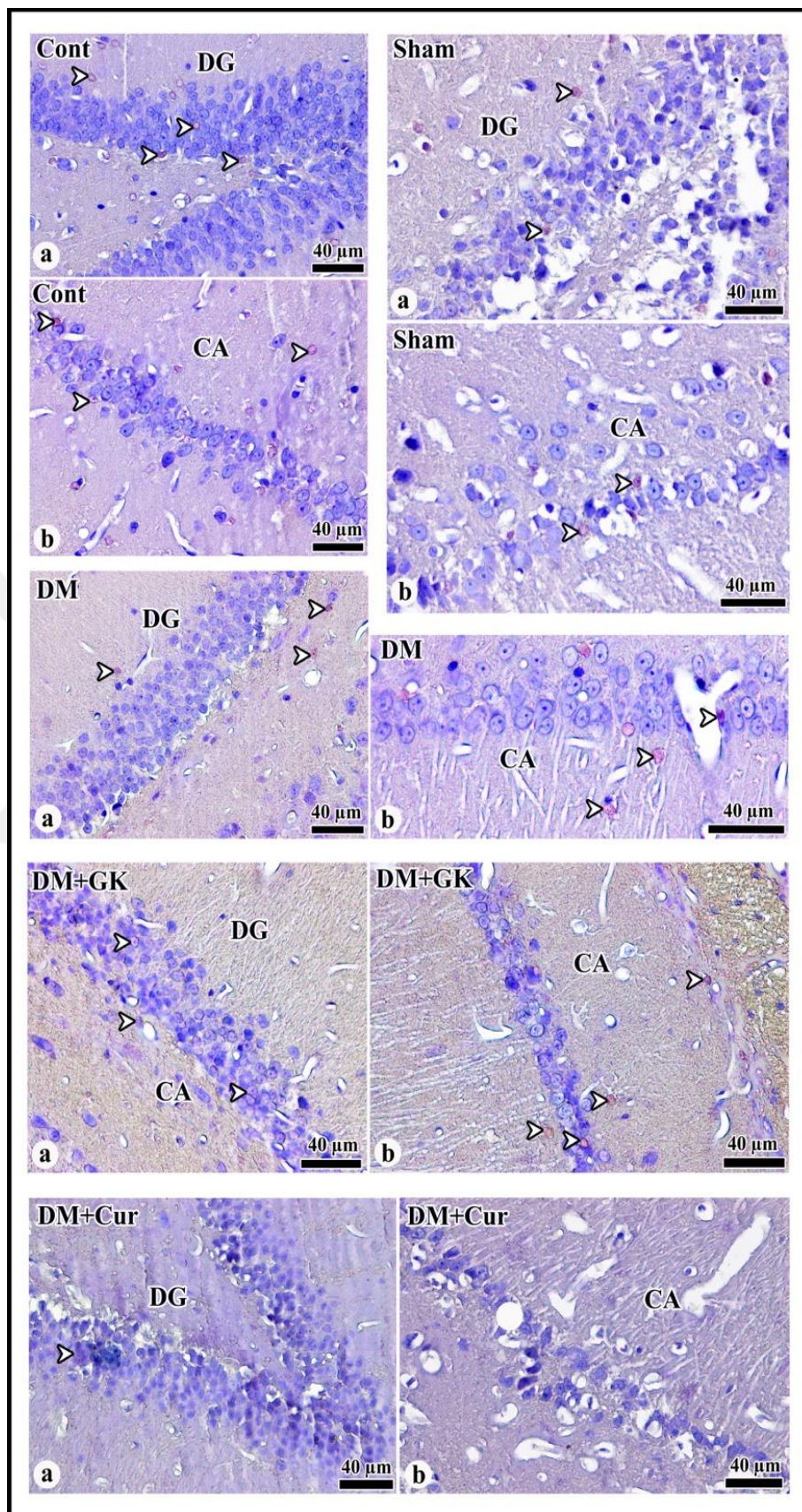
DM+Cur grubuna ait immünohistokimyasal görüntüler incelendiğinde, DG'de bulunan hücrelerde zayıf derecede boyanmalar gözlemlendi. Bu gruba ait CA bölgesinde herhangi bir anti-SOX-2 (+) boyanmaya rastlanmadı (**Şekil 63**).



Şekil 61. Tüm gruplara ait hipokampusun dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgelerinde anti-S100 (+) boyanan hücreler ve sinir lifleri (ok başı) görülmektedir. Kontrol grubunda DG’de granüler nöron tabakasında ve subgranüler tabakada kuvvetli boyanmalar ayırt edilmektedir (a). Kontrol grubuna ait CA bölgesinde anti-S100 (+) boyanan hücreler ve hücresel uzantıları gözlenmektedir (b). Sham grubuna ait DG bölgesinde subgranüler tabaka ve granüler tabakadaki hücrelerin kuvvetli boyanması dikkat çekmektedir (a-c). Ayrıca, DG’nin polimorfik tabakasındaki bazı büyük çaplı nöronların sitoplazmalarının anti-S100 (+) boyandığı gözlenmektedir (ok başları). CA bölgesinde az sayıda nöroglanın kuvvetli pozitif boyandığı gözlenmektedir (d). DM grubuna ait DG bölgesinde bazı nöroglia hücrelerinin anti-S100 (+) boyandığı (a-d) ve bu gruba ait CA bölgesinde piramidal nöronların etrafında bulunan nöroglia hücrelerinin anti-S100 ekspresyonunun olduğu görülmektedir (ok başları). DM+GK grubuna ait DG bölgesinde az sayıda hücrenin pozitif boyandığı gözlenmektedir (a-d, g, h), bu grubun CA bölgesinde sinir hücrelerinin gövdelerinde boyanma izlenmezken, etrafındaki az sayıda olan glia hücrelerinde boyanmanın olduğu fark edilmektedir (e, f). DM+Cur grubuna ait DG’nin granüler ve polimorfik tabakasında orta derecede pozitif boyanma görülmektedir (a). Bu grubun CA bölgesinde nöron gövdelerinde ekspresyon görülmezken, hücresel uzantıların ve nörogliaların pozitif boyandığı fark edilmektedir (b). Kesitlerde, zıt boyamalar Mayer’in hematoksileni ile yapılmıştır.



Şekil 62. Tüm gruplara ait hipokampusun dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgelerinde anti-kaspaz 3 (+) boyanan hücre çekirdekleri (ok başı) gözlenmektedir. Kontrol grubuna ait DG bölgesinin granüler ve subgranüler tabakasında (+) boyanan hücreler görülmektedir (a), (ok başı). Kontrol grubuna ait CA bölgesindeki nöronlarda anti-kaspaz 3 ekspresyonunun yoğun olduğu ayırt edilmektedir (b). Sham grubuna ait DG bölgesinin subgranüler ve granüler tabakasındaki granüler nöronlarda (+) boyanmanın kuvvetli olduğu (ok başı) ve hücresel uzantıların anti-kaspaz 3 (+) boyandığı görülmektedir (a). DM grubuna ait DG'deki bazı hücrelerin ve bu bölgeye yakın yerleşimli bazı nöronların kuvvetli reaksiyon verdiği (ok başı) görülmektedir (a, b, d). Anti-kaspaz 3 (+) boyanmanın (ok başı) özellikle hücre çekirdeklerinde belirgin olduğu fark edilmektedir (b, d). DM grubuna ait CA bölgesinde piramidal nöronların ve nöroglia hücrelerinin pozitif reaksiyon verdiği (ok başı) ve çekirdeklerinin kuvvetli boyandığı gözlenmektedir (c, e). Bu bölgedeki nöronların sitoplazmalarında pozitif reaksiyona rastlanmamaktadır. DM+GK grubuna ait DG'nin hilus bölgesindeki bazı hücrelerde anti-kaspaz 3 (+) aktivitesinin belirgin olduğu (ok başı) görülmektedir (a-c). Bu bölgede moleküler tabakada pozitif boyanmanın olduğu gözlenmektedir. DG'nin granüler ve polimorfik tabakasında az sayıdaki hücrelerde anti-kaspaz 3 (+) reaksiyonun olduğu ayırt edilmektedir. DG bölgesinde, anti-kaspaz 3 (+) boyanma (ok başı) hücre çekirdeklerinde belirgindir (b, c). DM+GK grubuna ait CA bölgesinde bazı piramidal nöronların çekirdeklerinde, aksonal uzantılarda ve bazı nöroglia hücrelerinde anti-kaspaz 3 (+) boyanmanın olduğu dikkat çekmektedir (d, e). Bu bölgedeki moleküler tabakada orta derecede boyanma görülmektedir. DM+Cur grubuna ait DG'nin granüler tabakasında kuvvetli anti-kaspaz 3 (+) boyanma (ok başı) görülmektedir (a). DM+Cur grubuna ait CA bölgesindeki piramidal nöronlarda ve nöroglia hücrelerinde kuvvetli pozitif boyanma (ok başı) izlenmektedir (b). Kesitlerde zıt boyamalar Mayer'in hematoksileni ile yapılmıştır.



Şekil 63. Tüm gruplara ait hipokampusun dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) bölgelerinde anti-SOX-2 (+) boyanan hücreler (ok başı) görülmektedir. Kontrol grubuna ait DG bölgesinin granüler ve subgranüler tabakasında çok az sayıda hücrenin pozitif boyandığı (ok başı) ayırt edilmektedir (a). Kontrol grubuna ait CA bölgesinde anti-SOX-2 (+) boyanan küçük çaptaki piramidal nöronların (ok başı) az sayıda olduğu görülmektedir (b). Sham grubuna ait DG'nin subgranüler tabakasında çok az sayıda hücrenin anti-SOX-2 (+) boyandığı (ok başı) gözlenmektedir (a). Bununla birlikte, DG'nin granüler ve polimorfik tabakalarında da pozitif boyanmalar gözlenmiştir. Sham grubuna ait CA bölgesinde az sayıda hücrenin zayıf pozitif boyandığı (ok başı) ayırt edilebilmektedir (b). DM grubuna ait DG bölgesinde moleküler tabakada ve polimorfik tabakada çok az sayıda nöroglia hücresinin anti-SOX-2 (+) boyandığı (ok başı) görülmektedir (a). DM grubuna ait CA bölgesindeki nöronların çoğunluğunda pozitif boyanma görülmezken; bazı bölgelerde az sayıda nöroglia hücresinin zayıf pozitif boyandığı (ok başı) fark edilmektedir (b). Ayrıca, kesitte görülen damar duvarındaki endotel hücresinde zayıf pozitif boyanmaların (ok başı) olduğu gözlenmektedir. DM+GK grubuna ait DG'nin granüler ve subgranüler tabakasındaki hücrelerde orta yoğunlukta pozitif boyanmalar (ok başı) dikkat çekmektedir (a). DG 'ye yakın CA bölgesindeki piramidal nöronlarda anti-SOX-2 (+) reaksiyon izlenmemektedir. DM+GK grubuna ait CA bölgesinde ve bu bölgeye yakın stratum alveusta çok az sayıda hücrenin pozitif boyandığı (ok başı) görülmektedir (b). DM+Cur grubuna ait DG'deki hücrelerde zayıf pozitif boyanma (ok başı) gözlenirken (a), bu grubun CA bölgesinde herhangi bir anti-SOX-2 (+) boyanmaya rastlanmamaktadır (b). Kesitlerde zıt boyamalar Mayer'in hematoksileni ile yapılmıştır.

5. TARTIŞMA

Gelişmekte olan ülkelerde, hücre ölümlerine ve enflamasyona neden olan kronik metabolik bir hastalık olarak değerlendirilen diyabetin görülme sıklığı %69 oranında artarken, gelişmiş ülkelerde 2010-2030 yılları arasında diyabetin görülme sıklığının %20 oranında artması beklenmektedir (420). Diyabet gelişiminde birçok faktör etkili olmakla birlikte; obezite, yaşlılık, alkol ve sigara kullanılması, yeterli enerji alınmaması gibi durumlar esas etkenler olarak sıralanmaktadır. Bunların yanı sıra, günlük beslenme düzeninde yer alan yağ miktarının artırılması, nişasta ve lifli yiyecek alımının azaltılması, basit şeker içeren besinlerin daha fazla alımı, obezite ve glikoz metabolizmasında düzensizliğe yol açmaktadır (87).

Diyabet metabolik bir hastalık olduğu için birçok sistemde yapısal ve fonksiyonel bozukluğa yol açmaktadır. Diyabetin merkezi ve periferik sinir sistemi üzerinde de (421) ciddi derecede olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (66). Erken aşamalardan itibaren diyabet, merkezi sinir sisteminde patolojiler oluşturarak birçok bilişsel bozukluğa yol açmaktadır (422). Tip 2 DM hastalarının %50'sinde, akson dejenerasyonu ve demiyelinizasyon (423) sonucunda kronik ilerleyici periferik nöropati geliştiği görülmüştür (275). STZ verilerek diyabet oluşturulan sıçanlarda yapılan incelemede uzaysal hafızanın bozulduğu görülmüştür (58). Diğer yandan Tip 1 diyabetli (insüline bağımlı) çocukların öğrenme becerilerinde azalma olduğu da bilinmektedir (424).

Diyabetin oluşturduğu komplikasyonları önlemek için verilen bazı tedavilerin faydalı olmadığı ve tedaviye rağmen bilişsel fonksiyon bozukluklarının (425) ve beyinde atrofik alanların arttığı bildirilmiştir (426). Bu nedenle diyabetin merkezi sinir sisteminde oluşturduğu komplikasyonların, patogenezinin ve hücrel süreçlerin açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (66). Diyabete bağlı gelişen komplikasyonların tedavisinde ilerleme kat edilmesine rağmen, yine de etkili terapötik ajan eksikliği söz konusudur. Bunun yanı sıra, mevcut ilaçların, çeşitli ciddi yan etkileri de bulunabilmektedir. Hasar oluşturan sinyal mekanizmalarını durdurabilmek için yeni çok hedefli terapötik ajanların geliştirilmesinin gerekliliği ortadır. Polifenollerin antioksidan ve anti inflamatuvar özellikler sergileyen çok hedefli ajanlar olduğu bilinmektedir. Doğal fenolik bileşiklerin, insülin bağımlı mekanizmalarla Tip 2 DM'nin yönetiminde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (427). Buradan yola çıkarak,

sunulan tez çalışmasında, diyabetin ve siyatik sinir hasarının bilişsel fonksiyon üzerindeki histopatolojik ve hücresel düzeydeki etkileri, stereolojik, immünohistokimyasal, ışık ve elektron mikroskopik yöntemler kullanılarak detaylı olarak araştırılmıştır. Diyabetin ve periferik sinir hasarının hipokampusta ortaya çıkardığı yıkıcı etkilere karşın *Garcinia kola* ve kurkuminin terapötik etkinliği hücresel düzeyde ele alındı.

Tip 2 diyabete erken dönemde müdahale edilmesi, tedavinin erken başlatılması patofizyolojik ilerlemeyi durdurmak için önemlidir. Diyabetin uzun dönem yönetiminde amaç glikoz toksisitesinin önlenerek, pankreatik hücre fonksiyonlarının korunmasıdır. Uzun dönem tedaviler özellikle mikrovasküler komplikasyonların önlenmesi ile yakından ilişkilidir. Diğer yandan farmakolojik tedavinin yanı sıra yaşam tarzının düzenlenmesi de diyabet komplikasyonlarının önlenmesi açısından önemlidir (87). Tip 2 diyabetli hastalarda, verilen tedavilerle glisemik kontrol sağlanması, HbA1c'nin normal değerlere getirilmesi ve beyin anormalliklerinin geri döndürülmesi hedeflenmektedir (2).

Çalışmamızda, siyatik sinir transeksiyonu sonucu ven grefti oluşturulan diyabetik sıçanlarda *Garcinia kola* ve kurkuminin, siyatik sinir rejenerasyonu üzerindeki etkinliğini araştıran bir çalışmanın kadavra beyin dokuları incelenmiştir. Çalışmamızda, siyatik sinir transeksiyonu oluşturulan diyabetik olmayan sıçanlar ile siyatik sinir dejenerasyonu oluşturulan diyabetli sıçanların hipokampal bölgedeki nörodejeneratif etkileri karşılaştırıldı. Hipokampal nörodejenerasyonun, hangi oranda diyabete bağlı olduğu değerlendirildi.

Siyatik sinir hasarının merkezi sinir sistemi üzerine etkileri ile ilgili yaptığımız araştırmalarda, periferik sinirlerdeki irritatif uyarının, periferik sinir sisteminden merkezi sinir sistemine, nöroinflamatuvar yanıt ve ağrı duyusunun taşınmasına yol açabileceği ile ilgili veriler elde edilmiştir (428). Kronik ağrı uyarımı ile beyin korteksinde ve beyin arka bölgesinde motor ve somatosensör merkezde nöral plastisitenin bozulabileceği ileri sürülmüştür (429, 430). Bunun yanı sıra hipokampusun da kronik ağrı ile ilişkili bir bölge olduğu düşünülmektedir (428). Merkezi sinir sisteminde ağrı ile ilgili süreçleri işleyen birçok merkez bulunması nedeniyle, nöropatik ağrıya bağlı bilişsel ve fonksiyonel bozuklukların farklı dönemlerde ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (431).

Liu ve ark.'nın (432) periferik sinir hasarı modeli oluşturarak yaptığı çalışmada, TNF ve mikroglia aracılı mekanizmaların, hipokampus ve omurilikte sinaptik plastisiteyi etkileyeceği bildirilmiştir (432). Bu sonuçlara göre kronik ağrı durumlarının, hafıza, öğrenme ve duygu durum üzerindeki olumsuz etkilerinin tedavi edilmesinde, mikrogliaların ve TNF reseptörleri inhibisyonunun bir seçenek olabileceği düşünülmektedir (432). Buradan yola çıkarak, çalışmamızda mikrogliyal ve TNF reseptör inhibisyonunda olduğu gibi, antiinflamatuvar etkiler oluşturabilecek iki antioksidan madde, siyatik sinir hasarından sonra hipokampustaki olası nörodejenerasyonun tedavisi için belirlenerek, etkileri farklı histolojik yöntemlerle incelendi. İleri de farklı başlıklar altında tartışılacağı üzere, iki antioksidan maddenin farklı derecelerde, hipokampustaki patolojiler üzerinde yapısal düzeyde olumlu etkilerinin olduğu belirlendi.

Literatürde, CCI ile oluşturulmuş nöropatik ağrıya bağlı olarak, hipokampusta proinflamatuvar sitokinlerden IL-1beta seviyesinin artabileceği yönünde sonuçlar bulunmaktadır (206). IL-10 ve IL-1 beta gibi inflamasyonla ilişkili sitokinlerin, hipokampusta ağrı duyusu oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir (433). Hipokampusta IL-1 beta gibi sitokinlerin artışı ve nörojenizde görülen azalış hafıza bozukluklarına yol açabilir (428). Ayrıca hipokampustaki IL-1 beta seviyesindeki artış, sinaps plastisitesini değiştirmesinin yanında, hafıza oluşumunda önemli bir mekanizma olan LTP gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (434). Bu bulgular, ağrı oluşumuyla görülen immün sistem ve sinir sistemi arasındaki etkileşimin, bilişsel fonksiyonları etkileyebileceğini göstermektedir (428). Bu çalışma aynı zamanda nöropatik ağrının hipokampus üzerindeki etkilerini ve mekanizmalarını gösteren bir çalışma olarak değerlendirilebilir (428). Çalışmamızda siyatik sinir hasarının hipokampusa etkisi hacimsel, sitopatolojik, histopatolojik ve immünohistokimyasal açılardan değerlendirildi.

Polifenollerin, antioksidan ve anti inflamatuvar özellikler sergileyen çok hedefli ajanlar olduğu bilinmektedir (427). Doğal fenolik bileşiklerin, insülin bağımlı mekanizmalarla Tip 2 diyabet yönetiminde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (427). Polifenoller, diyabet tedavisi dışında diyabet ilişkili komplikasyonların gelişiminin önlenmesinde de etkilidir (435-437). Polifenollerin diyabette güçlü nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir (438). Polifenollerin deneysel diyabetik nöropati tedavisinde

kullanılması sonucunda olumlu sonuçlar elde edildiği görülmüştür (427). Bu nedenle çalışmamızda potansiyel tedavi edici özelliği olduğu düşünülen antioksidanların verildiği gruplar oluşturularak hipokampus yapısı ve hacmi değerlendirilmiştir. Çok sayıda teknik kullanılarak konunun farklı yönleri detaylandırılmaya çalışıldı. Bu yönüyle sunulan çalışmamızın özgün olduğu söylenebilir. Diğer taraftan çalışmamızın yeni çalışmalar için yol gösterici olacağı ve literatüre önemli katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

5.1. Hipokampal Tabakaların Hacim Oranları

Tip 2 DM'nin bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya yol açtığı bilinmektedir (2). Daha önce çeşitli çalışmalarla incelenmiş olan, Tip 2 DM hastalarının beyin dokusunda birçok bölgede gri madde hacminde azalma olduğu ve bölgesel hacimlerde görülen azalmanın bilişsel bozukluklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (439-442). Collino ve ark. (443) tarafından yapılan çalışmada, obez adölesanlar ile Tip 2 DM'li adölesanların beyin yapıları karşılaştırıldığında; diyabetik adölesanlarda toplam serebral atrofi oranında artışla birlikte; prefrontal beyin bölgesi ve hipokampus hacminde bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, benzer bulguların yetişkin Tip 2 DM hastalarında da olduğu görülmüştür (443). Falvey ve ark. (444) tarafından yapılan çalışmada, yaşlı yetişkin hastalarda diyabetin, beyin dokusunun makro yapısında patolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Beyin dokusunda görülen patolojik değişikliklerin bilişsel bozukluklara ve özellikle Alzheimer hastalığı açısından risk artışına yol açtığı görülmüştür. MR görüntüleme sonuçlarına göre diyabetli yaşlı yetişkinlerde beyin dokusunda görülen atrofının büyük hacimlerde ve özellikle medial temporal ve frontal bölgelerde olduğu bildirilmiştir (444). Literatürde, diyabetik hastalarla yapılan çalışmalarda, genellikle toplam beyin hacimleri değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, antioksidan verilen ve siyatik sinir hasarının eşlik ettiği diyabet modelinin, hipokampus tabakalarının hacim oranları üzerine etkisine ilişkin çalışmaya rastlanmadı. Bu açıdan, çalışmamızın farklı bir bakış açısıyla konuya yaklaşarak diğer çalışmalardan ayrıldığını söyleyebiliriz.

Tip 2 DM hastalarında yapılan bir çalışmada, hastaların MoCA değerleri (bilişsel aktivite puanları) ve gri madde hacim değerleri arasında doğrusal bir oran olduğu bildirilmiştir. Hastaların, bilateral serebellar korteksleri, bazal ön beyin bölgesi, ön ve arka insula, iki yönlü para-hipokampal girus, arka-ön-orta singulat alanlar,

hipokampus, amigdala, putamen, alt-orta-üst temporal girus ve lingual girus gibi birçok beyin ve beyincik dokusu alanında gri madde hacim kayıpları görülmüştür (2). Bilişsel fonksiyon bozuklukları ilerleyerek demans, Alzheimer hastalığı ve vasküler demansa yol açabileceği bildirilmiştir (445, 446). Bununla birlikte, diyabete bağlı gelişen bilişsel fonksiyon bozukluklarının patogenezi tam olarak açıklanamamıştır (447). Brands ve ark. (448), Tip 2 DM hastalarında yaptıkları çalışmada, beyin dokusunun toplam hacminin azaldığını, periventriküler ve subkortikal bölgelerde beyaz cevher lezyonlarının arttığını, kortekste gri madde hacminin azaldığını bildirmişlerdir (448).

