

MERVE İNCİ ÇAMÇI	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DİYARBAKIR-2022
------------------	------------------------------------	--------------	-----------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE OLUŞTURULAN DİYABET MODELİNDE
BOZULAN DAVRANIŞSAL VE KOGNİTİF FONKSİYONLARIN
TEDAVİSİNDE MİNOSİKLİN KULLANIMININ
ARAŞTIRILMASI**

Merve İNCİ ÇAMÇI
DOKTORA TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

DİYARBAKIR- 2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE OLUŞTURULAN DİYABET MODELİNDE
BOZULAN DAVRANIŞSAL VE KOĞNİTİF FONKSİYONLARIN
TEDAVİSİNDE MİNOSİKLİN KULLANIMININ
ARAŞTIRILMASI**

Merve İNCİ ÇAMÇI
DOKTORA TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

DİYARBAKIR- 2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi **Merve İNCİ ÇAMÇI**'nin hazırladığı "**Farelerde Oluşturulan Diyabet Modelinde Bozulan Davranışsal ve Kognitif Fonksiyonların Tedavisinde Minosiklin Kullanımının Araştırılması**" başlıklı Tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 23/06/2022

Danışman: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Prof. Dr. M. Ensari GÜNELİ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. İlker KELLE

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Erdoğan ÖZGEN

Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Emre UYAR

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.../.../2022 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

13/06/2022

Araş. Gör. Merve İNCİ ÇAMÇI

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca kıymetli tecrübe, bilgi ve birikimleri ile bana her daim yol gösteren ve desteğini her an hissettiğim değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Meral Erdinç' e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübeleri ile bana destek olan, güler yüzünü ve samimiyetini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. İlker Kelle' ye teşekkürü bir borç bilir ve şükranlarımı sunarım. Psikofarmakolojik deneylerin gerçekleştirilmesinde tecrübesini ve yardımını esirgemeyen bilgi birikimini sakınmadan paylaşan arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Emre Uyar' a, moleküler çalışmaların gerçekleştirilmesi sırasında yardımdan kaçınmayan Araş. Gör. Dr. Meryem Şeyda Kaya' ya sonsuz teşekkür ederim.

Deneylerin gerçekleştirilmesi sırasında laboratuvar cihaz ve ekipmanlarından faydalandığım Tıbbi Genetik Anabilim Dalı' na teşekkürü bir borç bilirim.

İş yaşamımda ve tez sürecindeki manevi destekleri için arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Diren Sarısaltık Yaşın, Dr. Öğr. Üyesi Dilan Konyar, Dr. Öğr. Üyesi Fadime Aydoğan ve Araş. Gör. Cennet Duran 'a çok teşekkür ederim.

Desteklerini hep hissettiğim Raşit Karakaya, Yüksel Çamçi, Yaprak Çamçi ve Uğur Çamçi'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca desteklerini hissettiğim annem Aysel Karakaya' ya, kardeşim Bilal İnci' ye ve artık aramızda olmayan ama desteğini hep hissettiğim babam Muzaffer İnci' ye sonsuz teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği andan itibaren desteğini hep yanımda hissettiğim eşim M. Sinan Çamçi' ye ve en büyük teşekkürü tez çalışmalarım sırasında ihmal ettiğim küçük kızım Ronya Çamçi' ye sunuyorum.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından TIP.21.012 nolu araştırma proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZETLER	1
1.1. Türkçe Özet	1
1.2. Abstract	3
2.GİRİŞ VE AMAÇ	5
3.GENEL BİLGİLER	7
3.1. Nöroanatomi	7
3.1.1.Serebral korteks	7
3.1.2. Prefrontal korteks	7
3.1.3.Hipokampus	7
3.1.4.Amigdala	8
3.2. Nöroplastisite	9
3.2.1.Sinaptik plastisite	10
3.2.2.Sinaptogenezis	10
3.2.3.Nöroenez	10
3.2.4.Apoptozis ve nekroz	10
3.3.Diabetes Mellitus	12
3.3.1.Diyabetin sınıflandırılması	13
3.3.2.Diyabet tedavisinde kullanılan mevcut ilaçlar	15
3.4.Deneysel Diyabet Oluşturma Metodları	17
3.4.1.Streptozotosin aktivitesinin mekanizması	18
3.4.2.Streptozotosin duyarlılığını etkileyen faktörler	19
3.4.3.Tip 2 diyabet oluşturmak için kullanılan yüksek kalorili diyet	19
3.4.4.Yüksek kalorili diyetin insülin aktivitesi üzerine etkisi	20
3.4.5.Yüksek kalorili diyet ve streptozotosinin tip 2 diyabette kullanımının tarihçesi ..	22
3.4.6.Yüksek kalorili diyet ve streptozotosin ile diyabet oluşturmanın avantajları	22

3.4.7.Yüksek kalorili diyet ve streptozotosin ile diyabet oluşturmanın dezavantajları..	23
3.4.8.Yüksek kalorili diyet ve streptozotosin ile oluşturulan diyabetin vücut ağırlığı ve besin alımına etkisi	23
3.5. Diyabet- Depresyon ilişkisi	24
3.5.1.Tip 2 diyabet ve depresyon	26
3.5.2.Depresyon patofizyolojisi ve tip 2 diyabet ilişkisi.....	27
3.5.3.Depresyon ve diyabetik komplikasyonlar	32
3.5.4.Depresyon ve glisemik kontrol.....	33
3.5.5.Non-diyabetiklerde depresyon.....	33
3.6.Diyabet- Anksiyete ilişkisi	34
3.7.Diyabet- Kognitif Bozukluklar ilişkisi	35
3.8.Duygu Durum Bozuklukları.....	38
3.8.1.Depresyonda monoamin hipotezi	38
3.8.2.Antidepresanların sınıflandırılması.....	38
3.9.Depresyonda İnflamatuvar Sistem.....	39
3.9.1. İnflamasyonun depresyon riskini arttırması.....	40
3.9.2.Depresyonda pro-inflamatuvar belirteçlerin yükselmesi.....	40
3.9.3.Pro-inflamatuvar ajanların depresif semptomları uyarması.....	41
3.9.4.Depresyonda anti-inflamatuvar tedavi	41
3.10.Minosiklin	42
3.10.1. Minosiklinin endikasyonları.....	42
3.10.2.Etki mekanizması.....	43
3.10.3.Uygulama şekli	43
3.10.4.Yan etki profili	43
3.11.Minosiklinin Nörodejeneratif Hastalıklarda Kullanımı	44
3.11.1. Alzheimer hastalığında minosiklin kullanımı	44
3.11.2.Parkinson hastalığında minosiklin kullanımı	44
3.11.3.Huntington hastalığında minosiklin kullanımı.....	45
3.11.4.Amyotrofik lateral skleroz	45
3.11.5.Multiple skleroz.....	46
3.12.Minosiklinin Psikiyatrik Bozukluklarda Kullanımı	46
3.12.1. Şizofrenide minosiklin kullanımı.....	46
3.12.2.Otizm spektrum bozukluğu ve frajil x sendromunda minosiklin kullanımı	47
3.12.3.Depresyonda minosiklin kullanımı	48
3.12.4.Obsesif-kompulsif bozuklukta minosiklin kullanımı	50

4. GEREÇ VE YÖNTEM	51
4.1. Gereç.....	51
4.1.1. Kullanılan araç ve gereçler	51
4.1.2. Kullanılan deney hayvanları	52
4.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	52
4.2 Yöntem.....	53
4.2.2. Psikofarmakolojik incelemeler	56
4.2.3. Biyokimyasal incelemeler.....	65
4.2.4. Western blot analizi	66
4.2.5.Histolojik inceleme.....	71
4.2.5. İstatistiksel analiz	72
5.BULGULAR.....	73
5.1. Ağırlık Değişimi.....	73
5.2. Açlık Kan Glukoz Düzeyi (AKG)	74
5.3. Açık Alan Testi Bulguları	75
5.4. Yabancı Obje Tanıma Testi Bulguları.....	78
5.5. Modifiye Yükseltmiş Artı Labirent Testi Bulguları	79
5.6. Pasif Sakınma Testi Bulguları	80
5.7. Zorunlu Yüzme Testi Bulguları	81
5.8. Yükseltmiş Artı Labirenti Testi Bulguları	82
5.9. Hot Plate Testi Bulguları.....	84
5.10. HbA1c Değeri	85
5.11.Malondialdehit Düzeyleri.....	86
5.12.Western Blot Bulguları.....	87
5.13. Histoloji Bulguları	89
5.13.1 Histopatolojik bulgular.....	89
5.13.2. İmmünohistokimyasal bulgular.....	94
6.TARTIŞMA.....	99
7.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
8.KAYNAKLAR	109
9.ÖZGEÇMİŞ	141
10.EKLER.....	142
10.1. Makale.....	142
10.2.Etik Kurul Kararı	143

10.3. Tez İntihal Raporu.....	144
-------------------------------	-----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BLA	bazolateral amigdala
TRAIL	tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand
TNF- α	Tümör nekrozis faktör
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
GLUT	glukoz transporter
i.p.	intraperitoneal
i.v	İntravenöz
IRS	insülin reseptör substrat
PI3K	fosfotidilinositol-3 kinaz
GSK3	glikojen sentaz kinaz 3
mTOR	mammalian target of rapamycin
PKB	protein kinaz B
JNK	c-Jun-N-terminal kinaz
LFD	düşük yağ içerikli diyet
HFD	yüksek yağ içerikli diyet
VHFD	çok yüksek yağ içerikli diyet
STZ	streptozotosin
PPAR- α	peroxisome proliferator-activated receptor
5-HT	Serotonin
HPA	Hipotalamo-pitüiter-adrenal
T2DM	Type-2 Diabetes Mellitus
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase-2
RVM	rostromedial medulla
ADA	American Diabetes Association
SSRI	Selektif serotonin geri alım inhibitörleri
IL-1ra	interlökin-1 reseptör antagonisti
IFN- α	İnterferon alfa
NSAI	non-steroid anti-inflamatuarlar
mRNA	mesajcı RNA
tRNA	transfer RNA

ALS	Amyotrofik lateral skleroz
MS	Multiple skleroz
FXS	Frafil X Sendrom
MMP	Matriks metalloproteinaz
AKG	Açlık Kan Glukoz
SEM	Standart error of mean, Standart hata
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
OF	Open filed, Açık alan
PA	Passive Avoidance, Pasif sakınma
FST	Forced Swimming Test, Zorunlu yüzme testi
EPM	Elevated Plus Maze, Yükseltilmiş artı labirenti
AchE	asetilkolinesteraz
PBS	fosfat tampon solüsyonu

RESİMLER DİZİNİ

		Sayfa
Resim 1	Açık alan testi (open field test)	56
Resim 2	Yükseltilmiş artı labirenti (Elevated Plus Maze, EPM) testi.	58
Resim 3	Zorunlu yüzme testi (Forced Swimming Test, FST).	60
Resim 4	Pasif sakınma (Passive Avoidance, PA) testi.	61
Resim 5	Pasif sakınma testi-alıştırma aşaması	62
Resim 6	Hot plate testi	64
Resim 7	SDS-PAGE jel elektroforez sistemi	68
Resim 8	KONTROL grubu beyin kesiti	89
Resim 9	MİN grubu beyin kesiti	90
Resim 10	MET grubu beyin kesiti	90
Resim 11	DM grubu beyin kesiti	91
Resim 12	DM+MİN grubu beyin kesiti	91
Resim 13	DM+MET grubu beyin kesiti	92
Resim 14	DM+MET+MİN grubu beyin kesiti	92
Resim 15	DM+PİR grubu beyin kesiti	93
Resim 16	DM+FLU grubu beyin kesiti	93
Resim 17	KONTROL grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama	94
Resim 18	MİN grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama	95
Resim 19	MET grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama	95
Resim 20	DM grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama	96
Resim 21	DM+MİN grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama	96
Resim 22	DM+MET grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama	97
Resim 23	DM+MET+MİN grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama	97
Resim 24	DM+FLU grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama	98
Resim 25	DM+PİR grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama	98

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1 Ayırıcı ve yoğunlaştırıcı jel içeriği	67
Tablo 2 Antikorlar ve Seyreltme Oranları	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1	Tip 2 diyabetin patojenezisi	14
Şekil 2	İnsülin sinyal yolağı ve yüksek kalorili diyet	20
Şekil 3	Diyabet-depresyon ilişkisini açıklayan olası patofizyolojik mekanizmalar	28
Şekil 4	Tip 2 diyabetin kognitif bozukluklar ile ilişkisi	35
Şekil 5	Fluoksetinin moleküler yapısı	39
Şekil 6	Minosiklinin kimyasal yapısı ve 3 boyutlu görünümü	42
Şekil 7	Deney protokolü	54
Şekil 8	Elektroblotlama sistemi	68
Şekil 9	Deneklerin ağırlık değişimi	71
Şekil 10	Deneklerin açlık kan glukoz düzeyi değişimi	72
Şekil 11	Açık alan testi bulguları, toplam katedilen mesafe	74
Şekil 12	Açık alan testi bulguları, hız.	74
Şekil 13	Açık alan testi bulguları, merkeze giriş sayıları	75
Şekil 14	Açık alan testi bulguları, merkezde geçirilen süre	75
Şekil 15	Deneklerin yabancı obje tanıma testi	76
Şekil 16	Modifiye yükseltilmiş artı labirent testi bulguları	77
Şekil 17	Pasif sakınma testi bulguları	78
Şekil 18	Zorunlu yüzme testi bulguları, hareketsiz zaman.	79
Şekil 19	Yükseltilmiş artı labirenti testi bulguları, açık kollarda geçirilen süre yüzdeleri.	81
Şekil 20	Yükseltilmiş artı labirenti testi bulguları, açık kollara giriş yüzdeleri	82
Şekil 21	Deneklerin ağırlı uyarandan sakınma süresi	82
Şekil 22	Deneklerin HbA1c değerleri	83
Şekil 23	Deneklerin MDA değerleri	84
Şekil 24	Hipokampal doku protein ekspresyon düzeyleri	86
Şekil 25	Bütün gruplarda çalışılan proteinlere ait western blot bant görüntüleri	86

1. ÖZETLER

Farelerde Oluşturulan Diyabet Modelinde Bozulan Davranışsal ve Kognitif Fonksiyonların Tedavisinde Minosiklin Kullanımının Araştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Merve İnci Çamçı

Danışmanı: Prof. Dr. Meral Erdinç

Anabilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji

1.1. Türkçe Özet

Amaç:

Bu çalışmada, minosiklin ve metformin ile kombinasyonunun, farelerde oluşturulan tip 2 diyabet modelinde gelişen depresyon, anksiyete ve kognitif bozukluklar üzerine etkisi ile bu etkiye neden olabileceği düşünülen mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:

Farelerde Streptozotosin (50mg/kg, 5 gün, i.p.) ve yüksek kalorili diyet uygulanarak tip 2 diyabet modeli oluşturulmuştur.

Diyabet değerlendirilmesi, haftalık ağırlık değişimi, düzenli açlık kan glukoz düzeyi takibi ve deney sonunda alınan kanlarda HbA1c düzeyi ölçümü ile yapıldı.

Davranışsal parametrelerin değerlendirilmesi; açık alan, yabancı obje tanıma, modifiye yükseltilmiş artı labirenti, yükseltilmiş artı labirenti, pasif sakınma, zorunlu yüzme ve hot plate testi ile gerçekleştirildi. Lipit peroksidasyonun değerlendirilmesi için beyin dokularında malondialdehit düzeyleri ölçüldü. Beyin dokularında western blot metodu ile TNF- α ve IL-6, BDNF, iba-1 ekspresyonları incelendi. Ayrıca, beyin kesitlerinde immonohistokimyasal olarak iba-1 ekspresyon seviyeleri incelendi ve histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

Bulgular:

Diyabetik gruplarda kognitif bozukluklar, anksiyete ve depresyon benzeri etkiler olduğu görüldü ($p<0.05$). Minosiklin ve minosiklin+metformin kombinasyonu, fluoksetin grubuna benzer düzeyde anti-depresan, anksiyolitik etkiler gösterdi

($p<0.05$), pirasetam grubuna benzer şekilde uzaysal öğrenme-bellek bozukluklarını tersine çevirdiği gözlemlendi ($p<0.05$). Minosiklin ve minosiklin+metformin kombinasyonu ile diyabet durumunda artan MDA seviyesi önemli oranda azaldı ($p>0.05$), azalan BDNF protein ekspresyonu belirgin biçimde arttı ($p>0.05$), artan TNF- α , IL-6 ve iba-1 protein ekspresyonu azaldı ($p<0.05$).

Sonuç:

Minosiklinin hızlı ve güçlü antidepresan-benzeri etkileri bu çalışmanın sonuçlarına göre açıkça görülmüştür. Ayrıca diyabetik farelerde artmış olan anksiyete ve kognitif yetersizlikler de minosiklin ile iyileşmiştir. Metformin ile kombinasyonlarının benzer etkinlikte olduğu anlaşılmıştır. Bu etkilerin oluşumunda oksidasyon, nörodejenerasyon, inflamasyon ve mikrogial aktivite artışının rolü bu çalışma ile gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: anksiyete, depresyon, diyabet, kognitif bozukluk, minosiklin

Investigation of minocycline treatment on behavioral and cognitive dysfunction in diabetic mice

Student's Surname and Name: İnci Çamçı, Merve

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Meral Erdiñ

Department: Medical Pharmacology

1.2. Abstract

Aim:

In the present study, it was aimed to investigate the effects of minocycline and its combination with metformin on depression, anxiety and cognitive disorders emerging in type 2 diabetes mice model and the possible mechanisms inducing these effects.

Material and Method:

Firstly, type 2 diabetes model was induced by i.p. injection of 50 mg/kg of Streptozotocin for 5 days and using a high fat diet in mice. The assessment of diabetes model in mice was performed by controlling weekly weight alterations and monitoring fasting blood glucose levels in a regular base. Besides these, blood HbA1c levels were also measured at the end of the experiments.

The behavioral parameters were evaluated by using open field, novel object recognition, modified elevated plus maze, elevated plus maze, passive avoidance, forced swimming, and hot plate tests. Malondialdehyde levels were measured for the assessment of lipid peroxidation in brain tissues. Moreover, western blotting method was performed for measurement of TNF- α , IL-6, BDNF and iba-1 expressions. Iba-1 expressions and histopathological assessment were practiced in brain sections.

Results:

Depression-like effects, anxiety and cognitive disorders were observed in diabetic groups ($p < 0.05$). Minocycline and its combination with metformin had similar anti-depressant and anxiolytic effects as fluoxetine group ($p < 0.05$). Also, it was observed that minocycline and its combination with metformin reversed spatial learning-memory impairments like the piracetam group ($p < 0.05$). In the diabetic group, MDA levels and TNF- α , IL-6, iba-1 expression levels increased, BDNF expression levels

decreased. Minocycline and its combination with metformin reversed all these parameters.

Conclusion:

The results of this study demonstrated minocycline has rapid and potent antidepressant-like effects. Besides that, minocycline alleviated increased anxiety and cognitive deficits in diabetic mice. Its combination with metformin has similar efficacy. In this study, it was shown that oxidation, neurodegeneration, inflammation, and microglial activity were all implicated in the development of these effects.

Keywords: anxiety, cognitive impairment, depression, diabetes, minocycline

2.GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus, pankreatik β hücrelerinde insülin üretiminin ve periferel dokulara salınımının bozulması sonucu kan glukoz düzeyi artışı ve metabolizmal değişiklikler ile karakterize kronik bir endokrin bozukluktur(1). Tip 2 diyabet (T2DM) ise, tüm diyabetlilerin %90'ını oluşturan, insülin direnci ve yetersiz insülin salınımının birlikte görüldüğü diyabet türüdür(2). T2DM' lilerde depresyon görülme sıklığının normal popülasyonun 2 katı olduğu belirtilmiştir(2). Ayrıca T2DM' lilerde Alzheimer görülme olasılığının normal popülasyondan çok daha fazla olduğu, beyinde insülin direnci, oksidatif stres ve kognitif bozuklukların Alzheimer hastalığının zeminini oluşturduğu, bu nedenle de Alzheimer hastalığının diyabetin beyne selektif bir formu olup tip 3 diyabet olarak nitelendirilebileceği bildirilmiştir(3).

T2DM' ta görülen depresyon, anksiyete ve kognitif bozukluğun hangi mekanizma ile ortaya çıktığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak anılan komplikasyonlar için oksidatif stres, proinflamatuvar sitokin düzeyi artışı, mikroglial aktivasyon ve nörodejenerasyon sorumlu tutulmaktadır. Kronik hiperglisemi ile insülin direnci, obezite gibi metabolizma bozuklukları plazmada IL-1 β , IL-6 ve TNF- α (tümör nekrozis faktör) gibi proinflamatuvar sitokin düzeylerinin artışı uyarıp oksidatif strese yol açarak hücrel hasara neden olup mikrovasküler veya makrovasküler komplikasyonların gelişmesini potansiyelize edebilmektedir. Ayrıca uzun süreli hiperglisemi; nörodejenerasyona sebep olan ileri glikasyon son ürünlerinin (advanced glycation end products-AGEs) oluşumuna yol açıp inflamatuvar yolağı uyararak oksidatif stresin daha fazla artmasına ve nöron hasarına yol açmaktadır(4, 5). Bunun yanı sıra mikrogliozis ve astrosit aktivasyonu ile ilişkili olarak diyabete bağlı santral sinir sistemi inflamasyonu meydana gelmektedir. Mikroglial hücrelerin aktivasyonu sonucu morfolojik değişiklikler ile hücreler aktif hale gelerek nöronal yaşam ve nörojenezis üzerine yıkıcı etkileri olan; proinflamatuvar sitokinler, nitrik oksit, reaktif oksijen türleri, hidrojen peroksit gibi nörotoksik moleküllerin salınımına neden olmaktadır(4-6).

Minosiklin yüksek lipit çözünürlüğü özelliği ile kan beyin bariyerinden kolayca geçip düşük dozlarında bile santral sinir sisteminde etki gösterebilen, FDA onaylı yarı sentetik ikinci kuşak tetrasiklin türevi bir antibiyotiktir. Minosiklinin, klasik pro-

inflamatuar durumdaki (M1) mikroglial aktivasyonu selektif olarak inhibe ettiği, alternatif anti-inflamatuar durumu (M2) etkilemediği, bu nedenle de nöroprotektif ve rejeneratif etkiler gösterdiği bildirilmiştir(7, 8). Yapılan alışmalar minosiklinin, nörojenezisin artışı, antioksidan aktivite, anti-glutamat eksitotoksitesisi, pro-inflamatuar moleküllerin regölasyonuyla oluşan nöroprotektif etkisi ile insanlarda ve deney hayvanlarında antidepresan etki yaptığı gösterilmiştir(9-11).

Minosiklinin santral sinir sisteminde inflamasyonu azaltmasından dolayı nöroprotektif etkili olduğu, ayrıca nörodejeneratif hastalıklarda nöroinflamasyon ve mikroglial aktivasyonu azalttığı bilinmektedir(12). Mikroglial hücreler başlangıçta anti-inflamatuar sürecin bir parçası olarak MCP-1 aracılı santral sinir sistemi hasarı olan bölgeye toplanmaktadır. Ancak fazla glial aktivasyon aşırı pro-inflamatuar sitokin salımı ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile kronik nöroinflamasyona neden olup nörotoksositeye yol açmaktadır. Hiperglisemi de santral hasardan bağımsız olarak sitokin aracılı demiyelinasyon süreci ve serbest oksijen radikallerinin birikimiyle ilişkilendirilmiştir(13). Hipokampal dokuda IL-1 β ve TNF- α düzeyi artışı diyabetin ilerlemesi ve kognitif bozuklukların ortaya çıkması ile bağılantılı bulunmuştur. Mehta ve ark. (2019) yaptıkları bir çalışmada diyabete bağı kognitif bozuklukların tedavisinde minosiklini (50 mg/kg, 15 gün, p.o.) etkili bulmuş, bu etkiyi diyabet durumunda artan IL-1 β , TNF- α ve MCP-1 düzeylerini azaltarak gösterdiğini ileri sürmüştür(4).

Bu çalışmada, minosiklin ve minosiklin+metformin kombinasyonunun deneysel olarak oluşturulan tip 2 diyabete bağı gelişen depresyon, anksiyete ve kognitif bozukluk gibi komplikasyonlar üzerine etkisinin incelenmesi ve bu etkiye neden olan mekanizmaların aydınlatılması amaçlandı.

3.GENEL BİLGİLER

3.1. Nöroanatomi

3.1.1.Serebral korteks

Serebral korteks; memelilerin beyinde algı, istemli hareket, öğrenme, hafıza ve duygular gibi birçok davranış üzerinde önemli bir etkiye sahip, baskın bir yapıdır. İnsanları tür ve birey olarak benzersiz kılan dil, öğrenme ve alet kullanımı gibi yetenekler için hayati önem taşımaktadır(14). Serebral korteks tüm nöronların yalnızca %20' sini, ancak büyük nöronları, bolca nöropilleri (dendritler, aksonlar, sinapslar) ve beyaz cevhere kadar uzanan kapsamlı aksonal projeksiyonlarından dolayı beyin kütlelerinin %80' ini oluşturmaktadır(15).

3.1.2. Prefrontal korteks

Prefrontal korteks, frontal lob ve onun korteks ile ilişkili olan kısmını tanımlayan, fonksiyonel özelliklerinden dolayı insan beyni araştırmalarında oldukça popüler olan kısımdır. Prefrontal korteks, yönetici işlevler olarak gruplandırılan üst düzey kognitif süreçlerde, dil öğrenimi, sosyallik ve duygusal süreçlerde yer almaktadır. Yürütme işlevleri çeşitli duygusal modalitelerden gelen girdilerin organizasyonu, dikkatin sürdürülmesi, bellekteki bilgilerin izlenmesi ve hedefe yönelik davranışların koordinasyonunu içerir(16). Tüm bunlar karmaşık sosyal gruplar ve öngörülemeyen çevresel şartlardan korunmak için gerekmektedir. Prefrontal korteks insana özgü bir kısım olmasa da, insanın bilişsel özelliği üzerine düşünülen ne varsa, bu bölgenin önemli etkisi bulunmaktadır(17).

3.1.3.Hipokampus

Hipokampus, Ammon boynuzu ve dentat gyrus kısımlarından oluşan, limbik sistemin kalbi olarak nitelendirilen, temporal korteks ve septum ile yakın ilişkisi olduğu bilinen bir beyin kısmıdır(18).

Çok sayıda çalışmada hipokampusun öğrenme-bellek sürecinde etkin rolü olduğu belirtilmiştir. Hipokampusun esas işlevi; bellek izlerinin sabitlenmesi, beyne gelen bilgilerin seçimi gibi bazı fonksiyonlar olmasına rağmen, frontal korteks ile olan ilişkisi öğrenme-bellek sürecinde anahtar bir rol oynamaktadır. Farklı hipokampus alanlarının hipokampal nörotransmitter sistemlerin aktivasyonuna bağlı olarak

öğrenmede edinme ve pekiştirme sürecinde farklı etkileri olduğuna inanılmaktadır(19).

Hipokampusun bir diğer önemli fonksiyonel özelliği, nöronlarının yeni bağlamsal uyaranlara net yanıtlar verme yeteneğidir ve böylece oryantasyon refleksini organize etmede ve dikkat sürecini kontrol etmede etkin rol alırlar. Yeni nöronların kaybıyla birlikte dış uyarılar devam ederse, karşılık gelen nöron cevabı da sönmektedir(18).

3.1.4.Amigdala

Korkunun, deney hayvanları ve insanlarda assosiyatif öğrenme paradigması olduğu kabul edilmekte(20), ayak şoku gibi caydırıcı şartlı bir uyaran veya yemek ödülü gibi teşvik edici şartlı olmayan bir uyaran olarak kullanımı üzerine uzun süredir çalışılmaktadır. Koşullu uyarılma uygun davranışsal sonuçları tetikleyen duygusal değerler bütünüdür. Literatür, koşullu-koşullu olmayan uyarıların bağlantılarını oluşturan amigdalanın assosiyatif öğrenme için gerekli olduğunu göstermiştir(21). Bazolateral amigdala (BLA) kısmı ile yapılan çalışmada, assosiyatif öğrenme, amigdaladaki nöronların caydırıcı veya teşvik edici koşullu uyarı yanıtı geliştirmesinin sonucu olarak BLA' nın deneyime dayalı plastisitesini içermektedir. Bu yanıtlar hem bazal hem de lateral amigdalada görülmektedir(20, 21).

Korku ve anksiyete durumunda gösterilen davranışsal yanıtlarda benzerlik bulunmaktadır. Beyin görüntüleme ve deney hayvanlarında yapılan davranış çalışmalarında anksiyete benzeri davranış BLA ile ilişkilendirilmiştir(22). Böylece amigdalanın inaktivasyonu ile anksiyojenik yanıtın önlenebileceği ileri sürülmüştür(23). Assosiyatif öğrenmeyi takiben, öğrenmeyi kodladığı düşünülen caydırıcı veya teşvik edici uyarılar, BLA' daki nöronlara gelişmiş yanıtlar kazandırmaktadır. Aynı yol ile BLA' nın anksiyete benzeri davranışın oluşumu ve artışında da rolü olduğu düşünülmektedir(24).

3.2. Nöroplastisite

İnsan hücreleri, yenilenebilme güçlerine ve hücre döngüsü ile ilişkilerine göre, sürekli bölünen hücreler, sessiz hücreler ve bölünmeyen hücreler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar. Nöroplastiklik kavramı, bölünmeyen hücreler grubunda yer alan beyin hücrelerinin, içsel ve dışsal uyaranlara yanıt olarak işlevinde ve yapısında gösterdiği değişiklikleri tanımlamaktadır(25). Beyin, plastiklik özelliği sayesinde yeni bilgiler öğrenmekte(25), tehlikeli durumlardan kaçınmayı ve kurtulmayı başarmaktadır(26). Beyindeki plastik değişiklikler, hormonlar, nörotransmitterler ve nörotrofik faktörler gibi içsel ve çevresel etkenlerin katkısı ile gen ifadesi, protein sentezi ve sinaptik bağlantılarda uzun süreli ve kalıcı etkiler ortaya çıkararak, özgül nöron ve glia hücrelerinde işlevsel ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır(27). Nöral döngülerin yeniden ve daha güçlü bağlanmasına neden olan sinaps şekil değişikliği ve yeni sinaps oluşması olarak tanımlanan sinaptogenez ve yeni nöronların oluşması olan nörogenez, erişkin beyinde nöroplastikliğe katkı sağlayan temel iki süreçtir.

Özellikle daha basit türler üzerinde yapılan, nöral plastiklik hakkındaki çalışmaların çoğu Hebb tipi sinaptik plastikliğe dayanmaktadır(28). Kuramsal olarak, plastiklik hakkındaki bu görüş, birbirine sıkıca bağlanmış bir ağ yapısındaki sinapsları, çeşitli güçlendirme etkenleri (sinaptik dayanıklılık) olarak tanımlamaktadır(26). Nöronlar arasındaki anatomik bağları değiştirmeksizin, sinaptik dayanıklılığı değiştiren işlevsel plastikliğin herhangi bir türüne zıt olarak yapısal plastiklik, sinaps sayılarındaki, aksonal lif yoğunluğundaki, aksonal ve dendritik dallanma şekillerindeki, sinaptik bağlantı şekillerindeki ve hatta nöronal hücre sayılarındaki değişiklikleri içermektedir. Bir nöral ağdaki sinaptik şebeke değişiklikleri, silinme(29) ve yeni sinapsların oluşumu(30) esasına dayanmaktadır. Bununla birlikte sinaptik ağ oluşumu, kortikal sütunlardaki aksonal dalların yeniden yönlenmesi(31) ve dendritik çıktılarının içe çekilmesi ve yeniden oluşması(32) ile de ortaya çıkabilmektedir.

3.2.1.Sinaptik plastisite

Sinaptik plastisite; beynin karmaşık bilgileri algılamasını, değerlendirmesini, saklamasını ve ilişkili uyaranlara uygun adaptif yanıtlar vermesini olanaklı kılan temel ve önemli bir işlevidir. Beynin bu önemli fonksiyonu, depresyon ve kısa - uzun süreli hafıza bozuklukların tedavisinde ve patofizyolojisi ile ilgili değişikliklerin aydınlatılmasında kritik bir role sahiptir(33).