Tip 2 DM hastalarında, beyin dokusu görüntülerinde yapılan bir çalışmada depresyon, anksiyete gibi duygu durum bozukluklarının oluşmasından sorumlu alanlar ve biliş düzenlenmesi ile ilgili birçok bölgede morfolojik değişimlerin olduğu görülmüştür. Patolojik değişimler başlıca, prefrontal korteks, hipokampus, parahipokampus, amigdala, insula, kaudat, singulat, talamus ve serebellum gibi alanlarda görülmüştür ve bu bölgelerde ciddi oranda gri madde hacim kaybının olduğu bildirilmiştir. Tip 2 DM hastalarında görülen bilişsel eksiklik ve nöropsikolojik bozuklukların belirlenen hacim kayıpları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (2).

Çalışmamızda yer alan diğer patolojik durum olan siyatik sinir yaralanmasına ilişkin yaptığımız araştırmalarda bu konunun farklı yaklaşımlarla ele alındığını, farklı yöntemlerle sinir hasarı veya kronik ağrı oluşturularak deneysel incelemeler yapıldığını gördük. Bu çalışmalardan birinde, kronik ağrının hipokampusa etkileri üzerinde durulmuştur. Bu çalışmaya göre, kısa süreli hafızada (207) ve tanıma belleğinde (449) bozuklukların olduğu, hipokampusta anormal antikor oluşumunun görüldüğü (206), LTP’de değişimlerin olduğu (195), ayrıca hipokampusta gerçekleşen nöroenezin bozulduğu (450) bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise kronik ağrısı olan yaşlı bireylerin hipokampus hacimlerinde azalma olduğu tespit edilmiştir (451).

Kronik ağrı ile ilgili farklı bir çalışmada, hücresel ve davranış değişimlerinin, hipokampus hacminde azalma ile bağlantılı olabileceği üzerinde durulmaktadır (28). Ayrıca kronik ağrı ile gelişen davranış anormalliklerinde, hipokampustaki nöroenez süreci ve sinaptik plastisitedeki değişimlerin temel patogenik mekanizmalar olabileceği düşünülmektedir (28).

Çalışma bulgularımız kronik ağrı araştırmalarından farklı olarak hipokampus tabakalarının hacim oranlarında fark oluşmadığı yönündeydi. Burada hipokampus tabakalarının hacim değerleri yerine hacim oranlarını değerlendirmemiz nedeniyle anlamlı bir fark oluşmamış olabilir. Bir diğer durum ise sinir hasarı veya kronik ağrı oluşturma yöntemlerinin farklı olması, farklı patogeneze süreçlerine ve farklı etkilere yol açmış olabilir.

Çalışmamızda, tüm gruplar arasında hipokampusun str. alveus, str. oriens, str. pyramidal ve str. radiatum tabakalarının toplam hipokampus hacmine oranları açısından bir fark gözlenmedi. Bu durum, diyabetin hipokampusta hacim oranı bakımından fark oluşturmadığı düşüncesiyle açıklanabilir. Bu sorunun cevabını bulmak için diyabetin ve diyabetik tedavide etkin olduğu düşünülen *Garcinia kola* ve kurkuminin bilişsel fonksiyon ve morfoloji üzerindeki etkilerini detaylı olarak araştırılmasının gerekli olduğu düşüncesindeyiz. Antioksidan verilen gruplara bakıldığında, *Garcinia kola* grubunda yedi gün ve kurkumin grubunda 28 gün olarak belirlediğimiz tedavi süresinin uzatılarak, hipokampal hacim değerlerindeki değişimin daha ayrıntılı incelenmesinin de faydalı olacağını düşünüyoruz.

Tip 2 DM hastalarında hipokampus bölgesinde atrofik alanların olduğu (9, 440, 452) ve hastalarda ilerleyen dönemde hipokampal hacim kaybının arttığı bildirilmiştir (453). Çalışma bulgularımıza göre, hipokampusta hacim oranlarında azalma görülmediği gibi sadece str. lusidum hacim oranının, Sham, DM, DM+Kur gruplarında arttığını gözlemledik. Bu durum, str. lusidumun ince bir tabaka olması ve stereolojik örneklem sıklığının yeterli olmaması ile ilişkilendirilebilir. Hata katsayısı değerleri, bu tabakada %5'ten fazla çıkmıştır. Sistemik rasgele örnekleme stratejisinin belirlenmesi için planlanan pilot çalışmada stereolojinin etkinlik ve tarafsızlık ilkesine bağlı olarak örneklem sıklığı oluşturulmuştur. Belirlenen strateji sonrası str. lusidum haricindeki tüm hipokampal tabakalarda elde edilen sonuçlara ait hata katsayıları %5'ten küçük bulundu.

Str. lusidumda, CA3'teki piramidal nöronları dentat girus granüler nöronlarına bağlayan yosunsu (Mossy) lifler bulunmaktadır. Aynı zamanda, str. lusidum yalnızca CA3 bölgesinde bulunan bir tabakadır (224). Bu tabakanın özelliğinden yola çıkarak, kronik patolojik süreçleri içeren siyatik sinir hasarı ve diyabet, üç ay gibi bir zaman diliminde reaksiyonel olarak hipokampusta şiddetli bir nörojenezi ve sinaptik oluşum

sürecini aktive etmiş olabilir. Çalışmamızda, diyabetin ve siyatik sinir hasarının hipokampusta yarattığı patolojinin reaksiyonel sonucu olan sinir lifi ve bağlantılarında görülen artış, *Garcinia kola* verilen grupta tedavinin bir sonucu olarak baskılanmış olabilir. Ayrıca, kurkumin verilen grupta diyabet ve siyatik sinir hasarının yol açtığı reaksiyonel etki önlenemediği için str. lucidumda görülen hacimsel artışın devam etmiş olabileceğini düşünüyoruz. Sonuç olarak, *Garcinia kola* uygulanan grupta str. lucidum tabakasının hacim oranında bir değişiklik gözlenmezken, kurkumin uygulanan tedavi grubunda, DM ve Sham gruplarında, str. lucidumun diğer tüm hipokampus tabakalarına hacimsel oranında artış olduğunu tespit ettik. *Garcinia kola*'nın beyindeki sinaptik etkilerine ilişkin daha fazla araştırma yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Kan glikoz düzeyi düzensizliğinin, hipokampus hacminde azalma ile ilişkili olduğu yönünde veriler bulunmaktadır. Ayrıca, HbA1c düzeyi ve hipokampus hacmi arasında bağlantı olduğu bilinmektedir (9). Bu durum bize hipokampus dokusunun diğer beyin bölgelerine göre insülinle ilgili metabolik bozukluklara karşı ileri düzeyde hassas olduğunu göstermektedir. Bunun nedenlerinden biri, hipokampustaki insülin reseptör yoğunluğunun fazla olması olabilir (77).

Literatür taramalarımızda elde ettiğimiz veriler, diyabetin hipokampusta yol açtığı patolojilerin, Alzheimer Hastalığı ile benzerlik gösterdiği yönündedir (454). Bu yüzden diğer bilişsel bozukluklarla ilgili patogenezin aydınlatılması açısından da diyabet modeli çalışmalarının katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Birçok bilişsel aktivite ve hayat kalitesi açısından önemli bir beyin bölgesi olarak tanımlayabileceğimiz hipokampus dokusu üzerinde, diyabet başta olmak üzere, siyatik sinir hasarı ve başka patolojik etkilerin araştırılmasının tıbbi açıdan önemli olduğu düşünülmektedir.

5.2. Hipokampusta Morfolojik ve Hücresel Düzeyde Değişiklikler

Diyabette en sık karşılaşılan komplikasyonun sinir dokusunda hasar oluşumu, başka bir deyişle diyabetik nöropati olduğu bilinmektedir (4, 136, 455, 456). Diyabetin patoloji oluşturma mekanizmasının temelinde, hiperglisemi sonucu gelişen oksidatif stres ve buna bağlı olarak lipid, karbonhidrat, proteinler, nükleik asitler gibi makromoleküllerin yapısındaki bozulmalar yer almaktadır. Diyabet, bu yolla sinir dokusunda hasar yaratarak, nöron kayıplarına yol açmaktadır (455). Tip 2 DM

hastalarında nöropsikolojik işlev bozukluğu görülme oranı hasta olmayan popülasyona göre iki kat daha yüksektir (2). Bu işlevsel bozuklukların, beyin dokusundaki histopatolojik değişikliklerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Tip 2 DM hastalarının beyin dokusu görüntüleme çalışmalarında, kortikal ve subkortikal bölgelerde atrofik alanlar, semptomatik veya asemptomatik olabilen enfarktüs alanları, periventriküler ve subkortikal bölgelerde beyaz cevher lezyonları olduğu tespit edilmiştir (2).

Siyatik sinir hasarı ve etkileri ile ilgili yapılan araştırmalarda, kronik ağrı duyusunun, uykusuzluğa, bilişsel ve bazı psikiyatrik bozukluklara neden olabileceği ile ilgili veriler elde edilmiştir (457, 458). Kronik ağrılı hastalarda, bilişsel alanda özellikle hafıza ile ilişkili bozuklukların olduğu görülmüştür (459, 460). Bu durum kronik ağrı durumunda, beyin dokusunun özellikle hipokampus bölgesinin önemli derecede etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda sham grubunda tek başına sinir hasarının ve diyabet grubunda ise diyabetle birlikte sinir hasarının hipokampus dokusuna etkileri incelendiğinde, iki grupta da nörodejeneratif değişimlerin olduğu gözlemlendi. Bulgularımıza göre diyabet grubundaki dejenerasyon daha belirgin olmakla birlikte, sham grubuna göre bazı sitolojik ve histolojik farklılıklar da mevcuttu.

CCI ile periferik nöropati oluşturulan farklı bir çalışmada, hipokampusu afferent yollarla gelen ağrı duyusunun, hipokampus yapısında değişikliğe yol açtığı tespit edilmiştir (461). Hipokampusta yapısal değişiklikler özellikle sinir dallanmalarında, dendrit uzunlukları ve morfolojisinde görülmüştür. Hipokampusun farklı bölgelerinde farklı tipte değişikliklere rastlanmıştır (461). Yaptığımız çalışmada, siyatik sinir transeksiyonunun hipokampustaki etkileriyle ilgili olarak, hipokampus tabakalarındaki hacimsel değişimler, hücresel patolojiler, hücre proliferasyonu, apoptozu ve nöroenezle ilgili hücresel metabolik süreçler ayrıntılı şekilde ele alındı. Bu arada diyabetle beraber siyatik sinir hasarını değerlendirmemiz araştırma konumuzun kapsamını biraz daha genişletmiştir. Siyatik sinir hasarı ve diyabetin beyin dokusuna etkileri ile ilgili farklı yaklaşımların yararlı olduğu düşüncesindeyiz.

Periferik sinir hasarı oluşturulan hayvanlarda beyin dokusunda histopatolojik değişimlerin incelendiği bir başka çalışmada, kısa süreli sinaptik değişikliklere ilaveten, yosunsu lifler ve CA3 nöronları arasındaki sinaptik plastisitelerde değişimlerin olduğu belirlenmiştir (28). Hipokampusta gerçekleşen hücresel ve

sinaptik süreçlerde bozulmanın düzeltilmesi ile kronik ağrı ve bununla ilişkili psikiyatrik ve bilişsel bozuklukların tedavi edilebileceği düşünülmektedir (28).

Stereolojik bulgularımızda, yukardaki çalışmada tarif edilen alana uygun olarak, CA3'e yakın bir alanı oluşturan str. lucidum'un, sham, diyabet ve kurkumin gruplarında hacim oranında artış olduğunu tespit ettik.

Çalışmamızda, DM grubuna ait yarı ince kesitlerde ışık mikroskopik incelemelerde nöron ve nöroglial hücrelerin yanı sıra, vasküler yapılarda da çeşitli patolojik değişiklikler gözlemlendi. CA bölgesinde, nöron kayıpları, bazı nöronların çapında küçülme, hücre sınırlarında belirsizleşme fark edildi. Ayrıca, koyu boyanan çok sayıda nöronun gözlenmesi bu hücrelerin işlevsiz hale gelen hücreler olduğunu düşündürmektedir. Hücreler arası alanda ve damar etrafında vakuollerin oluşması, granüler hücrelerin morfolojilerinin bozulması, diyabet ve siyatik sinir transeksiyonu kaynaklı ortaya çıkan stresin, hipokampus dokusu üzerinde oluşturduğu etkiler olarak değerlendirilebilir.

Farklı çalışmalarda, mikroglial hücrelerin, nöropatik ağrı duyusu ve ağrı ile ilişkili bilişsel fonksiyon bozuklukları oluşumunda önemli rolünün olduğu ileri sürülmektedir (462). Farklı çalışmalarda ise, mikroglial aktivasyonla birlikte hipokampusta görülen nöroenezin nörodejeneratif süreçler ve bilişsel fonksiyon bozuklukları gelişiminde etkili olabileceği gösterilmiştir (463, 464). Elde ettiğimiz ışık ve elektron mikroskopik bulgular bu çalışmayı destekler nitelikteydi. Sham ve diyabet grubunda mikroglial aktivasyon çok daha belirgindi.

Çalışmamızın sham grubunda, özellikle bazı alanlarda nöroglia hücrelerindeki patolojik değişimler ve dejenere olmuş koyu boyanan nöronların yoğunluğu dikkat çekmekteydi. DM grubunda, nöronlar arası mesafenin daha fazla olması bu gruptaki nöron kayıplarının daha fazla olabileceğinin bir göstergesi olabilir. DM grubunda özellikle CA bölgesinde dejenere olmuş nöronların daha fazla sayıda olduğu ve normal morfolojilerini yitirdikleri açıkça gözlemlendi. Ayrıca, DM grubunda vasküler yapılarda endotel hücrelerin de koyulaşma ve etrafındaki alanlarda vakuolleşmenin yaygın olduğu fark edildi. Bulgularımız, diyabetin özellikle vasküler yapılara önemli derecede hasar vererek hedef organlarda dejenerasyona neden olduğu (162) görüşünü destekler niteliktedir.

Çalışmamızın diyabet grubuna ait elektron mikroskopik görüntülerde, özellikle DG’de bulunan granüler nöronlardaki deformasyonlar ve hasar durumunda beyin dokusunda ortaya çıkan mikrogial aktivasyon dikkat çekiciydi. Sham grubundaki nöronların DM grubuna göre daha sağlıklı yapıda olduğu gözlemlendi. Bu durum, nöron hasarı oluşumunda diyabet ve kesi hasarının, yalnız kesi stresine göre daha dejeneratif bir etki oluşturduğunun göstergesiydi. CA bölgesinde hücre kayıplarının sham grubunda, DM grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi. Her iki grupta da mikrogia hücrelerinin aktivasyonu görülürken, sham grubunda damar yapısı daha sağlıklı morfolojideydi.

Glikoz metabolizmasındaki bozukluğun dokuların mikrovasküler yapılarında dejenerasyonlar oluşturduğu, hipokampusun mikro yapıda bozulma ve hacminde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (118, 119). Çalışmamızda, DM grubuna ait ışık ve elektron mikroskopik düzeydeki histopatolojik bulgulara, hücresel dejenerasyonlar, vasküler yapılarda vakuolizasyonlar ve mikrogial aktivasyonun olduğu görülmüştür. Tip 2 DM hastalığının hipokampusta yer alan mikrovasküler yapıları etkilediği bilinmektedir (119). Ancak Tip 2 DM hastalığında görülen hafıza ile ilgili sorunlar bu bulgularla tam olarak açıklanamamaktadır. Diyabetin bilişsel aktivite üzerindeki etkisinin açıklanabilmesi için hipokampusun mikrovasküler yapısındaki değişim ile ilgili daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiği yönünde görüşler bulunmaktadır (465).

Çalışmamızda, transekte siyatik sinir modeli oluşturulan diyabetli sıçanlarda yapılan inceleme, sadece diyabetin nöronal sonuçlarını değil, sinir hasarı komplikasyonu ile ortaya çıkan bulguları değerlendirmeye yöneliktir. Bu anlamda, sham grubunun DM grubu ile karşılaştırılması ile, ortaya çıkan patolojik tabloda diyabetin ne kadar etkisi olduğu belirlenebilir. Diyabetik hastaların önemli bir bölümünde periferik sinir nöropatisine rastlandığı için çalışmamızda elde edilen sonuçların daha kapsayıcı olduğu düşünülmektedir. Bilindiği üzere diyabet hastalarında, ilk evrelerde olmasa bile zamanla komplikasyonların gelişmesi kaçınılmazdır. Diyabet ile birlikte gelişen komplikasyonların ortaya çıkarttığı patolojilerin araştırılması ve farklı tedavi seçeneklerinin buna yönelik geliştirilmesi için, komplikasyon gelişen diyabetik hayvan modellerinde yeni çalışmaların yapılması gerektiği görüşündeyiz.

Diyabetin santral sinir sistemi (SSS) üzerindeki etkisi, insülin salgılanmasındaki bozukluk ve azlıkla ilişkilidir. İnsülin, SSS üzerinde önemli derecede etkili bir hormondur (77). İnsülin reseptörlerinin, SSS’de özellikle hipokampus ve komşuluğundaki limbik sistem yapılarında yoğunlaştığı bilinmektedir (77). Bu bölgelerin yapısal özelliklerinden dolayı glisemik kontrol bozukluğunun ve insülin dengesizliğinin olduğu prediyabette ve diyabet ortaya çıktığında etkilenen ilk alanlar olması doğaldır. Ayrıca insülin direnci nöropsikiyatrik birçok hastalığın etiyolojisinde rol almaktadır (77).

Çalışmamızda, sham ve DM grubunda, hipokampusta hücre ve doku düzeyinde patolojilere rastlandı. Diyabet ve buna bağlı gelişen komplikasyonların hipokampustaki hasarı, farklı komplikasyona sahip diyabetik deney grupları oluşturularak, farklı antioksidan maddeler ve boyama yöntemleri ile yeniden değerlendirilebilir.

Hücresel düzeyde baktığımızda diyabette görülen hiperglisemi ileri glikasyon ürünlerini arttırarak amiloid ve tau proteinlerinde çapraz bağ oluşumuna neden olmaktadır (77). Sonuçta hücre içi plak ve ekstraselüler alanda nörofibriler yumak oluşumu kolaylaşmaktadır. Bu bulgular AH ile benzerdir (77). Ayrıca diyabette görülen hipoglisemik ataklar, serebral atrofiye, beyaz maddede lezyonlara ve kalıcı kognitif bozulmalara yol açmaktadır (77). Hipokampusta meydana gelen atrofi bilişsel bozulmanın göstergesi ve AH öncüsü olarak düşünülmektedir (77). Elde ettiğimiz elektron mikroskop ve ışık mikroskop bulgular, hipokampusta nöronlar, nöroglialar ve vasküler yapılara ait dejenerasyonları göstermekteydi. Diyabette ve sinir hasarlarında görülen bilişsel bozulmaların açıklanması için hipokampus ile bağlantılı olan limbik sistem alanlarının ve diğer korteks yapılarının farklı histolojik tekniklerle incelenmesinin faydalı olabileceğini düşünüyoruz. Hipokampusta, diyabetle ilgili çok sayıda çalışma yapılmasına karşın, diyabet ve sinir hasarının birlikte hipokampusta yarattığı etkiler ve bilişsel fonksiyon bozukluklarının hücresel mekanizmaları hala iyi bilinmemektedir.

Diyabete bağlı hipokampus hasarının ileri glikasyon ürünleri sentezi ve oksidatif stres artışı, nörotransmitter yoğunluğunda değişimler gibi mekanizmalarla meydana geldiği yönünde bulgular vardır (141, 148). Doku hasarı oluşturan mekanizmalar yakından incelendiğinde, ileri glikasyon ürünleri sentezi artışının doku

hasarı ve sonuçta psikiyatrik sorunların ortaya çıkmasında en önemli faktör olduğu düşünülmektedir (140, 466). Hücre içi yolakların, özellikle protein sentezi ile ilgili metabolizmanın diyabetten nasıl etkilendiği, bu alanda yapılacak yeni araştırmalarla ortaya konulabilir ve diyabetin etkilerini daha iyi anlamamızı sağlayabilir. Glikasyon ürünlerinin sentezinin, serbest oksijen radikali üretimini arttırarak, hücrelerdeki protein yapıların inhibisyonu ve yıkımına sonuçta organ disfonksiyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Glikasyon ürünlerinin etkilerini, reseptörleri (RAGE'ler) aracılığıyla oluşturduğu ve diyabette görülen vasküler hasara dolaylı yoldan etki ettiği düşünülmektedir (467). Glikasyon ürünleri aracılığıyla, antioksidan sistem kapasitesi üzerinde üretilen serbest oksijen radikalleri, beyin dokusunda hasar oluşturarak, diyabete bağlı psikiyatrik komplikasyonların gelişimine neden olabilir (140, 141, 143-145, 468). Bu durum, diyabetin oluşturduğu komplikasyonların ve klinik birçok hastalığın önemli nedenlerinden olması sebebiyle tedavi seçeneklerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Kronik ağrı oluşturulan bir çalışmada, merkezi sinir sisteminde mikrogliyal aktivasyonun meydana geldiği (469) ve bunun sonucunda hipokampal nörojenin de etkilenebileceği ileri sürülmüştür (428). CCI uygulanan hayvanların hipokampuslarında mikrogliyal aktivasyonun artışı, immünohistokimyasal metotlarla, CD86 proinflatuar belirtecin pozitif reaksiyonundaki artışla gösterilmiştir (428). Kronik ağrı sonucu, merkezi sinir sisteminde mikrogliyal aktivasyonu gösteren bu çalışmanın, sham ve diyabet grubu elektron ve ışık mikroskop bulgularımızla uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızdaki sham grubunda, hipokampusta meydana gelen mikrogliyal aktivasyon ve fagosite edilmiş maddelerin görülmesi, inflammatuar süreçlerin aktive olması ile hipokampusta hasar oluşumu sonucu gerçekleşmiş olabilir. Protein yapıların işlevsiz hale gelmesi sonucunda yıkılması, çalışmamızda diyabet grubundaki mikrogliyalarda fagosite edilmiş maddelerin, işlevsiz hale gelmiş protein yapılar olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda kullanılan *Garcinia kola* yapraklarında başta flavonoidler ve polifenoller olmak üzere yüksek miktarda fitokimyasal maddelerin bulunduğu bilinmektedir (470, 471). *Garcinia kola* 'nın anti-diyabetik etkisinin olabileceğine dair çalışma bulunmaktadır (472). Alloksan ile diyabetik hale getirilmiş hayvanlardaki bir

çalışmada; *Garcinia kola* tohumlarından elde edilen; kolaviron, garcinoik asit gibi bileşiklerin farklı seviyelerde antidiyabetik etki gösterdiği ve bu anti-diyabetik etkinin bioflavonoidlerle ilişkili olduğu belirlenmiştir (473). Başka bir çalışmada, sıçanlara *Garcinia kola* tohumundan elde edilen kolaviron etken maddesinin verilmesiyle antidiyabetik etki olduğu bildirilmiştir (255). Böylece anti diyabetik etki oluşumu ile diyabetin diğer organlara ve SSS verdiği hasarlar da önlenabilir.

Kolaviron alan diyabetik gruplarda, indirgenmiş glutatyon seviyesi ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür. Böylece antioksidan sistem aktivitesi artmaktadır. Bu etkiyle pankreas hücre onarımı sağlanarak, kan glikoz seviyesinde düşüş görülebileceği iddia edilmektedir (472). Fotokimyasalların, STZ ile diyabet oluşturulan hayvanlarda, oksidatif stresi ve kan glikoz seviyesini ciddi oranda düşürdüğü bilinmektedir (255, 474). Birçok çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *Garcinia kola*'nın, pankreastan insülin sekresyonunu uyarak, Langerhans adacıklarında beta hücrelerin rejenerasyonu ve glikoz metabolizmasında yer alan enzimlerin aktivasyonunu sağlayarak, anti-hiperglisemik etki gösterdiği tespit edilmiştir (475-479). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular, *Garcinia kola* ve ekstraktları ile diyabete ait genel patogenez süreçleri ile birlikte, diyabet sonucunda ortaya çıkan veya çıkması muhtemel olan komplikasyonların önlenebileceği söylenebilir.

MDMA (3,4- metilendioksimetamfetamin) gibi sinir dokusu için toksik olan maddenin yol açtığı nörodejenerasyonun tedavisinde denenen *Garcinia kola* ekstraktı nöroprotektif etki göstermiştir. *Garcinia kola* ekstraktı hipokampusta özellikle CA1 bölgesinde görülen oksidatif stres, piramidal nöron vakuolizasyonu ve astrogliosis gibi patogenez mekanizmalarını önleyerek nöroprotektif etki oluşturmuştur (480). Buradan hareketle biz de, benzer patogenetik mekanizmalarla hipokampusta hasar oluşturan sinir hasarının ve diyabetin tedavisinde *Garcinia kola*'yı değerlendirdik. Bulgularımıza göre *Garcinia kola* hipokampusta nöronlar ve sinir dokusu üzerinde kısmen protektif etki göstermektedir. Histopatolojik bulgularımız *Garcinia kola*'nın araştırdığımız patolojilerde tam bir koruma sağlayamadığı yönündedir.

Garcinia kola ile tedavi edilen grupta, genel olarak nöronların normal morfolojide olduğu, ancak CA bölgesinde nöron yoğunluğunun azaldığı gözlemlendi. Yine özellikle DG'de bazı alanlarda dejenere nöronların varlığı, diyabet ve siyatik sinir

hasarına bağılı gelişen patolojik durumun kısmen devam ettiğini göstermektedir. *Garcinia kola* grubuna ait elektron mikroskop bulgularımızda, normal yapıda nöronlar olmasına rağmen, dejenere nöronların varlığı ve bazı alanlarda hücre yoğunluğunda azalış olması dikkat çekiciydi.

Çalışmamızda kullandığımız diğerk bir antioksidan olan kurkuminin birçok farklı tıbbi özelliğı bulunmaktadır (326). Diyabet ve periferik sinir hasarına yönelik etkilerini incelediğimizde olumlu özellikleri olduğunu ve çalışmamız için bir tedavi seçeneğı olabileceğini belirledik. Kurkuminin, hipokampusun CA ve DG bölgesindeki oksidatif strese bağılı hücre ölümlerini azaltabileceğı düşünölmektedir. Bu sayede diyabette görölen hafıza bozukluklarının, hipokampusun CA ve DG bölgesindeki patolojilerin önlenebileceğı yönünde görüşler bulunmaktadır (481). Bu etkinin değerkendirilmesi için daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiğı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (481).

Diyabetin beyin dokusunda oluşturduğı patolojilerin moleköler yolaklarından biri de, sitoplazmadan çekirdeğı geçerek fosforilasyonla aktive olan, NF-KB (Nökleer faktör kappa B) p65 yoludur (287, 288, 482). NF-KB p65 yolağının hücrede, apoptoz, inflamasyon ve oksidatif stresle ilgili süreçlerde görev aldığı belirlenmiştir (289). İnsölin metabolizmasında düzensizlik sonucu gelişen hiperglisemi, merkezi sinir sistemindeki NF-KB p65 yolu aktivasyonuna yol açmaktadır (291). Başka çalışmalarda, diyabetik sıçan korteksinde, birbirine bağılı işlev gören TNF-a (292), COX2 (293) ve NF-KB p65 (294) ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Diğerk taraftan kurkumin uygulanan diyabetik sıçanların serumunda TNF-a düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir (295). Literatürde, kurkumin ve kurkumin analogu A13 maddesinin NF-KB p65 yolağını inhibe edebileceğı yönünde bilgiler bulunmaktadır. Aynı şekilde bu yolakta yer alan TNF-a ve COX2 düzeyinin de kurkumin ve A13 maddesi ile düşürölebileceğı böylece inflamatuvar reaksiyonların önlenebileceğı düşünölmektedir (483).

Diyabetik ensefalopatinin incelendiğı çalışmalarda, sıçan serebral kortekslerinde antioksidan sistem enzimlerinden süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin azaldığı, reaktif oksijen türlerinin lipitlerle etkileşimi sonucu oluşank malondialdehit (MDA) (484) miktarının arttığı görölmüştür (485, 486). Kurkuminin oksijen radikalleri seviyesini azaltarak, antioksidatif etki gösterdiği bilinmektedir

(300). Bu nedenle diyabetik sıçanlarda kurkuminin nöroprotektif etkili olabileceği savunulmaktadır (301). Diyabetin merkezi sinir sisteminde oluşturduğu dejenerasyonun hangi mekanizmalarla gerçekleştiğinin ve kurkumin ile analoglarının diyabetik ensefalopatideki tedavi edici etkinliklerinin yeni çalışmalarla araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (483).

Bu çalışmaların yanında, bazı raporlarda kurkuminin kan glikoz seviyesini düşürmede etkili olmadığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, STZ ve yüksek yağlı diyetle indüklenen diyabet modeli Sprague Dawley sıçanlara, 14 gün boyunca 200 mg/kg dozda kurkumin intragastrik olarak uygulanmış, serum insülin, glikoz ve triaçilgliserol seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (487). Bu çalışma verilerine göre yeterince antidiyabetik etki oluşturmeyen kurkuminin diyabete bağlı patolojilerde etkinliği sınırlı kalabilir. Bizim değerlendirmemize göre kurkumin grubunda fark edilir seviyede iyileşmenin olduğu yönündedir. Kurkuminin bu etkisini özellikle, mikrogial aktivasyondaki azalışı göz önünde bulundurarak, inflamatuvar reaksiyonları azaltarak göstermiş olabileceğini tahmin ediyoruz.

Literatürde, kurkuminin, sinir hasarı üzerine etkisi ile ilgili olarak, antioksidan, anti ER-stresi (endoplazmik retikulum stresi), antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkileri gözlenmiş olduğundan, periferik nöropati tedavisi için bir alternatif olabileceği ile ilgili görüşler bulunmaktadır. Bu özelliklerinin yanı sıra lipofilik yapıda olması sayesinde miyelin kılıfa nüfuzunun kolay olduğu ve periferik nöropatide bu yapı içinde güçlü iyileştirici etki gösterebileceği düşünülmektedir (488). Kurkumin farklı tıbbi özellikleriyle, farklı dokularda (dorsal kök ganglionu, sinir, kas) hasar oluşması durumunda tedavi edici etki gösterebileceği, dokudaki iyileştirici etkisiyle, duyuşsal ve motor fonksiyonlarda olumlu etkileri olabileceği yönünde görüşler bulunmaktadır (488). Çalışmamızdaki kurkumin grubunda, sinir hasarı ve diyabette oluşan nörodejenerasyonda iyileştirici-olumlu etkilerinin olduğunu gözlemledik. Bulgularımızda, sağlıklı yapıda nöronlar ve normal morfolojiye yakın doku alanlarının olması kurkuminin tedavi edici etkisini göstermektedir. Kurkuminin nöroprotektif etkisini araştıran yeni çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Diyabet ve diyabete bağlı sinir hasarının patogenezi mekanizmaları üzerine kurkuminin etkisinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, lipid peroksidasyonu

oluşan MDA seviyesinin düşmesinin, kurkuminin antioksidatif etkisinin göstergesi olabileceği bildirilmiştir (488). Kurkuminin, beyin ve sinir dokularında oksidatif stresi önleyerek nöroprotektif etki gösterebileceği düşünülmektedir (488). Aynı çalışmada, diyabete bağlı artan nitrözatif stresin, kurkuminin antioksidan etkisiyle normal seviyeye indiği gösterilmiştir (488). Diyabet ve siyatik sinir hasarına bağlı beyin dokularında oluşan hasarın, kurkuminin lipid peroksidasyonunu ve nitrözatif stresi inhibe etmesiyle, antioksidatif etkinliği sayesinde önlenebileceği tahmin edilmektedir (488). Sonuçta diyabetik hastalarda gelişen nörolojik komplikasyonların tedavisinde kurkuminin, bir seçenek olarak düşünülebileceği ileri sürülmektedir (488). Biz de hem sinir hasarında hem de sinir hasarı ile birlikte diyabet patolojilerinde kurkuminin faydalı etkilerinin olduğunu düşünüyoruz.

Kurkumin grubunda yaptığımız ışık mikroskop incelemelerde nöronların normal dizilim ve sağlıklı yapıda oldukları gözlemlendi. Çekirdek, çekirdekçik ve hücre sınırlarının belirgin olması, nöron yapılarının korunduğunu, diyabet ve sham grubunda görülen patolojilerin bu grupta görülmemesi kurkuminin diyabetik hasarlara karşı hipokampusta nöroprotektif etki gösterdiğini düşündürmektedir. Bu gruba ait elektron mikroskop bulgularımızda vasküler yapıların iyi durumda olması, diyabet sonrası oluşan hasarın kurkumin takviyesi ile düzelebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, bazı alanlarda piramidal nöronlarda büzülmenin ve perivasküler mikrogliya aktivasyonunun olması, bazı nöronlarda ve doku alanlarında hasarın belli bir oranda devam ettiğini düşündürmektedir. *Garcinia kola* verilen grupta, kurkumin verilen gruba göre dejeneratif nöronların daha çok olduğu ve hücre yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Bulgularımıza göre kurkuminin diyabet ve siyatik sinir hasarını tedavi edici etkinliğinin *Garcinia kola*'ya göre daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

Literatürde, diyabetli olmayan yaşlı bireylerde görülen sürekli hiperglisemi tablosunun hipokampusun mikro yapısını ve hafıza ile ilgili bilişsel aktiviteleri bozduğu yönünde çalışma bulunmaktadır (489). Tüm bu bulgulara rağmen, hipergliseminin hangi patolojik mekanizmalarla hafızayla ilgili bilişsel bozukluklara neden olduğu henüz kesin olarak tespit edilememiştir (119).

DM ve sham grubunda hücresel düzeyde görülen patolojik değişikliklerin incelenmesi bakımından, çalışmamızın özgün olduğunu düşünmekteyiz. Bununla birlikte beş grup olarak belirlediğimiz çalışmada, her gruptan bir hayvan rastgele

seçilerek yarı ince ve ince kesitlerinin ışık ve elektron mikroskopta değerlendirmeleri yapıldı. Bu açıdan gelecek çalışmalarda daha fazla sayıda hayvanda farklı tekniklerle yapılacak histopatolojik değerlendirmenin faydalı olabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca farklı komplikasyonları olan deney hayvan modellerinde, farklı antioksidan maddeler verilerek hipokampustaki patogeneze mekanizmalarının araştırılması gerektiğine inanıyoruz.

5.3. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi (S100)

S100 protein ailesi, fonksiyonlarına göre 3 gruba ayrılır (37). 24 farklı alt tipi tanımlanmış olan S100 proteinleri (alt gruplarından birini S100B proteinini oluşturmaktadır); yalnız hücre içi fonksiyonları düzenleyenler, hem hücre içi hem hücre dışı fonksiyonları düzenleyenler ve asıl olarak hücre dışı işlevleri düzenleyenler olarak alt gruplara ayırabiliriz (37). S100 proteinleri sentezlendikleri hücreye göre yapısal farklılıklar gösterirler (37).

S100 proteinleri, enzimler, reseptörler, hücre iskeleti birimleri, nükleik asitler, transkripsiyon faktörleri ile hücre içi etkileşimleri sonucunda farklı hücresel süreçlerde görev alırlar (37). S100 proteinleri çoğalma, farklılaşma, hücre göçü, enerji metabolizması, enerji homeostazı, apoptoz, iltihaplanma, gibi çok farklı hücresel sürecin düzenlenmesinde görev alır (37). S100 proteinleri salınımı, otokrin ve parakrin etki gösterebilir. Bir hücre tipinde normal koşullarda sentezlenmeyen S100 proteinini, patolojik bir etki sonucunda sentezlenmeye başlayabilir (37).

S100 protein ailesinin de içinde bulunduğu Ca^{2+} bağlayıcı proteinler, hücre içinde Ca sinyal yollarını ve Ca^{2+} seviyelerini düzenlemektedir (37). Troponin- C, kalmodulin ve S100 protein ailesindeki birçok proteinin yapısında, Ca bağlayıcı bölge bulunmaktadır. Bu proteinler, Ca sinyal proteinleri olarak fonksiyon görürler (37).

Stres durumlarında yanıt olarak, hücrelerde S100 sentezinin arttığı görülmüştür. Ayrıca patolojik durumlarda, bazı S100 proteinlerinin vücut sıvılarındaki seviyeleri hastalık göstergesi olarak değerlendirilmektedir (37). S100 proteinlerinin hücrelerden salgılanması, büyüme faktörleri, TLR (Toll benzeri reseptör) ligandları ve sitokinler tarafından uyarılır. Sonuçta, kanser hücre hareketi, doku onarımı ile ilişkili süreçler, doku hasarı ile ilgili mekanizmalar, doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtları oluşumuna katılırlar (355, 490-497). Diğer taraftan S100 proteinlerinin fizyolojik ve

patolojik durumlarda, sentez ve salgılanmalarının nasıl düzenlendiği tam olarak açıklanamamıştır (37).

S100 protein ailesi üyelerinden olan S100B, astrositler tarafından sentezlenen ve salgılanan bir proteindir. Bu yüzden literatürde beyin dokusunda yapılan çalışmalarda, S100B protein antikorumun kullanıldığını gördük. S100B, konsantrasyonuna bağlı olarak mikroglia, nöronlar ve astrositler üzerinde trofik veya toksik etkili olabilir (355, 498, 499). S100B proteini, belli bir seviyeye kadar nöronlarda protektif etki gösterirken, astrositler üzerinde düşük dozlarda proliferatif, yüksek dozlarda ise inflamatuvar etki oluşturur (37). Düşük dozlarda S100B'nin mikrogliyal aktivasyonu inhibe ettiği, yüksek dozlarda ise mikroglia aktivasyonu ve göçünü uyardığı görülmüştür. Sonuç olarak S100B proteinin özellikle nöroinflamatuvar reaksiyonlarda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (37). Ayrıca S100B proteininin beyin dokusunda farklı bir etkisi, beyin travması oluşturulmuş deney hayvanlarında, intraventriküler S100B infüzyonu uygulanmasıyla hipokampal nörogenez artışı ve bilişsel fonksiyonlarda iyileşme şeklinde görülmüştür (500, 501). Bu görevlerinin yanı sıra S100B'nin beyin dokusunda sinaps plastisitesinin düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir (37).

Hiperglisemi, mikrovasküler ve nöronal doku hasarına yol açmaktadır (502). Hiperglisemik hayvanların beyin dokusunda miyelin içeriği daha az ve hücre boyutu daha küçük olan hücrelerin sayıca artmış olduğu gösterilmiştir (503). Merkezi sinir sistemi, hasar durumunda ve metabolik rahatsızlıklarda astroglizis gelişimi ile tepki gösterir (504, 505). Astrositler, nöronların olgunlaşmasında etkileri olan hücrelerdir (365, 506). Astrosit işlevinde görülen değişimin serebral korteks ve hipokampus gelişimi üzerinde etkisinin olduğu bilinmektedir (503).

Hayvanların 4-8 haftalık süre içinde incelendiği çalışmada hipergliseminin nörobilişsel işlevde azalmaya neden olmadığı, ancak görülen fiziksel değişimler nedeniyle ilerleyen dönemde ortaya çıkma ihtimalinin yüksek olduğu bildirilmiştir (503). Aynı çalışmada, astrosit gövdesini işaretleyen S100B proteini kullanılmıştır (503). Merkezi sinir sisteminde hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde görevli, Ca^{+2} bağlayan protein grubunun üyesi olan S100B proteini (507) astrositlerde bulunur (508). Bu çalışmada S100B protein aktivasyonu beyin dokusunda hasar olduğu

düşünülen bölgede, glial aktivasyonun ve astrosit yoğunluğunun takibinde kullanılmıştır.

Farklı çalışmalarda, diyabet patogenezi ve tedavi ajanlarının etkinliğinin değerlendirilmesinde S100 protein belirteçleri kullanılmaktadır. Böylece hücrede birçok görevi bulunan S100 proteinin özellikle hücre proliferasyonu ile ilgili görevi (36) nedeniyle nöron yoğunluklarında görülen değişimler değerlendirilerek, diyabetin beyin dokusunda etki mekanizmalarından biri açıklanmaya çalışılmaktadır. DM ve kontrol gruplarının hipokampus bölgesinde immünohistokimyasal yöntemle S100B seviyelerinin ölçüldüğü çalışmada, diyabet grubunda S100B'nin azaldığı tespit edilmiştir (509). Bazı çalışmalarda ise antidepressan tedavi uygulamasının sıçan hipokampusunda S100B seviyesini arttırdığı görülmüştür (510, 511).

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, yukarıda bahsedilen çalışma bulgularıyla uyumluydu. Diyabet grubunda CA ve DG'de bazı nöroglia hücrelerinde S100 pozitifliği gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, S100 ekspresyonunun özellikle DG bölgesindeki hücrelerde bir miktar azaldığı gözlemlendi. Bu durumda, DM grubunda DG bölgesindeki bazı hücrelerde hücre proliferasyonu ve metabolizmasında azalma olduğu söylenebilir. Ayrıca kontrol grubunda özellikle DG'de ve bazı CA alanlarında S100 eksprese eden nöronlar bulunmasına karşın DM grubunda nöronlarda S100 aktivitesinin az olduğu ve daha çok nöroglia hücrelerinde S100 aktivasyonunun gerçekleştiği fark edildi. Bu bakımdan, diyabet ve siyatik sinir hasarı durumunda nöronlarda proliferasyon, hücre göçü, hücre farklılaşması ve enerji metabolizması ile ilgili aktivitelerin azaldığını, buna karşın nöroglialarda bahsedilen hücresel aktivitelerin arttığını söyleyebiliriz. Sonuçta nöroglial hücrelerde görülen aktivite artışı, diyabet ve siyatik sinir hasarı gibi dejeneratif süreçlerde nörogliaların doku onarımında aktif rol alması nedeniyle gerçekleşmiş olabilir.

Başka bir çalışmada ise yüksek glikoz ortamında kültüre edilen astrositlerin, S100B proteini sentezlenmesinde ve salgılanmasında azalmanın olduğu gözlenmiştir (512). Benzer iki çalışmada tip 2 diyabetli erişkinler ve kontrol grubu karşılaştırıldığında S100B seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (369, 513).

Çalışmamızda, sham grubunda; CA bölgesinde az sayıda nöroglia hücrelerinde S100 pozitif boyanma olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda DG bölgesinde nöronlarda S100 ekspresyonunun korunduğu gözlemlendi. Bu durum özellikle

kök hücre üretim merkezi olan DG bölgesinde hücre proliferasyonunun devam ettiğinin göstergesidir. CA bölgesinde, nöroglia hücrelerindeki S100 aktivitesinde, diyabet grubunda olduğu kadar belirgin bir artış olmadığını gördük. Bu bulgu, CA bölgesindeki nöroglial hücre aktivasyonu ve S100 ekspresyonu artışının, başka bir değişle hipokampusta onarım mekanizmasının özellikle diyabet tarafından indüklenmiş olabileceğini göstermektedir. Bizim bulgularımıza göre diyabet özellikle nöroglial hücrelerdeki S100 ekspresyonunu arttırırken, siyatik sinir hasarının DG bölgesindeki nöronlarda S100 ifadesinde belirgin bir değişikliğe yol açmamakla birlikte, bir miktar arttırmış olabileceği söylenebilir. Bu açıdan bizim bulgularımız, hiperglisemide S100 ifadesinin azaldığını savunan çalışmalardan farklıdır.

Garcinia kola ile tedavi edilen grubun DG bölgesinde az sayıda S100 pozitif hücre varken, CA bölgesindeki nöronlar negatiftir, burada az sayıda nöroglia hücresi pozitif boyanmıştır. Bu durum, DG bölgesinde kök hücre proliferasyonunun ve CA bölgesinde nöroprotektif nöroglial aktivasyonunun az miktarda gerçekleştiğini göstermektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda *Garcinia kola* grubunda nöronlarda ve nöroglialarda tüm hipokampus alanlarında S100 ekspresyonunun azalmış olduğu fark edilmektedir. *Garcinia kola* grubunda hücrelerin proliferasyon ve çeşitli hücre içi metabolik faaliyetlerinin azalmış olduğu savunulabilir. Bu durum *Garcinia kola*'nın hücre koruyucu etkisinin az olduğunu düşündürmektedir.

Kurkumin grubunda ise DG'de orta dereceli pozitif boyanma varken, CA bölgesinde nöronlar negatif, hücre uzantıları ve nöroglia hücreleri pozitif boyanmıştır. DG bölgesindeki kök hücre proliferasyonunun *Garcinia kola* uygulanan gruba göre daha fazla gerçekleştiğini söyleyebiliriz. CA bölgesindeki nöronlarda hücre proliferasyonu olmazken, kurkuminin olası nöroprotektif etkisiyle nöroglial hücre proliferasyonunu arttırdığı söylenebilir.

Diğer taraftan kurkumin verilen grupta hücresel uzantılarda S100 seviyesinin artışı, hücre dallanmaları ve sinapslarda bir miktar artış olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte S100 birçok hücre içi metabolik yolda görevli protein olduğundan, diyabetin ve sinir hasarının hücre içinde S100'ün rol aldığı hangi alt yolağı uyardığının belirlenmesi, bu durumlarda hücre içinde gelişen değişimlerin daha iyi anlaşılabilmesi açısından faydalı olacaktır. Kurkuminin birçok farklı moleküler yolak üzerinden etki

oluşturduğu bildirilmiştir (275). Gelişen etkilere bakıldığında, kurkuminin diyabet tedavisi için yararlı olabileceği düşünülmektedir (275).

5.4. Apoptozun Değerlendirilmesi

Diyabet kaynaklı bilişsel disfonksiyon ve demans gibi hipokampal fonksiyonla ilişkili olan hastalıkların temel patolojisi, apoptoz, oksidatif stres, inflamasyon, protein kinaz C aktivasyonu ve aldoz redüktaz aktivitesinde artışa dayanmaktadır. Diyabetik hastalarda gelişen komplikasyonlardan demansın patogenezi araştırıldığında, temel mekanizmanın nöron apoptozu olduğu bildirilmiştir (514).

Buradan yola çıkarak, çalışmamızda gruplara ait apoptotik süreçleri araştırmak için, anti-kaspaz 3 ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak değerlendirmeyi amaçladık. Sham ve DM grubunda, histopatolojik tekniklerle tespit edilen hücre kayıplarının apoptozla ilgili olup olmadığını inceledik. Hücre apoptozunun hipokampus tabakalarındaki yoğunluğunu belirlemeye çalıştık. Sham ve DM grubunda, dentat girus bölgesinde daha kuvvetli olmak üzere, kaspaz-3 aktivasyonunun yoğunluğu, bu grupların DG ve CA bölgelerinde görülen hücre dejenerasyonunun apoptotik süreçlerden kaynaklandığını düşündürmektedir. DG bölgesinde görülen immünohistokimyasal pozitifliğin, DM grubunda diğer gruplara göre daha yoğun olması, DM grubunda DG bölgesindeki apoptozun daha fazla gerçekleştiğine ve nörorejenerasyonun baskılandığına ilişkin bir gösterge olabilir.

Hücresel düzeyde yapılan incelemelerde, hücre içinde birçok işlevsel bozukluğa neden olan ve nöron apoptozu altında yatan önemli patolojik mekanizmalardan biri ER stresidir (514). Diğer taraftan diyabette ER stresini arttıran nedenler arasında reaktif oksijen türlerinin oluşması ve oksidatif stres sayılabilir (514). Hem Alzheimer hastalığı hem de diyabette görülen nöron kayıplarındaki artışın nedeninin AGE'lerin oksidatif stres oluşturması olduğu tespit edilmiştir (120, 121). Diyabette görülen demans ve bilişsel bozuklukların tedavisinde ER stresinin inhibe edilmesi bir seçenek olabilir (514). DM ve sham gruplarında oksidatif stres ve ER stresini kaynaklı nöron apoptozlarının artabileceği öngörülebilir. Çalışmamızda DM grubunda, DG bölgesi ve DG'ye yakın CA bölgesindeki piramidal nöronlarda ve nöroglia hücrelerinde kaspaz 3 ekspresyonunun artmış olduğu gözlemlendi, bu durum diyabetin, nöronlardaki apoptoz sürecini aktive etmesi ile ilgili olabilir. Sham grubunda DG bölgesinde, nöronlarda kuvvetli pozitif reaksiyon olduğu görüldü. Her

iki patolojik durum birlikte özellikle DG'deki hücrelerde apoptotik aktiviteyi artırıyor olabilir.