3.2.2.Sinaptogenezis

Sinaptogenezis sinyal yollarının karmaşık bağlantıları ile düzenlenir ve bu yollarda bozukluk; nörotrofik faktör desteği kaybı, estradiol döngüsünün bozulması ve inflamatuvar sitokinlerin artışı içeren depresyona yatkınlık parametreleriyle ilişkilendirilmiştir(34).

3.2.3.Nörogenez

Yakın zamana kadarki inancın aksine, erişkin memeli beyinde yeni nöronların olduğu bilinmektedir. Nörogenez, erişkin hipokampal dentat girus bölgesine yeni fonksiyonel nöronların eklenmesi süreci olarak tanımlanmaktadır. Hipokampal nörojenezis, hipokampus bağlantılı beyin fonksiyonlarının yürütülmesinde önemli rol oynamaktadır. Erişkin nörojenezisinin öğrenme-bellek sürecinin yanı sıra depresyon ve anksiyete gibi duyu durum bozukluklarını düzenleyici etkisinin olduğu da yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur(35).

3.2.4.Apoptozis ve nekroz

Apoptoz, hücreler içinde mevcut genetik olarak programlanmış ardışık biyokimyasal olaylar dizisinin uyarılması sonucu hücrenin kendisini yok etmesi (intiharı) olayıdır. Vücutta hasarlanmış hücrelerin, düzensiz bir şekilde parçalanması ve açığa çıkan ürünlerin iltihap reaksiyonu başlatması şeklinde gelişen diğer bir hücre yok olması olayı olan nekrozdan ayrılır. Apoptozda hücre parçalanmadığı, kendi membranı içinde yok olup içindeki iltihap tetikleyicisi komponentleri etrafa saçılmadığı için apoptoza iltihabi reaksiyon eşlik etmez(36).

Apoptoz, hücre içinde ölümle sonuçlanan iki ölüm yolağının aktive edilmesi ile oluşur. a) Ölüm reseptörü yolağı: ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktör reseptörü süper familyasına ait, birçok hücre tipinde bulunan trimer şeklindeki transmembranal reseptör proteinleridir. Bunların hücre dışındaki tümör nekroz faktörleri veya TRAIL

maddesi (tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand) tarafından aktivasyonu sitoplazmik bir enzim olan kaspaz-8'i aktive eder. Bu enzimin aktivasyonu da yolağın distal alt kısmında yerleşmiş ortak efektör kaspazları (kaspaz-3 vb.) uyarır. b) Mitokondriyal yolak: bu yolak hücre içinde çeşitli uyarılar (onarılamayan DNA zedelenmesi gibi) tarafından aktive edilir. Aracı proteinler (p53 vb.) tarafından sitoplazmik bir protein olan anti-apoptotik Bcl-2 gibi proteinler aktive edilir. Bunlar mitokondrilerden sitokrom-c'yi salıverir. Bu madde apoptozom kompleksinin içine girerek onun aracılığı ile kaspaz-9 enzimini aktive eder. O da yukarıda değinilen ortak efektör kaspazları aktive eder ve aktif duruma gelen bu enzimler genomik DNA'nın parçalanmasına, hücre içindeki enzimlerin ve yapısal proteinlerin kopup inaktive olmalarına, sonuçta apoptotik hücre ölümüne yol açar. Apoptoz sonucu parçalanmadan kendi membranı içinde büzülüp canlılığını kaybeden hücreler makrofajlar tarafından fagosite edilerek yok edilirler(36).

Hücreler anti-apoptotik mekanizmalara da sahiptir. Hücre membranında yerleşmiş transmembranal bir reseptör proteini olan sağ kalım reseptörünün (survival), hücre dışındaki sağ kalım faktörleri tarafından aktive edilmesi sitoplazma içindeki anti-apoptotik Bcl-2 proteinini aktive eder; o da mitokondrileri etkileyerek hücre içinde onlar üzerindeki pro-apoptotik etkenlerin etkisini antagonize eder. Böylece apoptoza yol açan mitokondriyal yolak sağ kalım mekanizması tarafından baskı altında tutulur. Ayrıca hücre içindeki apoptoz proteinlerinin inhibitörleri de hücrede apoptoz yollarındaki kaspazları inhibe ederek apoptozu baskı altında tutar(36).

3.3.Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus; insülin üretimi veya salınımının kısmi veya tamamen bozulmasından kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize metabolik bozukluk durumudur. Uluslararası diyabet federasyonuna göre; diyabet hastaları 2011 yılında 336 milyon kişi iken, 2030 yılında 552 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir(37). Kronik hiperglisemi; bazı organlarda uzun süreli hasar ve disfonksiyon sonucunda nöropati, nefropati, retinopati, makro/mikro anjiyopati gibi diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasına sebep olur(37). Bunun yanı sıra diyabet ve mental bozukluklar arasında sıkı bir ilişki olduğu da dikkat çekmektedir(38). Diyabet hastalarında görülen psikiyatrik ve kognitif bozukluklar mevcut çalışmalarda inflamasyon, mikrogial aktivasyonun artışı, apoptozis, oksidatif stres ve nörodejenerasyon ile ilişkilendirilmiştir(39).

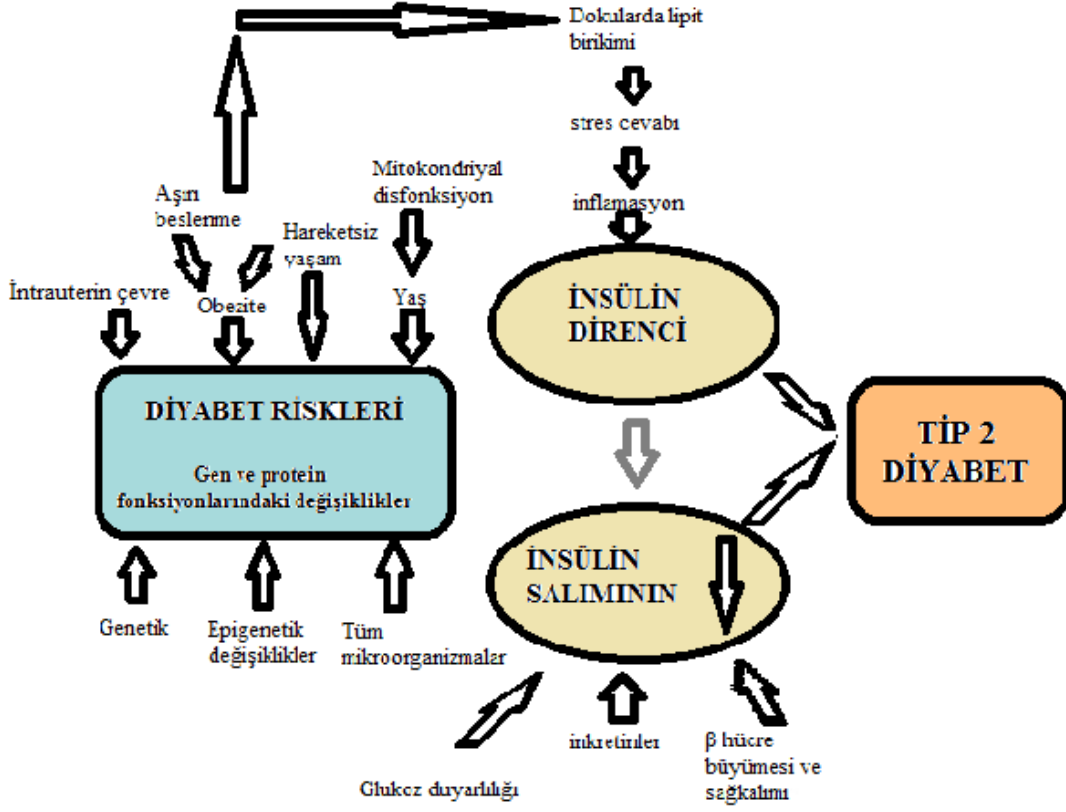
Kronik hipergliseminin; diyabetik bireylerde plazma IL-1 β , IL-6 ve TNF- α (tümör nekrozis faktör) gibi proinflamatuvar sitokinlerin düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. Diyabet sürecinde oluşan insülin direnci, obezite gibi metabolik bozukluklar ve dislipidemi de inflamatuvar yolları uyarıp oksidatif strese yol açarak diyabete sekonder gelişen komplikasyonların açığa çıkmasına neden olmaktadır. Kronik inflamasyon ve oksidatif stres hücrel hasara yol açabilir, diyabetin mikrovasküler veya makrovasküler komplikasyonlarının gelişmesini potansiyelize edebilir. Ayrıca uzun süreli hiperglisemi; nörodejenerasyona yol açan ileri glikasyon son ürünlerinin (advanced glycation end products-AGEs) oluşumuna yol açabilmektedir. İleri glikasyon son ürünleri inflamatuvar yolağı uyararak oksidatif stresin daha fazla artmasına neden olup nöron hasarına yol açar. Oksidatif stres antioksidanların ekspresyon ve fonksiyonlarının da azalmasına yol açarak hücrelerin oksidatif saldırılara açık hale gelmesine neden olur. Ayrıca mikrogliyozis ve astrosit aktivasyonu ile ilişkili olarak diyabet bağımlı santral sinir sistemi inflamasyonu meydana gelmektedir. Mikrogial hücrelerin aktivasyonu sonucu morfolojik değişiklikler ile hücreler aktif hale gelerek nöronal yaşam ve nörojenezis üzerine yıkıcı etkileri olan; proinflamatuvar sitokinler, nitrik oksit, reaktif oksijen türleri, hidrojen peroksit gibi nörotoksik moleküllerin salımına neden olur. Astroglisis öncelikle sinaptik glutamat homeostazının düzensizliğine, sonuç olarak eksitotoksik nöronal hasara katkıda bulunur(4-6).

Diyabet hastalığında hiperglisemi başlangıçta doku hasarına neden olmaktadır. Hiperglisemi tüm hücre ve dokuları etkilemesine rağmen, diyabet retinadaki kapiler endotelial hücreler, renal glomerulustaki mezenjiyal hücreler ve nöronlar gibi belirli hücrelere zarar verir. Hücreler hiperglisemiye maruz kaldığında, çoğu membran glukoz transportu ile sınırlı kalarak içerde sabit bir glukoz konsantrasyonu elde etmektedir. Ancak mezenjiyal hücreler, endotelial hücreler bunu efektif bir şekilde gerçekleştiremediği için hiperglisemiden zarar görmektedirler. Bununla birlikte katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin düzeyi diyabette azalarak, dokularda oksidatif hasara neden olmaktadır(40).

3.3.1.Diyabetin sınıflandırılması

Diyabet; nedenleri, diagnostik belirtileri ve tedavi stratejilerine göre sınıflandırılmaktadır. Buna göre; tip 1 diyabet, tip 2 diyabet ve gestasyonel diyabet olarak gruplandırılır. Tip 1 diyabet, beta hücre harabiyetinden dolayı pankreatik adacıkların hasarı ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Bunun yanı sıra tip 1 diyabetin patojenezisinde çevresel ve genetik faktörlerin de rol oynadığı bilinmektedir. Tip 2 diyabet ise, beta hücre harabiyeti ve insülin direncinin birlikte görüldüğü, kötü beslenme, hareketsizlik, obezitenin yanı sıra genetik bozukluk ile ilişkilendirilen çok daha sık görülen diyabet türüdür. Gestasyonel diyabet, vücut kitle indeksinin 25 kg/m^2 'nin üzerinde olması, sigara içme, hareketsiz yaşam gibi risk faktörlerinin etkisi ile gebelik süresince gelişen diyabet türüdür. Erişkinlerde latent otoimmün diyabet ise, yetişkinlikte ortaya çıkan, diğer diyabet türlerine ikincil gelişen diyabet tipidir(41).

3.3.1.1. Tip 2 diyabet



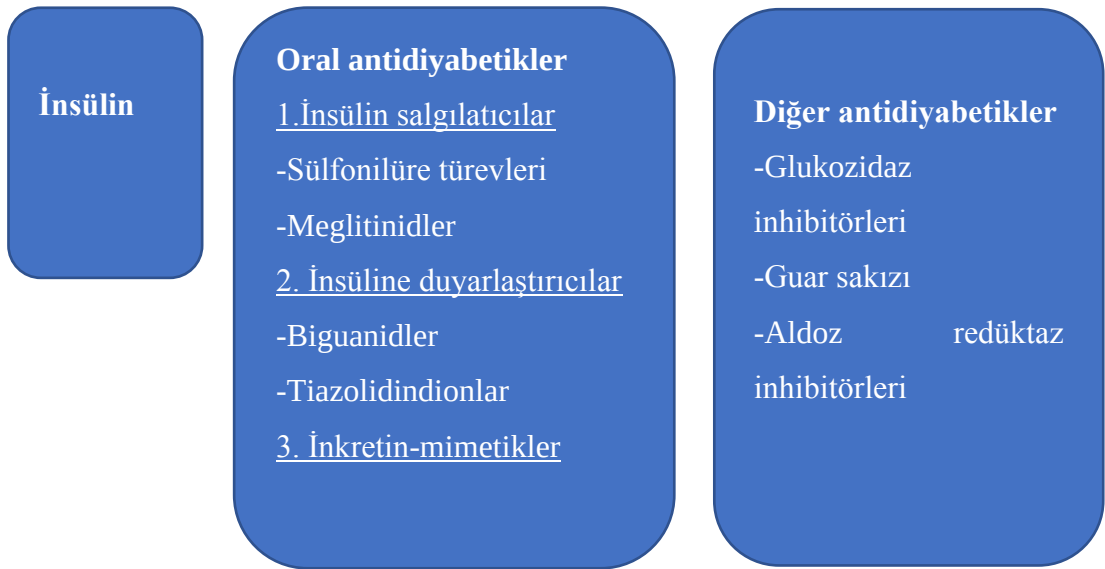
Şekil 1. Tip 2 diyabetin patojenezisi(42)

Diyabet; görülme sıklığı giderek artan, 2040 yılı itibarıyla dünya üzerinde 642 milyon kişiyi etkileyeceği tahmin edilen bir hastalıktır. Tüm diyabetlilerin %90-95'ini oluşturan, yetişkin diyabeti veya insülin bağımlı olmayan diyabet olarak nitelendirilen tip 2 diyabet; özellikle lipid metabolizması değişiklikleri, hiperglisemi, insülin direnci ve pankreatik β hücre hasarı ile karakterize, kompleks metabolik bir durumdur(43). Diyabetli hastalarda metabolizmada meydana gelen bu değişikliklere sekonder olarak; retinopati, nöropatik ağrı, kardiyak, psikiyatrik ve kognitif (öğrenme-bellek) bozukluklar gelişebilmektedir(37). Yapılan çalışmalarda; dünya nüfusunun %10'unda mental bozukluk, %8,3'ünde ise diyabet gözlenmiştir. Diyabet ve mental bozuklukların (depresyon, anksiyete, kognitif bozukluklar) aynı anda görülmesinin, ayrı ayrı görülme olasılığından iki kat fazla olduğu gösterilmiştir(44).

Tip 2 diyabet ile depresyon arasında çift yönlü bir ilişki ve biyolojik bir korelasyon olduğunu gösteren çok fazla çalışma bulunurken tip 1 diyabetin

depresyonla ilişkisinin biyolojik temelleri üzerine çok az çalışma bulunmaktadır. Tip 1 diyabet ve tip 2 diyabetin ortaya çıkış zamanları ve tedavi gereksinimleri oldukça farklıdır. Tip 1 diyabet genellikle çocukluk ve ilk gençlik çağlarında psikolojik ve fizyolojik değişiklikler ile ortaya çıkarken, tip 2 diyabet orta yaşlarda görülür. Tip 2 diyabetin tedavisinde diyet, yaşam tarzı değişiklikleri oral ilaç tedavisi ve insülin enjeksiyonu ile sağlanırken tip 1 diyabetin tedavisinde yaşam boyu insülin enjeksiyonu ya da infüzyonu gereklidir(45).

3.3.2.Diyabet tedavisinde kullanılan mevcut ilaçlar



3.3.2.1.Biguanidler

Biguanid türevi ilaçların; periferik dokuda insülin etkinliğini arttırarak, ince bağırsaktan glukoz emilimini azaltarak ve glukoneogenezi azaltarak etki ettikleri bilinmektedir. Beta hücrelerini etkilemeden insülin düzeyini azaltmaktadırlar(36). Metformin klinik olarak kullanılan tek biguanid türevi antidiyabetiktir(41).

3.3.2.1.1.Metformin

Metformin, insülin duyarlaştırıcılar olarak bilinen biguanidler sınıfı ilaçlardandır. Biguanidler hepatik glukoneogenezisin azalması ve beta oksidasyonun artışı ile sonuçlanan AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) yolağının aktivasyonu ile insülin duyarlılığını artırır(46).

Oral alımında çabuk emilip hızla elimine edilen etki süresi kısa bir ilaçtır. Diğer antidiyabetiklerin aksine vücut ağırlığını arttırmadığından yeni tanı konan şişman hastalarda ilk olarak tercih edilmektedir. Bununla birlikte metformin kullanımı laktik asidoz tablosuna yol açabilecek kalp yetmezliği, karaciğer hastalığı, dehidratasyon gibi durumlarda, laktasyon ve gebelikte kontrendikedir(36).

Steiner ve ark. yaptıkları çalışmaya göre de metformin, adiponektin düzeyini arttırarak insülin duyarlılığını arttırır(47). Adiponektin de insülin duyarlılaştırıcı ve antidepresan özelliğe sahip, adipositlerden oldukça fazla salgılanan sirküler hormondur. Bunun yanı sıra adiponektinin hipokampal hücreler üzerine nöroprotektif etkiler gösterdiği ve obezite ile ilişkili depresyonun tedavisinde alternatif bir yolak olabileceği ileri sürülmüştür(48).

Metforminin nörodejeneratif hastalıklar için kullanımı ile ilgili literatürde bazı çelişkiler bulunmaktadır. İn vitro çalışmalar, metforminin nöronal hücre dizilerinde ve tau transgenik farelerde, tau fosforilasyonunu azalttığını göstermiştir. İn vivo çalışmalarda ise leptin dirençli obez farelerde, metforminin kognitif bozukluk ve Alzheimer benzeri patolojide iyileştirme oluşturduğu gösterilmiştir. Ancak bunların tersine, yapılan hücre kültürü çalışmalarında metforminin amiloid beta protein çoğalmasını arttırdığı belirtilmiştir(49).

İnsanlarda yapılan gözlemsel çalışmalara göre, metformin kullananlarda kullanmayanlara veya başka bir glukoz düzenleyici kullananlara göre hafif kognitif bozukluk ve demansta iyileşme görülmüştür. Uzun süreli metformin kullanan hastalarda kognitif bozukluk görülme riskinin azaldığı, depresif kişilerde glikoz metabolizması değişiklikleri ile depresyon ve kognitif performansı iyileştirdiği görülmüştür. Hafif kognitif bozukluğu olan diyabeti olmayan kişilerde on iki aylık süreçte gerçekleştirilen pilot klinik çalışmada metformin kullanan hastaların kullanmayanlara göre bilişsel fonksiyonlarında iyileşme görülmüştür. Metformin kullanan diyabetli hastalarda diğer diyabet tedavilerinin uygulandığı hastalara göre kognitif fonksiyonlarda çok daha fazla iyileşme görülmüştür. Diğer taraftan Alzheimer olan hastaların kullandığı metforminin Alzheimer'ın ilerlemesini ve kognitif bozukluğu arttırdığı gösterilmiş, ancak bu durum metforminin oluşturduğu B12 vitamin eksikliğine bağlanmıştır. Vitamin eksikliği yerine koyma tedavisi ile giderildiğinde kognitif fonksiyonlarda iyileşme görülmüştür(49).

3.4.Deneysel Diyabet Oluşturma Metotları

Diyabet hastalığının kompleks oluşundan dolayı deney hayvanlarında tam olarak insandakine benzer bir patojenez oluşturmak oldukça zordur(50). Deney hayvanı modellerinin çoğunda pankreatik β hücreyi etkileyen toksik kimyasallardan faydalanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak 1943 yılında alloxan kullanılmış, bu madde serbest radikal oluşturup pankreatik beta hücrelerinin parçalanmasına neden olmuş(51), ancak etkin doz aralığının darlığından dolayı böbrek toksisitesi oluşturmuştur, bu nedenle kullanımı uygun bulunmamıştır(52).

Deney hayvanlarında diyabet oluşturmak için kullanılan yöntemlerden bazıları aşağıda özetlenmiştir (53).

1. Düşük doz, çok kez streptozotosin uygulaması ile Tip I diyabet oluşturulması;

Bu model insanlardaki tip I diyabet patolojisi ile benzer şekilde; kronik pankreatik hücre hasarı, insülitis, insülin yokluğu oluşturması ve diyabet oluşturmak için kullanılan diğer hayvan modellerine göre daha ucuz ve etkili olması sebebiyle en çok kullanılan yöntemdir.

2. Yüksek doz, bir kez streptozotosin uygulanması ile Tip I diyabet oluşturulması;

Bir kez, yüksek doz (200mg/kg) streptozotosin (STZ) uygulanması sonucu; 48 saat içinde oluşan pankreatik β hücre toksisitesi ile hızlıca diyabet gelişmesine ve kan glukoz düzeyinin 500 mg/dl'nin üzerine çıkmasına neden olur. Düşük doz STZ'nin çok kez uygulanması daha az toksik etki göstermesine rağmen araştırmalarda hala yüksek doz, bir defa STZ uygulaması ile tip I diyabet oluşturulması tercih edilebilmektedir.

3. Streptozotosin + nikotinamid kombinasyonu ile Tip II diyabet oluşturulması;

Bu modelde kullanılan nikotinamid pankreatik hücreleri STZ toksisitesinden kısmen korur. Bu şekilde oluşturulan tip II diyabet modelinde insülin yokluğu oluşturulur, ancak insülin direnci oluşmaz. Pankreatik β hücrelerinin yaklaşık %60'ının kaybı ile karakterize hafif bir hiperglisemi oluşturulur. Fakat tip II diyabetli hastaların çoğunda insülin sekresyonunun bozulmasının yanı sıra insülin direncinin olması nedeniyle başka bir yönteme ihtiyaç duyulmuştur.

4. Streptozotosin + yüksek kalorili diyet uygulaması ile tip II diyabet oluşturulması;

Bu yöntemde yüksek kalorili diyet uygulaması ile insülin direnci oluşturulup, STZ ile de pankreatik β hücre kapasitesi azaltılmıştır. Bunun sonucunda insanlardaki tip II diyabet ile benzer biçimde hiperglisemi ile birlikte hiperinsülinemi ve insülin direnci oluşturulmuştur.

Hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin oluşturulmasında yaygın olarak tercih edilen STZ ilk olarak 1963 yılında kullanılmıştır(51). Yüksek doz STZ uygulanması tip 1 diyabet ile benzer olarak şiddetli biçimde insülin sekresyonunu bozmaktadır. Bunun yanı sıra, kontrolsüz tip 1 diyabette görüldüğü gibi keton cisimciği oluşumuna ve idrardan atılımına neden olmaktadır(54). Önceki çalışmalar yüksek kalorili diyet ile fazlaca beslenen deneklerde insülin direnci oluştuğunu göstermiştir(55). Bu nedenle periferik insülin direnci için yüksek kalorili diyetin ardından STZ ile pankreas beta hücre hasarı oluşturmak, insandaki tip 2 diyabetle hem fenotip hem de patojenezis olarak oldukça benzer bir model oluşturmaktadır(56).

3.4.1.Streptozotosin aktivitesinin mekanizması

STZ esasen nitrozüre analogu *Streptomyces achromogenes*' den türemiş bir antibiyotiktir(52). STZ' nin nitrozüre kısmı β hücre hasarına neden olurken(57), deoksiglukoz kısmı doğal moleküllerin hücre membranından geçerek transportunu sağlamaktadır(52). STZ' nin pankreas beta hücre içine taşınması glukoz transporter-2 (GLUT-2) ile gerçekleştirilmektedir. Bu transporteri kullanan karaciğer, böbrek ve bağırsaklar gibi diğer organlar da STZ' den etkilenmektedirler(52). STZ alkolasyon, DNA zincirinin kırılması ve sonuç olarak poli ADP-riboz sentetaz etkinliğinin artması ile hücrelere zarar vermektedir(58). Yüksek tek doz streptozotosin, hızlı ve yoğun β hücre nekrozuna neden olarak tip-1 diyabete yol açmaktadır(59). Diğer taraftan çok kez düşük doz STZ uygulaması kısmi β hücre hasarına yol açar, tip 1 diyabet patojenezi ile yakından ilgili olan inflamatuvar süreci uyararak daha fazla β hücre hasarına neden olur(60). STZ uygulaması ile ilişkili metabolik değişiklikler genellikle maruziyetten 2-8 hafta sonra ortaya çıkmaktadır. Meydana gelen metabolik değişiklikler 3 fazlı yanıt olarak nitelendirilmektedir: a) 2-4 saat sonra serum insülin düzeyinde eş zamanlı yükselme olmaksızın karaciğer glikojeninde hareketlilikten

kaynaklı erken hiperglisemi. b) 6-10 saat sonra serum insülin düzeyindeki artıştan dolayı hipoglisemi. c) enjeksiyondan 24 saat sonra görülen pankreatik insülin içeriğinde azalma, poliüri, glikozüri ve hiperglisemi ile karakterize kalıcı hiperglisemi(52)

3.4.2.Streptozotosin duyarlılığını etkileyen faktörler

Birçok hayvan türünün pankreatik β hücresi STZ sitotoksitesine duyarlıdır(61). Yapılan çalışmalar STZ uygulamasının günün hangi saatinde yapıldığının diyabet insidansını etkilediğini göstermektedir. Diyabet insidansını sirkadiyen ritmin nasıl ve ne şekilde etkilediği henüz tam olarak bilinmese de diyabetin STZ uygulamasının 16:00'da yapıldığında en çok, 08:00'de yapıldığında en az olduğu görülmüştür(62). Ayrıca insülin duyarlılığının hayvanın yaşı ve kilosu ile de ilişkili olduğu belirtilmiş, genç hayvanların streptozotosine daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir(63). STZ' nin duyarlılığının uygulama yolu ile de değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir. STZ intrakardiyak, subkutanöz, intramusküler uygulanabilmektedir ancak en çok intraperitoneal (i.p.) veya intravenöz uygulama tercih edilmektedir(51). İ.p. uygulama kolay ve hızlıdır fakat i.v. uygulama ile stabil ve tekrarlanabilir diyabet modeli oluşturulmaktadır(64). İ.p. uygulamanın yanlılıkla subdermal veya bağırsaklara yapılması da mortaliteyi arttırıp diyabetojenik etkiyi azaltabilmektedir(61). Uygulanan STZ dozu deneklerin cinsiyetine ve türüne göre değişmekle birlikte genel olarak >65mg/kg dozu yüksek doz, 40-55mg/kg orta doz, <35mg/kg düşük doz şeklinde nitelendirilmektedir(52).

3.4.3.Tip 2 diyabet oluşturmak için kullanılan yüksek kalorili diyet

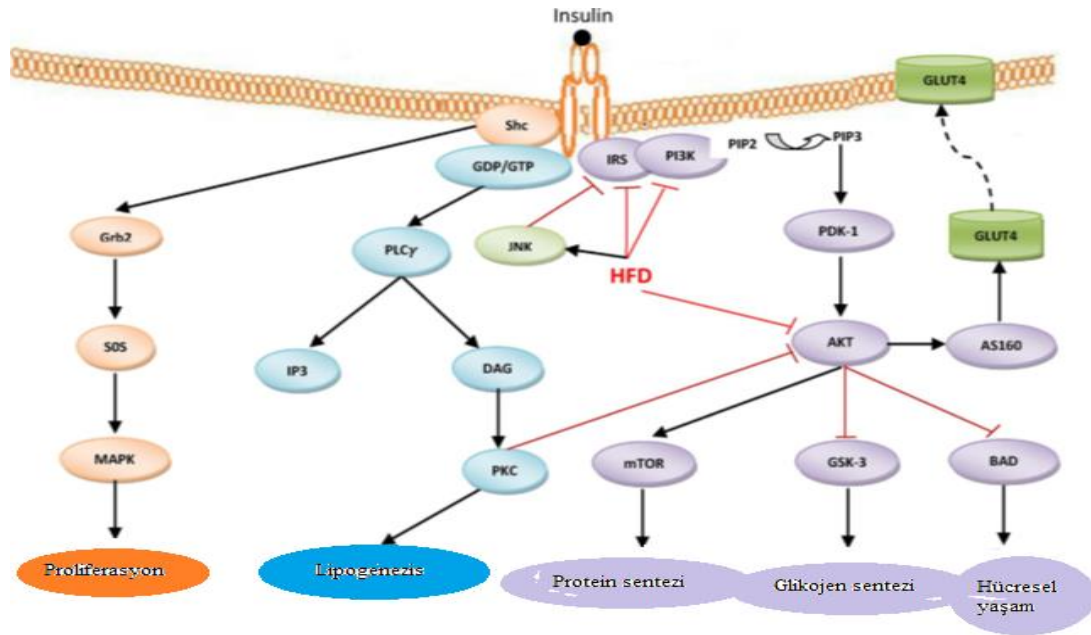
Deney hayvanı beslenmesinde diyet en önemli faktörlerden biridir. Özel beslenme ile elde edilen deney hayvanı modellerinde normal pellet diyetler genellikle %26 protein, %63 karbonhidrat, %11 yağ içermektedir(65). Deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan saflaştırılmış diyet rafine edilmiş izole protein, rafine şeker ve yağ, saf vitamin ve mineral kaynaklı maddelerden oluşmaktadır. Oldukça fazla sayıda yüksek yağlı diyet formülasyonu bulunmakla birlikte, her birinin yağ seviyesi ve kaynağı birbirinden farklılık göstermektedir. Genellikle %40-60 kalorisi yağdan kaynaklanan diyetler metabolik bozukluklara, hipertansiyona, obezite ve pro-inflamatuar sitokin üretimine neden olmaktadır(66). Diyetlerin yağ düzeyi göz önüne

alındığında kalorinin %10'unun yağdan alındığı diyetler 'düşük yağ içerikli diyet (LFD)', %30-50'sinin yağdan alındığı diyetler 'yüksek yağ içerikli diyet (HFD)', %50 'den fazlasının yağdan alındığı diyetler 'çok yüksek yağ içerikli diyet (VHFD)' olarak tanımlanmaktadır. Diyabet ve obezite oluşturmak için HFD veya VHFD kullanılabilir.

Diyetlerde kullanılan yağ çeşidinin glukoz homeostazisi ve insülin duyarlılığına etki gösterdiği bilinmektedir(67).

Diyabet/obezite üzerine yapılan araştırmalarda genellikle içeriği saflaştırılmış diyet uygulanırken, bazı çalışmalarda bileşenler normal yemlere emdirilmektedir(68). Bu durum dengesiz diyet içeriğine; protein, vitamin ve mineral miktarını seyrelterek beslenme düzensizliklerine ve yetersizliklerine yol açmaktadır(69).

3.4.4.Yüksek kalorili diyetin insülin aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 2. İnsülin sinyal yolağı ve yüksek kalorili diyet(43)

İnsülin kendi reseptörüne bağlanarak insülin reseptör substratını (IRS) fosforilleyen insülin reseptör tirozin kinaz kısmını aktive eder(70). Fosforillenen IRS proteini daha sonra adaptör proteini gibi davranır ve fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K) gibi çok sayıda sinyal merkezine bağlanma noktası sağlar(71). Fosfotidilinositol-3 kinaz fosfotidilinositol (4,5)-bifosfatı fosforilleyerek Akt olarak bilinen protein kinaz B (PKB)'yi aktive eden fosfotidilinositol (3,4,5)-trifosfatı oluşturur(71). Aktive

olan Akt/ PKB; glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)' ü inhibe etmek yoluyla glikojen sentezini(72), mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivasyonu yoluyla protein sentezini(73), çok sayıda pro-apoptotik ajanın inhibisyonu yoluyla hücre yaşamını uyarır(74).