Deneyssel CCI uygulanan hayvanlarda yapılan bir çalışmada, hipokampus bölgesinde TNF üretiminde artış olduğu saptanmıştır (515). Tedavi ile TNF üretiminin azaltılmasının hiperaljezi duyusunu ve ağrı duyusu sonucu oluşan davranış problemlerini azalttığı görülmüştür (516). Bu çalışmada periferik sinir hasarı sonrası hipokampusta görülen TNF gibi inflamatuvar bir sitokinin artışında olduğu gibi, bununla uyumlu olacak şekilde sinir hasarı oluşturduğumuz grupta mikroglial hücre aktivasyonu gerçekleştiğini gözlemledik. Diğer taraftan *Garcinia kola* ve kurkumin gibi antiinflamatuvar özellikte madde verdiğimiz gruplarda, kurkumin grubunda daha belirgin olmak üzere, hipokampusta olumlu etkilerinin olduğunu ve her ikisinde de belli derecelerde iyileşme sağlandığını gördük. Sonuç olarak sinir hasarı ve diyabetin hipokampus üzerine etkisi ile ilgili tedavilerde antiinflamatuvar özellikteki tedavilerin değerlendirilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Diyabet ve siyatik sinir hasarında inflamasyon ve oksidatif stres reaksiyonlarında artış olabileceği öngörülmektedir. Bu sebeple iki grupta görülen kaspaz 3 aktivasyonlarının hücrelerin apoptoz süreci ile ilişkili olduğu görüşünü güçlendirmektedir. Sham grubu ile diyabet grubunu karşılaştırdığımızda kaspaz 3 aktivasyonunun DM grubunda CA alanına doğru yayıldığı görülmektedir. Siyatik sinir hasarına diyabet tablosunun eklenmesiyle, daha geniş bir alanda hücresel hasar ve apoptozun görüldüğü söylenebilir.

Öte yandan, kaspaz 3 aktivasyonu gösteren bazı hücrelerin canlılığının devam ettiği gösterilmiştir (384). Bu durum, kaspaz 3'ün apoptotik süreçler dışında başka görevlerinin olabileceğini düşündürmektedir (39). Kanseri hücreleri ve farklılaşmamış dokulara ait hücrelerde yapılan çalışmalarda, hücre proliferasyonu, doku rejenerasyonu, hücre migrasyon ve invazyonu gibi süreçlerde de kaspaz 3'ün aktif rol aldığı gösterilmiştir (385-388).

Garcinia kola grubunda, DG ve CA alanlarındaki hücrelerde kaspaz 3 aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür. Bu durum *Garcinia kola*'nın hipokampustaki hücreler üzerinde antiapoptotik etkisinin göstergesi olabilir. *Garcinia kola*'nın, apoptozu baskılaması, nöroprotektif bir etki olarak değerlendirilebileceği gibi, diyabet ve sinir hasarında oluşan nörodejenerasyonda, doku homeostazı

sağlanması üzerinde negatif bir etki de oluşturuyor olabilir. Diğer taraftan kaspaz 3 aktivasyonu hücrelerde rejenerasyon, hücre migrasyon ve invazyonu gibi süreçlerle ilişkili olarak gerçekleştirebilir. Bu durumda *Garcinia kola*'nın hipokampusta nörorejeneratif süreçler üzerinde olumlu etkisinin az olduğu düşünülebilir. *Garcinia kola* tedavisi sonucu hipokampusta gerçekleşen kaspaz 3 aktivasyonu ile ilgili hangi hücresel süreçlerdeki yolların aktivasyonunun gerçekleştiğinin tespit edilmesi, *Garcinia kola*'nın rejenerasyon ve apoptoz süreçleri üzerine etkisinin belirlenebilmesi açısından önemlidir. Bulgularımıza göre *Garcinia kola*'nın diyabet ve sinir hasarı sonrasında hipokampusta DM ve sham gruplarında görüldüğü ve tahmin edildiği gibi artan apoptoz aktivitesini bastırması olabileceğini düşünüyoruz. Sonuçta *Garcinia kola*'nın hipokampusta anti apoptotik etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Nöronal dokuda gelişim ve farklılaşma gibi süreçlerin dışında olgun nöronlarda gerçekleşen nöronal plastisite sürecinde de kaspaz 3 aktivasyonu görülmüştür (389). Kaspaz 3 ün apoptoz süreçlerinde rol alarak doku homeostazının sağlanmasının yanında, spesifik olarak hücre farklılaşması ve nöral gelişim süreçlerinde de etkili bir enzim olduğu gözlenmiştir (380). STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlara kurkumin verilmesiyle, pankreastaki proinflatuar sitokinler, hücredeki immünolojik proteinler, ER stresi ve apoptozun azaldığı tespit edilmiştir (517, 518). Kurkuminin pankreastaki bu iyileştirici etkisinin, sistemik etkiyle beyin dokusunda diyabete bağlı gelişen patolojileri de azaltabileceği, benzer hücresel etkilerle sinir dokusunda da nöroprotektif etkiler oluşturabileceği düşünüldü.

Kaynaklarda, siyatik siniri hasarlı sıçanlara kurkumin takviyesi verilmesi ile, hücresel otofajik, akson rejenerasyonu ve remiyelinizasyon süreçlerinin aktive edilebileceği gösterilmiştir (519). Kurkuminin otofajik yolları aktive etmesi sonucu, hücre apoptozunun önlenilebileceği ve S100 ekspresyonunun artabileceği bildirilmiştir. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre, hasarlı siyatik siniri olan sıçanlara kurkumin tedavisi uygulanması ile Schwann hücrelerinde apoptotik süreçlerin inhibisyonu ve miyelinizasyon aktivitelerinin artırılması ile, sinir onarımına katkı sağlanabileceği görülmüştür (519). Bulgularımız bu çalışmadaki bulgulardan farklı olarak kurkumin verdiğimiz grupta da kaspaz 3 pozitifliğinin devam ettiği yönündeydi. Elde ettiğimiz sonuçlarda, tüm gruplarda, kaspaz 3 aktivasyonunun özellikle DG bölgesinde yoğunlaştığı gözlemlendi. İmmünohistokimyasal sonuçlara göre kurkuminin, özellikle

DG’da bir miktar antiapoptotik etki gösterdiği söylenebilir. Dikkat çekici olan kurkumin grubunda, kontrol grubuna benzer şekilde CA ve DG’da benzer yaygın alanlarda kaspaz 3 antikor pozitifliğinin olmasıydı. Bu benzerlikten dolayı her iki grupta, kaspaz 3’ün apoptoz görevi dışında nöral gelişim ve plastisite süreçlerindeki göreviyle ilişkili olarak bir aktivasyon gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bir başka bakış açısıyla değerlendirdiğimizde, hipokampus dokusunda, diyabet ve sinir hasarı sonrası gelişen hasarda, canlılığını kaybeden hücrelerin ortadan kaldırılması, yeni üretilen hücrelerin bu hücrelerin yerini alması ve doku homeostazının sağlanması yönünde bir apoptotik aktivite sonucu kaspaz 3 pozitifliği gerçekleşmiş olabilir. Bu açıdan kaspaz 3 pozitifliği dokudaki iyileşmenin de bir göstergesi olabilir.

Garcinia kola ve kurkumin gruplarını değerlendirdiğimiz de *Garcinia kola* grubunda anti-apoptotik etkinin daha fazla olduğu görülmektedir. Bununla birlikte kaspaz 3 aktivasyonunun azalması ve apoptozun baskılanması, hipokampus dokusunda iyileşmenin mi, yoksa dejenerasyonun devam ettiğinin mi bir göstergesidir? Bu konunun yapılacak yeni ve daha detaylı araştırmalarla açıklığa kavuşturulması gerektiğini düşünüyoruz.

Kaspaz 3’ün bu patolojik durumlarda, hücrede hangi metabolik süreçlerde görev aldığının belirlenmesi ile ilgili ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Kurkumin ve *Garcinia kola*’da görülen anti-kaspaz 3 pozitif reaksiyonların altında yatan mekanizmalar, moleküler düzeydeki çalışmalarla kapsamlı olarak araştırılmalıdır.

5.5. Hipokampal Nörogenезin Değerlendirilmesi

Diyabet, birçok doku ve organda olduğu gibi beyin dokusunda da harabiyet yaratarak fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (128). Özellikle uzun süredir diyabetli olan kişilerde bilişsel fonksiyon bozukluklarının geliştiği iyi bilinmektedir (58, 106-108). Hipokampal nörogenез ve bilişsel işlevler arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir (410). Diyabetin hipokampusta görülen, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve nörogenез gibi süreçler üzerinde negatif etkisi olduğu tespit edilmiştir (111-113).

SOX-2, insan embriyonik kök hücre belirteci olması yanında, insan pluripotent kök hücrelerinde ana düzenleyici gen bölgesidir. Aynı zamanda sinir sistemi

onarımında görev alan bir transkripsiyon faktörü olup, multipotent nöral projenitör hücrelerde de ekspresyonlarının arttığı görülmüştür (401).

Çalışmamızda, embriyonik kök hücre belirteci olan SOX-2 ile diyabete bağlı hipokampusta kök hücrelerde görülen değişimler ve diyabetin hipokampusta nörogenez üzerinde yarattığı etkiler araştırılmıştır. Araştırmamızda DM grubunda, DG’de çok az sayıda nöroglia hücresinde pozitif boyanma görülmüştür. Bununla birlikte, CA bölgesinde özellikle nöroglia hücrelerinde zayıf pozitif boyanmanın olduğu alanlar gözlemlendi. Bu grupta nöronlarda SOX-2 ekspresyonuna rastlanmazken, kontrole göre nöroglialarda SOX-2 ekspresyonunun artması yeni oluşan hücrelerin nöroglia yönünde gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Sonuçta DM grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sadece DG bölgesinde nöroglia sayısı ve aktivasyonunun bir miktar artmış olduğu fark edilmekteydi. Bu durum, sinir dokusunda hasar oluşumunda nörogliaların onarım süreçlerinde rol alması (520) ile ilgili olabilir.

DM grubunda, damar endotel hücresinde de SOX-2 ekspresyonunun pozitif olduğu görüldü. Yetişkin epitel dokularında kök hücre gelişimi ve dokuda homeostazın SOX-2 tarafından düzenlendiği yönünde kanıtlar bulunmaktadır (407). Buna bağlı olarak, DM grubunda endotel hücrelerinde görülen pozitiflik, diyabetin endotel hücrelerinde arttırdığı stres etkisinin azaltılması için hücresel bir cevap olabilir.

Sham grubunda hipokampusta oluşan değişimlere baktığımızda, özellikle DG’nin granüler ve polimorfik tabakasında pozitif boyanmış hücreler olduğu, bunun dışında subgranüler tabaka ile CA bölgesinde az sayıda hücrede pozitif boyanmanın varlığı gözlemlendi. Kontrol grubu ile sham grubunu karşılaştırdığımızda, sham grubunda DG’nin bazı bölgelerinde SOX-2 ekspresyonunun artması, nöral projenitör hücre sayısının artmış olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, siyatik sinir hasarı üç ay gibi görece erken bir dönemde reaksiyonel olarak hipokampusta, bir miktar nöral öncü hücre üretiminde artışa yol açmıştır. Kontrol grubunda, DG ve CA bölgesindeki az sayıdaki hücrede SOX-2 pozitifliği, normal koşullarda, kök hücre üretiminin ve nöral farklılaşmanın az miktarda devam ettiğinin bir göstergesi olabilir.

Tip 2 DM’nin, yetişkin nörogenezinde önemli bir süreç olan nöral göç üzerinde etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (122). Benzer şekilde Alzheimer hastalığında nörodejenerasyonun yanı sıra nörogenez sürecinde de bozulmanın olduğu

bilinmektedir (123). Nörogenezin hafıza, öğrenme ve yaralanma durumunda iyileşme süreçlerinde önemli rol oynadığı ve ömür boyu devam ettiği tespit edilmiştir (123).

Literatür araştırmamız sonucunda antidiyabetik, antienflamatuar ve antioksidatif etkileri bulunan, dejeneratif süreçleri olumlu yönde etkileyecek tıbbi özelliğe sahip iki antioksidan maddeden biri olan *Garcinia kola* verdiğimiz grupta, DG'nin granüler ve subgranüler bölgelerinde orta yoğunlukta anti-SOX-2 pozitif boyanmalar gözlemlendi. Buradan DG'de kök hücre üretiminin bir miktar artmış olabileceğini söyleyebiliriz. Yine DG'ye yakın CA bölgesinde piramidal nöronlarda pozitif boyanmaların olması çoğalan ve farklılaşan nöral hücrelerin bu bölgeye göç etmiş olduğunu gösterebilir. Bunun dışında CA bölgesi boyunca ve str. alveus' ta az sayıda pozitif boyanan hücrelerin olması yeni üretilen ve farklılaşan nöron ve nörogliaların bu alanlara doğru yer değiştirmesi ile pozitif anti-SOX-2 boyanmaya yol açmış olabilir. Sonuç olarak *Garcinia kola*'nın diyabet ve sinir hasarına yönelik tedavide nörogenezi bir miktar arttırdığı söylenebilir.

Travmatik beyin hasarından sonra uygulanan, aralıklı oruç şeklinde besin alımı kısıtlamasının hipokampusun subgranüler bölgesinde nörogenezi arttırdığı gösterilmiştir (42). Ayrıca diyetin yetişkinlerdeki nörogenezi etkilediği başka çalışmalarda da tespit edilmiştir (521). Aynı zamanda, besin tüketiminin azaltılmasının hipokampal biliş üzerinde olumlu etkisinin olduğu gösterilmiştir (522, 523). Özellikle aralıklı orucun (524-527) bilişsel sağlığa faydalı olduğu ve bilişin gelişmesine katkı sağlayabileceği savunulmaktadır (42).

Hipokampusta meydana gelen nörogenez aktivasyonunu sağlayan bir başka uyaran olan kurkuminin, sinir hasarı ile oluşan ağrının neden olduğu bilişsel bozuklukları düzeltebileceği ileri sürülmektedir (220). Nöropatik ağrı oluşumunun belli bir oranda hipokampusta meydana gelen nörogenezis sürecini bozarak uzaysal hafıza ile ilgili sorunlara yol açabileceği yönünde kanıtlar bulunmaktadır (220). Periferik sinir hasarı sonucu oluşan hafıza bozukluğunun, hipokampusta meydana gelen nörogenezin aktivasyonu ile iyileştirilebileceği düşünülmektedir (220). Bu amaçla yapılan çalışmalarda, kurkumin uygulamasının hem ağrı duyusunu azalttığı hem de hafıza ile ilişkili bozuklukların iyileşmesini sağladığı görülmüştür (214-217, 219). Başka bir çalışmada 28 gün boyunca CCI uygulanarak ağrı oluşturulan deneklerde, hipokampus DG bölgesinde, yeni oluşan immatür ve matür nöron

sayılarında azalma ile fonksiyonel anlamda uzaysal hafızanın bozulduğu gözlenmiştir (209, 528).

Çalışmamızda kurkumin grubunda anti-SOX2 ile yaptığımız IHC boyamada, dentat girusta zayıf boyanmalar olduğu ve CA bölgesinde herhangi bir boyanmanın olmadığı gözlemlendi. Buradan kurkuminin, hipokampusta nörogenez, kök hücre proliferasyonu ve nöral farklılaşma üzerinde etkili olmadığı sonucuna vardık. Bu açıdan elde ettiğimiz sonuçlar kurkuminin nörogenezi uyarak sinir hasarının hipokampusta meydana getirdiği dejenerasyonu azaltabileceği ve fonksiyonel iyileşme sağlayabileceği yönündeki bulgulardan farklıdır.

Siyatik sinir hasarı, diyabet modeli ve iki farklı antioksidanın hipokampusta nörogenez ve kök hücreler üzerine etkilerinin araştırılması açısından bildiğimiz literatür kaynakları içinde çalışmamızın başka bir örneğinin olmadığını gördük.

Hipokampustaki nörogenez sürecindeki değişim, diyabetin farklı komplikasyonları ile kombine edilen hayvan modellerinde farklı tekniklerle araştırılabilir. Diyabette komplikasyon gelişimi gerçek hayatta sık karşılaştığımız bir durum olduğu için, araştırmaların da bu yönde yürütülmesinin faydalı olacağı kanaatindeyiz. Diğer taraftan anti-SOX-2 ile yaptığımız immünohistokimyasal boyamalar farklı dilüsyonlarda ve farklı kitlerle denenebilir. Özellikle zayıf boyanmaların çalışmamızdaki dilüsyon oranıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, sham, diyabet ve kullanılacak antioksidan gruplarının deney süreleri değiştirilerek erken veya geç dönemde nörogenez üzerine etkilerinin araştırılması faydalı olabilir. Diğer taraftan *Garcinia kola* ve kurkuminin farklı dozlarda, farklı bileşimler şeklinde biyoyararlanımları arttırılarak, farklı sürelerde veya farklı yollardan uygulanması ile tedavi edici etkinliklerinin belirlenmesi başka araştırmaların konusu olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda siyatik sinir transeksiyonu yapılan gruptaki ve siyatik sinir hasarı ile birlikte diyabet modeli oluşturulan gruptaki hipokampus dokuları stereolojik, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle incelenmiş olup, diyabetin beyin bilişsel yapısı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Siyatik sinir transeksiyonu olan diyabetik sıçanlara tedavi amaçlı *Garcinia kola* ve kurkumin verilerek, bu antioksidan ajanların hipokampustaki nöroprotektif etkinliği araştırıldı.

Dokuların stereolojik analizi sonrasında, hipokampusa ait beş tabakanın (str. alveus, str. oriens, str. piramidale, str. lucidum ve str. radiatum), toplam hipokampus hacmine oranları gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılarak, hacim oranlarındaki değişiklikler değerlendirildi. Str. lucidum tabakası dışında, str. alveus, str. oriens, str. piramidale ve str. radiatum oranları arasında farklılık bulunmadı. Sham, DM ve DM+Kur gruplarında, str. lucidumun toplam hipokampus hacmine oranında, kontrol grubuna göre artış gözlemlendi. Bu tabakanın, dentat giristan CA3 bölgesine doğru uzanan sinir hücre liflerinden oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda, str. lucidum tabakasında reaksiyonel onarım süreciyle ilişkili olarak kalınlaşma olabileceği düşünülebilir. Diğer taraftan str. lucidumun ince bir tabaka olması nedeniyle, örneklem aralığımız bu tabakanın sağlıklı bir biçimde değerlendirilmesi için yetersiz olmuş olabilir. Farklı örneklem stratejileri kullanılarak, str. luciduma ait hacimsel değişimlerin yeniden değerlendirilmesinde yarar vardır. Tüm stereolojik sonuçlarımız incelendiğinde, str. lucidum tabakası haricinde, hacim oranlarında gruplar arasında bir farkın olmadığı gözlemlendi.

Işık ve elektron mikroskopik analizlerimiz, sham ve DM grubunda çok sayıda dejenere nöroglia ve nöronların varlığını göstermiştir. Bu durum, sinir hasarı ve diyabetin, beyinde hücresel düzeyde nörodejeneratif bir etkiye neden olduğunun bir kanıtı olabilir. Ayrıca DM grubundaki damarların morfolojisinde izlenen dejenerasyonların/bozulmaların diyabetin yıkıcı etkisine işaret ettiğini düşünmekteyiz. DM grubunun kesitlerinde, mikrogliya aktivasyonun yüksek olduğu gözlemlendi. Sham grubuna ait hipokampus dokusunda, nörodejenerasyonla birlikte görülen mikrogliyal aktivasyonun, transeksiyon sonrası oluşan strese kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sham ve DM gruplarına ait hipokampal dokularda meydana gelen dejenerasyon ele alındığında, diyabet modeli oluşturulan grupta daha fazla nöron kaybı ve hücre

yapısında deformasyon olduğu gözlemlendi. Ayrıca iki grup arasında görülen farklardan biri de, sham grubunda sağlıklı yapıda görülen damar yapılarının diyabet modeli oluşturulan grupta biçimsel deformasyona uğramasıydı.

Garcinia kola ile tedavi edilen diyabetik sıçanlardan oluşan gruba ait elektron ve ışık mikroskop bulgularında, hipokampusta bulunan çok sayıdaki koyu hücreler, bu grupta hücre kaybının önemli derecede olduğunu düşündürmektedir. Özellikle, dentat girus bölgesindeki granüler nöronlarda görülen dejenerasyon, sinir hasarı ve diyabet sonucu oluşan dejeneratif etkinin *Garcinia kola* uygulamasıyla önlenemediğinin göstergesidir. Kurkumin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlara ait histopatolojik ve hücresel düzeydeki morfolojik değişiklikler incelendiğinde, bazı piramidal nöronların boyutunda küçülme olduğu görülse de nöronların çoğunun normal morfolojide ve doku bütünlüğünün genel olarak korunduğu tespit edildi. Bu durum, kurkuminin diyabetik hipokampal nöronlardaki protektif etkinliğini göstermektedir. Morfolojik incelemeler sonucunda, kontrol grubuna en yakın yapısal özellikte ve normal morfolojiye sahip olan grubun kurkumin grubu olduğu, en fazla hücre dejenerasyonun ise diyabet grubunda olduğu söylenebilir. *Garcinia kola* ve kurkumin gruplarına ait ışık ve elektron mikroskop bulguları karşılaştırdığımızda, kurkuminin tedavi edici özelliğinin daha fazla olduğu söylenebilir. Kurkumin ve *Garcinia kola*'nın uygulama dozu (ları) ve süresine bağlı olarak yeni araştırmaların planlanmasının gerekli olduğunu düşünüyoruz.

İmmünohistokimyasal analizler değerlendirildiğinde, sham ve DM grubunda bazı hücrelerin anti-S100 ile kuvvetli pozitif boyanması, bu gruplardaki hücre içi inflammatuar ve oksidatif reaksiyonların arttığına ilişkin bir kanıt olarak düşünülebilir. Özellikle sham grubuna ait DG'deki boyanmalar incelendiğinde, subgranüler tabakanın aktif olarak S100 eksprese ettiği görülmektedir. S100 proteininin aynı zamanda hücre proliferasyonunda rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda, sham grubunda DG'nin subgranüler tabakasında artan ekspresyon, stresin hücre proliferasyonunu uyarması ile ilişkili olabilir. Tedavi uygulanan gruplara ait S100 ekspresyonları incelendiğinde, kurkumin uygulanan grupta DG ve CA bölgelerinde, *Garcinia kola* grubuna göre daha fazla artış olduğu gözlemlendi. Bu durum, kurkuminin DG' taki hücre proliferasyonunu ve koruyucu etkinlikte olduğunu düşündüğümüz

nörogliyal çoğalma ve aktivasyonu uyarması bakımından daha etkin olduğunu düşündürmektedir.