Yüksek kalorili diyet insülin reseptör afinitesini değiştirmeksizin toplam insülin reseptör sayısında bir azalmaya neden olur(75). Bunun yanı sıra yağ oranı yüksek diyet insülin reseptör otofosforilasyonunu IRS-1 fosforilasyonu(76) birlikte PI3K aktivasyonunu(77), Akt fosforilasyonunu ve aktivitesini azaltmaktadır(78). Bu durumu mitokondriyal oksidatif kapasitesinin azalmasından dolayı intramiyoselüler lipidlerin birikiminin artması takip etmektedir(79). Yüksek kalorili diyet inflamatuvar genlerin up-regülasyonuna, proteinlerin ayrışmasına, liposentetik gen ekspresyonunda azalmaya neden olmaktadır(80). İnflamatuvar sitokinlerin stimülasyonu mitokondriyal fonksiyonun bozulmasıyla ilişkilidir(81). Yüksek kalorili diyet kas hücre membranında GLUT-4' ün fonksiyonunu veya insülin bağlanmasını etkileyen fosfolipit bileşimini de değiştirmektedir(82). Yüksek kalorili diyet karaciğerde hepatik insülin direnci ile ilgili bir durum olan hepatik steatozise neden olmaktadır(83). Yüksek kalorili diyetin karaciğer üzerindeki etkisi, kas ve yağ dokuda gözlenen klasik bozukluklarla tam olarak benzerlik göstermemektedir(69). Hepatotoksisitenin olası işareti olarak nükleer faktör-κB aktivitesinin ve yüksek kalorili diyetin neden olduğu inflamasyonun artışı gösterilmiştir(84). Tüm bunlar göz önüne alındığında yüksek kalorili diyetin bozduğu Akt/ PKB yolağı ve hedef dokularda insülin aktivitesinin değişikliği, insülin direnci ve tip 2 diyabet oluşumuna neden olmaktadır(76-78). Bununla birlikte yüksek kalorili diyet ile beslenen deneklerde insülin reseptör ve IRS' de insülinin uyardığı tirozin fosforilasyonu azalmıştır(85). Yüksek kalorili diyet yoluyla insülin sinyal yolağında c-Jun-N-terminal kinaz (JNK)'nin aktivasyonu IRS' yi inhibe ederken, bu yolağın daha fazla bozulmasına neden olan inflamatuvar cevabı aktive etmektedir(86). Yüksek kalorili diyet ile beslenen deneklerde insülin direncinde majör rol oynayan GLUT-4 düzeyinin hücre yüzeyinde düştüğü gösterilmiştir(85).

3.4.5.Yüksek kalorili diyet ve streptozotosinin tip 2 diyabette kullanımının tarihçesi

Deney hayvanlarında tip 2 diyabet oluşturmak için en uygun yöntem, yüksek kalorili diyet ile insülin direnci oluşturup STZ ile de pankreatik beta hücre disfonksiyonu oluşturmak şeklinde ortaya konmuştur(87). Yüksek kalorili diyet ile beslenme hiperinsülinemi, insülin direnci ve obezite oluşturmuş ancak tam olarak hiperglisemi veya diyabete neden olmamıştır(66). Bu nedenle tip 2 diyabet oluşturulması için düşük doz STZ uygulaması bir gereklilik olmuştur. İlk kez Reed ve ark. tarafından rapor edilen bu metoda göre; tip 2 diyabetli hastaların karakteristik özelliği olan insülin direnci gösterilmiştir. Buna göre yüksek kalorili diyet ile beslenen deney hayvanlarında yüksek insülin düzeyi gözlenmiş, ancak glukoz konsantrasyonu normal düzeyde bulunmuştur. Araştırmacılar yüksek kalorili diyetin ardından STZ uygulamasının pankreas beta hücrelerinin fonksiyonel kapasitelerinin insülin sekresyonunu tamamen sona erdirmeden yavaşça azaltacağını rapor etmiştir(88).

3.4.6.Yüksek kalorili diyet ve streptozotosin ile diyabet oluşturma avantajları

Rodentlerin tutulmasının kolay oluşu, üreme sürecinin kısıllığı, kolay elde edilebilmesi, küçük boyutta oluşları, sakin davranışları, ucuz maliyetli oluşu gibi nedenlerle yüksek kalorili diyet ve STZ ile tip 2 diyabet oluşturmak için kullanımı ilk tercih sebebi olmaktadır. Her ne kadar diyabetin genetik modeli (zucker diyabetik rat ve db/db fare) diyabet patojenezi ile daha fazla benzerlik gösterse de bu yöntemin pahalı, ulaşılması güç, düzenli tarama verileri elde edilebilmesinin zor oluşu gibi nedenler ile kullanımı pek yaygın değildir(89). Yüksek kalorili diyet ve STZ ile oluşturulan tip 2 diyabet modeli metabolik karakter ve doğal gelişim seyri olarak insandaki tip 2 diyabet ile benzerlik göstermektedir. Bu model ile stabil ve uzun süreli hiperglisemi oluşturulabilmektedir. Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada ratlara 4 hafta yüksek kalorili diyetin ardından iki kez 30mg/kg STZ uygulandıktan sonra 4-8 hafta stabil hiperglisemi elde edilmiştir(90). Başka bir çalışmada da STZ uygulamasından 9 hafta sonra da kan glukoz düzeyinin sabit kaldığı gösterilmiştir(91). Bunun yanı sıra bu metod tip 2 diyabetin polidipsi, polifaji, poliüri, insülin duyarlılığı ve insülinotropik ajan cevabı gibi belirtilerini de göstermektedir(92).

3.4.7.Yüksek kalorili diyet ve streptozotosin ile diyabet oluşturma nın dezavantajları

Deneysel protokolün maliyetini yükselten uzun deneysel süreç, STZ ve yüksek kalorili diyet ile tip 2 diyabet oluşturulmasının en önemli dezavantajıdır(93). Bunun yanı sıra yüksek kalorili diyetdeki yağ bileşimi farklılıklarının elde edilen sonuçlarda değişkenliğe neden olabileceği belirtilmektedir(69). Ayrıca diyet içeriğinin çok düşük oranda yağ içermesi gerekli olan obezitedeki gen mutasyonu, nutrasötik ve antidiyabetik ilaçların etkisinin araştırıldığı çalışmalarda çok yüksek kalorili diyet etkisinin korunması ve geri döndürülmesinin oldukça zor olduğu bildirilmiştir(43).

3.4.8.Yüksek kalorili diyet ve streptozotosin ile oluşturulan diyabetin vücut ağırlığı ve besin alımına etkisi

Rodentlerin çoğu yüksek kalorili beslenme sonucunda obez olma eğiliminde olmasına rağmen vücut ağırlığı ve besin alımı konusunda birbiriyle çelişen oldukça fazla literatür bulunmaktadır. Ancak literatürde yüksek kalorili beslenmeyi takiben vücut ağırlığının anlamlı biçimde arttığı, STZ uygulamasından sonra ise bu artışın azaldığı konusunda görüş birliğine varılmıştır(93, 94). Bazı denekler insülinin anoreksijenik etkisine merkezi direnç gösterdiği için ve anoreksijenik peptitlerin hipotalamik ekspresyonları azaldığı için daha oburdurlar ve yüksek kalorili diyet ile beslendiklerinde obez olmaya daha duyarlı bulunmuşlardır(95). Yüksek kalorili diyetin aynı türden deneklere uygulanmasında bile fenotipik yanıtta farklılıklar görülmektedir(96). Yüksek kalorili diyet genç deney hayvanlarına ve birkaç takip eden hafta uygulandığında deneklerde daha fazla ağırlık artışı gözlenmiştir(97). Ağırlık artışındaki farklılıklar yalnızca kullanılan deney hayvanının türüne değil aynı zamanda uygulanan diyet kompozisyonuna da bağlı bulunmuştur(69). Vücut ağırlığı artışı yüksek kalorili diyet ile beslenildiği sürece kademeli olarak artış göstermekte, bu artış diyet başlangıcından 2 hafta sonra gözlenmeye başlamaktadır. Srinivasan ve ark. yüksek kalorili diyetin deneklerde ağırlık artışına neden olduğunu STZ enjeksiyonunun ağırlık artışında geçici bir düşüşe sebep olduğunu, en sonunda diyabetik deneklerin ağırlığının kontrol grubuna göre dramatik bir biçimde arttığını göstermiştir(93). Wang ve ark. yaptıkları çalışmada ise yüksek kalorili diyet uygulamasından sonra ağırlık artışında bir değişiklik gözlenmezken, STZ uygulamasını takiben ağırlık artışında anlamlı bir düşüş görülmüştür. Bu çalışmada

diyabetik ratlarda leptin ve adiponektinin mRNA ekspresyon düzeyi artmıştır. Bu durum adipojenezis ve lipolizisin eş zamanlı gerçekleştiğini belirterek ve vücut ağırlığında gözlenen azalmayı açıklamaktadır(98). Tüm bu bilgiler ışığında deneklerin diyetlerinin %60'ını yağ oluştuyorsa hızlıca kilo almakta, daha fazla yağ oranına sahip diyetlerle çok daha fazla kilo almaktadırlar. Yüksek kalorili diyet ile uzun süre beslenen deneklerde vücut ağırlığı %10-20 artış göstermektedir(69).

3.5. Diyabet- Depresyon İlişkisi

Depresyon psikolojik bir bozukluk olmasının yanı sıra, yemek ve uyku bozuklukları ve fiziksel ağrı ile karakterize fizyolojik bir bozukluktur(99). Depresyon global bir hastalık olarak nitelendirilmiş ve Amerika Birleşik Devletlerindeki popülasyonun yaklaşık %17'sini etkilediği ortaya konmuştur(100). Günümüzde mevcut farmakolojik tedaviler; yüksek nüks oranları, hastalığın rekürrensi ve tedaviye direnç ile ilişkilendirilmiştir(101). Ne yazık ki ampirik olarak başlanan tedaviler ile hastaların depresif semptomları, fonksiyonel bozukluk ve eksiklikleri devam etmektedir. Sonuç olarak depresyon tedavisi için mümkün oldukça hızlı biçimde yeni ilaçlar geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Diyabet ile birlikte seyreden depresyon hastalarında; diyabet tedavisine uyuncun, diyet tavsiyelerine uyuncun, glisemik kontrolün azaldığı, diyabete sekonder gelişen komplikasyonların ve mortalite riskinin depresyonu olmayan diyabetlilere göre büyük oranda arttığı gösterilmiştir(102).

Diyabet ve depresyon arasında çift yönlü bir ilişki olduğu savunulmaktadır(103). Diyabetli hastalarda depresyon gelişme olasılığına paralel olarak depresyonlu hastalarda da diyabet görülme riski artış göstermektedir(104). Yapılan prelinik çalışmalarda diyabetik deney hayvanlarında da diyabet olmayanlara göre depresyon benzeri davranış artmıştır(105).

Diyabet ve depresyonun patofizyolojisinde rolü olduğu düşünülen mekanizmalar; serotonin düzeyinin azalması(106), inflamasyon ve stres ile ilişkili diyabet(107), mitokondriyal kayıp(108), hipokampal sitokrom c oksidaz inhibisyonu(109), heksokinaz 1'in mitokondrial ayrılması(110), beyinde insülin direnci(111), beyinde

insülin duyarlılığı azalması ve glukoz metabolizması değişiklikleri(112) şeklinde belirtilmiştir.

İnflamasyonun depresyonun patofizyolojisinde(113) ve diyabet gelişiminde(114) önemli bir rolü olduğu belirtilmiştir. Depresyon ve diyabet durumunda immun sistem aracılığıyla proinflamatuvar sitokin salınımının stimüle olduğu gösterilmiştir(115). Proinflamatuvar sitokinlerin beyinden aşırı salımı, depresyona neden olan nörotoksik madde artışı ve depresyon patolojisiyle oldukça ilişkili bir monoamin olan serotonin düzeyinin azalması gibi mekanizmalarla ilişkilidir.

Deneklerde depresyon düzeyi ölçümü için klasik olarak porsolt zorunlu yüzme testi kullanılmakta ve yalnızca deneklerin deney süresince geçirdikleri toplam immobil zaman ölçülmektedir(116). Detke modifiye zorunlu yüzme testinde ise deneklerin deney süresince yüzme, tırmanma gibi aktif davranışlarının süresi ile hareketsiz geçirdiği pasif davranışın süresi ayrı ayrı ölçülmektedir(117). Aktif geçen sürenin noradrenalin ve serotonin gibi nörotransmitter sistem mediyatörleri ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür. Buna göre yüzme davranışı artışının serotonerjik nörotransmisyonun, tırmanma davranışı artışının ise noradrenerjik nörotransmisyonun artışının göstergesi olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarda da diyabet oluşturulan deneklere uygulanan modifiye zorunlu yüzme testinde yüzme ve tırmanma davranışının azaldığı, hipokampuslarından alınan dokularda noradrenalin ve serotonin düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir(118, 119).

Depresyon ve diyabet durumunda serotonin ve noradrenalin nörotransmitter sisteminde belirgin düzensizlikler saptanmaktadır. Daha da özele indirgenecek olursa, diyabetik deneklerde serotonin düzeyi beyin çeşitli bölgelerinde değişiklik göstermiştir(120). Örneğin diyabetli deneklerde serotonin düzeyinin talamus, hipotalamus, serebellum ve beyin sapında azalırken, kortex ve orta beyinde arttığı gösterilmiştir. Diyabetli deneklerin noradrenalin düzeylerine bakıldığında ise; kortex, serebellum ve beyin sapında anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür(121). Bu durumun reseptör yoğunluğu ve cevabındaki değişikliklerle ilgili olabileceği öne sürülmüştür. Örneğin serotonerjik reseptörler göz önüne alındığında, yapılan çalışmalar bu değişikliğin özellikle 5-HT_{1A} ve 5-HT_{2A} reseptör alt tipinde olduğunu göstermiştir(122, 123). 5-HT düzeyindeki düzensizliklerden dolayı serotonerjik

sistemde adaptif değişiklikler gözlenmiş ve depresyon nörobiyolojisindeki önemli rolün belirleyicisi olmuştur(124). Diyabet ile birlikte görülen depresyonun patofizyolojisinde serotonerjik sistemin multifaktöryel bir hedef olduğu vurgulanmıştır(125).

Beyinde hipokampal bölge hacmi azalması ile depresyon arasında bir ilişki olduğu bildirilmektedir(126). Nörodejeneratif hastalarda görülen depresyon davranışının hipokampal lezyonlar ile ilişkili olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir(127, 128). Hipokampustaki inflamatuvar durum da depresyonun sebeplerinden biri olarak düşünülmektedir(129).

3.5.1. Tip 2 diyabet ve depresyon

Tip 2 diyabet ile depresyon ilişkisinin gösterildiği birçok klinik çalışma bulunmaktadır. Ancak aralarındaki ilişki henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Knol ve ark. göre depresyon diyabetin bir sonucu olabileceği gibi diyabet için bir risk faktörü de olabilir(130). Diyabeti olmayan depresyonlu bireylerde diyabet görülme riski artış göstermektedir. Mezuk ve ark. depresyonun tip 2 diyabet gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğunu, depresyonlu bireylerde tip 2 diyabet görülme riskinin %60 arttığını bildirmektedir(131). Bunun sebebi olarak fazla depresif semptom gösteren bireylerde sağlıklı yaşama yönelik eğilimin azalması ve bu nedenle diyabet riskinin artışı gösterilmiştir. Ancak diyabet tedavisi gören depresyonu olmayan kişilerde de depresyon gelişme riski yüksek bulunmuştur(132). Bu bulgular depresyon ve diyabet arasındaki çift yönlü ilişkiyi ortaya koyan güçlü kanıtlar olarak kabul edilmiştir(133).

Literatüre göre diyabetli hastaların depresyona yakalanma olasılığı normal popülasyonun iki katıdır(134). Kadınlarda bu risk %28,2 iken erkeklerde %18’ dir(135). Diğer çalışmalara göre tip 2 diyabetlilerde depresyon görülme oranı %24-30 aralığındadır(136). Depresyonlu hastaların yaklaşık % 30’ u depresyon semptomları gösterir ancak bunların yalnızca %10’ u majör depresyon olarak nitelendirilebilir(137).

Depresyon ve diyabet arasındaki yakın ilişki bazı yaygın nöroendokrin ve nörotransmitter değişiklikler ile açıklanabilmektedir. Buna örnek olarak, hipotalamo-pitüiter-adrenal aksın kronik disregülasyonu, immün sistem aktivasyonu veya kronik inflamatuvar sürecin yol açtığı azalmış insülin duyarlılığı verilebilir(138).

Tip 2 diyabetli hastalarda depresyon gelişiminin risk faktörleri diyabete eşlik eden, diyabetle ilişkili özellikle vasküler komplikasyonları içermektedir(139). Diyabetli olmak(104), zorlu diyetler ve günlük aktivitelerin azlığı(140), obezite(141) ve sigara içmek(142) risk faktörleri arasında sayılabilir.

Yapılan bazı çalışmalarda ise tip 2 diyabet hastalarında depresyon gelişimi düşük eğitim düzeyi, bekar olmak(143) ve kadın olmak(144) gibi demografik nedenlere bağlanmıştır.

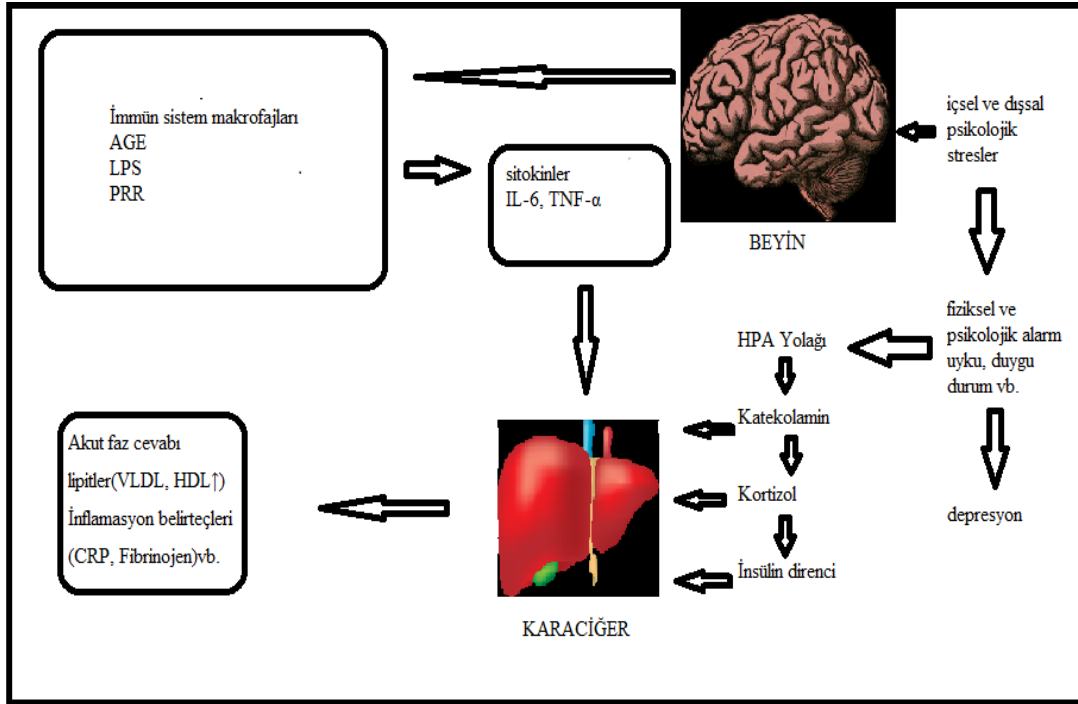
Depresyon gelişiminin diyabetli sürenin uzunluğu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Diyabetli geçen süre uzadıkça diyabetik komplikasyonların görülme olasılığı ve sağlık harcamaları artarak bireylerde psikolojik bozukluğa eğilimi arttırmaktadır(145).

Tip 2 diyabetlilerde depresyon görülmesi diyabetik öz bakımın azalması(146) ve yaşam kalitesinin düşmesi(147) ile de ilişkilendirilmiştir.

Dünya sağlık örgütüncce astım, artrit, anjina, diyabet gibi bazı kronik hastalıklarla birlikte seyreden depresyonun yaşam kalitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, diyabeti ve depresyonu olan hastaların yaşam kalitesinin en fazla düştüğü bildirilmiştir(148).

3.5.2. Depresyon patofizyolojisi ve tip 2 diyabet ilişkisi

Depresyon ve diyabet arasındaki yakın ilişkinin nedeni henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yaygın görüş, depresif semptomların artışı ile sağlıklı yaşama gösterilen özen ve dikkat azalarak tip 2 diyabete yatkın hale gelinmesi şeklindedir. Bir diğer yaklaşıma göre ise; diyabet durumunda görülen yüksek kortizol düzeyi, azalmış insülin duyarlılığı, immün sistemin aktive olarak kronik inflamatuvar prosesi uyarması ile hipotalamo-pitüiter-adrenal (HPA) aksın kronik disregülasyonu sonucu depresyon geliştiği savunulmaktadır(138). Başka bir yaklaşıma göre de, diyabetli hastalardaki depresyonun, diyabet ile ilişkili yüksek stres bozukluğundan kaynaklandığı yönündedir(149). Duyarlı hastalarda diyabet ile ilişkili yüksek düzeyde stres bozukluğu veya diyabete ikincil gelişen hastalıklar ile baş etme sorunu artmış depresif semptomlar ile kendini gösterir. Diğer bir yaklaşıma göre, kan glukoz düzeyi güçlü bir duygu durum belirtecidir. Hipoglisemi veya şiddetli hiperglisemi diyabetli hastalarda negatif duygu durumu oluşturur(150).



Şekil 3. Diyabet-depresyon ilişkisini açıklayan olası patofizyolojik mekanizmalar(2)

3.5.2.1. Doğal bağışıklık ve inflamasyonun tip 2 diyabet, depresyon ve kognitif bozukluklar ile ilişkisi

Tip 2 diyabet patojenezisinde aktif doğal bağışıklık ve inflamasyon önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle pro-inflamatuar sitokin konsantrasyonunun artışı diyabet olmayan hastalarda tip 2 diyabet zeminini hazırlayan pankreas β hücre apoptozisi ve insülin direncine neden olmaktadır(151). T2DM'lu hastalarda görülen inflamasyonda doğal bağışıklığın önemi yapılan prospektif çalışmalar ile doğrulanmıştır(152). Bunun yanı sıra yapılan plasebo kontrollü çalışmalarda interlekin-1 reseptör antagonisti ve non-steroidal antiinflamatuar ilaçlar gibi ajanlar, glisemik kontrolü arttırmıştır(153). Bununla birlikte artan sayıda çalışma göstermiştir ki, diyabeti olmayan kişilerde de sitokin aracılı inflamatuvar cevap ile depresyon arasında bir ilişki bulunmaktadır. Serum sitokin konsantrasyonunun artışı HPA yolağını uyarmakta, beyinde oksidatif stres artmakta, triptofan-kynürenin yolağı aktive olarak serotonin üretimini azaltmaktadır(154). İnterferon alfa sitokini ile tedavi edilen hastalarda depresif semptomlar ve kognitif bozukluklar rapor edilmiştir(154). Majör depresyon ile sitokin düzeyi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir meta analizde depresyonlu hastalarda TNF- α ve IL-6'nın sirküler konsantrasyonunun depresyonu olmayan kişilere göre anlamlı

olarak arttığı gösterilmiştir(155). Bunun yanı sıra yardımcı tedavi olarak PTGS2 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2) inhibitörü selekoksib uygulanmasının ise depresif semptomları azalttığı gösterilse de tip 2 diyabetlilerde trombozis olasılığını arttırdığından dolayı kullanımının uygun olmayacağı düşünülmüştür(156).

Doğal bağışıklık sisteminin genel popülasyonun depresyon patolojisinde önemli olduğu bildirilse de bu popülasyonun çok azı diyabet ile ilişkilendirilmiştir. Tip 2 diyabetli hastaların depresyonunda doğal bağışıklığın rolü henüz yeterince açıklanamamıştır. Yapılan bir çalışmada tip 2 diyabet tedavisine yeni başlamış 1790 kişiden depresyonu olanların olmayanlara göre aşırı kilolu, genç, c-reaktif proteini ve interlökin-1 reseptör antagonisti konsantrasyonu yüksek ve beyaz hücre miktarı oldukça artmıştır(157). Yapılan bir başka çalışmada, CRP ve IL-6 konsantrasyonunun yükselmesi tip 2 diyabet(158) ve depresyon riskinin(159) artışı için ortak değişkenler olarak kabul edilmektedir. Buna ek olarak depresyonun tip 2 diyabetli hastalarda demans riskini arttırdığı(160), IL-6 konsantrasyonunun artması ile tip 2 diyabetli hastalarda kognitif bozukluk oluşması arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir(161).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda doğal bağışıklık, yaşam boyu maruz kalınan stresörler sonucunda tip 2 diyabet ve depresyon gelişimini açıklayan bir mekanizma olarak düşünülmektedir(162).

İnflamasyonun tip 2 diyabetlilerde görülen depresyonun patojenezisinde önemli rolü olduğu göz önüne alındığında, tedavi protokolünde yeni bir hedef olarak inflamasyonun azaltılmasının amaçlanması düşünülmektedir. Ancak tip 2 diyabetli hastaların depresyonu için bu şekilde bir planlama henüz yapılmamıştır. Tip 2 diyabeti olan depresyonlu hastaların tedavisinde yaklaşım glisemik kontrolün sağlanması, depresif semptomlara yönelik ve anti-inflamatuvar tedavi şeklindedir(45).

3.5.2.1.1.Mikroglial aktivasyon

Son çalışmalar diyabetin yanı sıra gelişen nöron hasarı ile spinal glial hücrelerin özellikle mikroglialının güçlü bir şekilde aktive olup çoğaldığını göstermektedir(163). Mikroglia santral sinir sisteminin düzenlenmesi, korunması ve onarımı için oldukça önemli rol oynamaktadır(164). Yapılan çalışmalarda, diyabet oluşumundan sonra spinal kordda mikroglial aktivasyon tespit edilmiştir. Diyabetin ilerlemesi ile birlikte mikroglial aktivasyonun belirgin işaretleri supraspinal düzeyde yani önemli bir

supraspinal düzenleme merkezi olan rostroventromedial medullada (RVM) izlenmektedir(165). Bu bölgede glial dalların geri çekilmesi gibi mikrogial aktivasyonun tipik morfolojik değişikliklerinin yanı sıra mikrogial hücrelerin belirtecinden biri olan iba-1 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir(166). Mikroglia aktivasyonu IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentezi ve lokal olarak salımı ile sonuçlanmaktadır(167). Son yıllarda yapılan çalışmalar, mikrogial aktivasyon sonrası artan proinflamatuvar salınımının depresif durumun gelişiminde önemli bir rolü olduğunu kanıtlamaktadır(11, 168).

3.5.2.1.2.Proinflamatuvar sitokinler

Santral sinir sisteminde yükselmiş proinflamatuvar sitokin düzeyi nöro-inflamasyon ile ilişkilendirilmiştir(169). TNF α , IL-1 β , IL-6 gibi pro inflamatuvar mediyatörlerin gen ekspresyonu yüksek kalorili diyet ve STZ ile diyabet oluşturulan deneklerde artmıştır(43).

TNF- α , hücrelerin hayatta kalma, apoptozis gibi birçok aktivitesinden sorumlu olan pleiotropik sitokindir. Diyabet gibi bazı hastalık durumlarında TNF- α 'nın makrofajlardan ekstraselüler alana salımı artmaktadır. TNF- α obezitede insülin direnci gelişimine katkı sunan adipositler tarafından üretilmekte, glukoz metabolizmasındaki insülin aktivitesini bozup lipolizisi arttırmak suretiyle glukoz ve lipid metabolizmasında da etki göstermektedir. TNF- α , düşük konsantrasyonlarında immün inflamatuvar yanıtı regüle ederken (otokrin ve parakrin etki), yüksek konsantrasyonlarında insülin direnci ile ilgili sirkülasyona katılarak endokrin faktör gibi davranır. TNF- α 'nın adipositlerden yağ asidi salımını arttırması, serbest yağ asidi miktarının artışı ile sonuçlanarak insülin sinyalini bozabilir, insülin sinyal transdüksiyonunu ve insülin salımını azaltabilir(170). Moleküler düzeyde ise, TNF- α insülin reseptör substrat-1 (IRS)'in fosforilasyonunu arttırır ve GLUT-4 ekspresyonunu down-regüle ederek insülin direncine zemin hazırlar(171).

İnterlökinler birçok hastalığın patojenezisini ve immün cevabını regüle eden küçük protein sitokinleridir. IL-1 β ve IL-6, çok sayıda hedef hücrenin metabolizmasını ve gelişimini etkileyerek yaygın inflamatuvar yanıt oluştururlar. IL-6, yaklaşık olarak %30'luk kısmı adipoz dokudan salınan bir sitokindir. Obez ve insülin direnci olan kişilerde IL-6 düzeyi belirgin biçimde yüksek bulunmuştur. Plazmada yüksek IL-6

düzeyi, hastanın tip 2 diyabet olma olasılığını düşündürmektedir. IL- 6' nın glukoz metabolizması üzerine etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır. TNF- α 'nın IL-6' nın transkripsiyon genini stimüle ettiği ve reseptörlerini ürettiği ileri sürülerek aralarındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır(170).

Yang ve ark. hipokampal nöronlardaki apoptozisin hiperglisemiyle artan TNF- α ve IL-6 düzeyi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir(172). Hwang ve ark. hipokampusta artan pro-inflamatuar sitokin düzeyinin mikrogial aktivasyonun artışından kaynaklandığını ileri sürmüştür(173). Önceki çalışmalar yüksek glukoz konsantrasyonunun IL-1 β üretimini arttırarak pankreatik β hücrelerinin apoptozisine yol açabileceğini göstermiştir(174). TNF- α , IL-1 β gibi proinflamatuar sitokinlerin aşağıda belirtilen mekanizmalar yoluyla insülin desensitizasyonuna neden olduğu bilinmektedir(175-177).

1.insülin üretiminin inhibisyonu

2. 3-kinaz fosfatidilinositol aktivasyonunun azalması

3.insülin iletiminin majör mediyatörü olan tirozin ve insülin reseptör substrat protein fosforilasyonunun azalması.

3.5.2.2.Hipotalamo-pitüiter-adrenal (HPA) yolak

Stres, adrenal bezdeki glukokortikoid üretimini etkileyen HPA yolağının aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Kronik stres portal ve periferel serbest yağ asitlerinin yükselmesine yol açan hiperkortizolemi ile ilişkilidir(178). Bununla birlikte hiperkortizolemi, insülinin SLC2A4 glukoz transporterinden hücre yüzeyine geçişini bozar(179). Kronik hiperkortizolemi bu nedenle metabolik sendrom, tip 2 diyabet ve insülin direncine yol açabilmektedir(180).

Birçok çalışma depresyonun, HPA yolağının kronik disregülasyonu ile ilgili olduğunu göstermiştir. Aşırı kortizol salımı(181), tip 2 diyabet ve depresyon ile ilişkisi bilinen hipokampal bölgenin nörojenezisini bozmaktadır(182). Yapılan çalışmalar depresyonlu hastalarda HPA yolağının aşırı aktivasyonu yatan hastalarda, şiddetli ve melankolik olgularda görülürken(183), tip2 diyabet ve ayakta tedavi gören olguların depresyonunda HPA aktivasyonu daha azdır(184).

HPA yolağının depresyon ile ilişkisi ortaya konulursa bu yolak üzerinden yeni farmakolojik manipülasyonlar denenebilecektir. Deney hayvanlarında

mineralokortikoid antagonistleri glukokortikoidlerin indüklediği depresif davranış gelişimini önlemesine karşın(185) klinik çalışmalarda mineralokortikoidlerin antagonist veya agonistleri ile depresyon davranışı arasında ilişki bulunmamıştır(186).

3.5.2.3.İnsülin direnci ve sekresyonu

Depresyon ve insülin direnci arasındaki ilişki, tip 2 diyabet ile depresyon arasındaki biyolojik bağlantı olasılığını arttırmaktadır. 50-70 yaşları arasındaki hastalarda 6 yıl yürütülen prospektif çalışmada insülin direncinin zaman içinde kötüleşmesi ve vücut kitle indeksinin artışı ile de paralel olarak depresyonun somatik- vejetatif semptomlarında (uykusuzluk, yeme bozuklukları, yorgunluk) artış gözlenmiştir(187).

3.5.2.4.Sirkadiyen ritm

Sirkadiyen bozukluk hem tip 2 diyabet(188) hem de depresyon(189) ile ilişkilendirilmiştir. Depresyonlu ve metabolik sendromlu(190) hastalarda uyku süresinin çok arttığı, uyku yapısında varyasyonlar görüldüğü, uzun süre uyuyan depresyonlu hastalarda CRP ve IL-6 konsantrasyonunun yüksek olduğu rapor edilmiştir(190).

Hücrese düzeyde ele alındığında zamanlama genleri, sirkadiyen ritmi aydınlık-karanlık siklusu, yemek ve sosyal etkileşimler gibi çevresel ipuçları doğrultusunda ayarlamaktadır(191). Tip 2 diyabet hastalarında zamanlama geni ekspresyonu yüksek glikoz konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir(192). Depresyon hastalarında hızlı antidepresan etkili düşük doz ketamin ve uykusuzluk terapisinin, anormal zaman genlerini düzenleyerek sirkadiyen ritmin ayarlanmasında etkili olabileceği ileri sürülmüştür(193).