Kaspaz 3 antikoru ile yaptığımız IHC boyanmalar değerlendirildiğinde; sham, DM ve *Garcinia kola* grubunda DG ve bu bölgeye yakın CA alanlarında pozitif boyanmaların olduğu gözlemlendi. Özellikle, DM ve sham grubundaki ekspresyonun DG bölgesinde artması, nörodejenerasyonun uyarılmasının yanı sıra hücrelerde rejeneratif aktivitenin baskılandığını düşündürmektedir. Bu pozitifliğin hücrelerde artan apoptotik aktivasyonla ilişkili olduğu düşünülmektedir. *Garcinia kola* ile tedavi grubunda, anti-kaspaz 3 aktivitesinin, DM grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Bu durum, bu terapötik ajanın anti-apoptotik etkinliğine ilişkin bir kanıt olabilir. Kurkumin grubunda ise anti-apoptotik etki yoğun değildi. Aynı zamanda, kaspaz 3 proteini, nöronal plastisitede görev almaktadır. Kurkumin ve *Garcinia kola* gruplarında izlenen bu pozitifliğin benzer şekilde kontrol grubunda da görülmesi nedeniyle bu gruplardaki kaspaz 3 aktivitesinin, nöroplastisitenin artışı ve hücre homeostazının korunması ile ilişkili olabileceği de düşünülmektedir. Kurkumin ve *Garcinia kola*'nın kaspaz 3 aktivasyonu üzerindeki etkisinin açıklanabilmesi için, kaspaz 3'ün görev aldığı metabolik yolların, moleküler düzeyde yapılacak araştırmalarla belirlenmesi gerekmektedir.

Embriyonik kök hücre veya multipotent nöral kök hücre belirteci olan SOX-2'ye ait boyanmalar ile hipokampustaki nörogenezin değişimini inceledik. Kontrol, sham ve DM gruplarında DG ve CA bölgelerinde az sayıda hücrede pozitif boyanmaya rastlandı. DM grubunda DG bölgesinde az sayıda nöroglia hücresinde SOX2 pozitifliği glial aktivasyonun artışının ve damar endotelinde SOX2 pozitifliğinin görülmesi, damar yapısındaki rejeneratif aktivitenin göstergesi olarak değerlendirildi. *Garcinia kola* grubunda, DG ve CA bölgelerinde orta yoğunlukta pozitifliğin olması, nörogenezin bir miktar artmış olduğunu gösterebilir. Bu grupta DG' ye yakın CA alanlarındaki nöronlarda ve diğer CA alanlarında az sayıda hücrede SOX2 pozitifliği DG' de üretilen hücrelerin bu alanlara doğru göç etmiş olabileceğini düşündürmektedir. Kurkumin verilen grupta ise CA alanında SOX2 pozitifliği yokken, DG alanında az sayıda hücrede zayıf boyanmanın olması bu grupta nörogenezin az oranda indüklendiğini göstermektedir. İmmünohistokimyasal boyanmalar

incelendiğinde, *Garcinia kola*’nın, kurkumine göre hipokampusta yeni nöron ve nöroglia hücre gelişimini daha fazla uyardığı söylenebilir.

Çalışmamızda hipokampus bölgesi, histopatolojik olarak incelendiğinde, DM grubunda, sham grubuna göre daha fazla hücresel dejenerasyon gözlemlendi. Kurkumin grubunda, *Garcinia kola* grubuna göre iyileşmenin daha iyi olduğu tespit edildi. Bu nedenle, diyabet hasarının yol açtığı hipokampustaki patolojik sürecin tedavisinde, kurkuminin farklı sürelerde ve farklı yollardan verilerek yeni araştırmaların yapılmasının faydalı olacağını düşünüyoruz. Diyabet, sıklıkla karşılaştığımız ve hayat kalitesini büyük oranda etkileyen metabolik bir hastalık olması nedeniyle, diyabetin patolojik süreçlerinin, hipokampusta hücresel ve moleküler düzeyde değerlendirilerek aydınlatılması gerektiği kanaatindeyiz.

Bilindiği üzere, diyabet genellikle farklı birçok komplikasyon ile birlikte görülmektedir. Gelecekte diyabetle ilgili yürütülen çalışmaların farklı patolojilerle kombine edilerek deney modellerinin oluşturulmasının, günlük hayattaki gerçekliğe daha yakın sonuçlar verebileceğini düşünmekteyiz. Diyabet ile birlikte görülen komplikasyonların hipokampusa etkilerinin birçok bilişsel bozukluk ve psikiyatrik hastalığa yol açabilme ihtimali nedeniyle bu alanda yeni çalışmaların yapılmasının değerli olacağı görüşündeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Daulatzai MA. Neurotoxic saboteurs: straws that break the hippo's (hippocampus) back drive cognitive impairment and Alzheimer's Disease. *Neurotox Res.* 2013;24(3):407-59.
2. Roy B, Ehlert L, Mullur R, Freeby MJ, Woo MA, Kumar R, et al. Regional Brain Gray Matter Changes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Sci Rep.* 2020;10(1):9925.
3. Salau VF, Erukainure OL, Bharuth V, Ibeji CU, Olasehinde TA, Islam MS. Kolaviron stimulates glucose uptake with concomitant modulation of metabolic activities implicated in neurodegeneration in isolated rat brain, without perturbation of tissue ultrastructural morphology. *Neurosci Res.* 2021;169:57-68.
4. McCall AL. The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes.* 1992;41(5):557-70.
5. Alagiakrishnan K, Sankaralingam S, Ghosh M, Mereu L, Senior P. Antidiabetic drugs and their potential role in treating mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Discov Med.* 2013;16(90):277-86.
6. Launer LJ. Diabetes and brain aging: epidemiologic evidence. *Curr Diab Rep.* 2005;5(1):59-63.
7. Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet.* 2010;375(9733):2215-22.
8. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, D'Agostino RB, Sr., Pencina MJ, Vasan RS, et al. Increasing cardiovascular disease burden due to diabetes mellitus: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2007;115(12):1544-50.
9. Gold SM, Dziobek I, Sweat V, Tirsi A, Rogers K, Bruehl H, et al. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2007;50(4):711-9.
10. Cherbuin N, Sachdev P, Anstey KJ. Higher normal fasting plasma glucose is associated with hippocampal atrophy: The PATH Study. *Neurology.* 2012;79(10):1019-26.

11. den Heijer T, Vermeer SE, van Dijk EJ, Prins ND, Koudstaal PJ, Hofman A, et al. Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetologia*. 2003;46(12):1604-10.
12. Soininen H, Puranen M, Helkala EL, Laakso M, Riekkinen PJ. Diabetes mellitus and brain atrophy: a computed tomography study in an elderly population. *Neurobiol Aging*. 1992;13(6):717-21.
13. Adegbehingbe OO, Adesanya SA, Idowu TO, Okimi OC, Oyelami OA, Iwalewa EO. Clinical effects of *Garcinia kola* in knee osteoarthritis. *J Orthop Surg Res*. 2008;3:34.
14. Ijomone OM, Obi AU. Kolaviron, isolated from *Garcinia kola*, inhibits acetylcholinesterase activities in the hippocampus and striatum of wistar rats. *Ann Neurosci*. 2013;20(2):42-6.
15. Omotoso GO, Olajide OJ, Gbadamosi IT, Adebayo JO, Enaibe BU, Akinola OB, et al. Cuprizone toxicity and *Garcinia kola* biflavonoid complex activity on hippocampal morphology and neurobehaviour. *Heliyon*. 2019;5(7):e02102.
16. Ayepola OR, Chegou NN, Brooks NL, Oguntibeju OO. Kolaviron, a *Garcinia* biflavonoid complex ameliorates hyperglycemia-mediated hepatic injury in rats via suppression of inflammatory responses. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:363.
17. Farombi EO, Abolaji AO, Farombi TH, Oropo AS, Owoje OA, Awunah MT. *Garcinia kola* seed biflavonoid fraction (Kolaviron), increases longevity and attenuates rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Pestic Biochem Physiol*. 2018;145:39-45.
18. Farombi EO, Adedara IA, Ajayi BO, Ayepola OR, Egbeme EE. Kolaviron, a natural antioxidant and anti-inflammatory phytochemical prevents dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;113(1):49-55.
19. Olajide O, Akinola O, Ajao S, Enaibe B. Sodium azide-induced degenerative changes in the dorsolateral prefrontal cortex of rats: Attenuating mechanisms of kolaviron. *European Journal of Anatomy*. 2016;20:47-64.
20. Omotoso GO, Olajide OJ, Gbadamosi IT, Rasheed MA, Izuogu CT. Kolaviron Protects the Prefrontal Cortex and Hippocampus against Histomorphological and Neurobehavioural Changes in Cuprizone Model of Multiple Sclerosis. *Malays J Med Sci*. 2018b;25(2):50-63.

21. Omotoso GO, Ukwubile, II, Arietarhire L, Sulaimon F, Gbadamosi IT. Kolaviron protects the brain in cuprizone-induced model of experimental multiple sclerosis via enhancement of intrinsic antioxidant mechanisms: Possible therapeutic applications? *Pathophysiology*. 2018a;25(4):299-306.
22. Hosseini-Zare MS, Sarhadi M, Zarei M, Thilagavathi R, Selvam C. Synergistic effects of curcumin and its analogs with other bioactive compounds: A comprehensive review. *Eur J Med Chem*. 2021;210:113072.
23. Poolsup N, Suksomboon N, Kurnianta PDM, Deawjaroen K. Effects of curcumin on glycemic control and lipid profile in prediabetes and type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215840.
24. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol*. 2017;174(11):1325-48.
25. Baliki MN, Chialvo DR, Geha PY, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, et al. Chronic pain and the emotional brain: specific brain activity associated with spontaneous fluctuations of intensity of chronic back pain. *J Neurosci*. 2006;26(47):12165-73.
26. Baliki MN, Geha PY, Apkarian AV, Chialvo DR. Beyond feeling: chronic pain hurts the brain, disrupting the default-mode network dynamics. *J Neurosci*. 2008;28(6):1398-403.
27. Metz AE, Yau HJ, Centeno MV, Apkarian AV, Martina M. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2423-8.
28. Mutso AA, Radzicki D, Baliki MN, Huang L, Banisadr G, Centeno MV, et al. Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *J Neurosci*. 2012;32(17):5747-56.
29. Nwaehujor C, Nwinyi FC, Igile G. The wound healing activities of *Garcinia* hydroxylbiflavanonol (GB1) from *Garcinia kola* in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Biochemistry*. 2013;173:173-80.
30. Ma J, Liu J, Yu H, Wang Q, Chen Y, Xiang L. Curcumin promotes nerve regeneration and functional recovery in rat model of nerve crush injury. *Neurosci Lett*. 2013;547:26-31.

31. Ma J, Yu H, Liu J, Chen Y, Wang Q, Xiang L. Curcumin promotes nerve regeneration and functional recovery after sciatic nerve crush injury in diabetic rats. *Neurosci Lett*. 2016;610:139-43.
32. Mohammadi R, Mahmoodi H. Improvement of peripheral nerve regeneration following nerve repair by silicone tube filled with curcumin: A preliminary study in the rat model. *International Journal of Surgery*. 2013;11(9):819-25.
33. Noorafshan A, Omid A, Karbalay-Doust S, Aliabadi E, Dehghani F. Effects of curcumin on the dorsal root ganglion structure and functional recovery after sciatic nerve crush in rat. *Micron*. 2011;42(5):449-55.
34. Patzkó A, Bai Y, Saporta MA, Katona I, Wu X, Vizzuso D, et al. Curcumin derivatives promote Schwann cell differentiation and improve neuropathy in R98C CMT1B mice. *Brain*. 2012;135(Pt 12):3551-66.
35. Tello Velasquez J, Nazareth L, Quinn RJ, Ekberg JA, St John JA. Stimulating the proliferation, migration and lamellipodia of Schwann cells using low-dose curcumin. *Neuroscience*. 2016;324:140-50.
36. Salman E, Bilici R, Tufan A. İnflamasyonun Önemli Bir Düzenleyicisi Olarak S100 Proteinleri. *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*. 2020;53:95-9.
37. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2013;13(1):24-57.
38. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(35):12815-9.
39. Suresh K, Carino K, Johnston L, Servinsky L, Machamer CE, Kolb TM, et al. A nonapoptotic endothelial barrier-protective role for caspase-3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019;316(6):L1118-126.
40. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005;73(4):1907-16.
41. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a008656.
42. Cao S, Li M, Sun Y, Wu P, Yang W, Dai H, et al. Intermittent fasting enhances hippocampal NPY expression to promote neurogenesis after traumatic brain injury. *Nutrition*. 2022;97:111621.

43. Anderson P, Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press; 2006.
44. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965;124(3):319-35.
45. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;4(11):1313-7.
46. Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci*. 2007;18(2):93-114.
47. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*. 1999;2(3):260-5.
48. Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, Clemenson GD, Jr., Consiglio A, Lie DC, et al. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn Mem*. 2009;16(2):147-54.
49. Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 2007;10(3):355-62.
50. Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*. 2006;16(3):296-304.
51. Thompson A, Boekhoorn K, Van Dam AM, Lucassen PJ. Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? *Genes Brain Behav*. 2008;7 Suppl 1:28-42.
52. Winner B, Kohl Z, Gage FH. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2011;33(6):1139-51.
53. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366(9503):2112-7.
54. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*. 2013;9(1):63-75.e2.

55. Gómez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(7):568-78.
56. Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):58-65.
57. Yau SY, Gil-Mohapel J, Christie BR, So KF. Physical exercise-induced adult neurogenesis: a good strategy to prevent cognitive decline in neurodegenerative diseases? *Biomed Res Int.* 2014;2014:403120.
58. Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 2000;23(11):542-9.
59. Satman I, Yilmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care.* 2002;25(9):1551-6.
60. Satman I TY, Gedik S, et al. The TURDEP-II Study Group. Diabetes epidemic in Turkey: Results of the second population based survey of diabetes and risk characteristics in Turkey (TURDEP-II). 47th EASD Annual Meeting; Lisbon, Portugal: Diabetologia; 2011.
61. Yoon KH, Lee JH, Kim JW, Cho JH, Choi YH, Ko SH, et al. Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet.* 2006;368(9548):1681-8.
62. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001;414(6865):782-7.
63. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005;365(9467):1333-46.
64. Taylor R. Type 2 diabetes: etiology and reversibility. *Diabetes Care.* 2013;36(4):1047-55.
65. Durruty P, Sanzana M, Sanhueza L. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. 2019.
66. Lebed YV, Orlovsky MA, Nikonenko AG, Ushakova GA, Skibo GG. Early reaction of astroglial cells in rat hippocampus to streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci Lett.* 2008;444(2):181-5.
67. Turan E, Kulaksızoğlu M. Current Medical Treatment Modalities in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Eur Arch Med Res.* 2015;31(0):86-94.

68. Pickavance L, Widdowson PS, King P, Ishii S, Tanaka H, Williams G. The development of overt diabetes in young Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats and the effects of chronic MCC-555 treatment. *Br J Pharmacol.* 1998;125(4):767-70.
69. Upton R, Widdowson PS, Ishii S, Tanaka H, Williams G. Improved metabolic status and insulin sensitivity in obese fatty (fa/fa) Zucker rats and Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats treated with the thiazolidinedione, MCC-555. *Br J Pharmacol.* 1998;125(8):1708-14.
70. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1994;37(7):643-50.
71. Bresnick GH. Diabetic retinopathy viewed as a neurosensory disorder. *Arch Ophthalmol.* 1986;104(7):989-90.
72. Satman İ. Diyabet epidemiyolojisi: salgın sonrasında bizleri neler bekliyor? DIMER Diyabet Sempozyumu, TÜSEB, 30 Ocak 2021; 4.
73. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843.
74. Sinclair A, Saeedi P, Kaundal A, Karuranga S, Malanda B, Williams R. Diabetes and global ageing among 65-99-year-old adults: Findings from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;162:108078.
75. Saeedi P, Salpea P, Karuranga S, Petersohn I, Malanda B, Gregg EW, et al. Mortality attributable to diabetes in 20-79 years old adults, 2019 estimates: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;162:108086.
76. Williams R, Karuranga S, Malanda B, Saeedi P, Basit A, Besançon S, et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;162:108072.
77. Rasgon NL, Kenna HA, Wroolie TE, Kelley R, Silverman D, Brooks J, et al. Insulin resistance and hippocampal volume in women at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2011;32(11):1942-8.

78. Sinha R, Dufour S, Petersen KF, LeBon V, Enoksson S, Ma YZ, et al. Assessment of skeletal muscle triglyceride content by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes*. 2002;51(4):1022-7.
79. Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E. Risk factors for type 2 diabetes mellitus: An exposure-wide umbrella review of meta-analyses. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194127.
80. Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Rosner BA, et al. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 1997;145(7):614-9.
81. Hillier TA, Pedula KL. Complications in young adults with early-onset type 2 diabetes: losing the relative protection of youth. *Diabetes Care*. 2003;26(11):2999-3005.
82. Lynch J, Helmrach SP, Lakka TA, Kaplan GA, Cohen RD, Salonen R, et al. Moderately intense physical activities and high levels of cardiorespiratory fitness reduce the risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in middle-aged men. *Arch Intern Med*. 1996;156(12):1307-14.
83. Weinstein AR, Sesso HD, Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, et al. Relationship of physical activity vs body mass index with type 2 diabetes in women. *Jama*. 2004;292(10):1188-94.
84. Venkatasamy VV, Pericherla S, Manthuruthil S, Mishra S, Hanno R. Effect of Physical activity on Insulin Resistance, Inflammation and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(8):1764-6.
85. Ross R. Does exercise without weight loss improve insulin sensitivity? *Diabetes Care*. 2003;26(3):944-5.
86. Strasser B. Physical activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1281(1):141-59.
87. Kaku K. Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. *Japan Medical Association Journal*. 2010;53:41-6.
88. Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL, Newell-Morris L. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care*. 2000;23(4):465-71.

89. Després JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis*. 1990;10(4):497-511.
90. Hayashi T, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Newell-Morris L, Kahn SE, et al. Visceral adiposity and the prevalence of hypertension in Japanese Americans. *Circulation*. 2003;108(14):1718-23.
91. Matsuzawa Y. Pathophysiology and molecular mechanisms of visceral fat syndrome: the Japanese experience. *Diabetes Metab Rev*. 1997;13(1):3-13.
92. Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Matsuda M, Mahankali S, Santini E, et al. Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):5098-103.
93. Raji A, Seely EW, Arky RA, Simonson DC. Body fat distribution and insulin resistance in healthy Asian Indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(11):5366-71.
94. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med*. 2001;345(11):790-7.
95. Schellenberg ES, Dryden DM, Vandermeer B, Ha C, Korownyk C. Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2013;159(8):543-51.
96. Chan JC, Cheung CK, Swaminathan R, Nicholls MG, Cockram CS. Obesity, albuminuria and hypertension among Hong Kong Chinese with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Postgrad Med J*. 1993;69(809):204-10.
97. Dabelea D, DeGroat J, Sorrelman C, Glass M, Percy CA, Avery C, et al. Diabetes in Navajo youth: prevalence, incidence, and clinical characteristics: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2(Suppl 2):S141-7.
98. Liu LL, Yi JP, Beyer J, Mayer-Davis EJ, Dolan LM, Dabelea DM, et al. Type 1 and Type 2 diabetes in Asian and Pacific Islander U.S. youth: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2(Suppl 2):S133-40.

99. Karter AJ, Schillinger D, Adams AS, Moffet HH, Liu J, Adler NE, et al. Elevated rates of diabetes in Pacific Islanders and Asian subgroups: The Diabetes Study of Northern California (DISTANCE). *Diabetes Care*. 2013;36(3):574-9.
100. Sattar N, Gill JM. Type 2 diabetes in migrant south Asians: mechanisms, mitigation, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(12):1004-16.
101. Haines L, Wan KC, Lynn R, Barrett TG, Shield JP. Rising incidence of type 2 diabetes in children in the U.K. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1097-101.
102. McKeigue PM, Shah B, Marmot MG. Relation of central obesity and insulin resistance with high diabetes prevalence and cardiovascular risk in South Asians. *Lancet*. 1991;337(8738):382-6.
103. Dimas AS, Lagou V, Barker A, Knowles JW, Mägi R, Hivert MF, et al. Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. *Diabetes*. 2014;63(6):2158-71.
104. Flannick J, Florez JC. Type 2 diabetes: genetic data sharing to advance complex disease research. *Nat Rev Genet*. 2016;17(9):535-49.
105. Franks PW, Pearson E, Florez JC. Gene-environment and gene-treatment interactions in type 2 diabetes: progress, pitfalls, and prospects. *Diabetes Care*. 2013;36(5):1413-21.
106. Strachan MW, Deary IJ, Ewing FM, Frier BM. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care*. 1997;20(3):438-45.
107. Messier C. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiol Aging*. 2005;26 Suppl 1:26-30.
108. Biessels G-J, ter Braak EW, Erkelens DW, Hijman R. Cognitive function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Neuroscience Research Communications*. 2001;28(1):11-22.
109. Toth C, Martinez J, Zochodne DW. RAGE, diabetes, and the nervous system. *Curr Mol Med*. 2007;7(8):766-76.
110. Whitmer RA. Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007;7(5):373-80.

111. Hwang IK, Yi SS, Kim YN, Kim IY, Lee IS, Yoon YS, et al. Reduced hippocampal cell differentiation in the subgranular zone of the dentate gyrus in a rat model of type II diabetes. *Neurochem Res.* 2008;33(3):394-400.
112. Lang BT, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R. Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats. *Brain Res.* 2009;1258:25-33.
113. Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci.* 2008;11(3):309-17.
114. Hwang IK, Yi SS, Song W, Won MH, Yoon YS, Seong JK. Effects of age and treadmill exercise in chronic diabetic stages on neuroblast differentiation in a rat model of type 2 diabetes. *Brain Res.* 2010;1341:63-71.
115. de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol.* 2008;2(6):1101-13.
116. Geroldi C, Frisoni GB, Paolisso G, Bandinelli S, Lamponi M, Abbatecola AM, et al. Insulin Resistance in Cognitive Impairment: The InCHIANTI Study. *Archives of Neurology.* 2005;62(7):1067-72.
117. Noor A, Zahid S. Alterations in adult hippocampal neurogenesis, aberrant protein s-nitrosylation, and associated spatial memory loss in streptozotocin-induced diabetes mellitus type 2 mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2017;20(10):1159-65.
118. Biessels GJ, Kamal A, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res.* 1998;800(1):125-35.
119. van Bussel FC, Backes WH, Hofman PA, van Oostenbrugge RJ, Kessels AG, van Boxtel MP, et al. On the interplay of microvasculature, parenchyma, and memory in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2015;38(5):876-82.
120. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, et al. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(15):7036-41.
121. Valente T, Gella A, Fernández-Busquets X, Unzeta M, Durany N. Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):67-76.

122. Ramos-Rodriguez JJ, Molina-Gil S, Ortiz-Barajas O, Jimenez-Palomares M, Perdomo G, Cozar-Castellano I, et al. Central proliferation and neurogenesis is impaired in type 2 diabetes and prediabetes animal models. *PLoS One*. 2014;9(2):e89229.
123. Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2002;83(6):1509-24.
124. Foster MW, Liu L, Zeng M, Hess DT, Stamler JS. A genetic analysis of nitrosative stress. *Biochemistry*. 2009;48(4):792-9.
125. Nakamura T, Lipton SA. Redox regulation of mitochondrial fission, protein misfolding, synaptic damage, and neuronal cell death: potential implications for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Apoptosis*. 2010;15(11):1354-63.
126. Mäkimattila S, Malmberg-Cèder K, Häkkinen AM, Vuori K, Salonen O, Summanen P, et al. Brain metabolic alterations in patients with type 1 diabetes-hyperglycemia-induced injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24(12):1393-9.
127. McCall AL. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. *European Journal of Pharmacology*. 2004;490(1):147-58.
128. Nam SM, Hwang IK, Yi SS, Yoo KY, Park OK, Yan B, et al. Differential effects of treadmill exercise on calretinin immunoreactivity in type 2 diabetic rats in early and chronic diabetic stages. *J Vet Med Sci*. 2011;73(8):1037-42.
129. van der Graaf M, Janssen SWJ, van Asten JJA, Hermus ARMM, Sweep CGJ, Pikkemaat JA, et al. Metabolic profile of the hippocampus of Zucker Diabetic Fatty rats assessed by in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy. *NMR in Biomedicine*. 2004;17(6):405-10.
130. Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res*. 2002;32(4):225-30.
131. Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1504(2-3):196-219.

132. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S-i, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(6779):787-90.
133. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
134. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*. 2002;23(5):599-622.
135. Renard C, Chappey O, Wautier MP, Nagashima M, Morser J, Scherrmann JM, et al. The human and rat recombinant receptors for advanced glycation end products have a high degree of homology but different pharmacokinetic properties in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;290(3):1458-66.
136. Zaltzberg H, Kanter Y, Aviram M, Levy Y. Increased plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM. *Isr Med Assoc J*. 1999;1(4):228-31.
137. Celik S, Baydaş G, Yilmaz O. Influence of vitamin E on the levels of fatty acids and MDA in some tissues of diabetic rats. *Cell Biochem Funct*. 2002;20(1):67-71.
138. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, Mahajan A, Agarwala V, Gaulton KJ, et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*. 2016;536(7614):41-7.
139. Suchal K, Malik S, Khan SI, Malhotra RK, Goyal SN, Bhatia J, et al. Protective effect of mangiferin on myocardial ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats: role of AGE-RAGE/MAPK pathways. *Sci Rep*. 2017;7:42027.
140. de Morais H, de Souza CP, da Silva LM, Ferreira DM, Baggio CH, Vanvossen AC, et al. Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: Role of CB1 receptors. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016;26(10):1590-600.
141. Pereira MM, de Morais H, Dos Santos Silva E, Corso CR, Adami ER, Carlos RM, et al. The antioxidant gallic acid induces anxiolytic-, but not antidepressant-like effect, in streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis*. 2018;33(5):1573-84.
142. Rahmani G, Farajdokht F, Mohaddes G, Babri S, Ebrahimi V, Ebrahimi H. Garlic (*Allium sativum*) improves anxiety- and depressive-related behaviors and brain oxidative stress in diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*. 2020;126(2):95-100.

143. Rebai R, Jasmin L, Boudah A. The antidepressant effect of melatonin and fluoxetine in diabetic rats is associated with a reduction of the oxidative stress in the prefrontal and hippocampal cortices. *Brain Res Bull.* 2017;134:142-50.
144. Safhi MM, Qumayri HM, Masmali AUM, Siddiqui R, Alam MF, Khan G, et al. Thymoquinone and fluoxetine alleviate depression via attenuating oxidative damage and inflammatory markers in type-2 diabetic rats. *Arch Physiol Biochem.* 2019;125(2):150-5.
145. Wayhs CA, Mescka CP, Vanzin CS, Ribas GS, Guerreiro G, Nin MS, et al. Brain effect of insulin and clonazepam in diabetic rats under depressive-like behavior. *Metab Brain Dis.* 2013;28(4):563-70.
146. Patel SS, Ray RS, Sharma A, Mehta V, Katyal A, Udayabanu M. Antidepressant and anxiolytic like effects of *Urtica dioica* leaves in streptozotocin induced diabetic mice. *Metab Brain Dis.* 2018;33(4):1281-92.
147. Gupta D, Radhakrishnan M, Kurhe Y. Ondansetron, a 5HT₃ receptor antagonist reverses depression and anxiety-like behavior in streptozotocin-induced diabetic mice: possible implication of serotonergic system. *Eur J Pharmacol.* 2014;744:59-66.
148. Castillo-Gómez E, Coviello S, Perez-Rando M, Curto Y, Carceller H, Salvador A, et al. Streptozotocin diabetic mice display depressive-like behavior and alterations in the structure, neurotransmission and plasticity of medial prefrontal cortex interneurons. *Brain Res Bull.* 2015;116:45-56.
149. Baydas G, Sonkaya E, Tuzcu M, Yasar A, Donder E. Novel role for gabapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocine-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(4):417-22.
150. Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog Neurobiol.* 2013;108:21-43.
151. Okusaka T, Ueno H, Morizane C, Kondo S, Sakamoto Y, Takahashi H, et al. Cytotoxic chemotherapy for pancreatic neuroendocrine tumors. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2015;22(8):628-33.
152. Rodrigues L, Wartchow KM, Suardi LZ, Federhen BC, Selistre NG, Gonçalves CA. Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins linked to glucose metabolism alterations. *Neurochem Int.* 2019;128:85-93.

153. Bennett RA, Pegg AE. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.* 1981;41(7):2786-90.
154. Brouwers B, Pruniau V, Cauwelier EJG, Schuit F, Lerut E, Ectors N, et al. Phlorizin pretreatment reduces acute renal toxicity in a mouse model for diabetic nephropathy. *J Biol Chem.* 2013;288(38):27200-7.
155. Eizirik DL, Björklund A, Cagliero E. Genotoxic agents increase expression of growth arrest and DNA damage--inducible genes gadd 153 and gadd 45 in rat pancreatic islets. *Diabetes.* 1993;42(5):738-45.
156. Harb G, Toreson J, Dufour J, Korbitt G. Acute exposure to streptozotocin but not human proinflammatory cytokines impairs neonatal porcine islet insulin secretion in vitro but not in vivo. *Xenotransplantation.* 2007;14(6):580-90.
157. Katakam AK, Chipitsyna G, Gong Q, Vancha AR, Gabbeta J, Arafat HA. Streptozotocin (STZ) mediates acute upregulation of serum and pancreatic osteopontin (OPN): a novel islet-protective effect of OPN through inhibition of STZ-induced nitric oxide production. *J Endocrinol.* 2005;187(2):237-47.
158. Rosenberger C, Khamaisi M, Goldfarb M, Shina A, Shilo V, Zilbertrest F, et al. Acute kidney injury in the diabetic rat: studies in the isolated perfused and intact kidney. *Am J Nephrol.* 2008;28(5):831-9.
159. Knezovic A, Loncar A, Homolak J, Smailovic U, Osmanovic Barilar J, Ganoci L, et al. Rat brain glucose transporter-2, insulin receptor and glial expression are acute targets of intracerebroventricular streptozotocin: risk factors for sporadic Alzheimer's disease? *J Neural Transm (Vienna).* 2017;124(6):695-708.
160. Type 2 Diabetes. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/type-2-diabetes/symptoms-causes/syc-20351193> adresinden 05.03.2023 tarihinde erişilmiştir.
161. Early Signs of Type 2 Diabetes. https://www.webmd.com/diabetes/type-2-diabetes-symptoms?ecd=wnl_dia_071410 adresinden 05.03.2023 tarihinde erişilmiştir.
162. TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye Diyabet Programı 2015-2020. <https://erzurumism.saglik.gov.tr/Eklenti/8856/0/turkiyedyabetprogrami2015-2020pdf.pdf> adresinden 13.07.2023 tarihinde erişilmiştir.
163. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. Glucose toxicity. *Diabetes Care.* 1990;13(6):610-30.

164. Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J.* 2009;418(3):475-89.
165. Theodosiou A, Ashworth A. MAP kinase phosphatases. *Genome Biol.* 2002;3(7):Reviews3009.
166. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* 2012;92(2):689-737.
167. Mehan S, Meena H, Sharma D, Sankhla R. JNK: a stress-activated protein kinase therapeutic strategies and involvement in Alzheimer's and various neurodegenerative abnormalities. *J Mol Neurosci.* 2011;43(3):376-90.
168. Tümer G, ÇR. Tip 2 diabetes mellitusda tıbbi beslenme tedavisi. *Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2012;29(1s):12-5.
169. Yılmaz M. Obezite ve Diabetes Mellitus. 45. Ulusal Diyabet Kongre Kitabı 2009, s55. <https://diyabetkongresi.org/docs/gecmis-kongreler/45-ulusal-diyabet-kongresi.pdf> adresinden 04.06.2023 tarihinde erişilmiştir.
170. Evert AB, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ, et al. Nutrition Therapy Recommendations for the Management of Adults With Diabetes. *Diabetes Care.* 2013;37(Supplement_1):S120-S43.
171. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;346(6):393-403.
172. Bozkurt N. Diabetes mellitus ve beslenme ilkeleri. 5 ed. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi; 2008. 257- 87 p.
173. Hainer V, Toplak H, Mitrakou A. Treatment modalities of obesity: what fits whom? *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S269-77.
174. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu- 2013. https://www.ktu.edu.tr/dosyalar/17_02_15_2b178.pdf adresinden 03.06.2023 tarihinde erişilmiştir.

175. Carbohydrates in human nutrition. (FAO Food and Nutrition Paper - 66). <https://www.fao.org/3/w8079e/w8079e00.htm> adresinden 04.06.2023 tarihinde erişilmiştir.
176. Bantle JP, Wylie-Rosett J, Albright AL, Apovian CM, Clark NG, Franz MJ, et al. Nutrition recommendations and interventions for diabetes--2006: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2006;29(9):2140-57.
177. Palliative care. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/palliative-care> adresinden 03.06.2023 tarihinde erişilmiştir.
178. Toprak İ.D. AÖK, Köstek B., Acar M.A., Aslan İ.B., Yılmaz U., Eruzun H., Arman Y., Tükek T. Tip 2 Diyabetli Hastaların Tedavisinde Kılavuzlara Ne Kadar Uygun Hareket Ediyoruz? *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi* 2020;84(3):369- 75.
179. Kanter JE, Bornfeldt KE. Impact of Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(6):1049-53.
180. Sekimoto M, Ii M. Supplier-Induced Demand for Chronic Disease Care in Japan: Multilevel Analysis of the Association between Physician Density and Physician-Patient Encounter Frequency. *Value Health Reg Issues*. 2015;6:103-10.
181. Anjana RM, Shanthirani CS, Unnikrishnan R, Mugilan P, Amutha A, Nair HD, et al. Regularity of follow-up, glycemic burden, and risk of microvascular complications in patients with type 2 diabetes: a 9-year follow-up study. *Acta Diabetol*. 2015;52(3):601-9.
182. Hu M, Zhou Z, Zeng F, Sun Z. Effects of frequency of follow-up on quality of life of type 2 diabetes patients on oral hypoglycemics. *Diabetes Technol Ther*. 2012;14(9):777-82.
183. Javorsky E, Robinson A, Boer Kimball A. Evidence-based guidelines to determine follow-up intervals: a call for action. *Am J Manag Care*. 2014;20(1):17-9.
184. Kleinberger JW, Pollin TI. Personalized medicine in diabetes mellitus: current opportunities and future prospects. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1346(1):45-56.
185. Schmidt AM. Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(1):e1-e8.
186. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358(24):2560-72.

187. Kılıç Kan E. ÇR. Tip 2 diabetes mellitusta kombinasyon tedavisi. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2012;29(1s):39-43.
188. Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Jama*. 1999;281(21):2005-12.
189. U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes*. 1995;44(11):1249-58.
190. DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333(9):541-9.
191. Raskin P, Jovanovic L, Berger S, Schwartz S, Woo V, Ratner R. Repaglinide/troglitazone combination therapy: improved glycemic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2000;23(7):979-83.
192. Kolinko Y, Maleckova A, Kochova P, Grajciarova M, Blassova T, Kural T, et al. Using virtual microscopy for the development of sampling strategies in quantitative histology and design-based stereology. *Anat Histol Embryol*. 2022;51(1):3-22.
193. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(1):193-203.
194. Chou CW, Wong GT, Lim G, McCabe MF, Wang S, Irwin MG, et al. Peripheral nerve injury alters the expression of NF- κ B in the rat's hippocampus. *Brain Res*. 2011;1378:66-71.
195. Kodama D, Ono H, Tanabe M. Altered hippocampal long-term potentiation after peripheral nerve injury in mice. *Eur J Pharmacol*. 2007;574(2-3):127-32.
196. Duric V, McCarson KE. Persistent pain produces stress-like alterations in hippocampal neurogenesis and gene expression. *J Pain*. 2006;7(8):544-55.

197. Ahn HJ, Hernandez CM, Levenson JM, Lubin FD, Liou HC, Sweatt JD. c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation. *Learn Mem.* 2008;15(7):539-49.
198. Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C, et al. Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J Neurosci.* 2007;27(49):13436-45.
199. O'Sullivan NC, Croydon L, McGettigan PA, Pickering M, Murphy KJ. Hippocampal region-specific regulation of NF-kappaB may contribute to learning-associated synaptic reorganisation. *Brain Res Bull.* 2010;81(4-5):385-90.
200. Lubin FD, Sweatt JD. The IkappaB kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron.* 2007;55(6):942-57.
201. Ma W, Bisby MA. Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. *Brain Res.* 1998;797(2):243-54.
202. Meunier A, Latrémolière A, Dominguez E, Mauborgne A, Philippe S, Hamon M, et al. Lentiviral-mediated Targeted NF-κB Blockade in Dorsal Spinal Cord Glia Attenuates Sciatic Nerve Injury-induced Neuropathic Pain in the Rat. *Mol Ther.* 2007;15(4):687-97.
203. Boersma MC, Meffert MK. Novel roles for the NF-kappaB signaling pathway in regulating neuronal function. *Sci Signal.* 2008;1(6):pe7.
204. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci.* 2003;6(10):1072-8.
205. Derbyshire SWG, Jones AKP, Gyulai F, Clark S, Townsend D, Firestone LL. Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. *Pain.* 1997;73(3):431-45.
206. Del Rey A, Yau HJ, Randolph A, Centeno MV, Wildmann J, Martina M, et al. Chronic neuropathic pain-like behavior correlates with IL-1β expression and disrupts cytokine interactions in the hippocampus. *Pain.* 2011;152(12):2827-35.
207. Ren W-J, Liu Y, Zhou L-J, Li W, Zhong Y, Pang R-P, et al. Peripheral nerve injury leads to working memory deficits and dysfunction of the hippocampus by upregulation of TNF-α in rodents. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36(5):979-92.

208. Al-Amin H, Sarkis R, Atweh S, Jabbur S, Saadé N. Chronic dizocilpine or apomorphine and development of neuropathy in two animal models II: effects on brain cytokines and neurotrophins. *Exp Neurol*. 2011;228(1):30-40.
209. Dellarole A, Morton P, Brambilla R, Walters W, Summers S, Bernardes D, et al. Neuropathic pain-induced depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis and plasticity are dependent on TNFR1 signaling. *Brain Behav Immun*. 2014;41:65-81.
210. Gao C, Shen J. Metabolic Factors and Adult Neurogenesis: Impacts of Chinese Herbal Medicine on Brain Repair in Neurological Diseases. *Int Rev Neurobiol*. 2017;135:117-47.
211. Adedara IA, Awogbindin IO, Anamelechi JP, Farombi EO. Garcinia kola seed ameliorates renal, hepatic, and testicular oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol*. 2015;53(5):695-704.
212. Seke Etet PF, Farahna M, Satti GMH, Bushara YM, El-Tahir A, Hamza MA, et al. Garcinia kola seeds may prevent cognitive and motor dysfunctions in a type 1 diabetes mellitus rat model partly by mitigating neuroinflammation. *J Complement Integr Med*. 2017;14(3).
213. Farahna M, Seke Etet PF, Osman SY, Yurt KK, Amir N, Vecchio L, et al. Garcinia kola aqueous suspension prevents cerebellar neurodegeneration in long-term diabetic rat - a type 1 diabetes mellitus model. *J Ethnopharmacol*. 2017;195:159-65.
214. Arora R, Kuhad A, Kaur IP, Chopra K. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats. *Eur J Pain*. 2015;19(7):940-52.
215. Liu S, Li Q, Zhang MT, Mao-Ying QL, Hu LY, Wu GC, et al. Curcumin ameliorates neuropathic pain by down-regulating spinal IL-1 β via suppressing astroglial NALP1 inflammasome and JAK2-STAT3 signalling. *Sci Rep*. 2016;6:28956.
216. Sun J, Chen F, Braun C, Zhou YQ, Rittner H, Tian YK, et al. Role of curcumin in the management of pathological pain. *Phytomedicine*. 2018;48:129-40.
217. Zhu X, Li Q, Chang R, Yang D, Song Z, Guo Q, et al. Curcumin alleviates neuropathic pain by inhibiting p300/CBP histone acetyltransferase activity-regulated expression of BDNF and cox-2 in a rat model. *PLoS One*. 2014;9(3):e91303.

218. Saffarpour S, Janzadeh A, Rahimi B, Ramezani F, Nasirinezhad F. Chronic nanocurcumin treatment ameliorates pain-related behavior, improves spatial memory, and reduces hippocampal levels of IL-1 β and TNF α in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Psychopharmacology (Berl)*. 2021;238(3):877-86.
219. Zhang L, Ding X, Wu Z, Wang M, Tian M. Curcumin alleviates pain and improves cognitive impairment in a rat model of cobra venom-induced trigeminal neuralgia. *J Pain Res*. 2018;11:1095-104.
220. Du J, Deng Y, Qiu Z, Sun G, Guo Y, Hei Z, et al. Curcumin Alleviates Chronic Pain and Improves Cognitive Impairment via Enhancing Hippocampal Neurogenesis in Sciatic Nerve Constriction Rats. *J Pain Res*. 2021;14:1061-70.
221. Barr M, Klerman J. The human nervous system. Beşinci baskı. Philadelphia: JB Lippincott Comp; 1988.
222. Insausti R, Amaral D. Hippocampal Formation. 2004. p. 871-914.
223. Songur A ÖO, Sarsılmaz M. Hipokampus. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2001;21(5):427-31.
224. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: yapısı ve fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg*. 2015;25(3):287-95.
225. Moser E, Moser MB. Mapping your every move. *Cerebrum*. 2014;2014:4.
226. Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T, et al. Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cereb Cortex*. 2005;15(2):187-93.
227. Amaral DG, INSAUSTI R. Hippocampal formation. The human nervous system. 1990:711-55.
228. Zhang SJ, Ye J, Couey JJ, Witter M, Moser EI, Moser MB. Functional connectivity of the entorhinal-hippocampal space circuit. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1635):20120516.
229. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):11-21.
230. Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res*. 2012;226(1):56-65.

231. Wixted JT, Goldinger SD, Squire LR, Kuhn JR, Papesh MH, Smith KA, et al. Coding of episodic memory in the human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(5):1093-8.
232. Raisman G, Cowan W, Powell T. The extrinsic afferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain*. 1965;88(5):963-96.
233. Sendrowski K, Sobaniec W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacol Rep*. 2013;65(3):555-65.
234. Papez JW. A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1995;7(1):103-12.
235. Woollett K, Maguire EA. Exploring anterograde associative memory in London taxi drivers. *Neuroreport*. 2012;23(15):885-8.
236. Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(34):12474-9.
237. Saransaari P, Oja SS. Taurine release from the developing and ageing hippocampus: stimulation by agonists of ionotropic glutamate receptors. *Mech Ageing Dev*. 1997;99(3):219-32.
238. Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub*. 2012;24(2):152-8.
239. Kaiboriboon K, Hogan RE. Hippocampal shape analysis in status epilepticus associated with acute encephalitis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23(6):1003-6.
240. Lega B, Burke J, Jacobs J, Kahana MJ. Slow-Theta-to-Gamma Phase-Amplitude Coupling in Human Hippocampus Supports the Formation of New Episodic Memories. *Cereb Cortex*. 2016;26(1):268-78.
241. Moser MB, Rowland DC, Moser EI. Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(2):a021808.
242. Okoko T. In vitro antioxidant and free radical scavenging activities of *Garcinia kola* seeds. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(10):2620-3.
243. Omodamiro O, Obinna A, Ewa Ibe C. Evaluation of antioxidant potential and anti-diabetic effect of ethanol seed extract of *Garcinia kola* (Bitter Kola) in albino rat. *Journal of Medicinal Herbs and Ethnomedicine*. 2020;6:56- 60.

244. Erukainure O, Olakunle S., Islam, S. *Clerodendrum volubile*: Phenolics and Applications to Health. In: Watson R, Preedy, V., Zibadi, S. , editor. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* 2ed: Elsevier Inc.; 2018. p. 53-68.
245. Salau VF, Erukainure OL, Ibeji CU, Olasehinde TA, Koobanally NA, Islam MS. Ferulic Acid Modulates Dysfunctional Metabolic Pathways and Purinergic Activities, While Stalling Redox Imbalance and Cholinergic Activities in Oxidative Brain Injury. *Neurotoxicity Research*. 2020;37(4):944-55.
246. Uko O, Usman A, Ataja A. Some biological activities of *Garcinia kolain* growing rats. 2000;71.
247. Adebisi AA. In: Sunderland T, Ndoye O, editors. *Forest Products, Livelihoods and Conservation: Case Studies on Non-timber Forest Systems* Center for International Forestry Research. Bogor Barat 2004. p. 115- 32.
248. Ogunkunle AT, Oyelakin TM, Enitan AO, Oyewole FE. A quantitative documentation of the composition of two powdered herbal formulations (antimalarial and haematinic) using ethnomedicinal information from ogbomoso, Nigeria. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:751291.
249. Ruiz Perez M, Ndoye, O., Eyebe, A., Puntodewo, A. Spatial characteristics of non-timber forest product markets in the humid forest zone of Cameroon. *Int For Rev* 2. 2000:71- 83.
250. Adesina SK, Gbile, Z.O., Odukoya, O.A. . Survey of indigenous plants of West Africa with special emphasis on medicinal plants and issues associated with management. The United Nations Programme on Natural Resources in Africa. 1995:84-5.
251. Kalu WO, Okafor PN, Ijeh, II, Eleazu C. Effect of kolaviron, a biflavanoid complex from *Garcinia kola* on some biochemical parameters in experimentally induced benign prostatic hyperplastic rats. *Biomed Pharmacother*. 2016;83:1436-43.
252. Farombi EO, Tahnteng JG, Agboola AO, Nwankwo JO, Emerole GO. Chemoprevention of 2-acetylaminofluorene-induced hepatotoxicity and lipid peroxidation in rats by kolaviron--a *Garcinia kola* seed extract. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(6):535-41.

253. Adaramoye OA, Nwaneri VO, Anyanwu KC, Farombi EO, Emerole GO. Possible anti-atherogenic effect of kolaviron (a *Garcinia kola* seed extract) in hypercholesterolaemic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(1-2):40-6.
254. Oyenihini OR, Brooks NL, Oguntibeju OO. Effects of kolaviron on hepatic oxidative stress in streptozotocin induced diabetes. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:236.
255. Adaramoye OA. Antidiabetic effect of kolaviron, a biflavonoid complex isolated from *Garcinia kola* seeds, in Wistar rats. *Afr Health Sci*. 2012;12(4):498-506.
256. Adedara IA, Farombi EO. Influence of kolaviron and vitamin E on ethylene glycol monoethyl ether-induced haematotoxicity and renal apoptosis in rats. *Cell Biochem Funct*. 2014;32(1):31-8.
257. Farombi EO, Adedara IA, Oyenihini AB, Ekakitie E, Kehinde S. Hepatic, testicular and spermatozoa antioxidant status in rats chronically treated with *Garcinia kola* seed. *J Ethnopharmacol*. 2013;146(2):536-42.
258. Oluwatosin A, Tolulope A, Ayokulehin K, Patricia O, Aderemi K, Catherine F, et al. Antimalarial potential of kolaviron, a biflavonoid from *Garcinia kola* seeds, against *Plasmodium berghei* infection in Swiss albino mice. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(2):97-104.
259. Ayepola OR, Cerf ME, Brooks NL, Oguntibeju OO. Kolaviron, a biflavonoid complex of *Garcinia kola* seeds modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in diabetes-induced nephrotoxic rats. *Phytomedicine*. 2014;21(14):1785-93.
260. Omotoso GO, Ukwubile, II, Arietarhire L, Sulaimon F, Gbadamosi IT. Kolaviron protects the brain in cuprizone-induced model of experimental multiple sclerosis via enhancement of intrinsic antioxidant mechanisms: Possible therapeutic applications? *Pathophysiology*. 2018;25(4):299-306.
261. Abarikwu SO. Kolaviron, a natural flavonoid from the seeds of *Garcinia kola*, reduces LPS-induced inflammation in macrophages by combined inhibition of IL-6 secretion, and inflammatory transcription factors, ERK1/2, NF- κ B, p38, Akt, p-c-JUN and JNK. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(7):2373-81.
262. Akinmoladun AC, Akinrinola BL, Olaleye MT, Farombi EO. Kolaviron, a *Garcinia kola* biflavonoid complex, protects against ischemia/reperfusion injury:

pertinent mechanistic insights from biochemical and physical evaluations in rat brain. *Neurochem Res.* 2015;40(4):777-87.