3.5.3.Depresyon ve diyabetik komplikasyonlar

İyi kontrol edilmeyen diyabet retinopati, nöropati, nefropati, kalp hastalıkları, periferik-vasküler bozukluklar gibi birçok komplikasyona neden olabilmektedir. T2DM (Type-2 diabetes mellitus) hastalarında depresyon görülme sıklığı diyabetik komplikasyonların artışı ile paralellik göstermektedir(194). Yapılan çalışmalar depresif durumun diyabetik komplikasyonlar ile ilişkili olduğunu tip 2 diyabete eşlik eden retinopati, nefropati, nöropati gibi komplikasyonların depresyon görülme sıklığını arttırdığını göstermiştir(195, 196).

Yapılan bir çalışmada mikrovasküler komplikasyonların varlığının özellikle nöropatinin; cinsiyet, yaş, diyabet tipi, diyabet süresi, genel sağlık durumu, ağrı düzeyi, sosyal destek, hemogloblin ve insülin gerekliliğinden bağımsız olarak depresyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir(197). Bu ilişkiden dolayı da diyabetik komplikasyonların artışının depresif semptomların artışına neden olduğu ileri sürülmüştür.

3.5.4.Depresyon ve glisemik kontrol

HbA1c güncel glisemik kontrolün en iyi ölçümü olarak kabul edilmektedir. American Diabetes Association (ADA) rehberine göre HbA1c değeri klinik değerlendirme için kullanılmaktadır(198). Yapılan bir çalışma, tip 2 diyabet ile depresyon arasındaki ilişkinin, kan glukoz düzeyinin duygu durumunu regüle etme potansiyelinden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Özellikle hipoglisemi veya şiddetli hiperglisemi negatif duygu durumu uyarmaktadır(199).

Klinik çalışmalar depresyonun yüksek HbA1c değeri ve hiperglisemi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. T2DM yanı sıra depresyonu olan hastalarda herhangi bir duygu durum bozukluğu olmayanlara göre glisemik kontrol zayıflamaktadır. Diyabetli hastalarda depresyon görülmesinin en önemli nedenlerinden birisi uygun olmayan metabolik kontroldür. Özellikle bu hasta grubu yoğun medikal desteğe rağmen uygun glisemik kontrol noktasında başarılı olamamaktadır. Bunun yanı sıra diyabetli hastalarda HbA1c değeri depresyonu olanlarda olmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur(150).

3.5.5.Non-diyabetiklerde depresyon

Yaşam boyunca depresyon görülme sıklığı kadınlarda %10-25 aralığında iken, erkeklerde %5-12 aralığındadır. Her yıl kadınların %5-9'u erkeklerin ise %2-3'ü depresyona yakalanmaktadır(200). Depresyon, yaşam kalitesini düşürmesi(201) ve fonksiyonları azaltmasının yanı sıra sağlık bakım hizmetlerinden yararlanma ve harcamaların artışına sebep olur(202).

Depresyon kronik hastalığı olan kişilerde sıklıkla görülmektedir(203). Depresyon, diyabetlilerde alınması gereken medikal tedaviye uyuncun güçlüğü dolayısıyla daha sık görülmektedir(146). Toplumda T2DM'lu hasta oranı yaklaşık olarak %13 iken toplumun %30' u pre-diyabetlidir(204).

Yapılan birçok çalışmada, T2DM'lu erişkinlerde depresyon görülme sıklığı diyabetli olmayanlara göre 2 kat fazla bulunmuştur(136)

Depresyon tedavisi gören tip 2 diyabetli hastalar aynı yaş ve cinsiyetteki diyabet olmayan kontrol grubuna göre 1,5 kat daha fazladır. Ancak depresyonun tedavi edilmesi; yaş, cinsiyet, kardiyovasküler hastalıkların varlığı, vücut ağırlığı gibi faktörlere bağlı olmakla birlikte diyabetin görülme sıklığını % 15' e kadar düşürmüştür(205).

3.6.Diyabet- Anksiyete İlişkisi

Anksiyete; aşırı kaygı, sinirlilik, yorgunluk gibi sosyal fonksiyonlarda önemli derecede bozulmaya neden olan semptomlar ile kendini gösterir(144). Anksiyete semptomları diyabetli kişilerde diyabet olmayanlardan daha fazla görülür(206). Yüksek anksiyete düzeyi, diyabet hastalarında komplikasyonların artışı ve klinik tablonun kötüleşmesinin yanı sıra hastaların yaşam kalitesini de oldukça fazla etkilemekte(207), mortalite riskini arttırmaktadır(208). Bununla birlikte günümüzde diyabet hastalarında görülen anksiyete için özel bir tedavi rejimi bulunmamaktadır(206).

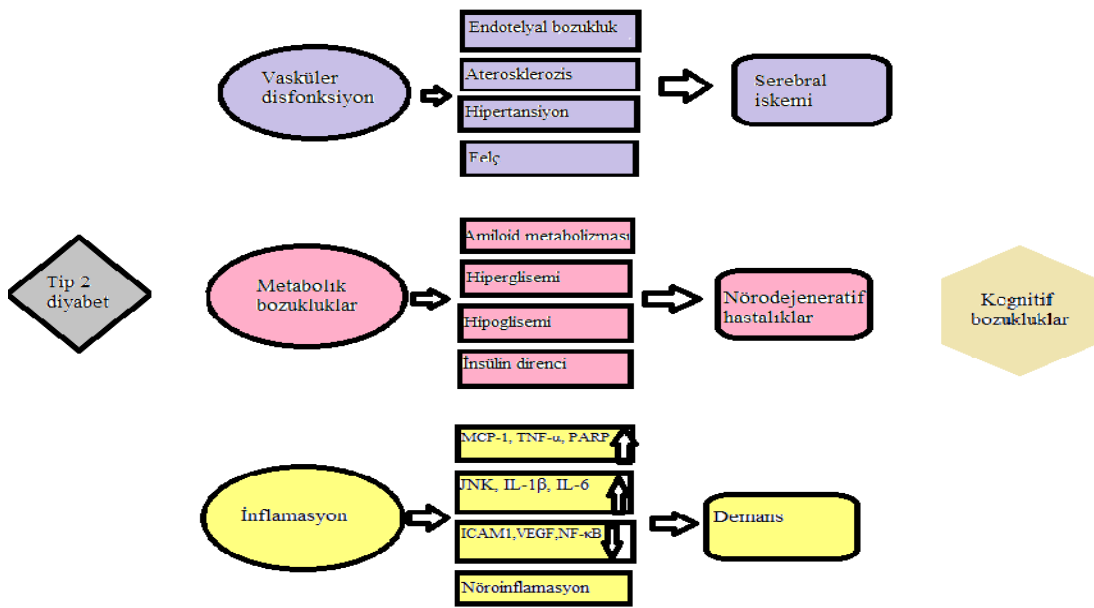
Anksiyete, insülin direncini tetikleyen hipotalamo-pitüiter-adrenal aksın disregülasyonu ile sıkı bir şekilde ilişkilidir(209). Bu nedenle anksiyete ve diğer duygu durum bozuklukları da biyolojik ve davranışsal tutum yoluyla diyabete zemin hazırlayabilmektedir.

Yapılan çalışmalar; miyelin ve oligodendrisit eksikliğinin, depresyon ve anksiyete oluşumunda önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Miyelin veya oligodendrisitleri hedefleyen bileşikler, depresyon ve anksiyete benzeri davranışı etkili biçimde hafifletmektedir. Duygu durum bozukluğu olan hastaların beyinde beyaz cevher tabakasının dejenere olduğu bulunmuştur(210). Multipl sklerosis gibi kronik demiyelinasyon hastalığı olan kişilerde duygu durum bozukluğu görülme riskinin arttığı gösterilmiştir(211). Bu bulgular miyelin bozukluğunun, anksiyete ve depresyon benzeri davranış gelişiminde önemli olduğunu işaret etmektedir. Diyabetin de periferik nöropati gibi miyelin anormallikleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(212). Diyabetik periferik nöropati, ileri aşamadaki diyabet hastalarında son derece yıkıcı bir

komplikeasyondur(213). Santral sinir sisteminde yapılan nöro-görüntüleme çalışmalarda diyabetli hastaların beyinlerindeki beyaz ve gri cevherin metabolitlerinde değışiklikler gösterilmiştir(214).

Daha önce yapılan bir çalışmada yüksek kalorili diyet ve STZ enjeksiyonu ile oluşturulan diyabete bağı gelişen depresyon ve anksiyete benzeri davranıştan hipokampusta artan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 proinflatuar sitokinlerinin ekspresyonu sorumlu tutulmuştur(215). Başka bir çalışmada ise, diyabete bağı depresyon ve anksiyetenin sebepleri arasında proinflatuar sitokinlerde görülen artışın yanı sıra BDNF düzeyindeki azalmaya bağı olarak hipokampal nöroplastikliğin azalması gösterilmiştir(216).

3.7.Diyabet- Kognitif Bozukluklar İlişkisi



Şekil 4. Tip 2 diyabetin kognitif bozukluklar ile ilişkisi(217)

Biliş; çevreden duyular vasıtasıyla edinilen bilgilerin anlanması ve bu bilgiler doğrultusunda bir yargıya varılmasını sağlayan fizyolojik bir süreçtir. Kognitif bozukluk, sosyal ve profesyonel aktiviteler de dahil yaşam kalitesini etkilemektedir(218). Diyabet ile ilişkili kognitif bozukluk dünya çapında klinisyenlerde ciddi kaygı uyandırmaktadır. Tedavi edilmeyen diabetes mellitus kognitif bozukluk ve demans riskini önemli oranda arttırmaktadır(219). Uzmanlar tip 2 diyabetin hafif kognitif bozuklukların progresyonunu arttırarak demans ve

Alzheimer hastalığına yol açabileceği konusunda görüş bildirmiştir(220). Hafif kognitif bozukluk hastaların günlük yaşamlarını sürdürmede soruna yol açmasa da, uzun süreli kognitif bozukluk ve bunun ilerleyerek Alzheimer hastalığına dönüşme riski önem arz etmektedir(221). Diyabet hastalarında kognitif bozukluk görülme sıklığı diyabet olmayan yaşlılardan çok daha fazladır(222). Kognitif bozukluk görülen diyabet hastalarının çok büyük bir kısmında insülin iletimi, nöroinflamatuvar süreç, depresyon ve mitokondriyal bozukluğu da içeren birbiriyle bağlantılı yollar uyarılmıştır(160). Kognitif bozukluklar aynı zamanda görme bozukluğu, duyma kaybı, fiziksel yetersizlikler, kronik ağrı ve öz bakım becerilerinin zayıflamasına yol açmaktadır(223). Diyabetik grup; bellek işlevleri, bilgi işleme hızı, dikkat, yürütücü işlevler ve dili anlama konusunda önemli ölçüde daha kötü performans göstermektedir(224).

Sağlıksız yaşam stilinin diyabet gelişiminin majör sebebi olduğu, yavaş fakat progresif akıl sağlığı bozukluklarına yol açabileceği düşünülmüştür(225). İnsanların ucuz, kalorili, işlenmiş gıdalara eğilimi ve hareketsiz yaşama adapte olmaları; aşırı kilo alımı, obezite, insülin direnci ve tip 2 diyabet gelişimine neden olmakta(226), bu yaşam stili kognitif bozukluk, demans ve Alzheimer hastalığına zemin hazırlamaktadır(225).

Diyabetin kognitif performansı farklı düzeylerde etkilediği bilinmektedir. Buna göre tip 1 diyabetlilerde zekâ, bilgi işleme hızı, psikomotor beceri, görsel ve sürdürülebilir dikkat, bilişsel esneklik ve görsel algı bozulurken; hafıza, seçici dikkat, motor fonksiyon ve dil becerisinde belirgin bir etki görülmemiştir. Diğer taraftan, tip 2 diyabetlilerde daha çok konuşma hafızası, çalışma hafızası, kelime akışkanlığı, dikkat, zihinsel planlama ve psikomotor hızı içeren kognitif fonksiyonlarda bozukluk görülmüştür(227).

Diyabet ile ilişkili kognitif bozukluğun olası mekanizmalarının aydınlatılması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunlardan biri, hipergliseminin reaktif oksijen türleri ve ileri glikasyon son ürünlerini arttırarak protein kinaz C ekspresyonu ile aşırı sitokin salınımını uyarıp inflamasyona yol açmasıdır. Bir diğeri, diyabet hastalarında sıkça rastlanan vasküler hasarın kognitif bozukluğa yol açacağını ileri sürmüştür. İnsülin direncinin de kognitif performansı olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, tekrarlayan hipoglisemi de kognitif bozukluğun olası sebepleri arasında sayılmaktadır.

Son olarak, nöron ve astrositler arasında metabolik koordinasyondaki dengesizliklerin de diyabet ile ilişkili kognitif bozukluğun gelişmesine neden olabileceği belirtilmiştir(227).

Diyabet hastalarında bazı patolojik durumlar beynin belirli bölgelerinde pro-inflamatuar sitokin düzeyinin artışına sebep olmakta, sinaptik plastisite ve uzun süreli belleği etkilemektedir(228). Yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı diyet ve fazla miktarda karbonhidrat tüketiminin beynin hipokampus bölgesinde nöroinflamatuvar belirteçlerin artışı ile birlikte kognitif bozukluğu uyardığı bildirilmiştir(229). Uzun süre yüksek yağ içerikli diyet ile beslenen farelerde kognitif bozukluk ve nöroinflamasyon gösterilmiştir(230).

Ratlarda yalnızca yüksek kalorili diyet uygulamasının öğrenme kabiliyetini bozduğu ortaya konmuştur(93). Diyabetin ratlarda asetilkolinesteraz düzeyini arttırdığı, glutasyon düzeyini düşürdüğü de bilinmektedir(231).

Önceki çalışmalar ratlardaki kognitif bozukluk için yüksek kalorili diyet, yüksek kan glukoz düzeyi ve insülin direncini suçlamaktadır(232). Yüksek kalorili diyet ve düşük doz streptozotosin uygulaması ile diyabet oluşturulan ratlarda, kognitif bozukluk ile birlikte mikrogliya ve astrosit aktivasyonu gösterilmiş, yapılan histopatolojik incelemelerde diyabetik hayvanların beyinde yüksek miktarda aktif mikrogliyal hücre tespit edilmiştir(233).

Diyabet oluşturulan deneklerin beyinde iskemiye takiben hipokampustaki kaspaz-3 hücrelerinde β -amiloid miktarı artışına bağlı kognitif fonksiyonlarda azalma gösterilmiştir(234).

3.8.Duygu Durum Bozuklukları

Affekt (duygulanım), içten hissedilen duygunun dışavurumu olarak ifade edilmektedir. Mani ile depresyon olarak belirtilen iki kutup, duygu durumun spektrumunu oluşturmaktadır. Bu spektrumdan hareketle hastalarda duygu durum bozukluğunu tarifleyen unipolar (depresyon) depresyon ve bipolar (manik-depresif) depresyon terimleri üretilmiştir. Depresyon ve maninin eş zamanlı görülmesi karma duygu durum, hastanın depresyon ve mani arasında hızlı geçiş yapması hızlı döngülü, maninin daha düşük şiddetli şekli hipomani olarak isimlendirilmiştir. Duygu durum spektrumu kısaca; mani, hipomani, ötimi (normal duygu durumu), distimi (depresyonun daha düşük şiddette olan ancak daha uzun süren biçimi) ve depresyon olarak ifade edilmektedir(235).

Majör depresif bozukluk tek veya tekrarlayıcı epizodlarla seyredebilmektedir. Hastanın majör depresyonun epizodları arası distimi düzeyine kadar yetersiz iyileşme gösterip bir başka majör depresyon epizodu geçirmesi; majör depresyonlu hastaların, majör depresyon ile distimi arasında salınım gösteren, iyileşmeyen çifte depresyonu olduğunu göstermektedir(235).

3.8.1.Depresyonda monoamin hipotezi

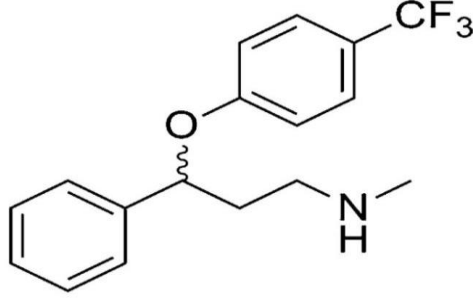
Klasik monoamin kuramına göre; monoamin nörotransmitterlerde yetersizlik depresyonu, aşırılık maniyi göstermektedir. Güncel monoamin kuramına göre ise; çeşitli beyin kısımlarında noradrenalin, serotonin ve dopamin monoaminlerinin oluşturduğu tüm monoaminerjik sistemin işlev bozukluğundan söz edilmektedir. Ancak duygu durum bozukluğu etiyolojisini açıklamak noktasında monoamin nörotransmitterlerin tek başına eksik kalması ile monoaminerjik reseptörlerin, bu reseptörlerin gen ekspresyonlarının ve büyüme faktörlerinin rolünün de incelenmesine ihtiyaç duyulmuştur(235).

3.8.2.Antidepresanların sınıflandırılması

1. Trisiklik antidepressanlar
2. Selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI)
3. Monoamin oksidaz inhibitörleri
4. Lityum ve diğer duygu durum düzenleyiciler
5. Antimanik ve / veya antidepressan etkili diğer ilaçlar

3.8.2.1. Selektif serotonin geri alım inhibitörleri

3.8.2.1.1. Fluoksetin



Şekil 5. Fluoksetin' in moleküler yapısı

Fluoksetin, yaşlı ve hamilelerde de etkili ve güvenli bir şekilde kullanılan geniş bir güven aralığına sahip, selektif serotonin re-uptake inhibitörü, yeni kuşak bir antidepresandır(236). Fluoksetin klinikte depresyon ve anksiyete bozukluklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılır(237). Fluoksetin, 5HT_{2C} antagonizması ile noradrenalin ve dopamin salımının artışı sağlamaktadır. Bu özelliği ile terapötik etkisi ve tolere edilme profili artmakta, ilk dozdan itibaren dikkat ve odaklanmayı arttırarak, enerji verip yorgunluk hissinin azalmasına katkı sağlamaktadır(235).

Önceki bir çalışma, fluoksetinin deney hayvanlarında öğrenme-bellek bozukluklarını hafiflettiğini göstermiştir(237). Yapılan başka bir klinik çalışmada da hafif hafıza bozukluğu olan hastalarda fluoksetinin öğrenme-bellek üzerine faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir(238).

3.9. Depresyonda İnflamatuvar Sistem

Depresyon durumunda inflamatuvar sistem aktivitesinin arttığına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır(239). Bu bulgular doğrultusunda anti-inflamatuvar tedavinin antidepresan etki gösterebileceği önerilmiştir. Klinik çalışmalarda da depresyon durumunda anti-inflamatuvar tedavinin faydalı sonuçlar sunduğu gösterilmiştir(240). İnflamatuvar yolak ve depresyon ile potansiyel ilişkisi karmaşık olsa da yeni ve gelişmiş tedaviye ihtiyaç duyan depresyonlu bireylerin tedavisi için bu bulgular oldukça dikkat çekicidir. Anti-inflamatuvar tedavi ile ilgili sonuçlar; kanıt azlığı ve metodolojik heterojenlik sebebi ile hala sınırlı ve tartışmalıdır(241).

Depresif semptom gelişimi ile inflamatuvar süreç arasındaki ilişki temel olarak; inflamasyon ve inflamatuvar süreci içeren somatik hastalıkların depresyon riskini arttırması, pro-inflamatuvar sitokin düzeylerinin depresyonlu hastalarda yüksek bulunması, antidepresan tedavinin pro-inflamatuvar sitokinleri uyarması şeklinde özetlenebilir(242).

3.9.1. İnflamasyonun depresyon riskini arttırması

Giderek artan sayıda çalışma, somatik hastalıklarda meydana gelen inflamatuvar patofizyolojik mekanizmaların, duygu durum bozuklukları özellikle de depresyon riskini arttırdığını göstermiştir. Tip 1 diyabet, romatoid artrit gibi birçok otoimmün hastalık ve hepatit, sepsis gibi bulaşıcı hastalıkların inflamatuvar yanıt ile ilişkili olduğu ve depresyon riskini arttırdığı bulunmuştur. Otoimmün hastalığından dolayı hastanede tedavi edilen hastaların %45'inde, enfeksiyondan dolayı hastanede tedavi edilen hastaların %62'sinde duygu durum bozukluğu görülmüştür(243).

3.9.2. Depresyonda pro-inflamatuvar belirteçlerin yükselmesi

Yapılan çalışmalar somatik bir hastalık olmaksızın depresyonlu bireylerde CRP, IL-6, TNF- α , IL-1ra (interlökin-1 reseptör antagonisti) düzeylerinin arttığını göstermiştir(244). Pro-inflamatuvar sitokin düzeyi artışı ile depresyon gelişimi arasındaki ilişki çift yönlüdür. Çeşitli yaş gruplarında CRP ve IL-6 düzeylerinin yükselmesi depresyon semptomlarının görülme riskinin artışı ile ilişkilendirilmiştir(245). Ancak, bu çalışmalarda yalnızca inflamasyonun periferik belirteçleri üzerine çalışıldığı görülmektedir. Fakat inflamasyon ile depresyon arasında ilişkinin nedeni ve bel çevresi, vücut kitle indeksi gibi faktörlerin katkısı olup olmadığı henüz açıklanamamıştır. Bunun yanı sıra, yapılan bir çalışmada, aktif depresyon epizodunda olan 20 hastada mikrogliyal aktivasyonun artışıyla gösterilen nöroinflamasyon düzeyinin arttığı 20 gönüllü kontrol ile karşılaştırılarak ortaya konmuştur(246).

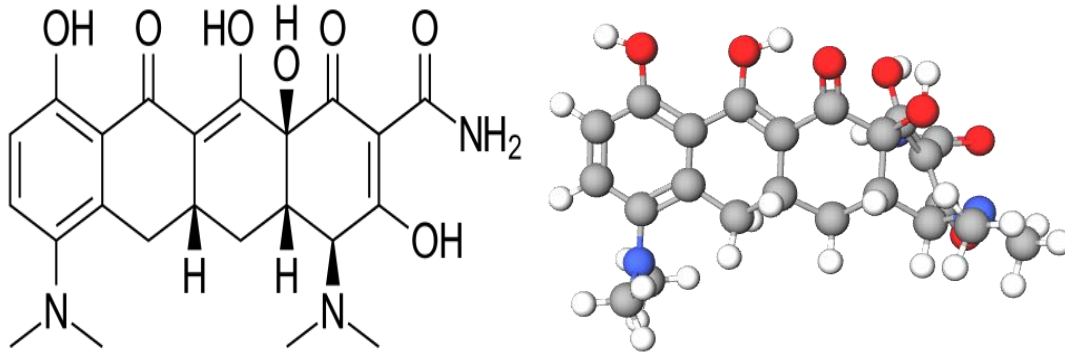
3.9.3.Pro-inflamatuar ajanların depresif semptomları uyarması

İnterferon alfa (IFN- α) gibi pro-inflamatuar ajanlar; malign melanom, hepatit C gibi bazı somatik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Somatik hastalıklara karşı etkili olmasına karşın pro- inflamatuvar tedavi sonrası sıklıkla psikiyatrik yan etkiler görülmektedir. IFN- α ile tedavi edilen hastaların %80'ine yakınında hafiften ağıra depresif semptomlar görülmüştür(247). Yapılan bir çalışmada, IFN- α tedavisi öncesi başlanan antidepresan tedavinin depresyon skorunu azalttığı bildirilmiştir(248).

3.9.4.Depresyonda anti-inflamatuar tedavi

Klinik çalışmalar, gerek yalnız başına gerekse başka bir antidepresanla kombinasyonu şeklinde kullanılsın depresyon tedavisinde anti-inflamatuar etkili ajanların daha etkili olduğunu göstermiştir. Fakat antidepresanların örneğin non-steroid anti-inflamatuarlar (NSAI) ile kombinasyonunun güvenli bir şekilde kullanılıp kullanılamayacağı tartışmalıdır. Ayrıca depresyonlu hastaların aynı zamanda yarar/zarar değerlendirmesi yapılması gereken komorbid somatik hastalıkları da vardır. Örneğin NSAI' lar kardiyovasküler yan etki olasılığını artırırken, sitokin inhibitörleri enfeksiyon riskini arttırmaktadır(242).

3.10.Minosiklin



Şekil 6. Minosiklinin kimyasal yapısı ve 3 boyutlu görünümü

3.10.1. Minosiklinin endikasyonları

Minosiklin ilk olarak 1967 yılında sentezlenmiş, yarı sentetik, ikinci kuşak tetrasiklin türevi enfeksiyon ve enfeksiyon dışı durumların tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Minosiklin, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı anti-enfektif aktivitesinin yanı sıra, anti-inflamatuar, anti-apoptotik, anti-oksidatif, immünmodülatör etkilere sahiptir. Ayrıca oldukça lipofilik bir molekül olduğundan kan beyin bariyerini kolayca geçer ve nöroprotektif etkiler sağladığı için diğer tetrasiklin türevlerinden çok daha etkili bulunmuştur(249). Minosiklin *Borrelia recurrentis*, *Mycobacterium marinum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Vibrio vulnificus* ve vankomisin dirençli enterococcus türlerine karşı etkilidir. Ayrıca riketsiyal enfeksiyonlar, klamidyal enfeksiyonlar, sifiliz, pelvik inflamatuvar hastalık, akne, nokardiyozis, brusellozis, amibiyazis, aktinomikozis, anaplazmozis, leptospirozis, erken dönem Lyme hastalığı, Lejyoner hastalığı, Whipple hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır(250).

Minosiklin antibiyotik dışı olarak gül hastalığında, kanser metastazında, aortik anevrizma, periodontitis, sarkoidozis, nötrofilik hastalığın yanı sıra skleroderma ve romatoid artrit gibi otoimmün bozukluklarda da kullanılmaktadır(251).

3.10.2.Etki mekanizması

Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde protein sentezi ribozomlarda fonksiyonel proteinlerin kodunu taşıyan mesajcı RNA (mRNA) aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Prokaryotik hücreler ribozomların 30S ve 50S alt ünitesini kullanırken, ökaryotik hücreler 40S ve 60S alt ünitesini kullanmaktadır. İki ribozomal alt birim, transfer RNA' nın (tRNA) bir amino asit getirmesine ve amino asit zincirlerinin uzaması yoluyla hücresel proteinler oluşturmaya izin vermek için mRNA şablonunda birleşir. Tetrasiklinler ve bu gruba dahil olan minosiklin, ribozomların 30S alt ünitesine bağlanarak uyarılan tRNA' nın bir amino asit meydana getirerek amino asit zincirini uzatmasını ve hücresel protein oluşturmaya önleyerek etki göstermektedirler. Bu süreç organizmaların büyüme ve çoğalmasını durduran bakteriyostatik etkiyi meydana getirmektedir(252).

3.10.3.Uygulama şekli

Minosiklin, oldukça lipofilik karakterlidir, bu nedenle de santral sinir sistemine ve deriye yüksek konsantrasyonda geçer.

Minosiklin oral ve parenteral kullanıma uygundur. Oral formda mide ve ince barsak proksimalinden absorbe olur. Absorbsiyon oranları açlık-tokluk durumuna ve tetrasiklin türevlerini şelatlayarak absorpsiyonu önleyen kalsiyum gibi 2 değerlikli katyonların varlığına bağlıdır. Bununla birlikte pnömoni, deri ve derinin yapısal enfeksiyonlarında intravenöz olarak kullanılmaktadır(253).

3.10.4.Yan etki profili

Minosiklinin en sık görülen yan etkisi gastrointestinal distres ve fotosensitivitedir. Deride hiperpigmentasyon ve tırnaklarda lekelenme de görülebilmektedir. Bunun yanı sıra özellikle çocuk hastalarda minosiklin kullananların %3-6' sında dişlerde lekelenme gözlenmiş, minosiklinin kemik büyümesini engellediği ileri sürülmüştür(254).

Minosiklin kullanımına bağlı hepatotoksisite meydana gelebilmekte, var olan börek yetmezliği şiddetlenebilmektedir(255).

Minosiklinin diğer tetrasiklinlere göre santral sinir sistemine yüksek oranda geçişi doza bağlı mide bulantısı, kusma, baş dönmesi, işitme duyusunda değişiklik gibi vestibular yan etkiler oluşturabilmektedir(256).

Minosiklin tedavisine bağı olarak 100.000 hastanın 8.8' inde sistemik lupus eritematozus görüldüğü rapor edilmiştir(257).

3.11.Minosiklinin Nörodejeneratif Hastalıklarda Kullanımı

Nörodejeneratif hastalıkların patojenezisinde büyük oranda nöroinflamasyon, oksidatif stres ve mikrogial aktivasyon rol almaktadır. Minosiklinin anti-inflamatuar, anti-apoptotik, mikrogia aktivasyonunun inhibisyonu gibi nöroprotektif etkileri ile nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkili olabileceği düşünülmekte, son yıllarda tedavide adjuvan olarak kullanımı denenmektedir.

3.11.1. Alzheimer hastalığında minosiklin kullanımı

Alzheimer hastalığı, korteks ve hipokampusta nöronal ölümün neden olduğu ilerleyici tipte kognitif fonksiyon kaybı ile karakterizedir. Bu değişiklik beyin bölgelerinde amiloid plak ve nörofibriler yumakların birikimi ile ilişkiliyken, oksidatif stres ve nöroinflamasyonda mikrogia önemli bir rol oynamaktadır(258).

Preklinik çalışmalarda, minosiklinin transgenik amiloid prekürsör protein fare modelinde ve Alzheimer hastalarının hücre kültüründen alınan örneklerde artan mikrogial aktivasyonu inhibe ettiği, mikrogial aktivasyonunun inaktive olması ile nöroinflamasyon, nöronal ölüm, pro-apoptotik faktörler ve ön beyindeki kolinerjik nöron kaybında azalma olduğu, öğrenme-bellek fonksiyonlarında iyileşme gözleendiği belirtilmiştir. Minosiklinin anti-inflamatuar, antioksidan özelliklerinin yanı sıra kurduğu sinapslar ile farklı sinyal proteinlerini uyarmasından kaynaklanan sinaptogenezis ve sinaptik plastisite artışı ile davranışsal değişiklikler meydana getirebileceği ileri sürülmektedir. Ancak Alzheimer hastalığı ve hafif kognitif bozukluğu olan az sayıda hastada minosiklin kullanımının araştırıldığı ilk klinik denemelerde, ilacın faydalı olmadığı, yüksek dozlarda çeşitli yan etkilere yol açtığı bildirilmiştir(259).

3.11.2.Parkinson hastalığında minosiklin kullanımı

Parkinson hastalığı, ekstrapiramidal sistemdeki dopaminerjik nöronların dejenerasyonunun postural ve bilinçli hareketlerin kontrolünde bozukluğa yol açtığı bir hastalıktır. Parkinson hastalığının etiyopatolojisinde pro-inflamatuar sitokin artışı ve inflamasyona bağı reaktif mikroglianın artışı önemli bir rol oynamaktadır.

Preklinik çalışmalarda minosiklinin rodentlerde Parkinson benzeri etkiler üzerine nöroprotektif bir ajan olduğu gösterilmiştir. Şu ana kadar Parkinson hastalarında minosiklin tedavisinin denendiği iki klinik çalışmadan ilkinde hastaların ilaca tolarensinin ilk yılın sonunda düştüğü gösterilmiş, çalışma sonlandırılmıştır. İkinci çalışmada ise minosiklin kullanımı ile hastaların üçte ikisinde mikrogial aktivasyon azalmış ancak semptomların şiddetinde değişme olmadığı için çalışma sonlandırılmıştır(259).

3.11.3.Huntington hastalığında minosiklin kullanımı

Huntington hastalığı, striatumdaki spinal nöronların dejenerasyonundan sorumlu olan huntigtin proteinindeki bozukluğun neden olduğu kognitif, motor ve psikiyatrik bozukluklara yol açan hereditör bir hastalıktır. Ayrıca, hastalığın etiyopatolojisinde apoptozisin de etkili olduğu bilinmektedir(259).