263. Nagayach A, Patro N, Patro I. Experimentally induced diabetes causes glial activation, glutamate toxicity and cellular damage leading to changes in motor function. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:355.

264. Yang S, Xia C, Li S, Du L, Zhang L, Hu Y. Mitochondrial dysfunction driven by the LRRK2-mediated pathway is associated with loss of Purkinje cells and motor coordination deficits in diabetic rat model. *Cell Death Dis.* 2014;5(5):e1217.

265. Ayepola OR, Brooks NL, Oguntibeju OO. Kolaviron improved resistance to oxidative stress and inflammation in the blood (erythrocyte, serum, and plasma) of streptozotocin-induced diabetic rats. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:921080.

266. Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int Psychogeriatr.* 2002;14 Suppl 1:77-91.

267. Cupic Miladinovic D, Borozan S, Ivanovic S. Involvement of cholinesterases in oxidative stress induced by chlorpyrifos in the brain of Japanese quail. *Poult Sci.* 2018;97(5):1564-71.

268. Melo JB, Agostinho P, Oliveira CR. Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci Res.* 2003;45(1):117-27.

269. Szwajgier D, Borowiec K. Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of the Institute of Brewing.* 2012;118(1):40-8.

270. Adefegha SA, Omojokun OS, Oboh G, Fasakin O, Ogunsuyi O. Modulatory Effects of Ferulic Acid on Cadmium-Induced Brain Damage. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2016;21(4):Np56-61.

271. Erukainure OL, Narainpersad N, Singh M, Olakunle S, Islam MS. *Clerodendrum volubile* inhibits key enzymes linked to type 2 diabetes but induces cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells via exacerbated oxidative stress and proinflammation. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:1144-52.

272. Ezenyi IO, Oluwakanyinsola, S. Screening of Herbal Medicines for Potential Toxicities. In: *New Insights into Toxicity and Drug Testing.* Idu, Abuja, Nigeria,

Department of Pharmacology and Toxicology, National Institute for Pharmaceutical Research and Development, 2013; 62-83.

273. Demmers A, Korthout H, van Etten-Jamaludin FS, Kortekaas F, Maaskant JM. Effects of medicinal food plants on impaired glucose tolerance: A systematic review of randomized controlled trials. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;131:91-106.

274. Suksomboon N, Poolsup N, Boonkaew S, Suthisisang CC. Meta-analysis of the effect of herbal supplement on glycemic control in type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2011;137(3):1328-33.

275. Pivari F, Mingione A, Brasacchio C, Soldati L. Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. *Nutrients.* 2019;11(8).

276. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods.* 2017;6(10).

277. Chuengsamarn S, Rattanamongkolgul S, Luechapudiporn R, Phisalaphong C, Jirawatnotai S. Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2012;35(11):2121-7.

278. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(4):787-809.

279. Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marmé D, Salimath BP. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(4):934-42.

280. Karimian MS, Pirro M, Majeed M, Sahebkar A. Curcumin as a natural regulator of monocyte chemoattractant protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;33:55-63.

281. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(1):40-59.

282. Derosa G, Maffioli P, Simental-Mendía LE, Bo S, Sahebkar A. Effect of curcumin on circulating interleukin-6 concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res.* 2016;111:394-404.

283. Mirzaei H, Shakeri A, Rashidi B, Jalili A, Banikazemi Z, Sahebkar A. Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. *Biomed Pharmacother.* 2017;85:102-12.
284. Strimpakos AS, Sharma RA. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(3):511-45.
285. Nabavi SF, Daglia M, Moghaddam AH, Habtemariam S, Nabavi SM. Curcumin and Liver Disease: from Chemistry to Medicine. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014;13(1):62-77.
286. Perrone D, Ardito F, Giannatempo G, Dioguardi M, Troiano G, Lo Russo L, et al. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *Exp Ther Med.* 2015;10(5):1615-23.
287. Wang Z, Huang Y, Cheng Y, Tan Y, Wu F, Wu J, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced neuronal inflammatory response and apoptosis likely plays a key role in the development of diabetic encephalopathy. *Oncotarget.* 2016;7(48):78455-72.
288. Oliveira WH, Nunes AK, França ME, Santos LA, Lós DB, Rocha SW, et al. Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Res.* 2016;1644:149-60.
289. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci.* 2015;8:77.
290. Dresselhaus EC, Meffert MK. Cellular Specificity of NF-κB Function in the Nervous System. *Front Immunol.* 2019;10:1043.
291. Ebrahimpour S, Esmaeili A, Dehghanian F, Beheshti S. Effects of quercetin-conjugated with superparamagnetic iron oxide nanoparticles on learning and memory improvement through targeting microRNAs/NF-κB pathway. *Sci Rep.* 2020;10(1):15070.
292. Miao Y, He T, Zhu Y, Li W, Wang B, Zhong Y. Activation of Hippocampal CREB by Rolipram Partially Recovers Balance Between TNF-α and IL-10 Levels and Improves Cognitive Deficits in Diabetic Rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2015;35(8):1157-64.
293. Liu YW, Zhu X, Zhang L, Lu Q, Zhang F, Guo H, et al. Cerebroprotective effects of ibuprofen on diabetic encephalopathy in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;117:128-36.

294. Yin Z, Yu H, Chen S, Ma C, Ma X, Xu L, et al. Asiaticoside attenuates diabetes-induced cognition deficits by regulating PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Behav Brain Res*. 2015;292:288-99.
295. Kuhad A, Chopra K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. *Eur J Pharmacol*. 2007;576(1-3):34-42.
296. Qiu Y, Yin Q, Fei Y, Li Y, Huang H, Fang W, et al. JLX001 Modulated the Inflammatory Reaction and Oxidative Stress in pMCAO Rats via Inhibiting the TLR2/4-NF- κ B Signaling Pathway. *Neurochemical Research*. 2019;44(8):1924-38.
297. Jain SK, Rains J, Croad J, Larson B, Jones K. Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF-alpha, IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in diabetic rats. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(2):241-9.
298. Zheng J, Cheng J, Zheng S, Feng Q, Xiao X. Curcumin, A Polyphenolic Curcuminoid With Its Protective Effects and Molecular Mechanisms in Diabetes and Diabetic Cardiomyopathy. *Front Pharmacol*. 2018;9:472.
299. Yu W, Wu J, Cai F, Xiang J, Zha W, Fan D, et al. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7(12):e52013.
300. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa M. Curcumin and Health. *Molecules*. 2016;21(3):264.
301. Zhang L, Kong XJ, Wang ZQ, Xu FS, Zhu YT. A Study on Neuroprotective Effects of Curcumin on the Diabetic Rat Brain. *J Nutr Health Aging*. 2016;20(8):835-40.
302. Fan H, Li D, Guan X, Yang Y, Yan J, Shi J, et al. MsrA Suppresses Inflammatory Activation of Microglia and Oxidative Stress to Prevent Demyelination via Inhibition of the NOX2-MAPKs/NF- κ B Signaling Pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:1377-89.
303. Liu M, Liu X, Wang L, Wang Y, Dong F, Wu J, et al. TRPV4 Inhibition Improved Myelination and Reduced Glia Reactivity and Inflammation in a Cuprizone-Induced Mouse Model of Demyelination. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:392.
304. Bondan EF, Monteiro Martins Mde F. Cyclosporine improves remyelination in diabetic rats submitted to a gliotoxic demyelinating model in the brainstem. *Microsc Res Tech*. 2013;76(7):714-22.

305. Jing L, He Q, Zhang JZ, Li PA. Temporal profile of astrocytes and changes of oligodendrocyte-based myelin following middle cerebral artery occlusion in diabetic and non-diabetic rats. *Int J Biol Sci.* 2013;9(2):190-9.
306. Lakshmanan AP, Watanabe K, Thandavarayan RA, Sari FR, Meilei H, Soetikno V, et al. Curcumin attenuates hyperglycaemia-mediated AMPK activation and oxidative stress in cerebrum of streptozotocin-induced diabetic rat. *Free Radic Res.* 2011;45(7):788-95.
307. Arun N, Nalini N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2002;57(1):41-52.
308. Patumraj S, Wongeakin N, Sridulyakul P, Jariyapongskul A, Futrakul N, Bunnag S. Combined effects of curcumin and vitamin C to protect endothelial dysfunction in the iris tissue of STZ-induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35(4):481-9.
309. Shehzad A, Ha T, Subhan F, Lee YS. New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases. *Eur J Nutr.* 2011;50(3):151-61.
310. El-Moselhy MA, Taye A, Sharkawi SS, El-Sisi SF, Ahmed AF. The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF- α and free fatty acids. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(5):1129-40.
311. Joshi RP, Negi G, Kumar A, Pawar YB, Munjal B, Bansal AK, et al. SNEDDS curcumin formulation leads to enhanced protection from pain and functional deficits associated with diabetic neuropathy: an insight into its mechanism for neuroprotection. *Nanomedicine.* 2013;9(6):776-85.
312. Kim HS, Hwang YC, Koo SH, Park KS, Lee MS, Kim KW, et al. PPAR- γ activation increases insulin secretion through the up-regulation of the free fatty acid receptor GPR40 in pancreatic β -cells. *PLoS One.* 2013;8(1):e50128.
313. Ho C, Hsu YC, Lei CC, Mau SC, Shih YH, Lin CL. Curcumin Rescues Diabetic Renal Fibrosis by Targeting Superoxide-Mediated Wnt Signaling Pathways. *Am J Med Sci.* 2016;351(3):286-95.
314. Kumar PT, Antony S, Soman S, Kuruvilla KP, George N, Paulose CS. Role of curcumin in the prevention of cholinergic mediated cortical dysfunctions in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;331(1):1-10.

315. Lao CD, Ruffin MTt, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6:10.
316. Chainani-Wu N, Silverman S, Jr., Reingold A, Bostrom A, Mc Culloch C, Lozada-Nur F, et al. A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of curcuminoids in oral lichen planus. *Phytomedicine*. 2007;14(7-8):437-46.
317. Hsu YC, Weng HC, Lin S, Chien YW. Curcuminoids-cellular uptake by human primary colon cancer cells as quantitated by a sensitive HPLC assay and its relation with the inhibition of proliferation and apoptosis. *J Agric Food Chem*. 2007;55(20):8213-22.
318. Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. *Indian J Exp Biol*. 1980;18(1):73-5.
319. Liju VB, Jeena K, Kuttan R. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). *Food Chem Toxicol*. 2013;53:52-61.
320. Murphy CJ, Tang H, Van Kirk EA, Shen Y, Murdoch WJ. Reproductive effects of a pegylated curcumin. *Reprod Toxicol*. 2012;34(1):120-4.
321. Volak LP, Ghirmai S, Cashman JR, Court MH. Curcuminoids inhibit multiple human cytochromes P450, UDP-glucuronosyltransferase, and sulfotransferase enzymes, whereas piperine is a relatively selective CYP3A4 inhibitor. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(8):1594-605.
322. Bahramsoltani R, Rahimi R, Farzaei MH. Pharmacokinetic interactions of curcuminoids with conventional drugs: A review. *J Ethnopharmacol*. 2017;209:1-12.
323. Liu AC, Zhao LX, Lou HX. Curcumin alters the pharmacokinetics of warfarin and clopidogrel in Wistar rats but has no effect on anticoagulation or antiplatelet aggregation. *Planta Med*. 2013;79(11):971-7.
324. Mohammed A, Islam MS. Spice-Derived Bioactive Ingredients: Potential Agents or Food Adjuvant in the Management of Diabetes Mellitus. *Front Pharmacol*. 2018;9:893.
325. Ayati Z, Ramezani M, Amiri MS, Moghadam AT, Rahimi H, Abdollahzade A, et al. Ethnobotany, Phytochemistry and Traditional Uses of *Curcuma* spp. and

Pharmacological Profile of Two Important Species (*C. longa* and *C. zedoaria*): A Review. *Curr Pharm Des.* 2019;25(8):871-935.

326. Nath J, Kalita B, Das G. Curcumin and its Nanoformulations: A Comprehensive Overview for the Management of Diabetes Complications. *International Journal of Current Pharmaceutical Research.* 2019;11(4):18-21.

327. İ.A. K. Sağlık Alanında Kullanılan Kantitatif Yöntem, Stereoloji. *Dicle Tıp Dergisi.* 2019;46(3):615-21.

328. Odacı E, Canan, S., Baş, O., Bilgiç, S., Kaplan, S. . Yeni stereolojik yöntemlerin olası hata kaynakları ve çözüm yolları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.* 2004;24:78- 87.

329. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis.* 1988;96(10):857-81.

330. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis.* 1988;96(5):379-94.

331. Altunkaynak B, Altunkaynak, Önger M, Altunkaynak M, Ayrancı E, Canan S. A Brief Introduction to Stereology and Sampling Strategies: Basic Concepts of Stereology. *NeuroQuantology.* 2012;10:31-43.

332. Stereoloji nedir?. <https://stereoloji.tripod.com/stereo.html> adresinden 10.06.2023 tarihinde erişilmiştir.

333. Howard CV, Reed, M.G. Unbiased Stereology. *Three-Dimensional Measurement in Microscopy. Journal of Anatomy.* 1999;194:156-7.

334. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 1987;147(Pt 3):229-63.

335. Odacı E, Bas O, Kaplan S. Effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on the dentate gyrus of rats: a stereological and histopathological study. *Brain Res.* 2008;1238:224-9.

336. Bas O, Sonmez O, Aslan A, İkinci Keleş A, Hancı H, Yildirim M, et al. Pyramidal Cell Loss in the Cornu Ammonis of 32-day-old Female Rats Following

Exposure to a 900 Megahertz Electromagnetic Field During Prenatal Days 13-21. *Neuroquantology*. 2013;11:591-9.

337. İkinci A, Odacı, E., Baş, O. Effects of ethyl pyruvate administration on female rats' pyramidal cells of cornu ammonis after brain ischemia: a stereological and histopathological study. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2013;43(3):354- 61.

338. Şahin A, Aslan A, Baş O, İkinci A, Özyılmaz C, Fikret Sönmez O, et al. Deleterious impacts of a 900-MHz electromagnetic field on hippocampal pyramidal neurons of 8-week-old Sprague Dawley male rats. *Brain Res*. 2015;1624:232-8.

339. Canan S, Şahin, B., Odacı, E., Ünal, B., Aslan, H., Bilgiç, S., Kaplan, S. Toplam Hacim, Hacim Yoğunluğu ve Hacim Oranlarının Hesaplanmasında Kullanılan Bir Stereolojik Yöntem: Cavalieri Prensibi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2002;22(1):7-14.

340. Mayhew TM, Gundersen HJ. If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat*. 1996;188 (Pt 1)(Pt 1):1-15.

341. Mayhew TM. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *J Neurocytol*. 1992;21(5):313-28.

342. Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc*. 1986;143(Pt 1):3-45.

343. Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J Microsc*. 1999;193(Pt 3):199-211.

344. Malas MA, Gokcimen A, Sulak O, Candir O. Estimating the testis volume during the fetal period using the stereological method. *Early Hum Dev*. 2001;62(1):65-77.

345. Royet JP. Stereology: a method for analyzing images. *Progress in Neurobiology*. 1991;37(5):433-74.

346. Canan S, Çolakoğlu, S., Şahin, B., Ünal, B., Bilgiç, S., Kaplan, S., III. Stereolojik metotlar ve uygulamaları kursu CD I ve CD II , 2001; Gaziantep.

347. Şahin B, Aslan H, Unal B, Canan S, Bilgic S, Kaplan S, et al. Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: A stereological study. *Image Anal Stereol*. 2001;20:9-13.

348. Austermann J, Zenker S, Roth J. S100-alarmins: potential therapeutic targets for arthritis. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(7):739-51.
349. Foell D, Kucharzik T, Kraft M, Vogl T, Sorg C, Domschke W, et al. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(6):847-53.
350. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of Disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2007;3(7):382-90.
351. Kligman D, Hilt DC. The S100 protein family. *Trends Biochem Sci*. 1988;13(11):437-43.
352. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2711-9.
353. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*. 2007;13(9):1042-9.
354. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(1):43-64.
355. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(6):1008-22.
356. Baydas G, Nedzvetskii VS, Tuzcu M, Yasar A, Kirichenko SV. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol*. 2003;462(1-3):67-71.
357. Reier PJ, Houle JD. The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. *Adv Neurol*. 1988;47:87-138.
358. Cerutti SM, Chadi G. S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. *Cell Biol Int*. 2000;24(1):35-49.
359. Fanò G, Biocca S, Fulle S, Mariggiò MA, Belia S, Calissano P. The S-100: a protein family in search of a function. *Prog Neurobiol*. 1995;46(1):71-82.
360. Kligman D, Marshak DR. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(20):7136-9.

361. Bhattacharyya A, Oppenheim RW, Prevette D, Moore BW, Brackenbury R, Ratner N. S100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J Neurobiol.* 1992;23(4):451-66.
362. Marshak DR, Pesce SA, Stanley LC, Griffin WS. Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiol Aging.* 1992;13(1):1-7.
363. Filippidis AS, Papadopoulos DC, Kapsalaki EZ, Fountas KN. Role of the S100B serum biomarker in the treatment of children suffering from mild traumatic brain injury. *Neurosurgical Focus FOC.* 2010;29(5):E2.
364. Glaser N, Lo W, Tancredi D, Orgain M, Puvanna V, Janigro D, et al. Levels of S100B in brain and blood of rats with diabetic ketoacidosis. *Brain Res.* 2015;1624:536-44.
365. Coleman E, Judd R, Hoe L, Dennis J, Posner P. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia.* 2004;48(2):166-78.
366. Zimmer DB, Chessher J, Wilson GL, Zimmer WE. S100A1 and S100B expression and target proteins in type I diabetes. *Endocrinology.* 1997;138(12):5176-83.
367. Gonçalves C-A, Concli Leite M, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical Biochemistry.* 2008;41(10):755-63.
368. Marchi N, Bazarian JJ, Puvanna V, Janigro M, Ghosh C, Zhong J, et al. Consequences of Repeated Blood-Brain Barrier Disruption in Football Players. *PLOS ONE.* 2013;8(3):e56805.
369. Celikbilek A, Akyol L, Sabah S, Tanik N, Adam M, Celikbilek M, et al. S100B as a glial cell marker in diabetic peripheral neuropathy. *Neurosci Lett.* 2014;558:53-7.
370. Hovsepian MR, Haas MJ, Boyajyan AS, Guevorkyan AA, Mamikonyan AA, Myers SE, et al. Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. *Neuroscience Letters.* 2004;369(3):224-7.
371. Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP-1: Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α . *Neurobiology of Aging.* 2010;31(4):665-77.

372. Bianchi R, Kastrisianaki E, Giambanco I, Donato R. S100B Protein Stimulates Microglia Migration via RAGE-dependent Up-regulation of Chemokine Expression and Release*. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(9):7214-26.
373. Steiner J, Walter M, Wunderlich MT, Bernstein H-G, Panteli B, Brauner M, et al. A New Pathophysiological Aspect of S100B in Schizophrenia: Potential Regulation of S100B by Its Scavenger Soluble RAGE. *Biological Psychiatry*. 2009;65(12):1107-10.
374. Concli Leite M, Galland F, Guerra M, Rodrigues L, Monteforte P, Hirata H, et al., editors. S100B secretion is mediated by Ca²⁺ from endoplasmic reticulum: a study using DMSO as a tool for intracellular Ca²⁺ mobilization. 13th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease; 2017: Wiley.
375. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*. 1999;6(11):1028-42.
376. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(6):725-31.
377. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):107-20.
378. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1570-83.
379. Woo M, Hakem R, Furlonger C, Hakem A, Duncan GS, Sasaki T, et al. Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat Immunol*. 2003;4(10):1016-22.
380. Miura M, Chen XD, Allen MR, Bi Y, Gronthos S, Seo BM, et al. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1704-13.
381. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:217-45.
382. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 1996;384(6607):368-72.

383. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kägi D, et al. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 1998;12(6):806-19.
384. Ding AX, Sun G, Argaw YG, Wong JO, Easwaran S, Montell DJ. CasExpress reveals widespread and diverse patterns of cell survival of caspase-3 activation during development in vivo. *Elife.* 2016;5.
385. Boland K, Flanagan L, Prehn JH. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death Dis.* 2013;4(7):e725.
386. Brentnall M, Weir DB, Rongvaux A, Marcus AI, Boise LH. Procaspace-3 regulates fibronectin secretion and influences adhesion, migration and survival independently of catalytic function. *Journal of Cell Science.* 2014;127(10):2217-26.
387. Connolly PF, Jäger R, Fearnhead HO. New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol.* 2014;5:149.
388. Liu YR, Sun B, Zhao XL, Gu Q, Liu ZY, Dong XY, et al. Basal caspase-3 activity promotes migration, invasion, and vasculogenic mimicry formation of melanoma cells. *Melanoma Res.* 2013;23(4):243-53.
389. Gulyaeva NV. Non-apoptotic functions of caspase-3 in nervous tissue. *Biochemistry (Mosc).* 2003;68(11):1171-80.
390. Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11025-30.
391. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med.* 1999;190(12):1891-6.
392. Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med.* 2001;193(2):247-54.
393. Brafman DA, Moya N, Allen-Soltero S, Fellner T, Robinson M, McMillen ZL, et al. Analysis of SOX2-expressing cell populations derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 2013;1(5):464-78.
394. Kiefer JC. Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn.* 2007;236(8):2356-66.

395. Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Méndez A, Han Y, Pallavi B. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(12):2195-214.
396. Lorthongpanich C, Yang SH, Piotrowska-Nitsche K, Parnpai R, Chan AW. Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells. *Reproduction.* 2008;135(6):805-13.
397. Rossant J. Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocyst. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(5):573-81.
398. Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature.* 2006;444(7117):364-8.
399. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 1998;95(3):379-91.
400. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.
401. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci.* 2004;26(2-4):148-65.
402. Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam KT, Kurotani R, Morrissey EE, et al. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development.* 2007;134(13):2521-31.
403. Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C, et al. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature.* 2005;434(7036):1031-5.
404. Dabdoub A, Puligilla C, Jones JM, Fritzsche B, Cheah KS, Pevny LH, et al. Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(47):18396-401.
405. Okubo T, Pevny LH, Hogan BL. Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes Dev.* 2006;20(19):2654-9.

406. Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):2907-12.
407. Arnold K, Sarkar A, Yram MA, Polo JM, Bronson R, Sengupta S, et al. Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell*. 2011;9(4):317-29.
408. McClelland Descalzo DL, Satoorian TS, Walker LM, Sparks NR, Pulyanina PY, Zur Nieden NI. Glucose-Induced Oxidative Stress Reduces Proliferation in Embryonic Stem Cells via FOXO3A/ β -Catenin-Dependent Transcription of p21(cip1). *Stem Cell Reports*. 2016;7(1):55-68.
409. Wang HK, Huang CY, Chen YW, Sun YT. Hyperglycemia compromises the ischemia-provoked dedifferentiation of cerebral pericytes through p21-SOX2 signaling in high-fat diet-induced murine model. *Diab Vasc Dis Res*. 2021;18(1):1479164121990641.
410. Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18(6):335-46.
411. Ajayi SA, Ofusori DA, Ojo GB, Ayoka OA, Abayomi TA, Tijani AA. The microstructural effects of aqueous extract of *Garcinia kola* (Linn) on the hippocampus and cerebellum of malnourished mice. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(4):261-5.
412. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi S, Farhangi A, Verdi AA, et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*. 2007;22(2):60-4.
413. Graham ML, Janecek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Schuurman HJ. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med*. 2011;61(4):356-60.
414. Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, Patil CR, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact*. 2016;244:49-63.
415. Motyl K, McCabe LR. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. *Biol Proced Online*. 2009;11:296-315.

416. Karacalar A, Ciahntimur, B., Akın, S., Özcan, M. Dijital Sinir Defektlerinin Onarımında Ven Grefti Kullanımı. *Türk Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Dergisi*. 1997;5(3).
417. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab*. 2000;26(3):163-76.
418. Jende JME, Kender Z, Mooshage C, Groener JB, Alvarez-Ramos L, Kollmer J, et al. Diffusion Tensor Imaging of the Sciatic Nerve as a Surrogate Marker for Nerve Functionality of the Upper and Lower Limb in Patients With Diabetes and Prediabetes. *Frontiers in Neuroscience*. 2021;15.
419. Benjamini Y, Krieger AM, Yekutieli D. Adaptive Linear Step-up Procedures That Control the False Discovery Rate. *Biometrika*. 2006;93(3):491-507.
420. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;87(1):4-14.
421. Luchsinger JA. Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective. *Eur J Pharmacol*. 2008;585(1):119-29.
422. Brands AM, Kessels RP, de Haan EH, Kappelle LJ, Biessels GJ. Cerebral dysfunction in type 1 diabetes: effects of insulin, vascular risk factors and blood-glucose levels. *Eur J Pharmacol*. 2004;490(1-3):159-68.
423. Veves A, Malik RA, Lye RH, Masson EA, Sharma AK, Schady W, et al. The relationship between sural nerve morphometric findings and measures of peripheral nerve function in mild diabetic neuropathy. *Diabet Med*. 1991;8(10):917-21.
424. Holmes CS, Richman LC. Cognitive profiles of children with insulin-dependent diabetes. *J Dev Behav Pediatr*. 1985;6(6):323-6.
425. Ryan CM. Neurobehavioral complications of type I diabetes. Examination of possible risk factors. *Diabetes Care*. 1988;11(1):86-93.
426. Ferguson SC, Blane A, Wardlaw J, Frier BM, Perros P, McCrimmon RJ, et al. Influence of an early-onset age of type 1 diabetes on cerebral structure and cognitive function. *Diabetes Care*. 2005;28(6):1431-7.
427. Kabir MT, Tabassum N, Uddin MS, Aziz F, Behl T, Mathew B, et al. Therapeutic Potential of Polyphenols in the Management of Diabetic Neuropathy. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021;2021:9940169.

428. Tyrtysynaia AA, Manzhulo IV, Sultanov RM, Ermolenko EV. Adult hippocampal neurogenesis in neuropathic pain and alkyl glycerol ethers treatment. *Acta Histochem.* 2017;119(8):812-21.
429. Rusanescu G, Mao J. Peripheral nerve injury induces adult brain neurogenesis and remodelling. *J Cell Mol Med.* 2017;21(2):299-314.
430. Seifert F, Maihöfner C. Functional and structural imaging of pain-induced neuroplasticity. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2011;24(5):515-23.
431. Dimitrov EL, Tsuda MC, Cameron HA, Usdin TB. Anxiety- and depression-like behavior and impaired neurogenesis evoked by peripheral neuropathy persist following resolution of prolonged tactile hypersensitivity. *J Neurosci.* 2014;34(37):12304-12.
432. Liu Y, Zhou LJ, Wang J, Li D, Ren WJ, Peng J, et al. TNF- α Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci.* 2017;37(4):871-81.
433. Rodella L, Rezzani R, Agostini C, Bianchi R. Induction of NADPH-diaphorase activity in the rat periaqueductal gray matter after nociceptive visceral stimulation. *Brain Res.* 1998;793(1-2):333-6.
434. Lynch MA. Neuroinflammatory changes negatively impact on LTP: A focus on IL-1 β . *Brain Res.* 2015;1621:197-204.
435. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Jokkala J, Kolehmainen M, Mykkänen H, et al. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *International journal of molecular sciences.* 2010;11:1365-402.
436. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):270-8.
437. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(4):287-306.
438. Cásedas G, Les F, González-Burgos E, Gómez-Serranillos MP, Smith C, López V. Cyanidin-3-O-glucoside inhibits different enzymes involved in central nervous system pathologies and type-2 diabetes. *South African Journal of Botany.* 2019;120:241-6.
439. Espeland MA, Bryan RN, Goveas JS, Robinson JG, Siddiqui MS, Liu S, et al. Influence of type 2 diabetes on brain volumes and changes in brain volumes: results

from the Women's Health Initiative Magnetic Resonance Imaging studies. *Diabetes Care*. 2013;36(1):90-7.

440. Hayashi K, Kurioka S, Yamaguchi T, Morita M, Kanazawa I, Takase H, et al. Association of cognitive dysfunction with hippocampal atrophy in elderly Japanese people with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;94(2):180-5.

441. Jongen C, van der Grond J, Kappelle LJ, Biessels GJ, Viergever MA, Pluim JP. Automated measurement of brain and white matter lesion volume in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2007;50(7):1509-16.

442. Moran C, Phan TG, Chen J, Blizzard L, Beare R, Venn A, et al. Brain atrophy in type 2 diabetes: regional distribution and influence on cognition. *Diabetes Care*. 2013;36(12):4036-42.

443. Collino M, Aragno M, Castiglia S, Tomasinelli C, Thiemermann C, Boccuzzi G, et al. Insulin reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in the hippocampus of diabetic rats: a role for glycogen synthase kinase-3beta. *Diabetes*. 2009;58(1):235-42.

444. Falvey CM, Rosano C, Simonsick EM, Harris T, Strotmeyer ES, Satterfield S, et al. Macro- and microstructural magnetic resonance imaging indices associated with diabetes among community-dwelling older adults. *Diabetes Care*. 2013;36(3):677-82.

445. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2006;5(1):64-74.

446. Cheng G, Huang C, Deng H, Wang H. Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Intern Med J*. 2012;42(5):484-91.

447. Milne NT, Bucks RS, Davis WA, Davis TME, Pierson R, Starkstein SE, et al. Hippocampal atrophy, asymmetry, and cognition in type 2 diabetes mellitus. *Brain Behav*. 2018;8(1):e00741.

448. Brands AM, Biessels GJ, Kappelle LJ, de Haan EH, de Valk HW, Algra A, et al. Cognitive functioning and brain MRI in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: a comparative study. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;23(5):343-50.

449. Kodama D, Ono H, Tanabe M. Increased hippocampal glycine uptake and cognitive dysfunction after peripheral nerve injury. *Pain*. 2011;152(4):809-17.

450. Terada M, Kuzumaki N, Hareyama N, Imai S, Niikura K, Narita M, et al. Suppression of enriched environment-induced neurogenesis in a rodent model of neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2008;440(3):314-8.
451. Zimmerman ME, Pan JW, Hetherington HP, Lipton ML, Baigi K, Lipton RB. Hippocampal correlates of pain in healthy elderly adults: a pilot study. *Neurology*. 2009;73(19):1567-70.
452. Kamiyama K, Wada A, Sugihara M, Kurioka S, Hayashi K, Hayashi T, et al. Potential hippocampal region atrophy in diabetes mellitus type 2: a voxel-based morphometry VSRAD study. *Jpn J Radiol*. 2010;28(4):266-72.
453. Debette S, Seshadri S, Beiser A, Au R, Himali JJ, Palumbo C, et al. Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline. *Neurology*. 2011;77(5):461-8.
454. Kazkayası İ, Bozkurt, N.B., Uma, S. . Diyabet ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*. 2018;7(2):110- 7.
455. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol*. 1999;375(1-3):217-23.
456. Low PA, Nickander KK, Tritschler HJ. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 1997;46 Suppl 2:S38-42.
457. Argoff CE. The coexistence of neuropathic pain, sleep, and psychiatric disorders: a novel treatment approach. *Clin J Pain*. 2007;23(1):15-22.
458. Schnurr RF, MacDonald MR. Memory complaints in chronic pain. *Clin J Pain*. 1995;11(2):103-11.
459. Eccleston C. Chronic pain and attention: a cognitive approach. *Br J Clin Psychol*. 1994;33(4):535-47.
460. Jamison RN, Matt DA, Parris WC. Effects of time-limited vs unlimited compensation on pain behavior and treatment outcome in low back pain patients. *J Psychosom Res*. 1988;32(3):277-83.
461. Tyrtysnaia A, Manzhulo I. Neuropathic Pain Causes Memory Deficits and Dendrite Tree Morphology Changes in Mouse Hippocampus. *J Pain Res*. 2020;13:345-54.

462. Apkarian AV, Baliki MN, Geha PY. Towards a theory of chronic pain. *Prog Neurobiol.* 2009;87(2):81-97.
463. Biscaro B, Lindvall O, Tesco G, Ekdahl CT, Nitsch RM. Inhibition of microglial activation protects hippocampal neurogenesis and improves cognitive deficits in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.* 2012;9(4):187-98.
464. Fan R, Xu F, Previti ML, Davis J, Grande AM, Robinson JK, et al. Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *J Neurosci.* 2007;27(12):3057-63.
465. Xiong Z, Li J, Zhong X, Zhang S, Sun X, Zhou H, et al. Visit-to-Visit Fasting Glucose Variability in Young Adulthood and Hippocampal Integrity and Volume at Midlife. *Diabetes Care.* 2019;42(12):2334-7.
466. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;67(1):3-21.
467. Ergenc M, Ozacmak HS, Turan I, Ozacmak VH. Melatonin reverses depressive and anxiety like-behaviours induced by diabetes: involvement of oxidative stress, age, rage and S100B levels in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. *Arch Physiol Biochem.* 2022;128(2):402-10.
468. Rahmani G, Farajdokht F, Mohaddes G, Babri S, Ebrahimi V, Ebrahimi H. Garlic (*Allium sativum*) improves anxiety- and depressive-related behaviors and brain oxidative stress in diabetic rats. *Archives of Physiology and Biochemistry.* 2018;126:1-6.
469. Nair A, Bonneau RH. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *J Neuroimmunol.* 2006;171(1-2):72-85.
470. Badmus JA, Adedosu OT, Adeleke EG, Akinboro KH, Odeyemi BI, Ayoola BI, et al. In Vitro and In Vivo Biochemical Evaluations of the Methanolic Leaf Extract of *Garcinia kola*. *Int Sch Res Notices.* 2014;2014:391692.
471. Omonigho D, Ezeanya-Bakpa C. Antibacterial activity of *Garcinia kola* seed and leaf extracts on some selected clinical isolates. *Science Journal of Microbiology.* 2013:1-9.

472. Ogbole F, Crown O, Olayeriju O, Olaleye T, Akindahunsi A. Antidiabetic Effect of Methanolic Extract of *Garcinia Kola* Leaves on Streptozotocin- Induced Diabetic Rats. 2019;7(4).
473. Tchimine M, Anaga A, Ugwoke C, Onoja J, Ezugwu C, Okunji C, et al. Anti-diabetic Profile of Extract, Kolaviron, Biflavonoids and Garcinoic acid from *Garcinia kola* seeds. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2016;5:317-22.
474. Nasri H, Shirzad H, Baradaran A, Rafieian-Kopaei M. Antioxidant plants and diabetes mellitus. J Res Med Sci. 2015;20(5):491-502.
475. Adebisi AA. A Case Study of *Garcinia kola* Nut Production- to- Consumption System in J4 area of Omo Forest Reserve, South -West Nigeria. In: Forest Products, Livelihoods and Conservation: Case Studies on Non-Timber Forest System Sunderland, T. and O. Ndoeye (Eds). CIFOR, Bogor, Indonesia 2004. 1-24 p.
476. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008;51(2):216-26.
477. Richards AJ. Studies in *Garcinia*, dioecious tropical forest trees: the origin of the mangosteen (*G. mangostana* L.). Botanical Journal of the Linnean Society. 2008;103(4):301-8.
478. Spasov AA, Samokhina MP, Bulanov AE. Antidiabetic properties of *gymnema sylvestre* (a review). Pharmaceutical Chemistry Journal. 2008;42:626-9.
479. Srinivasan K. Plant foods in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. Int J Food Sci Nutr. 2005;56(6):399-414.
480. Olatunji SY, Okoro I, Owolabi JO, Olanrewaju JA, Adelodun ST, Fabiyi SO. *Garcinia kola* Attenuates MDMA-Induced Neuroinflammation in the CA1 Region of the Hippocampus in the Rat Model. Ann Neurosci. 2020;27(3-4):104-13.
481. Noorafshan A, Karimi F, Kamali AM, Karbalay-Doust S, Nami M. Restorative effects of curcumin on sleep-deprivation induced memory impairments and structural changes of the hippocampus in a rat model. Life Sci. 2017;189:63-70.
482. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017;2:17023-.

483. Miao C, Chen H, Li Y, Guo Y, Xu F, Chen Q, et al. Curcumin and its analog alleviate diabetes-induced damages by regulating inflammation and oxidative stress in brain of diabetic rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2021;13(1):21.
484. Nirwane A, Sridhar V, Majumdar A. Neurobehavioural Changes and Brain Oxidative Stress Induced by Acute Exposure to GSM900 Mobile Phone Radiations in Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Res*. 2016;32(2):123-32.
485. Mao XY, Cao DF, Li X, Yin JY, Wang ZB, Zhang Y, et al. Huperzine A ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):7667-83.
486. Wang SB, Jia JP. Oxymatrine attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2014;35(3):331-8.
487. Nishizono S, Hayami T, Ikeda I, Imaizumi K. Protection against the diabetogenic effect of feeding tert-butylhydroquinone to rats prior to the administration of streptozotocin. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64(6):1153-8.
488. Caillaud M, Aung Myo YP, McKiver BD, Osinska Warncke U, Thompson D, Mann J, et al. Key Developments in the Potential of Curcumin for the Treatment of Peripheral Neuropathies. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(10).
489. Kerti L, Witte AV, Winkler A, Grittner U, Rujescu D, Flöel A. Higher glucose levels associated with lower memory and reduced hippocampal microstructure. *Neurology*. 2013;81(20):1746-52.
490. Chen M, Sinha M, Luxon BA, Bresnick AR, O'Connor KL. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin. *J Biol Chem*. 2009;284(3):1484-94.
491. Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2007;7(8):711-24.
492. Eggers K, Sikora K, Lorenz M, Taubert T, Moobed M, Baumann G, et al. RAGE-dependent regulation of calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 in human THP-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011;119(6):353-7.
493. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):557-66.

494. Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, Sorenson BS, Khammanivong A, Ross KF, et al. Anti-infective Protective Properties of S100 Calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2009;8(4):290-305.
495. Kim TH, Kim HI, Soung YH, Shaw LA, Chung J. Integrin (alpha6beta4) signals through Src to increase expression of S100A4, a metastasis-promoting factor: implications for cancer cell invasion. *Mol Cancer Res*. 2009;7(10):1605-12.
496. Riuzzi F, Sorci G, Donato R. S100B protein regulates myoblast proliferation and differentiation by activating FGFR1 in a bFGF-dependent manner. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 14):2389-400.
497. Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, Bonifazi P, Zelante T, Zagarella S, et al. The Danger Signal S100B Integrates Pathogen- and Danger-Sensing Pathways to Restrain Inflammation. *PLOS Pathogens*. 2011;7(3):e1001315.
498. Sorci G, Bianchi R, Riuzzi F, Tubaro C, Arcuri C, Giambanco I, et al. S100B Protein, A Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010.
499. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*. 2003;21(3-4):97-108.
500. Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, Colello RJ, Hamm RJ, Bullock MR. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2005;22(6):645-55.
501. Kleindienst A, Ross Bullock M. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma*. 2006;23(8):1185-200.
502. Group DCaCTR. Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial. *J Pediatr*. 1994;125(2):177-88.
503. Malone JJ, Hanna SK, Saporta S. Hyperglycemic brain injury in the rat. *Brain Res*. 2006;1076(1):9-15.
504. Eng LF, Yu AC, Lee YL. Astrocytic response to injury. *Prog Brain Res*. 1992;94:353-65.

505. van Vliet EA, Aronica E, Tolner EA, Lopes da Silva FH, Gorter JA. Progression of temporal lobe epilepsy in the rat is associated with immunocytochemical changes in inhibitory interneurons in specific regions of the hippocampal formation. *Exp Neurol*. 2004;187(2):367-79.
506. Le R, Esquenazi S. Astrocytes mediate cerebral cortical neuronal axon and dendrite growth, in part, by release of fibroblast growth factor. *Neurol Res*. 2002;24(1):81-92.
507. Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech*. 2003;60(6):614-32.
508. Haan EA, Boss BD, Cowan WM. Production and characterization of monoclonal antibodies against the "brain-specific" proteins 14-3-2 and S-100. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(23):7585-9.
509. Gos T, Schroeter ML, Lessel W, Bernstein HG, Dobrowolny H, Schiltz K, et al. S100B-immunopositive astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampus are differentially afflicted in unipolar and bipolar depression: a postmortem study. *J Psychiatr Res*. 2013;47(11):1694-9.
510. Manev R, Uz T, Manev H. Fluoxetine increases the content of neurotrophic protein S100beta in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 2001;420(2-3):R1-2.
511. Rong H, Wang G, Liu T, Wang H, Wan Q, Weng S. Chronic mild stress induces fluoxetine-reversible decreases in hippocampal and cerebrospinal fluid levels of the neurotrophic factor S100B and its specific receptor. *Int J Mol Sci*. 2010;11(12):5310-22.
512. Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, et al. S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int*. 2007;50(5):774-82.
513. Hovsepian MR, Haas MJ, Boyajyan AS, Guevorkyan AA, Mamikonyan AA, Myers SE, et al. Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. *Neurosci Lett*. 2004;369(3):224-7.
514. Chen J, Bi Y, Chen L, Zhang Q, Xu L. Tanshinone IIA exerts neuroprotective effects on hippocampus-dependent cognitive impairments in diabetic rats by attenuating ER stress-induced apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 2018;104:530-6.

515. Covey WC, Ignatowski TA, Knight PR, Spengler RN. Brain-derived TNF α : involvement in neuroplastic changes implicated in the conscious perception of persistent pain. *Brain Res.* 2000;859(1):113-22.
516. Gerard E, Spengler RN, Bonoio AC, Mahajan SD, Davidson BA, Ding H, et al. Chronic constriction injury-induced nociception is relieved by nanomedicine-mediated decrease of rat hippocampal tumor necrosis factor. *Pain.* 2015;156(7):1320-33.
517. Kim HY, Park EJ, Joe EH, Jou I. Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia. *J Immunol.* 2003;171(11):6072-9.
518. Rashid K, Chowdhury S, Ghosh S, Sil PC. Curcumin attenuates oxidative stress induced NF κ B mediated inflammation and endoplasmic reticulum dependent apoptosis of splenocytes in diabetes. *Biochem Pharmacol.* 2017;143:140-55.
519. Zhao Z, Li X, Li Q. Curcumin accelerates the repair of sciatic nerve injury in rats through reducing Schwann cells apoptosis and promoting myelination. *Biomed Pharmacother.* 2017;92:1103-10.
520. Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, et al. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron.* 1996;17(4):607-15.
521. Poulouse SM, Miller MG, Scott T, Shukitt-Hale B. Nutritional Factors Affecting Adult Neurogenesis and Cognitive Function. *Adv Nutr.* 2017;8(6):804-11.
522. Andika FR, Yoon JH, Kim GS, Jeong Y. Intermittent Fasting Alleviates Cognitive Impairments and Hippocampal Neuronal Loss but Enhances Astrocytosis in Mice with Subcortical Vascular Dementia. *J Nutr.* 2021;151(3):722-30.
523. Hu Y, Yang Y, Zhang M, Deng M, Zhang JJ. Intermittent Fasting Pretreatment Prevents Cognitive Impairment in a Rat Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion. *J Nutr.* 2017;147(7):1437-45.
524. Liu Z, Dai X, Zhang H, Shi R, Hui Y, Jin X, et al. Gut microbiota mediates intermittent-fasting alleviation of diabetes-induced cognitive impairment. *Nat Commun.* 2020;11(1):855.
525. Liu Z, Yuan T, Dai X, Shi L, Liu X. Intermittent Fasting Alleviates Diabetes-induced Cognitive Decline via Gut Microbiota-metabolites-brain Axis (OR32-04-19):

Curr Dev Nutr. 2019 Jun 13;3(Suppl 1):nzz052.OR32-04-19. doi: 10.1093/cdn/nzz052.OR32-04-19. eCollection 2019 Jun.

526. Ooi TC, Meramat A, Rajab NF, Shahar S, Ismail IS, Azam AA, et al. Intermittent Fasting Enhanced the Cognitive Function in Older Adults with Mild Cognitive Impairment by Inducing Biochemical and Metabolic changes: A 3-Year Progressive Study. *Nutrients*. 2020;12(9).

527. Shin BK, Kang S, Kim DS, Park S. Intermittent fasting protects against the deterioration of cognitive function, energy metabolism and dyslipidemia in Alzheimer's disease-induced estrogen deficient rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(4):334-43.

528. Xia SH, Hu SW, Ge DG, Liu D, Wang D, Zhang S, et al. Chronic Pain Impairs Memory Formation via Disruption of Neurogenesis Mediated by Mesohippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling. *Biol Psychiatry*. 2020;88(8):597-610.

8. EKLER

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN SIÇAN HİPOKAMPUSUNUN IŞIK, ELEKTRON MİKROSKOBİK VE STEREOLOJİK TEKNİKLER KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr
İnternet Kaynağı

%**2**

2

acikerisim.omu.edu.tr
İnternet Kaynağı

%**1**

3

veterinerhistoloji.atauni.edu.tr
İnternet Kaynağı

<%**1**

4

Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Öğrenci Ödevi

<%**1**

5

acikerisim.medipol.edu.tr
İnternet Kaynağı

<%**1**

6

dergipark.org.tr
İnternet Kaynağı

<%**1**

7

www.utsakcongress.com
İnternet Kaynağı

<%**1**

8

www.journalagent.com
İnternet Kaynağı

<%**1**

akademikiletisim.com

9	İnternet Kaynağı	<%1
10	documents.mx İnternet Kaynağı	<%1
11	www.arastirmax.com İnternet Kaynağı	<%1
12	Submitted to Istanbul Medeniyet Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
13	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
14	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
15	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
16	cdn.comu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
17	www.abcam.com İnternet Kaynağı	<%1
18	AKTÜRK, Zeynep, ODACI, Ersan, İKİNCİ, Ayşe, BAŞ, Orhan, CANPOLAT, Sinan, ÇOLAKOĞLU, Serdar and SÖNMEZ, Osman Fikret. "Effect of Ginkgo biloba on brain volume after carotid artery occlusion in rats: a stereological and histopathological study", TÜBİTAK, 2014. Yayın	<%1

19	doczz.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
20	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
21	gensek.gop.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
22	journals.tubitak.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
23	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
24	shgmgetatdb.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
25	tur.bioconus.com İnternet Kaynağı	<% 1
26	İNCE, Nazan Gezer and KAHVECİOĞLU, K. Oya. "Koyun (Kıvırcık koyunu) ve keçilerde (Kıl keçisi) ventriculus cordis'lerin stereolojik metot'la değerlendirilmesi", İstanbul Üniversitesi, 2010. Yayın	<% 1
27	acikerisim.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
28	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1

29	dmsjournal.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<% 1
30	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
31	ilacvetedavidernegi.org İnternet Kaynağı	<% 1
32	jsurgmed.com İnternet Kaynağı	<% 1
33	tez.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
34	tr.ulfsciences.com İnternet Kaynağı	<% 1
35	turkailehekderg.org İnternet Kaynağı	<% 1
36	www.degruyter.com İnternet Kaynağı	<% 1
37	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
38	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
39	Abdalla Ahmed Eldaw ELAMIN, Omur Gulsum DENİZ, Suleyman KAPLAN. "The Effects of Gum arabic, Curcumin (Curcuma longa) and Garcinia kola on the Rat Hippocampus after	<% 1

Electromagnetic Field Exposure: A
Stereological and Histological Study", Journal
of Chemical Neuroanatomy, 2021

Yayın