Preklinik çalışmalarda değişik huntington modelleri oluşturulmuş ve bu modellere göre minosiklin tedavisine verilen yanıt değişkenlik göstermiştir. Kaspaz bağımlı huntington modelinde minosiklin apoptotik süreçte oldukça etkili olup nöroprotektif etkili bulunmuş, ancak kalpain bağımlı huntington modelinde etkisiz bulunmuştur. Yine genetik huntington hastalıklı farelerde de minosiklin tedavisi ile hastalıkta bir iyileşme gözlenmemiştir(259).

Huntington hastalığı olan kişilere uygulanan bir yıllık minosiklin tedavisi ile tedavi bitirildiğinde kötüleşen motor ve psikiyatrik semptomlarda remisyon gözlenmiştir. Bir çalışmada Huntington hastalığında minosiklin tedavisinin iyi tolere edildiği, motor ve mental semptomlarda iyileşme oluşturduğu gözlenirken, bir başkasında hastalarda toleransın düşük olduğunu ve %68'inde hiperpigmentasyon olduğu bildirilmiştir(259).

3.11.4.Amyotrofik lateral skleroz

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), temelde reaktif mikroglianin neden olduğu inflamasyondan kaynaklanan, kaslarda atrofi, paralizis ve zayıflama ile karakterize demiyelinizasyon patolojisidir. Hayvan çalışmalarında minosiklin tedavisi ile deneklerin yaşam süresinin uzadığı, motor nöronların dejenerasyonunun geciktiği, sitokrom c salınımının ve kaspaz aktivasyonunun inhibe edildiği, motor fonksiyonların geliştiği, kreatin ile birlikte verildiğinde semptomların başlamasında gecikme olduğu

ortaya konmuştur. Yapılan klinik çalışmalarda da kronik kullanımda güvenli ve toleransının iyi oluşu ile dikkat çeken minosiklinin ALS üzerine etkisinin daha fazla araştırılması gerekmektedir(259).

3.11.5. Multiple skleroz

Multiple skleroz (MS) çeşitli beyin bölgelerinde progresif demiyelinasyonun neden olduğu inflamatuvar bir hastalıktır. MS beyinde aksonal kayıpları tetikleyen fokal inflamasyon ile başlamaktadır. Sonuç olarak otoreaktif T lenfositler kan-beyin bariyerini geçer ve pro-inflamatuvar sitokinler salınarak mikroglia ve astrositleri stimüle eder. Daha fazla inflamatuvar hücre daha büyük bir inflamasyonu tetikler, sonuçta demiyelinasyon ve nörodejenerasyon artar. Yapılan preklinik çalışmalarda MS hastalarına minosiklin uygulanmasının T hücre migrasyonunu azalttığı, semptomların şiddetini azalttığı, nöroinflamasyon, demiyelinasyon, ve aksonal hasarı azalttığı, apoptozis ve glutamaterjik eksitotoksisiteyi azalttığı, beyin lezyonlarında azalma meydana getirdiği, BDNF, NGF gibi nörotrofinlerin arttığı rapor edilmiştir. klinik çalışmalarda da minosiklinin MS hastalarında iyi tolere edildiği, advers olaya neden olmadığı, ancak beyin lezyonlarının sayısındaki azalmanın sınırlı olduğu belirtilmiştir(259).

3.12. Minosiklinin Psikiyatrik Bozukluklarda Kullanımı

Psikiyatrik hastalıkların etiyolojisi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte son yıllarda, patolojiden inflamasyon ve oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır. Mevcut tedaviye dirençli hastaların terapisinin tam olarak gerçekleştirilememesi, tedavide yeni bileşenlerin kullanılması gerekliliğini doğurmuştur. Minosiklinin, antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri ile psikiyatrik bozuklukların ilerlemesini durdurma ve şiddetini azaltma noktasında yardımcı olduğu, yapılan klinik ve preklinik birçok çalışma ile ortaya konmuştur.

3.12.1. Şizofrenide minosiklin kullanımı

Şizofreni, delüzyon ve halüsinasyon gibi psikotik semptomların motivasyonel ve kognitif bozukluklarla kombinasyonu ile karakterize mental bir bozukluktur. Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte multifaktöryeldir ve mikroglial aşırı aktivasyonu ile oluşan oksidatif stres ve nöroinflamasyonun nöronal dejenerasyonda anahtar bir rolü olduğu düşünülmektedir. Minosiklinin ise mikroglial aktivasyonu

inhibe etme özelliği ile şizofrenide tedaviye yardımcı olabileceği düşünülmektedir(260).

Preklinik çalışmalarda minosiklinin hiperlokomasyonu azalttığı(261), görsel- uzaysal hafızayı arttırdığı gösterilmiştir(262). Bunun yanı sıra minosiklin şizofreni oluşturulan deney hayvanlarında mikrogial aktivasyonu azaltmıştır(261).

Klinik çalışmalarda şizofreni tedavisinin kesildiği durumlarda minosiklin verildiğinde hastaların halüsinasyon ve delüzyonlarında hafif iyileşme görülmüştür(263). Erken faz şizofreni hastalarının sürdürdükleri antipsikotik tedavilerinin yanı sıra verilen minosiklin tedavisi ile negatif ve pozitif semptomlarda iyileşme gözlemlendiği ve beyinde gri cevher kaybının korunduğu(264), hastaların depresyon, anksiyete ve bellek bozukluklarında iyileşme(265), serumda IL-6 ve IL-1 β düzeylerinde düşüş olduğu bildirilmiştir(266).

3.12.2.Otizm spektrum bozukluğu ve frajil x sendromunda minosiklin kullanımı

Otizm spektrum bozukluğu, kalıcı iletişim bozukluğu, kısıtlı ve tekrarlayan davranış kalıpları, bazen de yoğun ve yüksek odaklı ilgi alanları ile karakterize heterojen bir nörogelişimsel bozukluktur(267). Otizm ile Frajil X Sendrom (FXS) benzer nörobiyolojik temellere dayanmaktadır. Bu sendrom frajil x mental retardasyon proteinin azalması, MMP-9 (Matriks metalloproteinaz) ekspresyonunun artışı, sinaptik plastisite bozukluğu, glutamat nörotransmisyon dengesizliklerine neden olmaktadır. Minosiklinin de MMP türlerinin ekspresyonunu inhibe ederek tedaviye yardımcı olduğu düşünülmektedir(268). Otizm ile benzer nörogelişimsel anormallikler gösteren FXS modeli oluşturularak yürütülen preklinik çalışmalarda minosiklin kullanımı ile lokomasyon, sirkadiyen aktivite ve öğrenme-bellek bozukluğu gibi bu hastalıklarla ilgili nöronal devrelerde iyileşme oluşturmuştur(269). Otizimli küçük bir grup çocuk üzerinde gerçekleştirilen çalışmaya göre minosiklin tedavisi birçok nörotrofin düzeyinde değişiklikler oluşturmuş ancak bu değişiklikler davranışsal değişiklikler ile paralellik göstermemiştir(270). Fakat minosiklin ile tedavi edilen FXS' li çocuklarda klinik olarak gözlenen iyileşme ve plazma MMP-9 düzeyinde düşüş görülmüştür. Minosiklin tedavisinin mevcut çalışmalarda FXS durumunda daha etkili olduğu görülse de daha geniş bir grup ile daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır(271).

3.12.3. Depresyonda minosiklin kullanımı

Depresyon, anhedonia, sinirlilik, kaygı gibi duygu durum belirtileri, uykusuzluk veya aşırı uyku, psikomotor retard veya ajitasyon, yorgunluk gibi geniş skalada belirtiler ile karakterize heterojen bir hastalıktır(272). Semptomlarının oldukça karışık olmasının yanı sıra, semptomların şiddeti ve etiyolojisine bağlı olarak birçok klinik alt tipe ayrılması, bu geniş spektrumlu patolojiye uygun ilaç bulunmasını zorlaştırmaktadır. Son yıllarda immün sistem bipolar ve unipolar depresyon tedavisi için yeni hedef olarak gösterilmektedir(273). Son yapılan meta analizlere göre bazı anti-inflamatuar tedavilerin bipolar(273) ve unipolar(241) depresyon tedavisinde potansiyel olarak etkili ve iyi tolere edilebilir olduğu bulunmuştur. Anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkileri(274) olduğu bilinen minosiklin, 1996 yılında depresyon tedavisinde kullanılabileceği bildirilen ilk çalışmanın ardından(275), depresyon tedavisi için oldukça fazla çalışılan bir ilaç olmuştur.

FDA onaylı, ikinci kuşak yarı sentetik tetrasiklin türevi olan minosiklin uygulamasının, klasik pro-inflamatuar durumdaki (M1) mikrogial aktivasyonu selektif olarak inhibe ederken, alternatif anti-inflamatuar durumdaki aktivasyonu etkilemediğinden dolayı minosiklinin hastalık sonrasında nöroprotektif ve rejeneratif etki gösterdiğine inanılmaktadır(8). Minosiklinin nörojenezisi arttırması(10), anti-oksidan etkisi(9), anti-glutamat ekzitotoksitesisi(276), pro-inflamatuar moleküllerin regülasyonunu(277) içeren nöroprotektif etkisinin sonucu olarak insanlarda ve deney hayvanlarında antidepresan etkili olabileceği önerilmiştir(11).

Minosiklin, yüksek lipit çözünürlüğü özelliği ile kan beyin bariyerini kolayca geçerek santral sinir sistemine penetre olmakta, düşük dozlarında bile anti-inflamatuar, anti-apoptotik etkiler göstermektedir(13, 232). Ayrıca minosiklin, beyinde nöronal yaşam için zararlı olan pro-inflamatuar sitokin ekspresyonunu ve mikrogial aktivasyonu baskılamakta(251), mikrogial aktivasyonun meydana getirdiği inflamasyonun, depresyon gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmekte, bu nedenle de depresyon ve bipolar depresyon tedavisinde minosiklinin antidepresan ve antipsikotikler ile tedavide iyi bir adjuvan olabileceği düşünülmektedir(278).

Hipokampal nörojenezis, depresyon durumunda yaygın olarak görülen öğrenme-bellek bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir(279). Hipokampal nörojenezis dentate

gyrus'un granül hücre katmanına konstitüe olan granül hücreleri üretir, bu hücrelerin sayısı depresyon hastalarında azalmıştır(126). Bazı antidepresanların hipokampal nörojenezisi de düzenlediği gösterilmiştir. Bu nedenle bozulmuş hipokampal nörojenezisin depresyonun henüz aydınlatılmamış bir patojenezi olduğu düşünülmektedir(280). Minosiklinin hipokampal nörojenezisi düzenleyerek antidepresan etki gösterebileceği bulunmuştur(281). Deneysel diyabet modellerinde de hipokampal nörojenezisin bozulduğu ileri sürülmüştür(282).

Minosiklinin antioksidan etkisi hipokampal nörogenezis ve sinaptogenezisin yanı sıra nöroprotektif ve nörorestorative fonksiyonu ile oldukça ilişkilidir(283). Minosiklin, mikrogliya ve astrosit aktivasyonunu azaltmakta; IL-1 β , TNF- α ve nitrik oksit gibi nörotoksik ajanların salınımını inhibe etmektedir(284). Serebral iskemi/reperfüzyon hasarında inflamasyonu azalttığı ve eksitotoksisiteyi önlediği gösterilmiştir(285). Ayrıca önceki bir çalışmada, minosiklinin down sendromlu deney hayvanlarında kolinerjik nöron kaybını geri döndürdüğü bildirilmiştir(286).

Minosiklinin mikrogliyal hücrelerin stimülasyonunu ve üretimini baskıladığı gösterilmiştir. Başlangıçta mikrogliyal hücreler, anti-inflamatuar sürecin bir parçası olarak santral sinir sistemi hasarının olduğu bölgeye doğru toplanır. Ancak, çok fazla mikrogliyal aktivasyon reaktif oksijen türlerinin(287) ve IL-1 β , TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı salınımına neden olarak nörotoksisiteyle sonuçlanan kronik nöroinflamasyona yol açmaktadır(288). Diyabetin progresyonu ile hipokampal beyin homojenatında IL-1 β , TNF- α düzeyinin artışı ve kognitif bozukluk rapor edilmiştir(289). Mehta ve ark.(4) yaptıkları çalışmada, uzun süreli minosiklin tedavisi ile diyabetik hayvanların beyinlerinde hipokampal IL-1 β , TNF- α düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, diyabet ile ilişkili kognitif bozukluğun ise bir miktar düzeldiği gösterilmiştir.

Minosiklinin santral sinir sistemi bozukluklarındaki nöroprotektif etkisine, serbest radikal üretimini azaltması, serbest radikalleri uzaklaştırması ve sonuç olarak oksidatif stres azaltmasının katkı sağladığı belirtilmiştir(9).

Preklinik çalışmalarda minosiklinin anksiyetede iyileşme sağladığı, inflamasyonu ve inflamatuvar mediyatörleri azalttığı, özellikle BDNF gibi nörotropin düzeyinin artışı ile

nörojeneziste iyileşme meydana getirdiği gösterilmiştir(290). Minosiklinin antidepresan etkisi yapılan birçok hayvan çalışması ile ortaya konmuştur(291, 292).

Yapılan klinik çalışmalar sayıca az olmasına rağmen, şu ana kadar elde edilen randomize kontrollü çalışmaların sonuçlarına göre minosiklin farklı düzeylerde sınıflandırılan depresyon türlerinin tedavisinde depresif semptomlarda iyileşme göstermesi bakımından faydalı bulunmuştur(293, 294).

Küçük ölçekli randomize olmayan open-label bir denemede psikotik özellik gösteren 25 majör depresyon hastasına kullandıkları antidepresan tedaviye ek uygulanan 150mg/ gün dozunda minosiklinin depresyonda iyileşmeyi arttırdığı gösterilmiştir(295).

3.12.4. Obsesif-kompulsif bozuklukta minosiklin kullanımı

Obsesif-kompulsif bozukluk, bireylerin anksiyete oluşturacak kadar takıntılı ve zorunda hissetmeleri ile karakterizedir. Bazal ganglia ve orbitofrontal kortekste glutamaterjik nörotransmisyon disfonksiyonu ile birlikte oksidatif stresin artışı obsesif-kompulsif bozukluğun nedenleri arasında gösterilebilir. Minosiklinin obsesif-kompulsif bozukluk üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir prelinik çalışma bulunmamaktadır, ancak yapılan klinik çalışmaların birinde kronik hastalara adjuvan olarak verilmesinin etkili olmadığı bulunurken, erken dönem hastalarda etkili olduğu görülmüştür. Yapılan bir diğer klinik çalışmada da fluvoksamin ile birlikte verilen minosiklin tedavisi obsesif kompulsif skala ile değerlendirildiğinde belirtilerde iyileşme gözlenmiştir(259).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Kullanılan araç ve gereçler

Hassas terazi (Sartorius BP 1215)

Accu chek şeker ölçüm cihazı ve stripleri

Açık Alan Test Düzeneği (MAY OP-M)

Yükseltilmiş Artı Labirenti Test Düzeneği (MAY EPM01-M)

Pasif Sakınma Test Düzeneği (MAY-PA 1014-M)

Zorunlu Yüzme Test Düzeneği (MAY FSTM-M)

Hot plate test (MAY 9601)

Ethovision-XT 11 (Noldus, Netherlands) bilgisayar programı

Cerrahi alet seti

Stereo Mikroskop (Zeiss Stereomicroscope Stemi 508)

Santrifüj Cihazı (Thermo MicroCL 17R)

UV Spektrofotometre (UV-1205 Shimadzu)

MagNA Lyser Homojenizatör (Roche)

NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre (Thermo ND-2000/2000c)

Dikey Elektropherez Sistemi (Thermo OWL-P8DS-1)

Güç Kaynağı (Thermo OWL-EC300XL2)

Hızlı Elektrophotlama Sistemi (Thermo G2 Fast Blotter) (Thermo FP-94060103)

Yatay çalkalayıcı (Stuart SSM4)

iBright Western Blotting Görüntüleme Sistemleri (Thermo Fisher (CL 1000)

Standart Otomatik Pipet Seti (Eppendorf Research® plus)

Otomatik Doku Takibi Cihazı ile (Thermo, Excelsior AS)

Mikrotom Cihazı (Leica, RM2245)

Otomatik Boyama Cihazı (Shardon, Varistain Gemini)

Işık Mikroskobu (Nikon, Eclipse 50i)

SPSS 21.0 bilgisayar programı

4.1.2. Kullanılan deney hayvanları

Çalışmada Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜSAM)' nden temin edilen 10- 12 haftalık, ortalama 30 gram ağırlığında 72 adet erkek BALB/c fare kullanıldı. Hayvanlar deney prosedüründen evvel ortama alışmaları amacıyla deneyin gerçekleştirileceği DUSAM Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarına getirildi ve yeme-içme kısıtlaması uygulanmaksızın, 12 saat aydınlık-karanlık siklusunda, sabit oda sıcaklığında (22±2 °C) ve nemde, her bir kafeste 8 fare olacak biçimde barındırıldı. Deney protokolü Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' nun (DÜHADEK) 12/11/2019 tarih ve 1 nolu kararı ile 'Hayvan Haklarının Korunması' hususundaki esaslara uyularak gerçekleştirildi.

4.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Yüksek kalorili diyet (research diet-D12492)

Streptozotosin (Sigma-Aldrich)

Minosiklin (Sigma-Aldrich)

Fluoksetin (Sigma-Aldrich)

Metformin (Sigma-Aldrich)

Pirasetam (Sigma-Aldrich)

Actb (abcam #ab8227)

BDNF (thermo fisher OSB00017W)

TNF- α (abcam #ab6671)

IL-6 (santa cruz #32296)

Sekonder Antikor (abcam #6721)

Trikloroasetikasit

Tiyobarbiturikasit

T-PER™ Total Protein Ekstraksiyon Reaktifi (Thermo Pierce)

Halt™ Proteaz ve Fosfotaz İnhibitör Kokteyli (100X) (Thermo Pierce)

Total Protein Kuantifikasyon Kiti (Thermo Pierce)

Sample Laemmli Buffer (Sigma Aldrich)

Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v) (Sigma Aldrich)

Tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma Aldrich)

Amonyum Persülfat (APS) (Sigma Aldrich)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma Aldrich)

Tris Hidroklorür (Tris HCl) (Sigma Aldrich)
Tris Baz (Sigma Aldrich)
Glisin (Sigma Aldrich)
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (10 – 250 kDa) (Thermo Pierce)
1 Step Transfer Buffer (1 L) (Thermo Pierce)
Poliviniliden florür transfer membranı (GVS)
Filtre Kâğıdı (Thermo Pierce)
Tris-buffered saline with 0.1% Tween[®] 20 (TBST) Tablet (Sigma Aldrich)
ECL Kit (Thermo Pierce)
Hidrojen peroksit solüsyonu (TA-015-HP, ThermoFischer)
Ultra V Block (TA-015-UB, ThermoFischer)
Biotinli sekonder antikor (TP-015-BN, ThermoFischer)
Streptavidin-peroxidase (TS-015-HR, ThermoFischer)
Diaminobenzidin (DAB) (TA-001-HCX, ThermoFischer)
Entellan (107961, Sigma-Aldrich)

4.2 Yöntem

BALB/c cinsi erkek fare kullanılarak yapılan deneysel çalışmalar 9 grupta (n=8) gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullanılan minosiklin, fluoksetin, metformin ve pirasetam %0,9 salin çözeltisinde, streptozotosin (STZ) ise pH:4.5 olan 0.1 M sodyum sitrat tamponunda çözülerek deneklere 10g/0.1 ml hacminde, intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Çalışma deney protokolünde (şekil 3) belirtildiği gibi tip 2 diyabet oluşturulan tüm gruplarda 4 haftalık yüksek kalorili beslenmenin ardından 5 gün günde 1 defa 50mg/kg dozunda STZ uygulanırken, diyabet oluşturulmayan gruplara sodyum sitrat çözeltisi verildi. STZ enjeksiyonunu takiben oluşan hipoglisemiye önlemek için deneklere %5' lik glukoz çözeltisi verildi ve enjeksiyonlardan 1 hafta sonra deneklerde diyabetin oluşup oluşmadığını kontrol etmek için AKG (açlık kan glukoz) değerleri ölçümü yapıldı. AKG düzeyi 200mg/dl'nin üzerinde olan tüm deneklerde diyabetin oluştuğu kabul edildi(296). Takip eden günlerde de diyabet oluşturulan gruplardaki denekler, yüksek kalorili diyet ile beslenmeye devam edildi. STZ enjeksiyonundan 2 hafta sonra 7 gün boyunca günde 1 defa minosiklin (40 mg/kg), metformin (200 mg/kg, i.p.), fluoksetin (20 mg/kg, i.p) ve pirasetam (200 mg/kg, i.p) uygulandı.

Kontrol grubuna enjeksiyondan kaynaklanan stresi eşitlemek maksadı ile eşit hacimde salin çözeltisi enjekte edildi. Tüm enjeksiyonlar her gün aynı saatlerde yapıldı. Kullanılan tüm ilaçların dozları daha önce yapılmış benzer çalışmalardan elde edildi(297-299).

Çalışmamızda deneklerin ağırlık değişimini ortaya koymak için tüm deney protokolü boyunca haftalık kilo takibi yapıldı.

	Gruplar		1. haft a	2. haft a	3. haft a	4. haft a	5 gün	6. haft a	7. haft a	8. hafta
1	Kontrol	KONTROL								
2	Tip 2 diyabet	DM	*	*	*	*	*	*	*	*
3	Tip 2 diyabet + Minosiklin	DM+MİN	*	*	*	*	*	*	*	*
4	Tip 2 diyabet + Metformin	DM+MET	*	*	*	*	*	*	*	*
5	Tip 2 diyabet + Metformin + Minosiklin	DM+MİN+MET	*	*	*	*	*	*	*	*
6	Tip 2 diyabet + Fluoksetin	DM+FLU	*	*	*	*	*	*	*	*
7	Tip 2 diyabet + Pirasetam	DM+PIR	*	*	*	*	*	*	*	*
8	Minosiklin	MİN								
9	Metformin	MET								

Uygulamalar		
Yüksek kalorili diyet	Ad libitum	*
Sodyum sitrat çözeltisi		
%0,9 salin		
Minosiklin	40 mg/kg, i.p	
Metformin	200 mg/kg, i.p.	
Fluoksetin	20 mg/kg, i.p.	
Pirasetam	200 mg/kg, i.p	
Streptozotosin	50mg/ kg, i.p (5 gün)	

Şekil 7. Deney protokolü

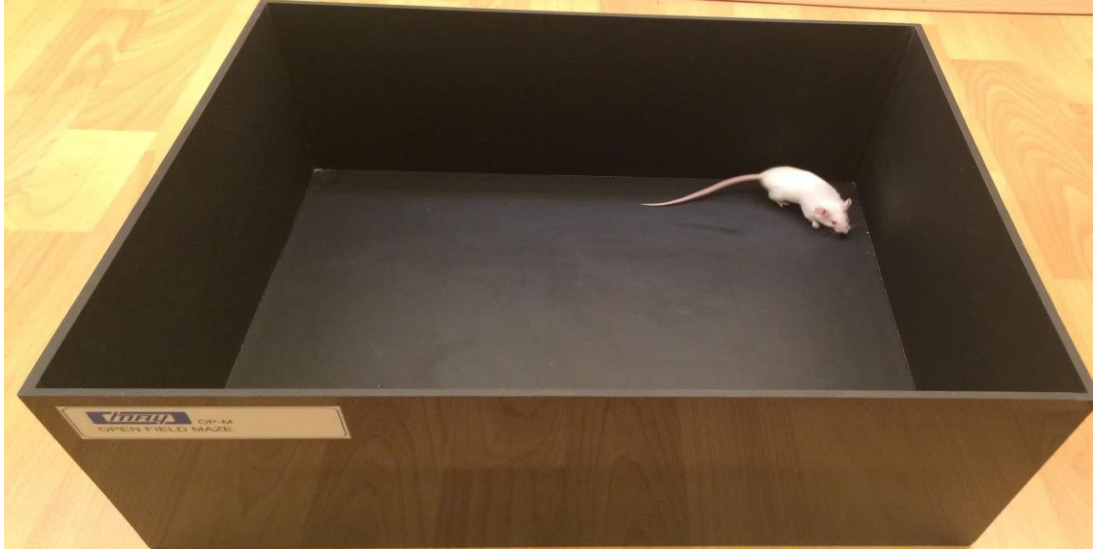
Çalışmamızda deneklere sırasıyla açık alan, yeni obje tanıma, modifiye yükseltilmiş artı labirenti, pasif sakınma, yükseltilmiş artı labirenti, zorunlu yüzme testi ve ağırlık düzeyi tayini protokolleri uygulandı.

Çalışmanın sonunda deneklerden alınan kan örneğinde Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda HbA1c değeri ölçüldü.

Deneysel protokolü tamamlanan hayvanlar, eter anestezisi altında servikal dekapitasyon suretiyle sakrifiye edildi. Deneklerin beyin dokusu biyokimyasal, histolojik ve moleküler incelemeler için izole edildi. Beyin dokuları sagittal bir kesi ile iki hemisfere ayrıldı ve beynin bir hemisferi histopatolojik incelemeler için %10'luk çinkolu formaldehit solüsyonuna konuldu. Diğer hemisfer ise -85 °C derin dondurucuda bir gün süreyle bekletildikten sonra, koronal kesitlere ayrılarak hipokampus dokuları izole edildi. Gruplar rastgele ikiye ayrıldı. Bir kısmında tiyobarbitürik asit (TBA) metodu(300) ile MDA konsantrasyonları geri kalan kısmında ise western blot yöntemi ile BDNF, TNF- α , IL-6 ve iba-1 tayini yapıldı.

4.2.2. Psikofarmakolojik incelemeler

4.2.2.1. Açık alan testi



Resim 1. Açık alan testi (open field test)

Açık alan testi (OF), ilk olarak Calvin Hall tarafından 1932 yılında tasarlanmış ve deneklerin doğası gereği sergilediği çekingen davranışlar üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu düzenek daha sonra deneklerin lokomotor aktivitelerini ve anksiyete düzeylerini ortaya koymak üzere modifiye edilmiştir. Bu düzenek ile elde edilen veriler doğrultusunda, deneklerin hızları ve kat ettikleri toplam mesafe lokomotor aktivite, merkezi alanda geçirdikleri süre ve bu bölgeye giriş-çıkış sayıları anksiyete durumu hakkında bilgi vermektedir. Anksiyete düzeyi düşük olan hayvanlar serbestçe dolaşırken, anksiyetesi olanlar periferik alanda daha fazla vakit geçirmektedir.

Açık alan testi düzeneği her bir kenarı 42 cm, yüksekliği 30 cm olan kare şeklinde, tüm zeminleri siyah renkli bir düzendir. Bu düzende hayvanların doğal eğilimleri merkez kısımdansa duvara yakın kısımlarda daha çok zaman geçirmek yönündedir. Ancak keşfetme dürtüleri gereği de merkezi alanı merak etmektedirler.

Çalışmamızda hayvanlar düzeneğe birer birer bırakılıp 5 dk boyunca serbest, spontan hareketleri düzeneğin üzerine yerleştirilen kamera ile kayıt edildi. Elde edilen veriler EthoVision XT 11 programı kullanılarak incelenip değerlendirildi. Her deney sonrası deneklerin birbirlerinin kokusundan etkilenmelerini önlemek amacıyla düzenek %20 alkol ile, daha sonra çeşme suyu ile silinerek kurulandı.

4.2.2.2. Yabancı obje tanımlama testi

Uzaysal olmayan, görsel tanıma belleği; insanlarda daha önce gördükleri insanları, nesneleri, yerleri hatırlamalarına yarayan epizodik belleğin önemli bir parçasıdır. Rodentlerde bu belleğin ölçümü yeni obje tanıma testi ile yapılmaktadır(301).

Açık alan düzeneğinde (42*42*30) gerçekleştirilen bu test üç aşamada yapılmaktadır. İlk aşamada hayvanların düzeneğin içinde herhangi bir nesne yok iken 5 dk boyunca serbestçe gezip, ortamı keşfedip alışmaları sağlanır (alıştırma aşaması-habituatation). Alıştırma aşamasından 30 dk sonra denekler birbirine 10 cm aralık ile yerleştirilmiş renk, şekil boyut olarak birbirinin aynısı iki objenin bulunduğu düzeneğin tam ortasında yüzü her seferinde aynı yöne dönük olacak şekilde dikkatlice bırakılır. Her bir hayvanın objeleri incelemesi, tanınması için harcadığı süre 5 dk boyunca kaydedilir (training-eğitim). Bu aşamadan 90 dk sonra, objelerden biri kaldırılıp yerine farklı şekil, boyut ve renkte yeni bir obje konularak hayvanlar tekrar düzeneğe konulur ve hareketleri 5 dk boyunca kaydedilir. Bilişsel fonksiyonları iyi olan hayvanların yeni konulan obje etrafında eski objeye oranla daha fazla zaman geçirmesi, yeni objeyi farkedip tanımaya çalışması beklenir (hatırlama-retention). Tüm kayıtlar açık alan düzeneğinin tam üzerine yerleştirilen bir kamera ile gerçekleştirildi ve EthoVision XT 11 programı ile değerlendirildi. Her deney sonrası düzenek %20 alkol ile temizlenip çeşme suyu ile durulanıp kurulandı. Hayvanların burunlarının objenin 2 cm yakınında olması durumunda obje ile ilgilendikleri kabul edildi.

4.2.2.3. Yükseltilmiş artı labirenti testi



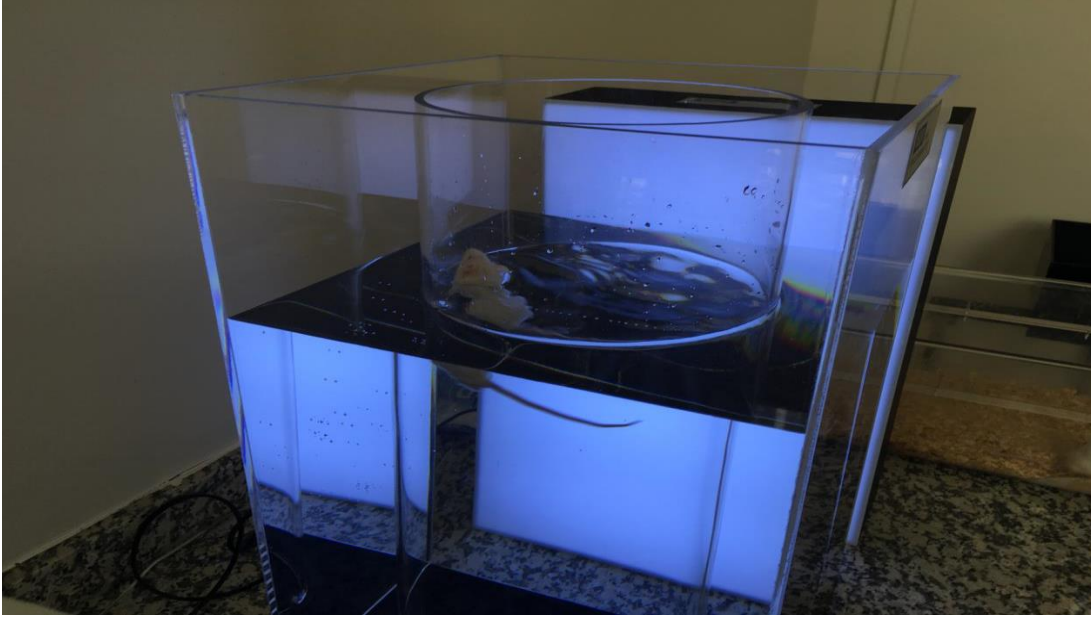
Resim 2.Yükseltilmiş artı labirenti (Elevated Plus Maze, EPM) testi.

Yükseltilmiş artı labirenti (EPM) test düzeneği ilk olarak Pellow ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir ve anksiyete düzeyinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. EPM testi, farelerin açık ve yüksek alandan kaçınmaları, diğer taraftan da yeni çevreyi keşfetme dürtüleri üzerine temellendirilmiştir. Hayvanların doğal eğilimi kapalı kolları daha fazla zaman geçirmek yönündedir ancak, ankiyolitik etkili ilaç uygulanan gruptaki hayvanların kontrol grubundakilere göre açık uçlarda daha fazla zaman geçirdiği gösterilmiştir(302).

EPM, santral alan olarak tanımlanan her bir kenarı 5 cm olan kare alanın etrafında uzanan 25 cm uzunluğunda ve 5cm genişliğinde birbirine simetrik olarak konumlanan ikisi kapalı, ikisi açık uçlu toplam dört koldan oluşan, yerden yüksekliği 50 cm olan, artı (+) şeklinde bir düzeneştir. Kapalı kolların etrafını çevreleyen duvar 16 cm yüksekliğindedir, açık uçlu kolların etrafında ise farelerin düşmesini önlemek için 1 cm yüksekliğinde şeffaf plaklar bulunmaktadır. Bu şeffaf kısım haricinde düzeneğin tüm kısımları siyah renklidir.

Çalışmamızda denekler düzeneğin santral noktasına yüzleri hep aynı açık kola dönük biçimde yavaşça bırakıldı. Farelerin spontan hareketleri düzeneğin üzerine yerleştirilen kamera ile 5 dk boyunca kaydedildi. Elde edilen veriler EthoVision XT 11 programı kullanılarak incelenip değerlendirildi. Her deney sonrası deneklerin birbirlerinin kokusundan etkilenmelerini önlemek amacıyla düzenek %20 alkol ile, daha sonra çeşme suyu ile silinerek kurulandı.

4.2.2.4. Zorunlu yüzme testi



Resim 3. Zorunlu yüzme testi (Forced Swimming Test, FST).

FST, ilk olarak 1977 yılında porsolt ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır(303). Buna göre FST, hayvanların zemine temas etmelerini önleyecek miktarda su ile dolu silindir içerisinde yüzmeye, tırmanmaya, çırpınmaya gibi hareketler yaparak aktif geçirdikleri süre ile sadece kafalarının suyun dışında batmadan kaldığı ancak sudan kurtulma çabasıyla vazgeçtiği (öğrenilmiş çaresizlik) pasif sürenin karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Bu testten elde edilen verilere göre hayvanların düzenekte hareketsiz geçirdikleri zaman depresyon lehine yorumlanmaktadır. Antidepresan tedavinin ise, hayvanların testte geçirdikleri hareketsiz zamanı azalttığı, hareketli zamanı artırdığı gösterilmiştir.

Zorunlu yüzme testi düzeneği, 25 cm yüksekliğinde 10 cm çapında silindir şeklinde bir tank içerisine hayvanların zemine temas etmesini önleyecek miktarda, oda sıcaklığında (25°C) su doldurularak hazırlanmaktadır. Çalışmamızda, hayvan bu düzeneğe bırakılıp, davranışları 6 dk boyunca düzenek yanına yerleştirilen kamera ile kaydedildi. Düzeneğe bırakılan tüm hayvanlar ilk aşamada aktif hareketler sergilemektedir, bu durum çalışmanın sonuçlarının yanlış yorumlanmasına neden olabilmektedir. Bu sebeple kaydın değerlendirilmesinde son 4 dk' daki görüntüler kullanılarak hayvanların düzenekte geçirdikleri hareketli ve hareketsiz süreler EthoVision XT 11 ile değerlendirildi.

4.2.2.5. Pasif sakınma testi



Resim 4. Pasif sakınma (Passive Avoidance, PA) testi.

Pasif sakınma testi, hayvanların korkuyu öğrenmesi, koşullanması ve bundan sakınması esasına dayanan, psikofarmakolojide duygusal öğrenme- bellek düzeyinin ortaya konulması maksadı ile oldukça yaygın olarak kullanılan bir davranış testidir. Bu test ile hayvanların korkulu uyarana koşullanmaları ve bundan sakınma düzeyleri değerlendirilmektedir(304).

Pasif sakınma testi düzeneği her birinin eni 14 cm, boyu 7 cm, yüksekliği 12 cm olan bir aydınlık, bir karanlık odadan ve bu odaları birbirine bağlayan açılır kapanır bir kapıdan oluşur. Karanlık olan kısımda elektrik akımını ileten 0.3 cm çapında çelik ızgaralar bulunmaktadır. Deney iki günde gerçekleştirilir. Hayvanlar ilk gün düzeneğin aydınlık kısmına, arkaları karanlık bölüme dönük olacak şekilde yerleştirilir (başlangıç pozisyonu). Ortama alışmaları ve çevreyi tanımaları için 60 saniye beklenir (alıştırma aşaması). Bu sürenin sonunda ortadaki kapı açılır, hayvanlar içgüdüsel olarak karanlık ortamda olmaya sevdikleri için genellikle kısa sürede karanlık odaya

geçerler. Hayvanların aydınlık odadan karanlık odaya geçme süreleri kaydedilir. Karanlık odaya geçmeleri için 5 dk beklenir, ilk gün karanlık odaya geçmeyen hayvanlar deneyden çıkarılır. Hayvanlar tamamen karanlık odaya geçtikten sonra ortadaki kapı kapatılır ve hayvana korku yaşatıp bundan sakınmasını sağlayacak süre ve şiddette (0,05-1,5 mA, 1 sn) elektrik şoku uygulanır. Hayvan yaşadığı bu kötü tecrübeyi hafızasına alıp öğrenmesi için 10 sn daha karanlık odada tutulur (öğrenme aşaması). Ve ilk gün deneyleri bu şekilde sonlanır.

Pasif sakınma testinin ikinci gününde de ilk günkü deney prosedürü aynı şekilde uygulanır. Hayvan düzeneğin aydınlık bölümüne yerleştirilir, alışması için 60 sn beklenir, daha sonra ortadaki kapı açılır. Bir önceki gün yaşadığı kötü tecrübeyi öğrenmiş ve hatırlayan hayvanlar bundan sakınmak için karanlık kısma geçme içgüdülerine karşı koymaktadır. Ortadaki kapı açıldıktan sonra hayvanların aydınlık odadan karanlık odaya geçme süreleri kaydedilir. Bu süre ‘geçiş süresi’ (step through latency)’dir. Hayvanlar karanlık kısma geçince deney sonlandırılır. 5 dk boyunca karanlık kısma geçmeyen hayvanlar için de deney sonlandırılır, geçiş süresi 300 sn olarak kabul edilir.



Resim 5. Pasif sakınma testi-alıştırma aşaması

4.2.2.6. Modifiye yükseltilmiş artı labirenti testi

Yükseltilmiş artı labirenti düzeneği kullanılır, bu düzenek zeminden 50 cm yükseklikte, dört ayak üzerine oturtulmuş, iki kapalı (25*5*16 cm), iki açık koldan (25*5*0.5 cm) oluşan tüm zeminleri siyah renkle boyalı, açık kolları deneklerin düşmesini engelleyecek şekilde şeffaf plakla çevrili bir düzeneştir. Açık ve kapalı kolların ortasında (5*5*0.5 cm) santral kısım bulunur.

Modifiye artı labirenti testi ilk olarak Itoh ve ark.(1990) tarafından tanımlanmıştır(305). Buna göre; fareler düzeneğe yüzleri santrale dönük olacak şekilde her seferinde aynı açık kolun en uç kısmından bırakıldı. Bu düzenekte farelerin açık koldan kapalı kola geçiş süreleri (transfer latency time) kaydedildi (acquisition-edinme). Farelerin her dört patisi kapalı alanda olduğunda kapalı kısma geçtiği kabul edildi. 90 sn boyunca kapalı kola geçmeyen farelerin geçiş süresi 90 sn olarak kabul edilip deney sonlandırıldı. 90 sn sonunda farelerin düzenekte 10 sn serbestçe zaman geçirip kapalı kolu hatırlamasına izin verildi. Deneyden 24 saat sonra denekler düzeneğe tekrar aynı açık koldan yerleştirilip kapalı kola geçme süreleri (transfer latency time) kaydedildi (hatırlama-retention). Yine 90 sn boyunca kapalı kola geçmeyen farelerin geçiş süresi 90 sn olarak kabul edilip deney sonlandırıldı. Deney süresince her bir denekten sonra düzenek %20 alkol ile temizlenip çeşme suyu ile durulanıp kurulandı. Bu test; deneklerin doğal eğilimi gereği kapalı kolda kalma isteklerinden dolayı, ikinci gün uzamsal belediği iyi durumda olanların, kapalı kısmı daha kısa sürede hatırlayıp bulmaları esasına dayanmaktadır.

4.2.2.7.Hot plate test



Resim 6. Hot plate testi

Ağrı eşiği ölçümü için, hot plate düzeneği kullanıldı. Test, 56 °C sıcaklıkta metal zeminli ve etrafı pleksiglas malzeme ile (26x19) çevrili bir sistem üzerinde gerçekleştirildi. Deneklerin arka ayaklarını yalamaları veya zıplama hareketi yapmaları halinde deney sonlandırıldı, bu süre ağrılı uyarandan sakınma süresi olarak kaydedildi. Bahsi geçen hareketlerin gözlenmemesi durumunda ise deney en fazla 60 sn sürdürüldü ve sakınma süresi 60 sn kabul edildi. Deney süresince dikkatli bir gözlem yapıldı, sıcağa karşı herhangi bir tepki vermeyen deneklerin testi sonlandırıldı ve deney dışı bırakıldı.

4.2.3. Biyokimyasal incelemeler

4.2.3.1. MDA düzeyi tayini

Lipit peroksidasyonunun göstergelerinden biri olan MDA'nın dokulardaki düzeyi incelenerek oksidasyon düzeyi hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. MDA düzeyi, tiyobarbitürik asit metodu olarak bilinen, düşük pH ve yüksek sıcaklıkta MDA'nın nükleofilik ekleme reaksiyonu ile 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve kırmızı florasan, 1:2, MDA: TBA şeklinde 532 nm de pik absorbansı ölçülebilen bir ürün oluşturması esasına dayanan yöntemle hesaplanmaktadır(300).

Beyinden izole edilen hipokampus dokularının ağırlıkları hassas terazi ile tartılıp üzerlerine 0.5 ml %10 ve 4.5 ml %5 (ağırlık/hacim, a/h) trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu eklenerek homojenize edildi (Fisher Scientific Model FB50). Homojenatlar 15 dk, 4500 rpm' de santrifüj edildi (Thermo MicroCL 17R). Santrifüj tüpünden alınan 1 ml süpernatant ayrı bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1 ml %0.67 TBA (a/h) ilave edilip 100 °C'de 10 dk kaynatıldı. Karışım soğuduktan sonra spektrofotometre ile 532 nm' de absorbansları ölçüldü (UV-1205 Shimadzu). Elde edilen veriler molar ekstinksiyon katsayısı ve seyreltme faktörleri hesaba katılarak nmol/gram doku şeklinde hesaplanarak ifade edildi.

4.2.4. Western blot analizi

4.2.4.1.Total protein ekstraksiyonu

İzole edilen beyin dokuları distile su ile yıkandı, parafilm sarıldı, işaretlendi ve total protein ekstraksiyonuna kadar -80°C’de muhafaza edildi. Beyin dokularının hipokampal kısmı buz üzerinde mikroskop altında izole edildi. Hipokampal dokuların homojenizasyonu için, öncelikle 1:100 oranında HALT ve T-PER çözeltilerinden alınarak karıştırıldı. Buz üzerinde, -80°C’de saklanan dokuların üzerine hazırlanan T-PER ve HALT karışımından 0,3 ml eklendi. Daha sonra homojenizatör ile homojen hale getirilen dokular, 13000 devirde 20 dk santrifüje edildi. Çıkarılan numuneler derhal buz üzerine yerleştirildi ve oluşan köpüklerin gitmesi için 15 dk beklendi. Elde edilen supernant çözeltileri yeni ependroflara aktarıldı, aliquatlanarak -80°C’de saklandı.

4.2.4.2.Total protein kuantifikasyonu

Bu prosedür için Thermo Pierce 660 nm Assay kiti kullanıldı. Yapılan tüm işlemler kit prosedürüne bağlı olarak gerçekleştirildi. Kit içeriğinde bulunan 7 adet farklı konsantrasyona sahip BSA çözeltileri (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml) standart olarak kullanıldı. Hem numunelerden hem de standartlardan 10 µl alınarak yeni eppendroflara konuldu. Daha sonra üzerlerine 150 µl reaktif eklenip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre cihazı ile standartların ve numunelerin absorpsiyonları ölçüldü. Konsantrasyonları bilinen standartların yardımıyla numunelerdeki total protein miktarı hesaplandı.

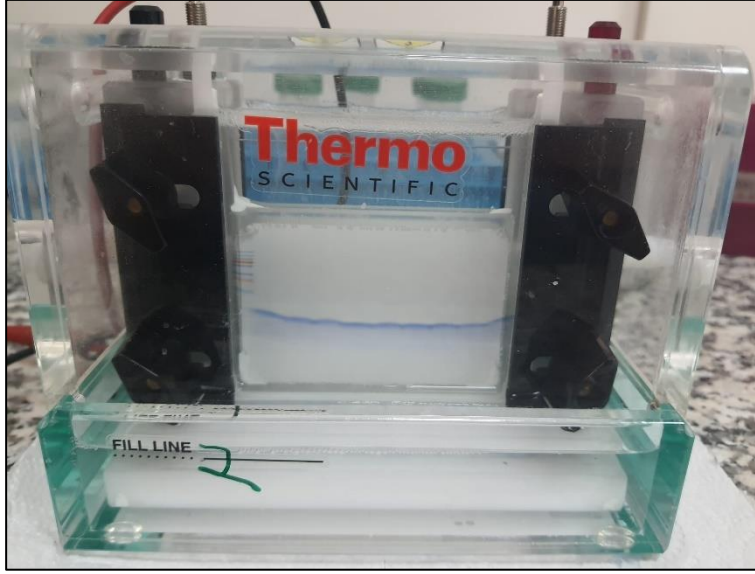
4.2.4.3.SDS-PAGE jel elektroforezi

Bu prosedür için Thermo marka Owl Duo P8DS-1 cihazı kullanıldı. Hazırlanan %2’ lik agaroz jel, herhangi bir sızıntıyı önlemek için kasetlerin tabanına yüklendi ve polimerize olması için 15 dk beklendi. Bu sırada %10’luk ayırıcı jel çözeltisi için tablodaki kimyasallar sırasıyla eklenerek karıştırıldı (Tablo 1). Agaroz jel polimerize olduktan sonra, her kasete 4,13 ml ayırıcı jel karışımı konuldu ve üzerine jellerin hava ile temasını kesmek için distile su eklendi. Jellerin iyice polimerize olması için 30 dakika bekletildi. Bu sırada %5’luk yoğunlaştırıcı jel çözeltisi için tablodaki kimyasallar sırasıyla eklenerek karıştırıldı. Polimerizasyondan sonra jelin üzerindeki

su kurutma kâğıdı ile uzaklaştırıldı. Her kasete 2,03 ml yoğunlaştırıcı jel, ayırıcı jelin üzerine pipetle eklendi. Bu işlemten hemen sonra, 0,8 mm aralıklı on dişli tarak yoğunlaştırıcı jel ile arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek jelin üzerine yerleştirildi. Bu jelin polimerizasyonu için de 30 dakika beklendi. Bu sırada yaklaşık 10-20 µg arasında total protein içeren numuneler oda sıcaklığında çözdürüldü. Her birine 1:1 oranında sample laemlii buffer eklendi. Kaynayan suda 5 dakika bekletildikten sonra 16000 rpm 5 dakika santrifüj edildi ve jele yüklemeye hazır hale getirildi. Tankın iç çemberine uygun miktarda yürütme tamponu eklendi. Taraklar dikkatlice jellerden çıkarıldı ve böylece jeller numune yüklenmesine hazır hale geldi. İki kasete de ilk kuyucuğa 5 µl protein ladder ve geri kalan kuyucuklara da 20 µl hazırlanan numunelerden yüklendi. Tankın dış çemberine de yürütme tamponu eklendi. Elektroforez cihazının kapağı anot ve katot uçlarının doğruluğu kontrol edilerek kapatıldı (Resim 7). Birinci jel için 90 dk sabit 90 volt ve ikinci jel için 40 dk sabit 110 volt uygulanarak proteinlerin ayrışması işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 1. Ayırıcı ve yoğunlaştırıcı jel içeriği

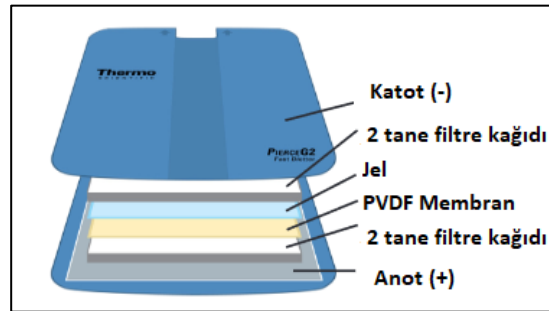
	Ayırıcı jel	Yoğunlaştırıcı jel
Ultrapür su	3,8 ml	2,975 ml
Akrilamid: Bisakrilamid	3,4 ml	0,67 ml
1,5 M Tris HCl pH=8,8	2,6 ml	
0,5 M Tris HCl pH=6,8		1,25 ml
%10 SDS	0,1 ml	0,05 ml
%10 APS	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,01 ml	0,005 ml



Resim 7: SDS-PAGE jel elektroforez sistemi

4.2.4.4. Elektrobloklama işlemi

Bu işlem için Thermo G2 Fastblotter elektrobloklama sistemi kullanıldı ve her aşama bu cihazın manueline göre gerçekleştirildi. Öncelikle 7x8,5 cm boyutlarındaki 2 adet PVDF membranı metanol ile ıslatıldı. Daha sonra PVDF membranlar ve 8 adet filtre kağıdının zerine Thermo 1. Step Transfer buffer eklendi ve 5 dakika inkübe edildi. Bu sırada çalışması biten elektroforez işleminden elde edilen kasetler sistemden dikkatlice çıkartıldı. Kaset camları dikkatlice ayrıldı ve jel membran transfere uygun hale getirildi. Fast blotter sisteminin kasetine, her jel için sırasıyla 2 adet filtre kâğıdı, PVDF membran, jel ve en son 2 filtre kâğıdı st üste yerleştirildi (şekil 8). Bu işlemlerde hava kabarcığı kalmaması için roller kullanıldı. En sonunda kaset dikkatlice kapatılarak cihaza yerleştirildi ve 7 dakikada proteinlerin jelden membrana transferi sağlandı. Srenin sonunda akım kesilerek membran çıkarıldı ve PVDF membranlar dikkatlice cam kaplara alındı.



şekil 8: Elektrobloklama sistemi

4.2.4.5. Bloklama işlemi

Öncelikle membranlar TBST buffer ile oda sıcaklığında 5 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra 20 ml bloklama çözeltisi ile 1 saat boyunca çalkalayıcının üzerinde oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama aşamasından sonra TBST tamponu ile 3 kez beşer dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

4.2.4.6. Antikorların inkübasyonu

Literatür taraması ve üretici firmanın önerileri ile uyumlu şekilde seyreltilen birincil antikorlar, her membran için tablo 2’ de belirtilen oranlarda 10 ml bloklama çözeltisi ile seyreltildi ve membranların üzerine eklendi. +4⁰ C’de 20 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde birincil antikorların inkübasyonu gerçekleştirildi.

Ertesi gün membranlar TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında 3 kez beşer dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandıktan sonra, 1:10000 oranında 10 ml bloklama çözeltisi ile seyreltilen sekonder antikor çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Son olarak, tekrar TBST buffer ile oda sıcaklığında 3 kez beşer dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

Tablo 2: Antikorlar ve Seyreltme Oranları

Antikor	Seyreltme oranı
Actb (abcam #ab8227)	1:1000
BDNF (thermo fisher OSB00017W)	1:1000
TNF- α (abcam #ab6671)	1:1000
IL-6 (santa cruz #32296)	1:500
Iba-1 (abcam #ab153696)	1:1000
Sekonder antikor anti Mouse	1:1000
Sekonder Antikor (abcam #6721)	1:10000

4.2.4.7.Kemilüminesans görüntüleme

Bu yöntemin temel prensibi, kullanılan görüntüleme kitinde bulunan luminolün, sekonder antikorların ucuna yerleştirilmiş olan Horse Radish Peroxidase enzimi ile kimyasal tepkimeye girmesi ve oluşan 3-aminoftalatın ışımasının 428 nanometre dalga boyunda CCD kamera ile ölçülmesi esasına dayanır. Bu nedenle, bu çalışmada Thermo ECL kit kullanıldı ve yapılan tüm işlemler kit prosedürüne bağlı olarak gerçekleştirildi. Her membran için toplamda 2 ml ECL solüsyonu hazırlandı, membranların üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Thermo Fisher iBright Western blotting görüntüleme sistemi kullanılarak bant görüntüleri elde edildi. Elde edilen görüntülerdeki protein bant yoğunlukları IMAGE-J (National Institute of Health, Bethesda, ABD) Analysis Software programında analiz edildi. Veriler β -Aktin housekeeping proteinine karşı normalize edildi.

4.2.5.Histolojik inceleme

4.2.5.1.Doku takibi

Beyin dokuları ilk önce zinc formalin solüsyonuna alınarak rutin paraffin doku takibine başlandı. 1 gece fiksasyon işleminden sonra dokular 6 saat akar çeşme suyu altında bekletildi. Dokular %50, %70, %80, %90, %96 ve absolü etil alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflaştırma işlemi için ksilende 3 kere 45 dakika bekletildi. Son olarak dokular infiltrasyon için 58°C’ de parafin yağına alındı. Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü ve mikrotom yardımıyla bloklardan Hematoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyamalar için 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

4.2.5.2.Hematoksilen-eozin boyama

Parafin bloklardan alınan beyin doku kesitleri 37°C’ye ayarlanmış benmariye alındı. Lam üzerinde fazla parafini eritmek için kesitler 58°C etüvde bir gece bekletildi. Kesitler 3x15 dakika ksilende deparafinize edildi. Kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70, %50 etil alkol) 10’ar dakika geçirildi ve distile suda 5 dakika bekletildi. Harris Hematoksilen boyasında 8 dakika bekletildikten sonra kesitler akar su altında 5 dakika yıkandı, durulandı ve alkolik eozin boyasında 6 dakika bekletildi. Kesitler artan alkol serilerine (%80, %90, %96 etil alkol serilerinden geçirilerek) hızlıca daldırıldı ve absolü alkolde 2 dakika bekletildi. Son olarak kesitler 3x15 dakika ksilende bekletildi ve doku üzerine Entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. (H-E, Bar: 50 µm)

4.2.5.3. iba-1 immünohistokimyasal boyama

Parafin bloklardan alınan beyin kesitleri 37°C’ ye ayarlanmış benmariye ve buradan polilislinli lamlara alındı. Lam üzerinde fazla parafini eritmek için kesitler 58°C etüvde bir gece bekletildi. Kesitler 3x15 dakika ksilende deparafinize edildi. Kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70, %50 etil alkol) 10’ ar dakika geçirildi ve distile suda 5 dakika bekletildi. Kesitler daha sonra fosfat tampon solüsyonunda (PBS) 3x5 dakika yıkandı ve immunohistokimya barına dizildi, barın nemliliği ve sıcaklığı kontrol edildi. Kesitlere endojen peroksidaz enzim blokajı için hidrojen peroksit solüsyonu damlatılıp 20 dakika inkübe edildi. Ardından PBS ile 3X5 dakika yıkama yapıldı, protein blokajı için Ultra V Block solüsyonunda 7 dakika bekletildi. Kesitler,

anti-Iba-1 primer antikoru ile bir gece +4°C’de bekletildi. Sonraki gün kesitler oda sıcaklığına bırakılarak 30-60 dakika bekletildi. PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine biotinli sekonder antikor damlatılıp 14 dakika kadar inkübe edildi. Daha sonra streptavidin-peroxidase damlatılıp 15 dakika beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı. Yıkanan kesitlerin üzerine kromojen olarak Diaminobenzidin (DAB) damlatılıp renk değişimi mikroskop altında izlendi ve reaksiyon PBS ile durduruldu. Gill III hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler entellan ile kapatılıp, Zeiss Imager A2 fotomikroskobunda değerlendirilip görüntülendi (Anti-iba-1, Bar: 20 µm).

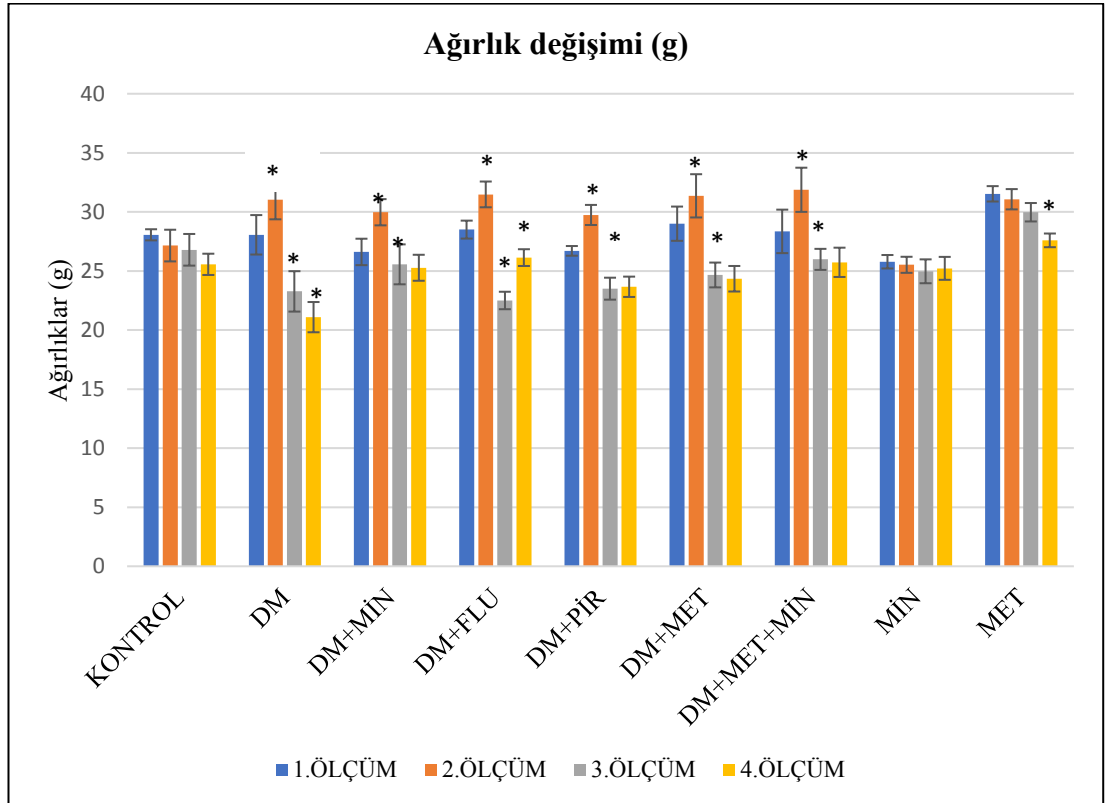
4.2.5. İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler, SPSS 21 programı ile hesaplandı. Gruplar arasında farkların anlamlı olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile, farklılıkların hangi gruplar arasında olduğu ise post hoc Tukey testi ile belirlendi. Aynı gruba ait verilerin ardışık ölçümünün kıyaslanmasında eşleştirilmiş t testi (paired t test) kullanıldı. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma (SEM, standard error of means) şeklinde ifade edildi, gruplar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılığı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

5.BULGULAR

5.1. Ağırlık Değişimi

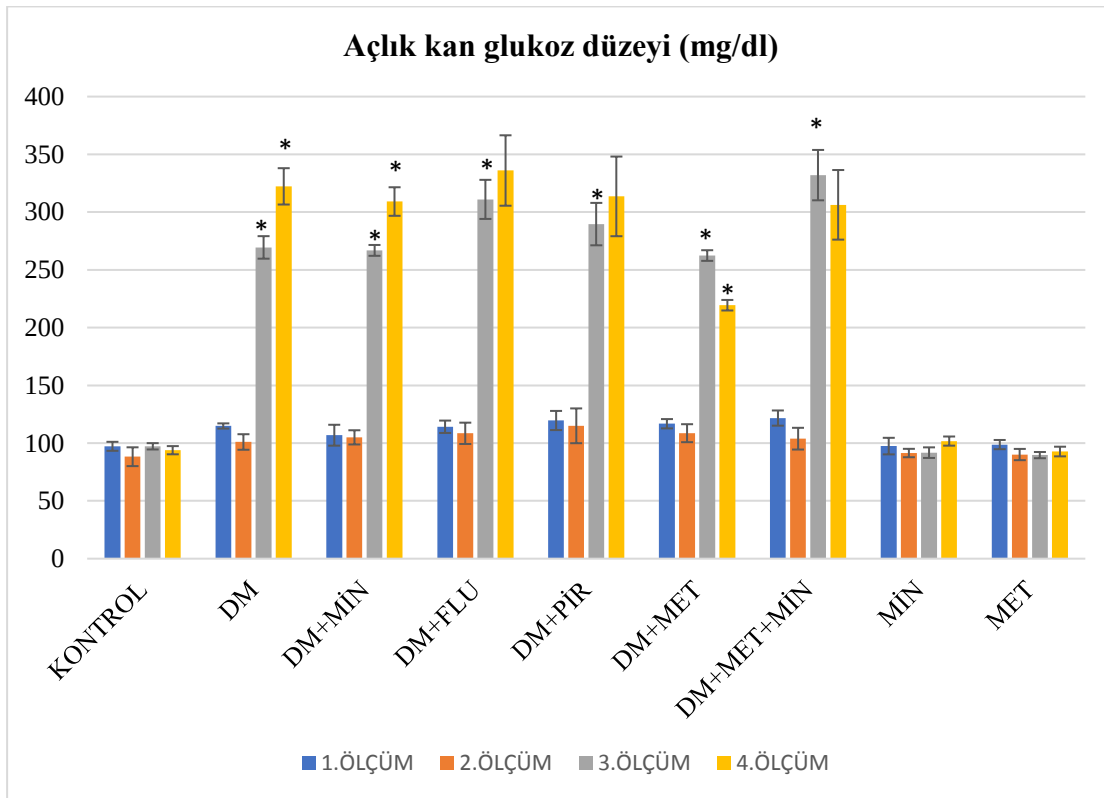
Deneklerin ağırlıkları her hafta ölçülmüştür. Aşağıda deneklerin deneylere başlamadan önce (1.ölçüm), 4 haftalık yüksek kalorili beslenme sonrası (2.ölçüm), STZ uygulamasından 1 hafta sonrası (3. ölçüm) ve sakrifikasyon öncesi (4. ölçüm) ağırlık ortalamaları, standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur. Diyabet oluşturulan grupların ağırlıkları, 4 hafta yüksek kalorili diyet ile beslenme sonrası anlamlı olarak artarken ($p<0.05$), STZ uygulanmasından sonra anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.05$). DM+FLU grubunda yapılan son ağırlık ölçümü anlamlı biçimde artarken ($p<0.05$), DM grubunda anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$). Diğer tüm diyabet gruplarında son ağırlık azalmış ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. KONTROL, MİN gruplarında ağırlık değişiminde herhangi bir anlamlılık bulunmazken, MET grubunda son ağırlık anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$, şekil 9).



Şekil 9. Deneklerin ağırlık değişimi. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. Hesaplamalarda eşleştirilmiş t testi (paired t test) kullanıldı(* $p<0.05$).

5.2. Açlık Kan Glukoz Düzeyi (AKG)

Deneklerin AKG düzeyleri her hafta ölçülmüştür. Aşağıda deneklerin deneylere başlamadan önce (1.ölçüm), 4 haftalık yüksek kalorili beslenme sonrası (2.ölçüm), STZ uygulamasından bir hafta sonrası (3. ölçüm) ve sakrifikasyon öncesi (4. ölçüm) AKG düzeyi ortalamaları, standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur. Diyabet oluşturulan grupların AKG düzeyleri STZ uygulanmasından sonra anlamlı biçimde artmıştır ($p<0.05$, şekil 10). Yapılan son ölçümde (4. ölçüm) DM, DM+MİN gruplarında AKG anlamlı biçimde artarken, DM+MET grubunda AKG anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$, şekil 10). DM+FLU ve DM+PİR gruplarında AKG düzeyinde artış, DM+MET+MİN grubunda AKG düzeyinde azalma gözlenmiş, ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



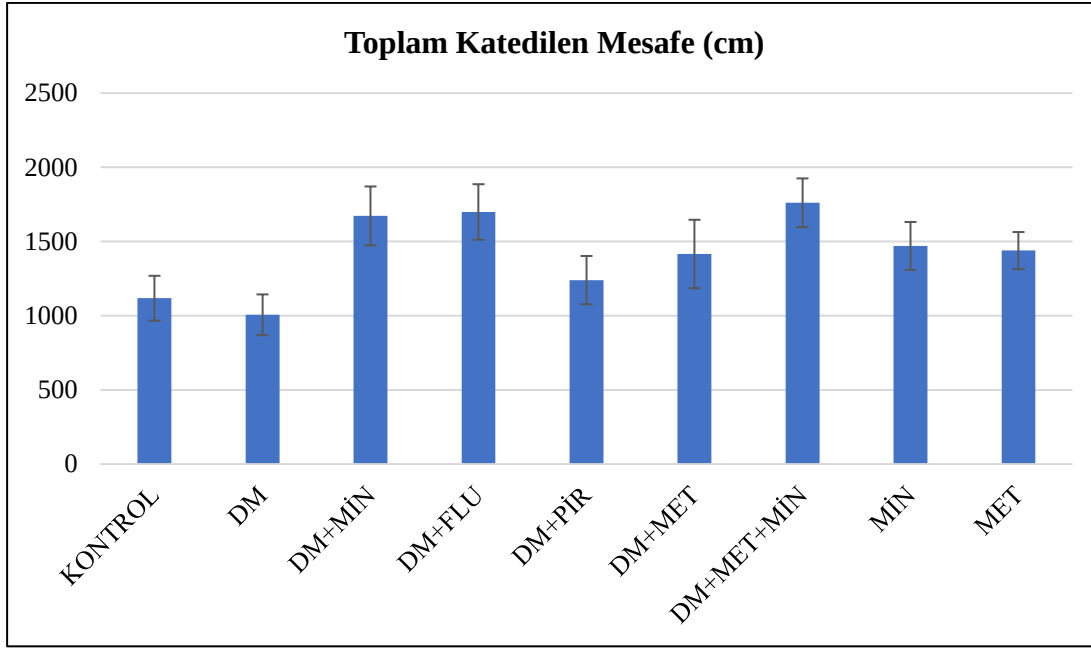
Şekil 10. Deneklerin açlık kan glukoz düzeyi değişimi. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. Hesaplamalarda eşleştirilmiş t testi (paired t test) kullanıldı (* $p<0.05$).

5.3. Açık Alan Testi Bulguları

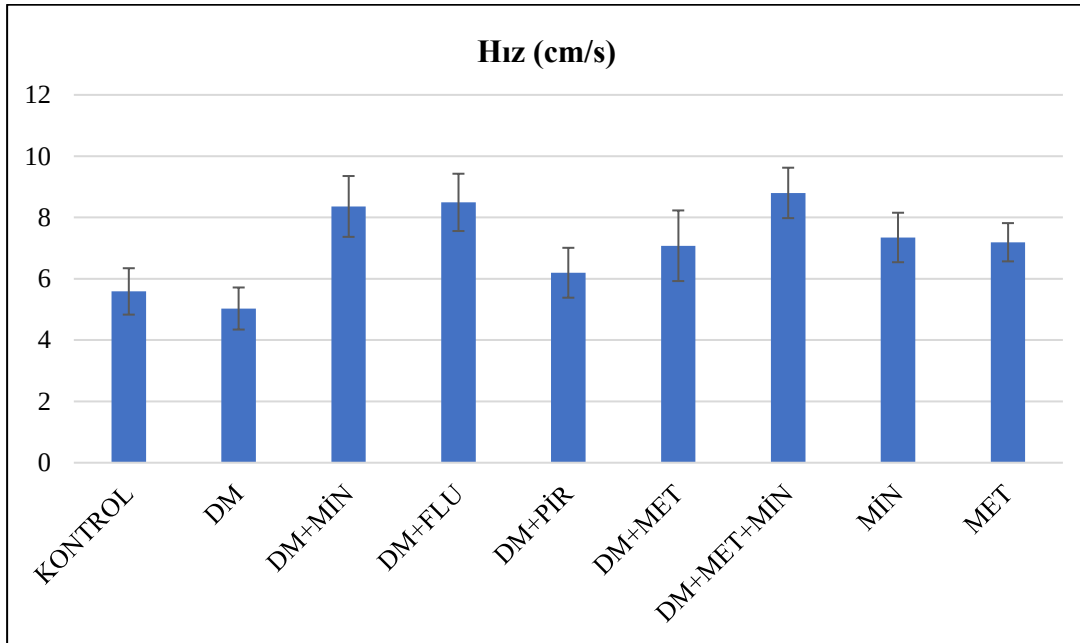
Açık alan (OF) testi sonuçları Ethovision XT 11 programı ile değerlendirilmiş olup, grupların toplam kat ettikleri toplam mesafe ve hız ortalamaları, standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur (şekil 11, şekil 12).

Açık alan testinden elde edilen verilere göre gruplar arasında toplam kat edilen mesafe ve hız bakımından bir farklılık bulunmamıştır. Diyabet ile lokomotor aktivitede bir değişiklik olmadığı, uygulanan ilaçlarında lokomotor aktivitede anlamlı bir değişiklik meydana getirmediği gösterilmiştir ($p>0,05$).

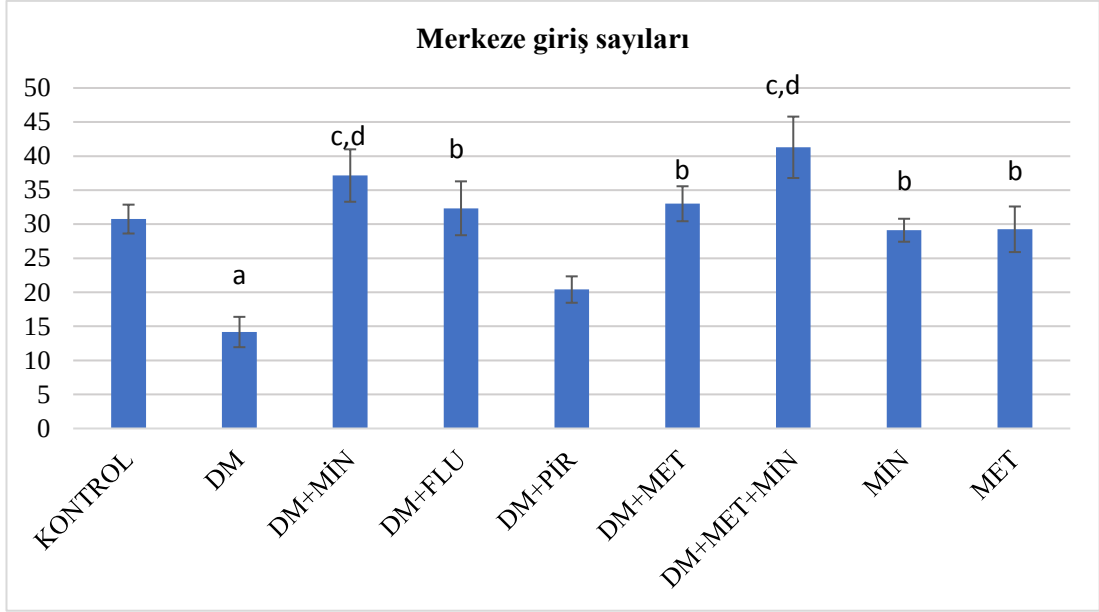
Ethovision XT 11 programı ile değerlendirilen açık alan (OF) testi sonuçlarına göre, grupların merkeze giriş sayılarının ve merkezde geçirilen sürelerin ortalamaları, standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur (şekil 13, şekil 14). Buna göre DM grubunun merkezde geçirdiği süre ve merkeze giriş sayısı KONTROL grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). Diyabet oluşturulup ilaç uygulanan tüm gruplarda merkeze giriş sayıları ve merkezde geçirilen süre bakımından DM grubu ile karşılaştırıldığında artış olduğu görülmüştür. Bu artış merkeze giriş sayıları açısından DM+MİN ($p<0,001$), DM+FLU, DM+MET ve DM+MET+MİN ($p<0,001$) gruplarında anlamlı, merkezde geçirilen süre bakımından DM+MİN ve DM+FLU gruplarında anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



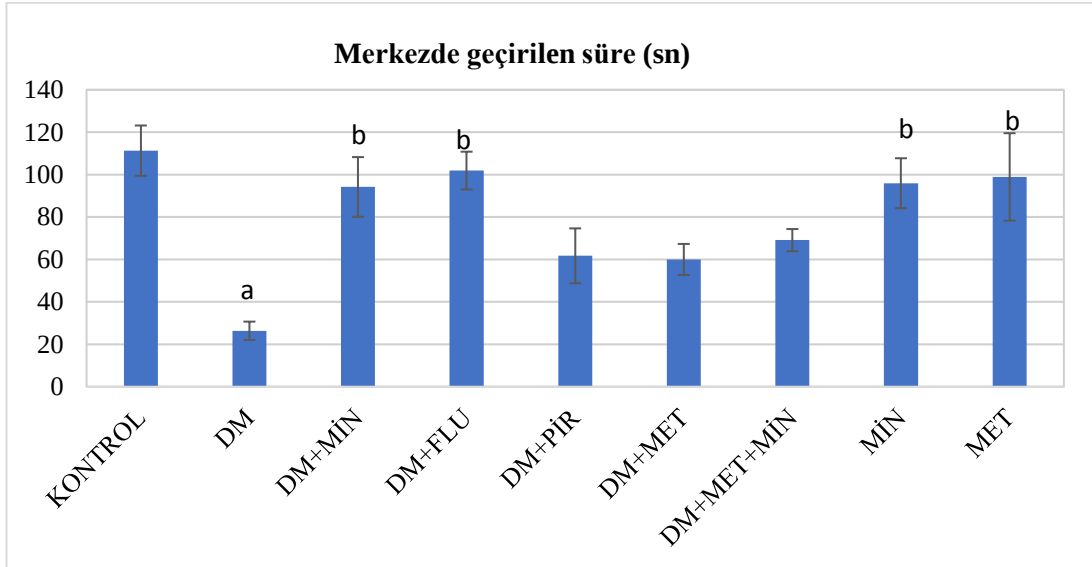
Şekil 11. Açık alan testi bulguları, toplam katedilen mesafe. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.



Şekil 12. Açık alan testi bulguları, hız. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.



Şekil 13. Açık alan testi bulguları, merkeze giriş sayıları. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p < 0,05$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p < 0,05$ DM grubu ile karşılaştırıldığında, ^c $p < 0,001$ DM grubu ile karşılaştırıldığında, ^d $p < 0,05$ DM+PİR grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

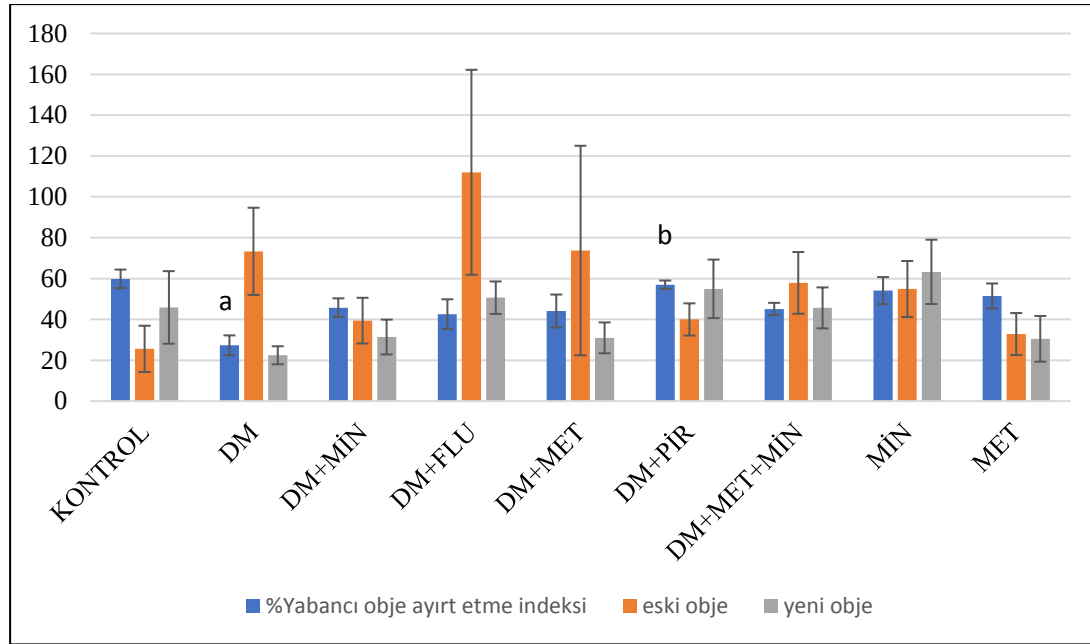


Şekil 14. Açık alan testi bulguları, merkezde geçirilen süre. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p < 0,05$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p < 0,05$ DM grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

5.4. Yabancı Obje Tanıma Testi Bulguları

Yabancı obje tanıma testinden elde edilen veriler Ethovision XT 11 programı ile analiz edildi ve deneklerin yeni ve eski obje etrafında geçirdikleri süreler ile yeni obje etrafında geçirilen sürenin nesnelerin etrafında geçirilen toplam süreye bölünmesi ile elde edilen % yabancı obje ayırt etme indeksi verileri standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur (şekil 15).

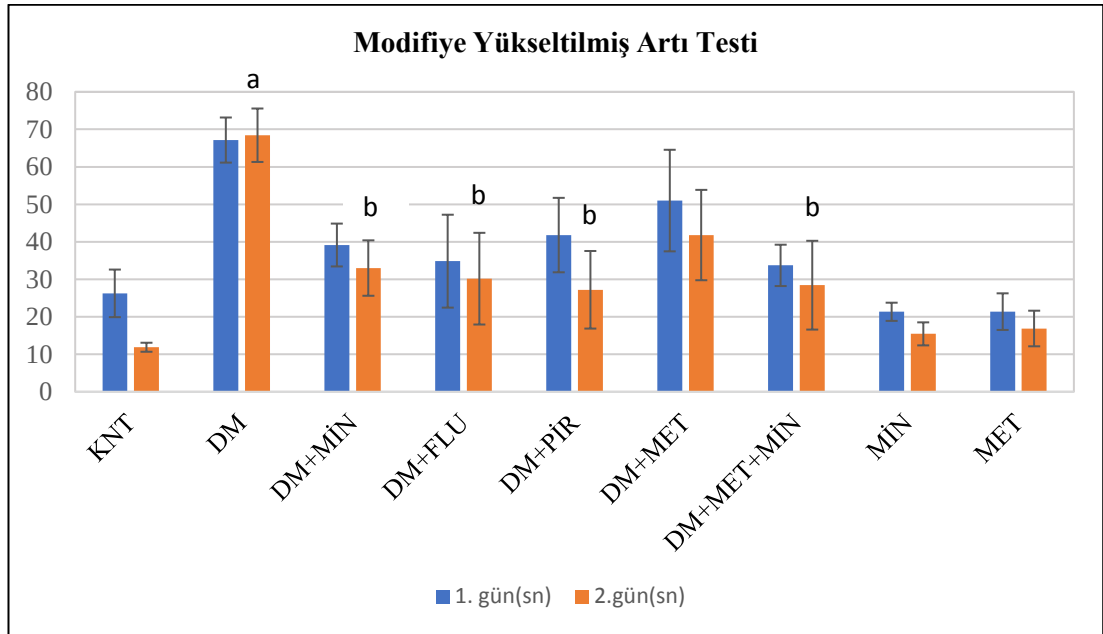
DM grubunda % yabancı obje ayırt etme indeksinin KONTROL grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0.05$), DM+ PİR grubunda ise DM grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir ($p<0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da % yeni obje ayırt etme indeksinin diyabet+ilaç gruplarında DM grubu ile kıyaslandığında fark edilir biçimde yükseldiği gözlenmiştir.



Şekil 15. Deneklerin yabancı obje tanıma testi, %ayırt etme indeksi, eski obje, yeni obje. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p<0.05$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p<0.05$ DM grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

5.5. Modifiye Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları

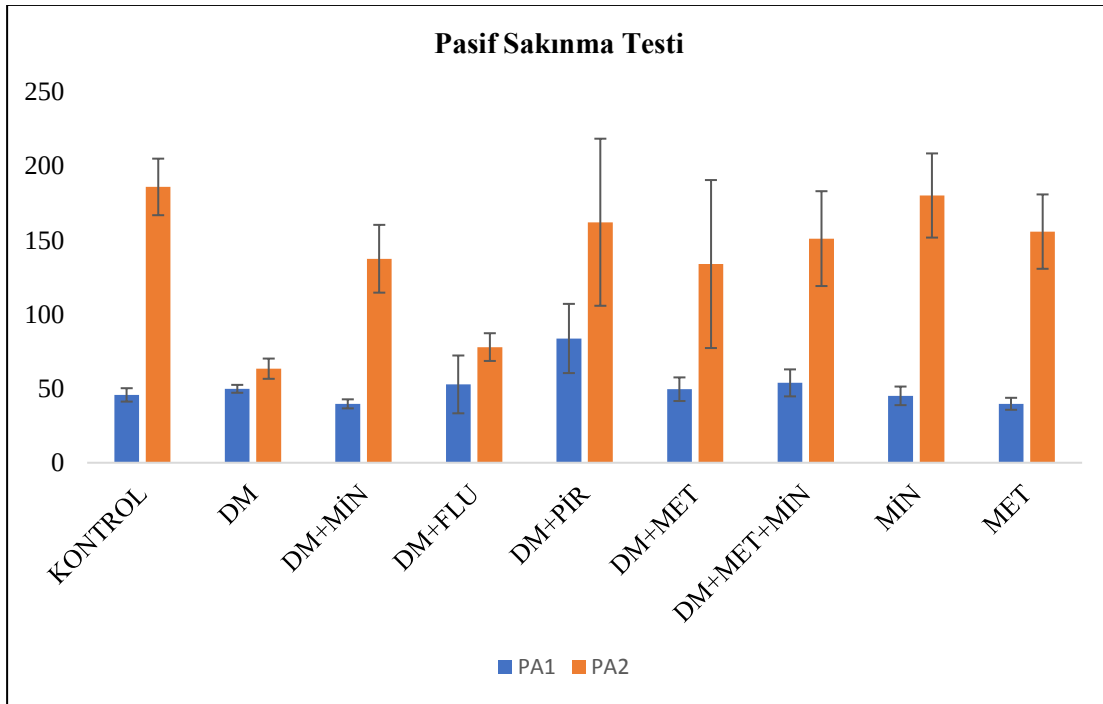
Modifiye yükseltilmiş artı labirenti testinde deneklerin 1. ve 2. gündeki geçiş sürelerinin ortalamaları standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur (şekil 16). DM grubu dışındaki tüm grupların 2. gündeki kapalı kola geçiş süresi 1. güne göre kısalmıştır. Deneyin 2. gününde DM grubunun kapalı kola geçiş süresi KONTROL grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). Yine deneyin 2. gününde DM+MİN, DM+FLU, DM+PİR ve DM+MET+MİN gruplarında kapalı kola geçiş süresinin DM grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p<0,05$).



Şekil 16. Modifiye yükseltilmiş artı labirent testi bulguları. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p<0,001$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p<0,05$ DM grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

5.6. Pasif Sakınma Testi Bulguları

Pasif sakınma (PA, Passive Avoidance) testinde deneklerin 1. ve 2. gündeki geçiş sürelerinin ortalamaları standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur (şekil 17). Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da deneyin 2. gününde DM grubunun geçiş süresinin KONTROL grubuna göre azaldığını, diyabet oluşturulup ilaç uygulanan gruplarda (fluoksetin hariç) ise geçiş süresinin DM grubuna göre önemli oranda arttığını göstermektedir.

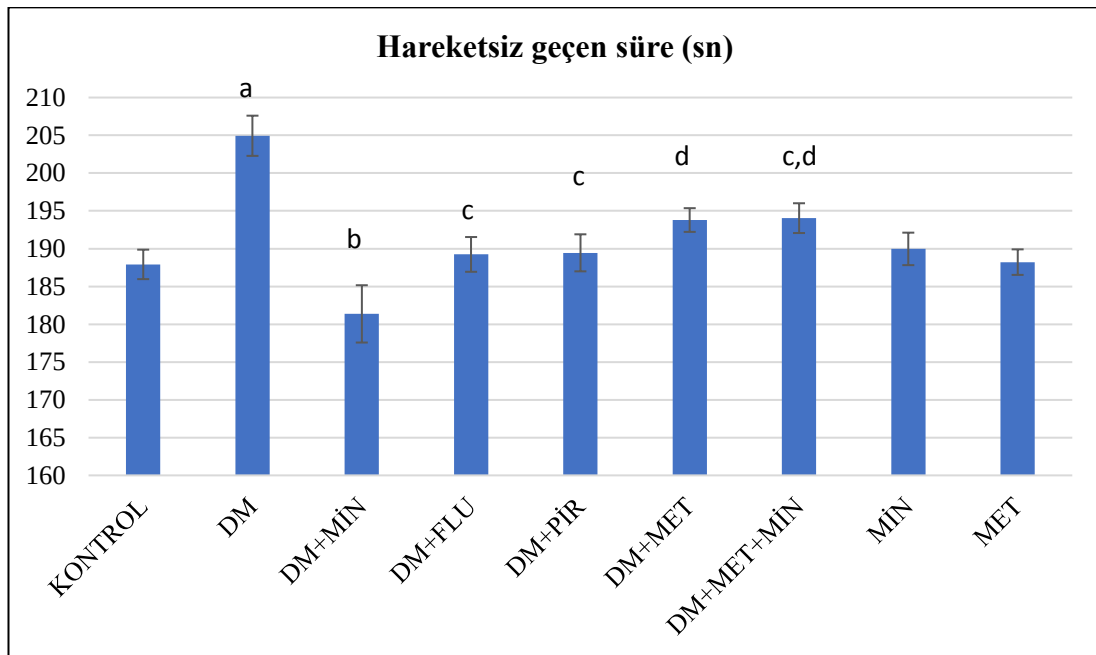


Şekil 17. Pasif sakınma testi bulguları. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir.

5.7. Zorunlu Yüzme Testi Bulguları

Zorunlu yüzme testi (FST, Forced Swimming Test) sonuçları Ethovision XT 11 programı ile değerlendirilmiş olup, grupların hareketsiz geçirdikleri süre ortalamaları, standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur (şekil 18).

KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda hareketsiz geçen sürenin anlamlı olarak arttığı ($p<0.05$), DM+MİN, DM+FLU, DM+PİR ve DM+MET+MİN gruplarında ise hareketsiz geçen sürenin DM grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir ($p<0.05$).



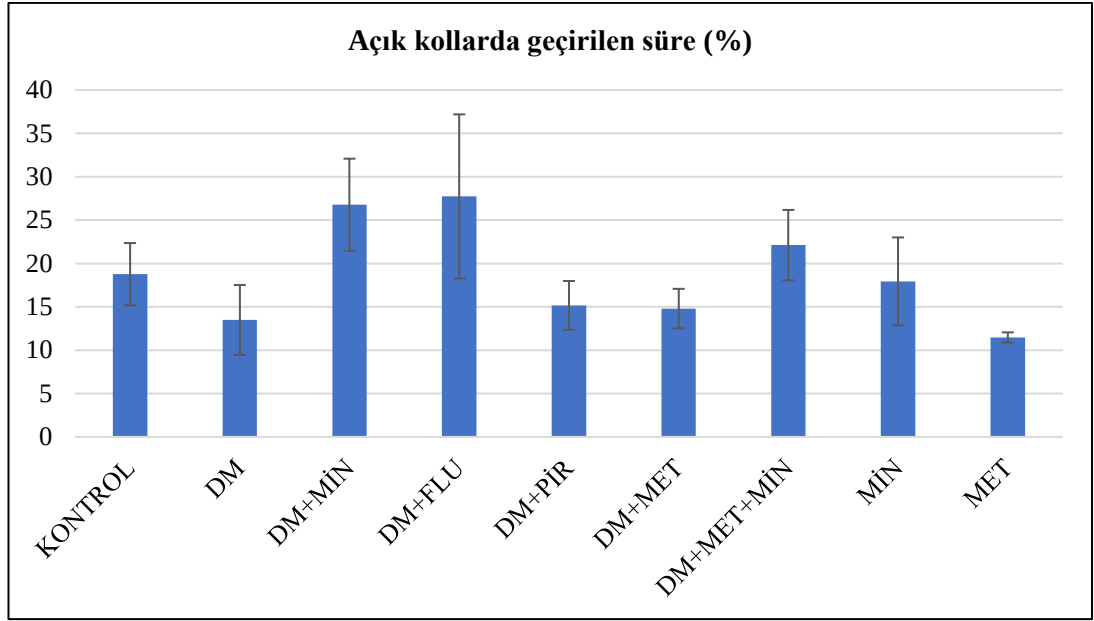
Şekil 18. Zorunlu yüzme testi bulguları, hareketsiz zaman. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p<0.001$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p<0.001$ DM grubu ile karşılaştırıldığında, ^c $p<0.05$ DM grubu ile karşılaştırıldığında, ^d $p<0.05$ DM+ MİN grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

5.8. Yükseltilmiş Artı Labirenti Testi Bulguları

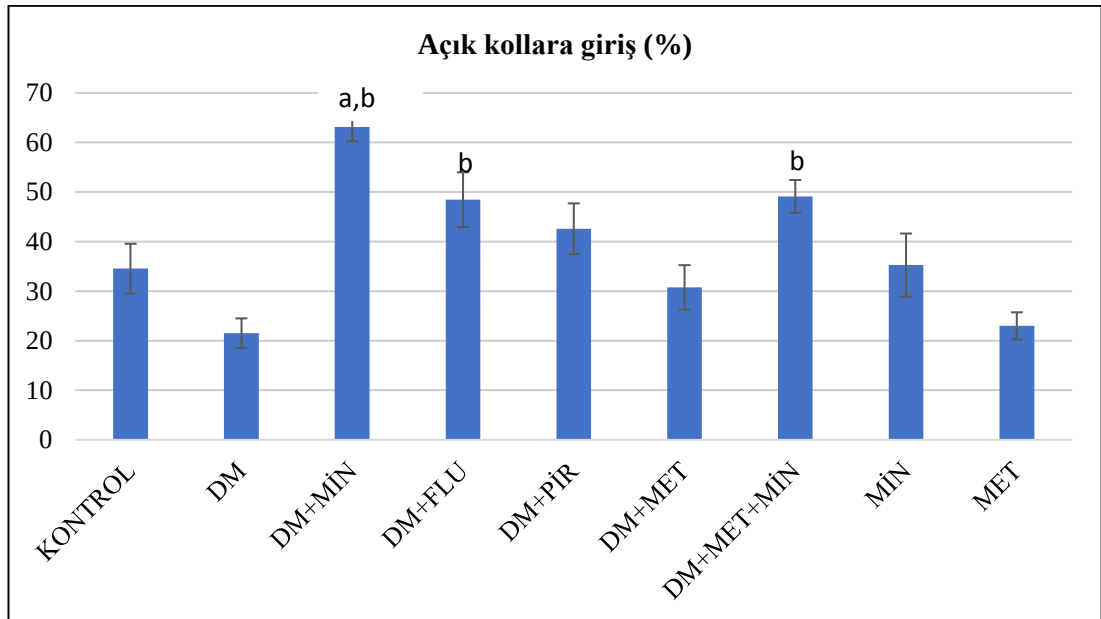
Yükseltilmiş artı labirenti (EPM, Elevated Plus Maze) testi sonuçları Ethovision XT 11 programı ile değerlendirilmiş olup, grupların açık kollara giriş ve açık kollarda geçirilen süre yüzdelerinin ortalamaları, standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur (şekil 19, şekil 20)

İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da açık kollarda geçirilen süre yüzdesinin DM grubunda KONTROL grubuna göre azaldığı, DM+MİN, DM+FLU ve DM+MET+MİN gruplarında ise açık kollarda geçirilen süre yüzdesinin DM grubuna göre arttığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

DM grubu ile karşılaştırıldığında açık kollara giriş yüzdesi bakımından DM+MİN, DM+FLU ve DM+MET+MİN gruplarında artış görülmüştür ($p<0,05$).



Şekil 19. Yükseltilmiş artı labirenti testi bulguları, açık kollarda geçirilen süre yüzdeleri. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

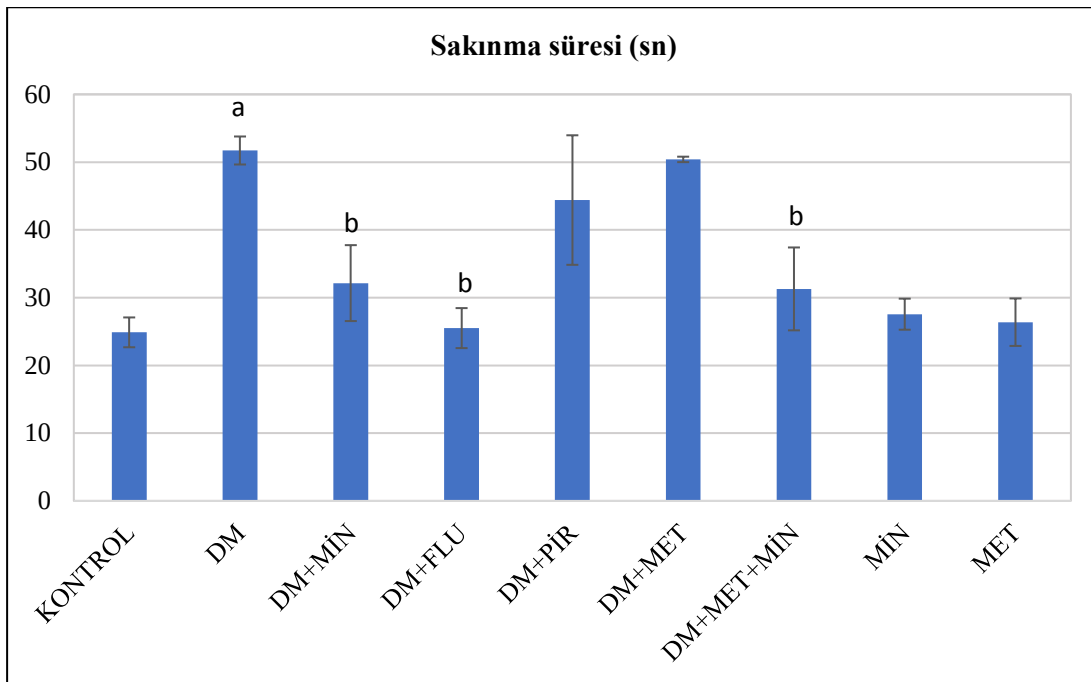


Şekil 20. Yükseltilmiş artı labirenti testi bulguları, açık kollara giriş yüzdeleri. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p < 0,05$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p < 0,05$ DM grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

5.9. Hot Plate Testi Bulguları

Deneklerin ağırlı uyarandan sakınma süreleri standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur (şekil 21).

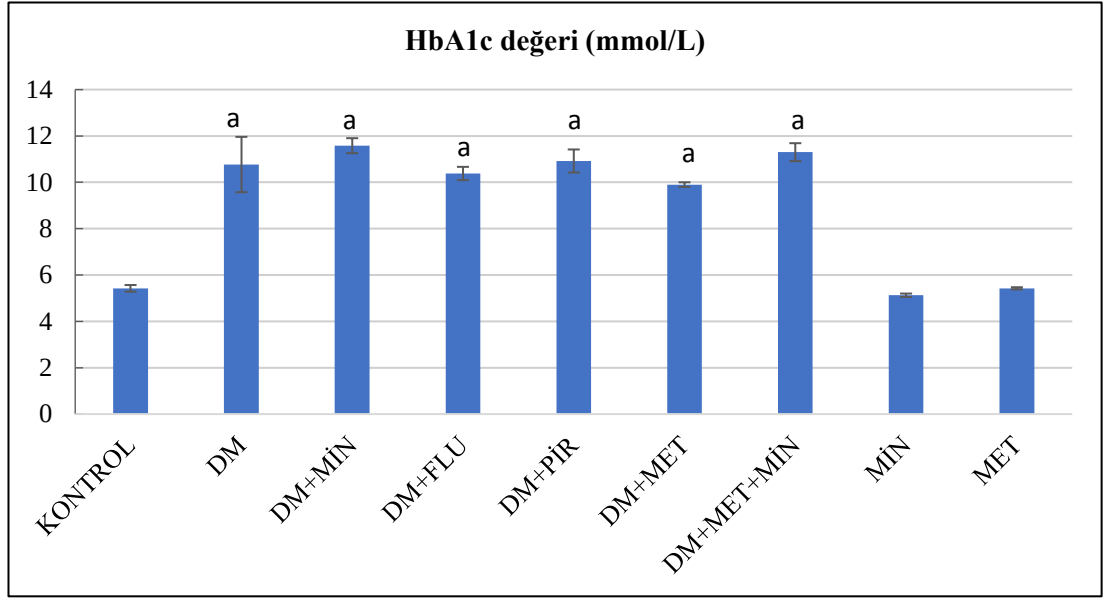
DM grubunun ağırlı uyarandan sakınma süresi KONTROL grubuna göre anlamlı biçimde artarken ($p<0,05$), DM+MİN, DM+FLU ve DM+MET+MİN gruplarında ağırlı uyarandan sakınma süresi DM grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 21. Deneklerin ağırlı uyarandan sakınma süresi. Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p<0,05$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p<0,05$ DM grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

5.10. HbA1c Değeri

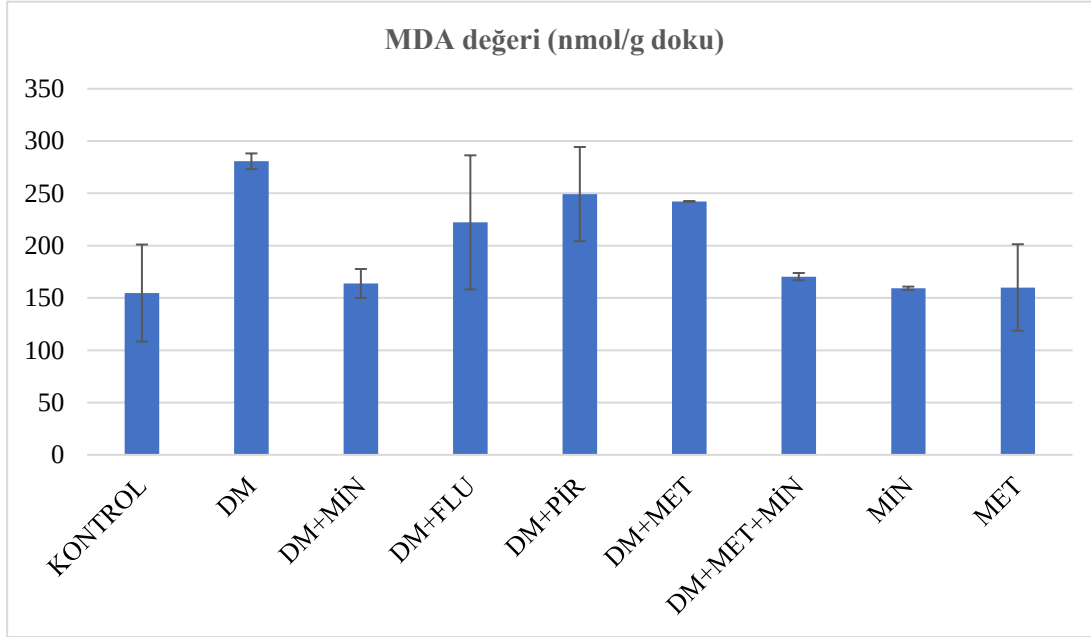
Gruplardan alınan kan örneklerinde ölçülen HbA1c değerleri standart sapmaları (SEM) ile birlikte sunulmuştur (şekil 22). Diyabetli grupların tümünde HbA1c değeri KONTROL grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 22. Deneklerin HbA1c değerleri (mmol/l). Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p<0,05$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

5.11.Malondialdehit Düzeyleri

Grupların hipokampus dokularında ölçülen MDA düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak DM grubunun MDA düzeyinin KONTROL grubuna göre arttığı, bu artışın DM+MİN ve DM+MET+MİN gruplarında düzeldiği gözlenmiştir ($p>0.05$, şekil 23)



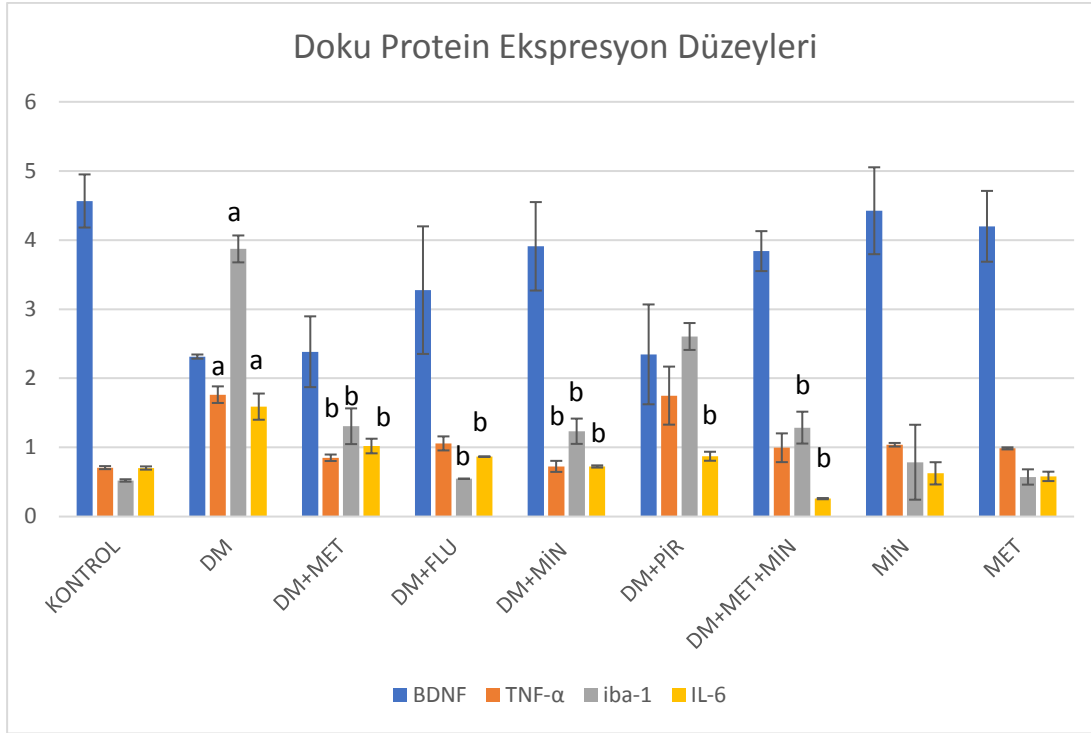
Şekil 23. Deneklerin MDA değerleri (nmol/g doku). Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

5.12. Western Blot Bulguları

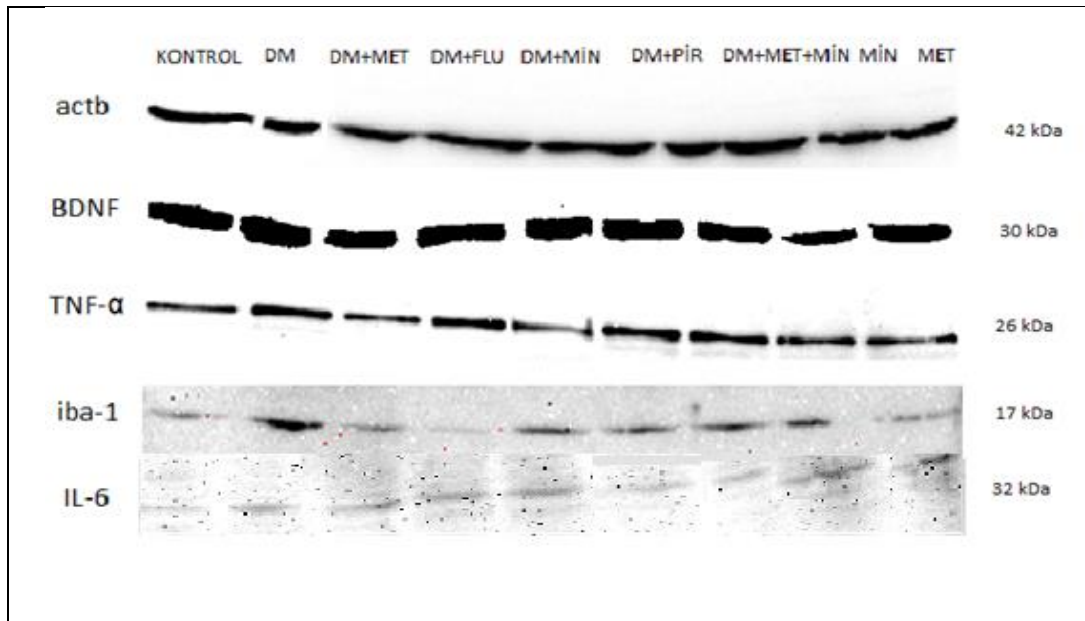
DM grubunda kontrol grubuna göre TNF- α , IL-6 ve iba-1 proteinlerinin ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı biçimde arttığı, DM+MET, DM+MİN gruplarında ise bu proteinlerin ekspresyonunun DM grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı görülmüştür ($p<0,05$, şekil 24). DM+MET+MİN ve DM +FLU gruplarında da IL-6 ve iba-1 protein ekspresyonları DM grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuş ($p<0,05$, şekil 24), bu gruplarda TNF- α proteini ekspresyonunda gözlenen düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, şekil 24). DM+PİR grubunda ise DM grubuna göre IL-6 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görülürken ($p<0,05$, şekil 24), TNF- α ve iba-1 düzeylerinde görülen azalma anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, şekil 24).

BDNF protein ekspresyonu DM grubunda kontrol grubuna göre azalmış, DM+FLU, DM+MİN ve DM+MET+MİN gruplarında ise DM grubuna göre açık şekilde artmıştır ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, şekil 24).

MİN ve MET gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$, şekil 24).



Şekil 24. Hipokampal doku protein ekspresyon düzeyleri (tüm proteinlerin ekspresyonu actb' ye göre standardize edilmiştir). Her sütun 6-8 farenin, ortalama $\pm$ SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p < 0,05$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p < 0,05$ DM grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

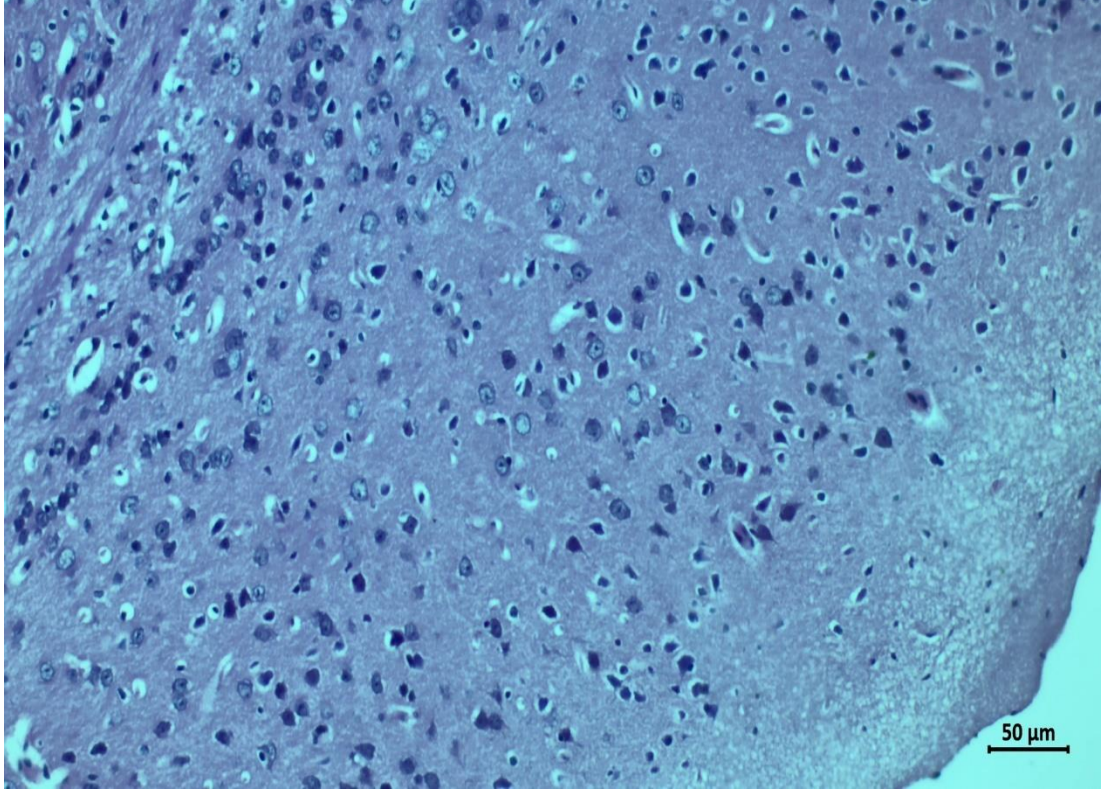


Şekil 25. Bütün gruplarda çalışılan proteinlere ait western blot bant görüntüleri

5.13. Histoloji Bulguları

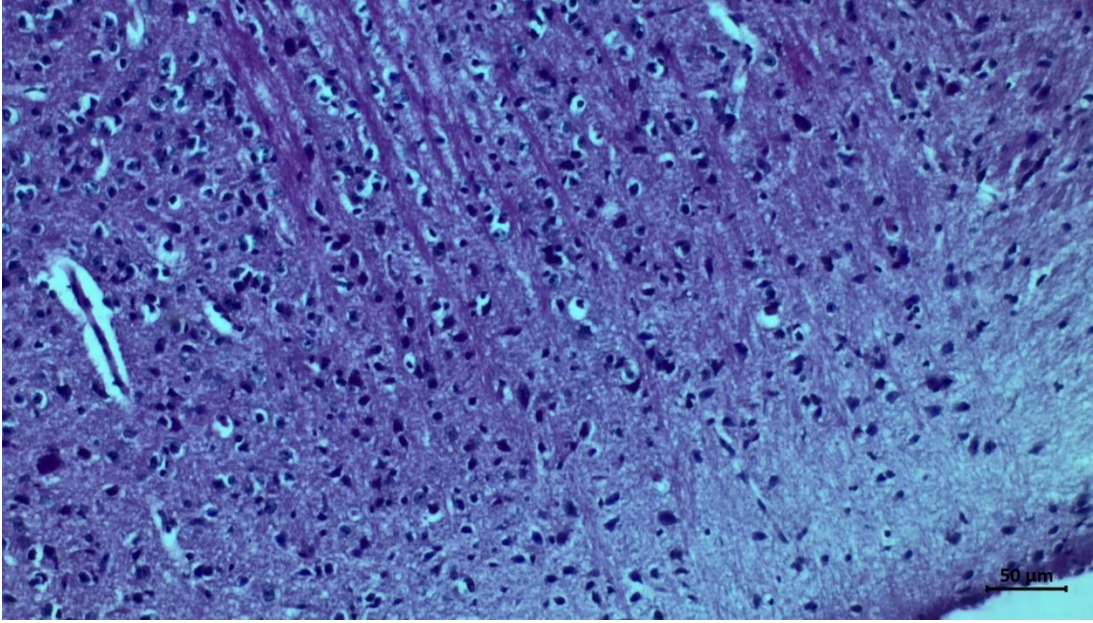
5.13.1 Histopatolojik bulgular

Kontrol grubu: Serebral kortekste normal histolojik yapı izlendi. (Resim 8)



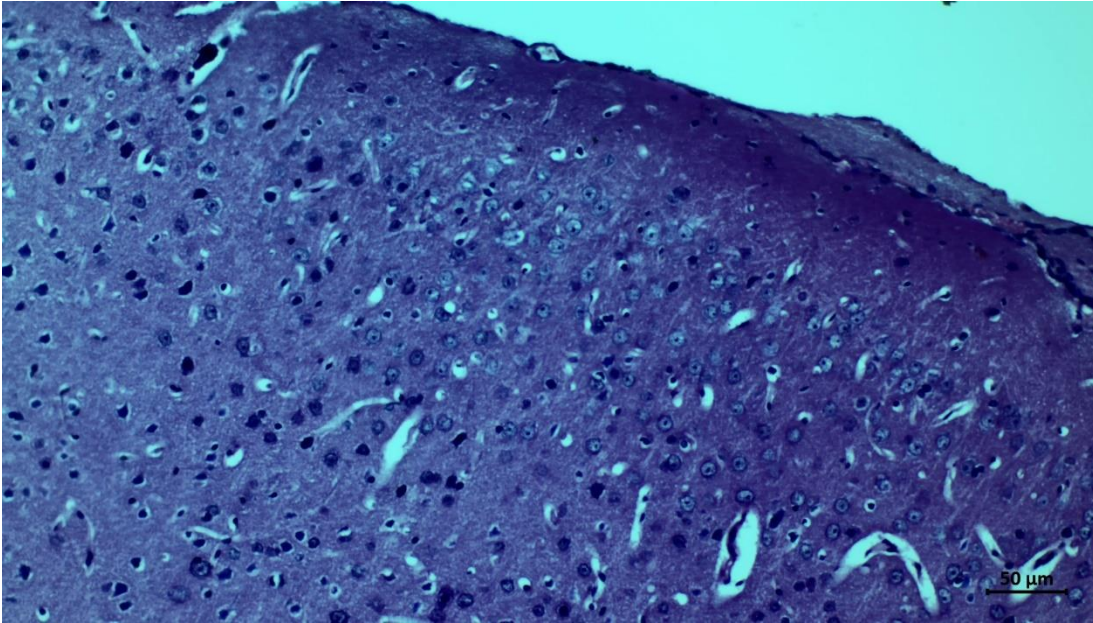
Resim 8. KONTROL grubu beyin kesiti. Beyin korteksinde normal histolojik görünüm (H-E, Bar: 50 µm)

MİN grubu: Serebral kortekste kontrol grubu ile benzer normal histolojik yapı izlendi (Resim9).



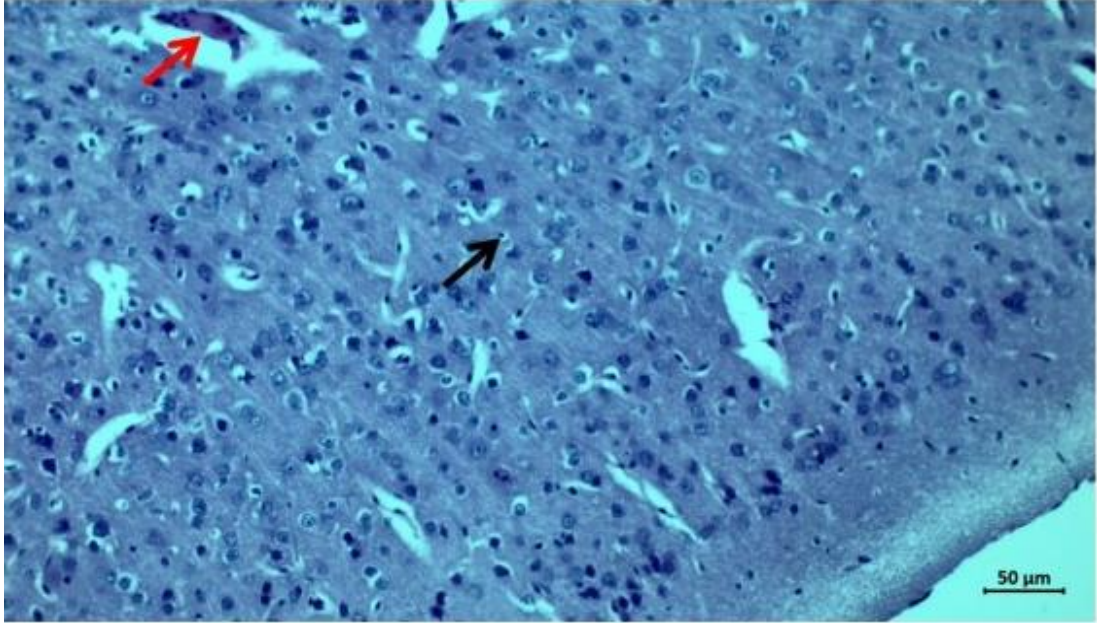
Resim 9. MİN grubu beyin kesiti. Beyin korteksinde normal histolojik görünüm (H-E, Bar: 50 µm)

MET grubu: Serebral kortekste kontrol grubu ile benzer normal histolojik yapı izlendi (Resim10).



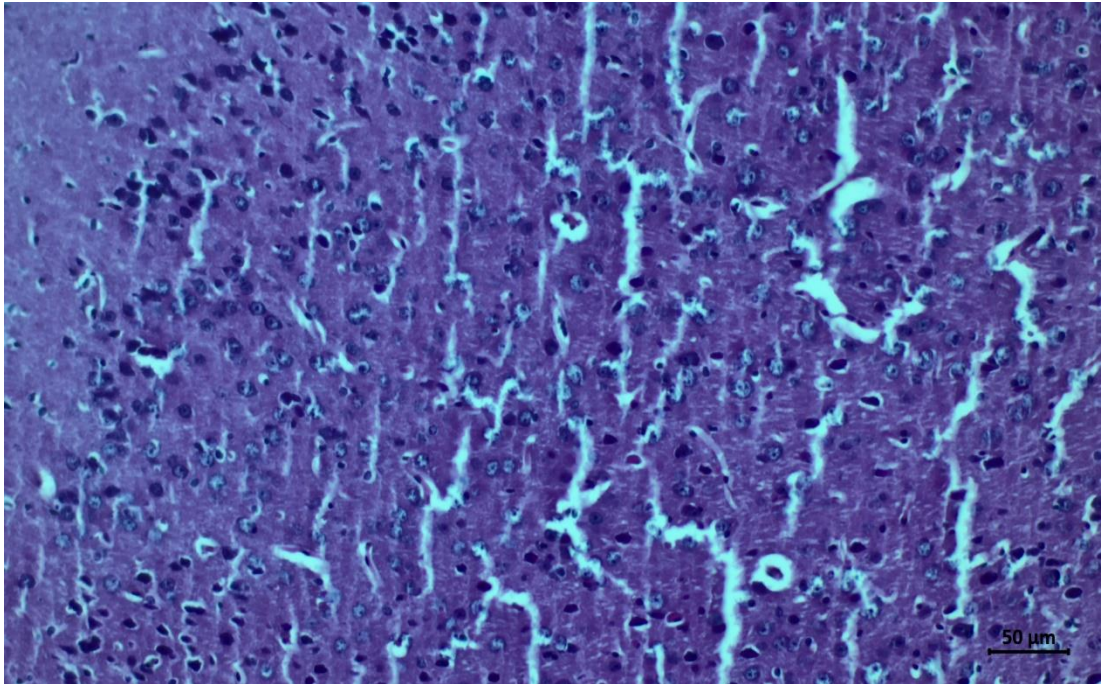
Resim 10. MET grubu beyin kesiti. Beyin korteksinde normal histolojik görünüm (H-E, Bar: 50 µm)

DM grubu: Beyin hücrelerinde vasküler dilatasyon, dejenerasyon ve piknozis izlendi (Resim 11).



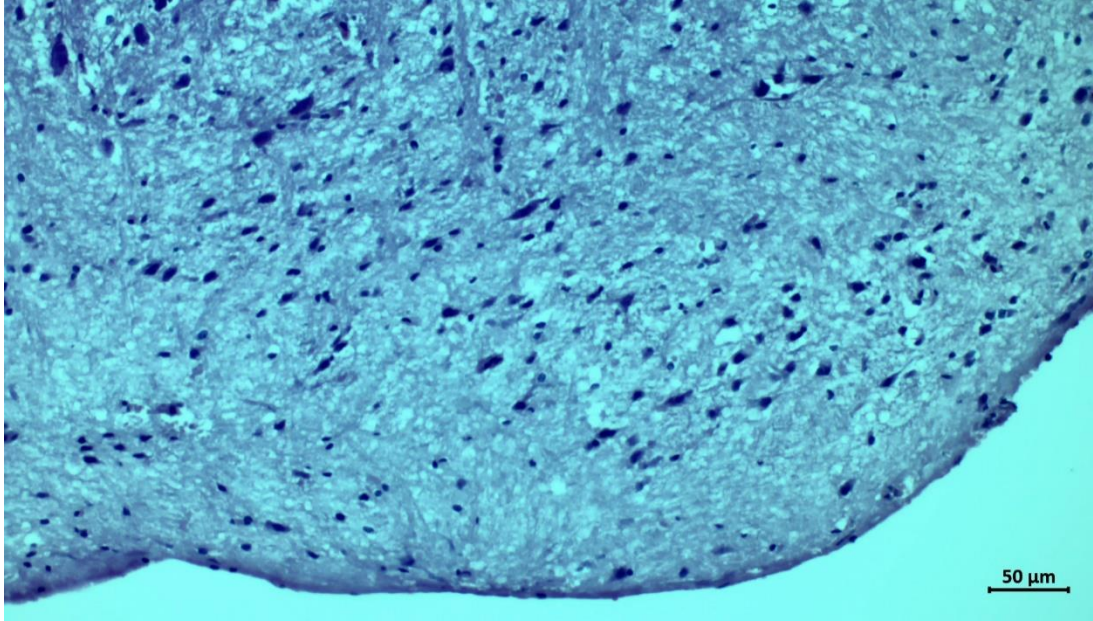
Resim 11. DM grubu beyin kesiti. Kırmızı ok: vasküler dilatasyon, siyah ok: nöronal dejenerasyon ve piknozisi ifade etmektedir (H-E, Bar: 50 µm).

DM+MİN grubu: DM grubunda gözlenen vasküler dilatasyon, dejenerasyon ve piknozisin azaldığı görülmüştür (Resim 12).



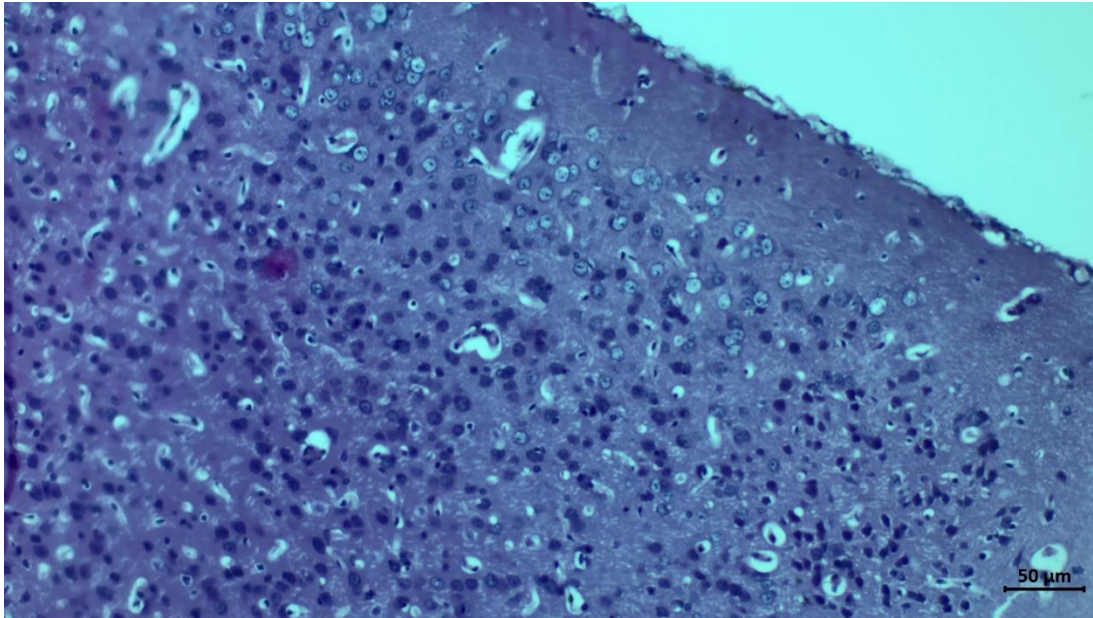
Resim 12. DM+MİN grubu beyin kesiti. (H-E, Bar: 50 µm).

DM+MET grubu: DM grubunda gözlenen vasküler dilatasyon, dejenerasyon ve piknozis azaldığı görülmüştür (Resim13).



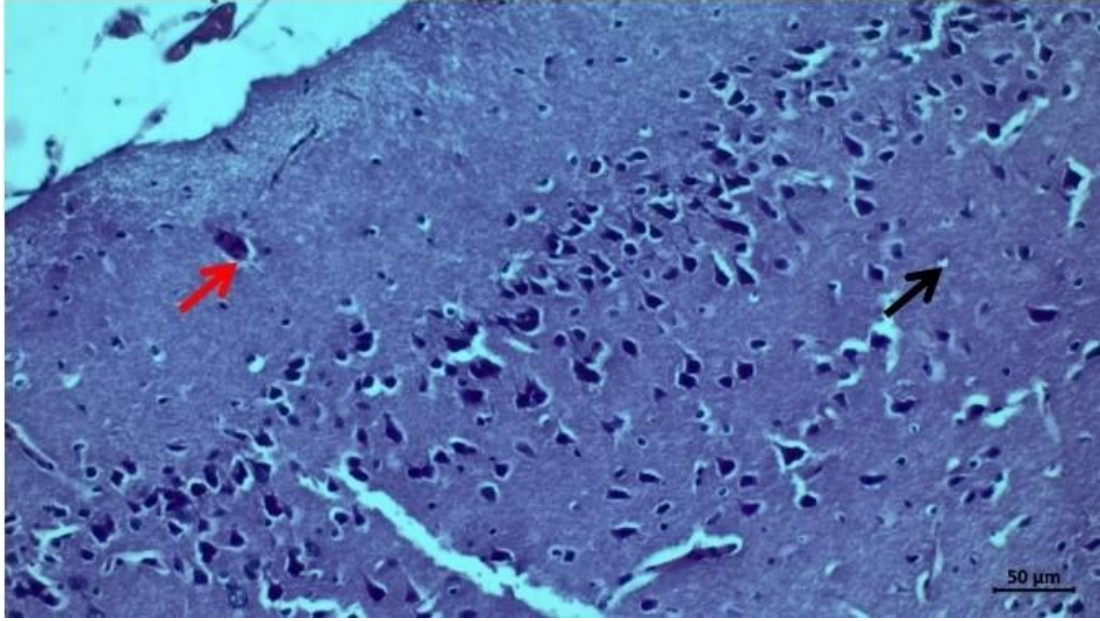
Resim 13. DM+MET grubu beyin kesiti (H-E, Bar: 50 µm).

DM+MET+MİN grubu: DM kaynaklı vasküler dilatasyon, dejenerasyon ve piknozis büyük oranda düzeldiği, kontrol grubuna yakın bir görünüm izlendi (Resim 14).



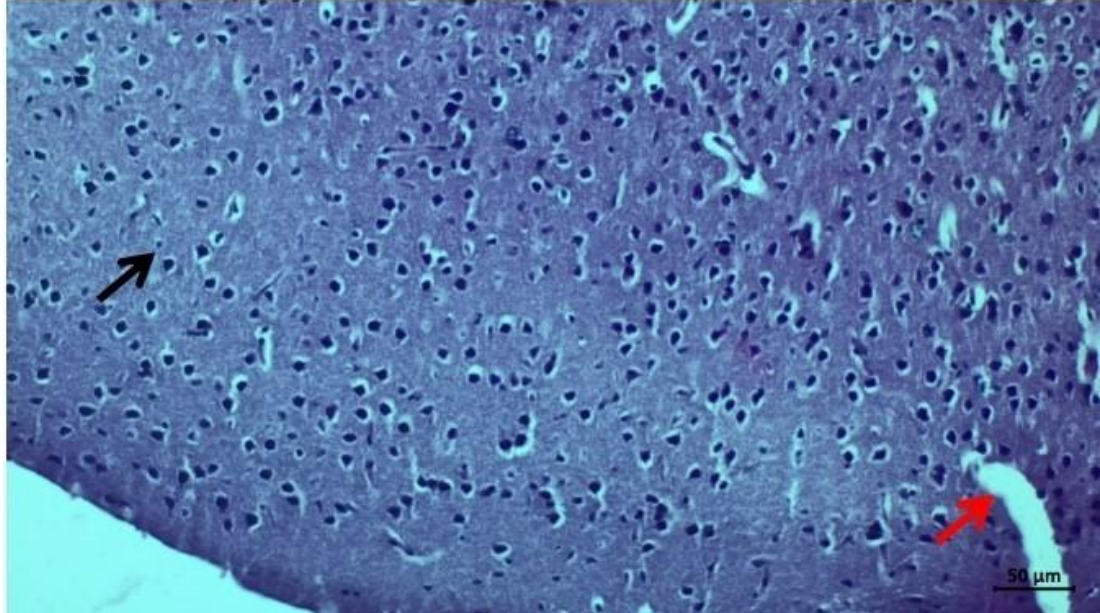
Resim 14. DM+MET+MİN grubu beyin kesiti (H-E, Bar: 50 µm).

DM+PİR grubu: Beyin hücrelerinde vasküler dilatasyon ve dejenerasyonun yer yer devam ettiği izlendi (Resim 15).



Resim 15. DM+PİR grubu beyin kesiti. Kırmızı ok: vasküler dilatasyon, siyah ok: nöronal dejenerasyon ve piknozisi göstermektedir (H-E, Bar: 50 µm).

DM+FLU grubu: Beyin hücrelerinde vasküler dilatasyon ve dejenerasyonun yer yer devam ettiği izlendi (Resim 16).

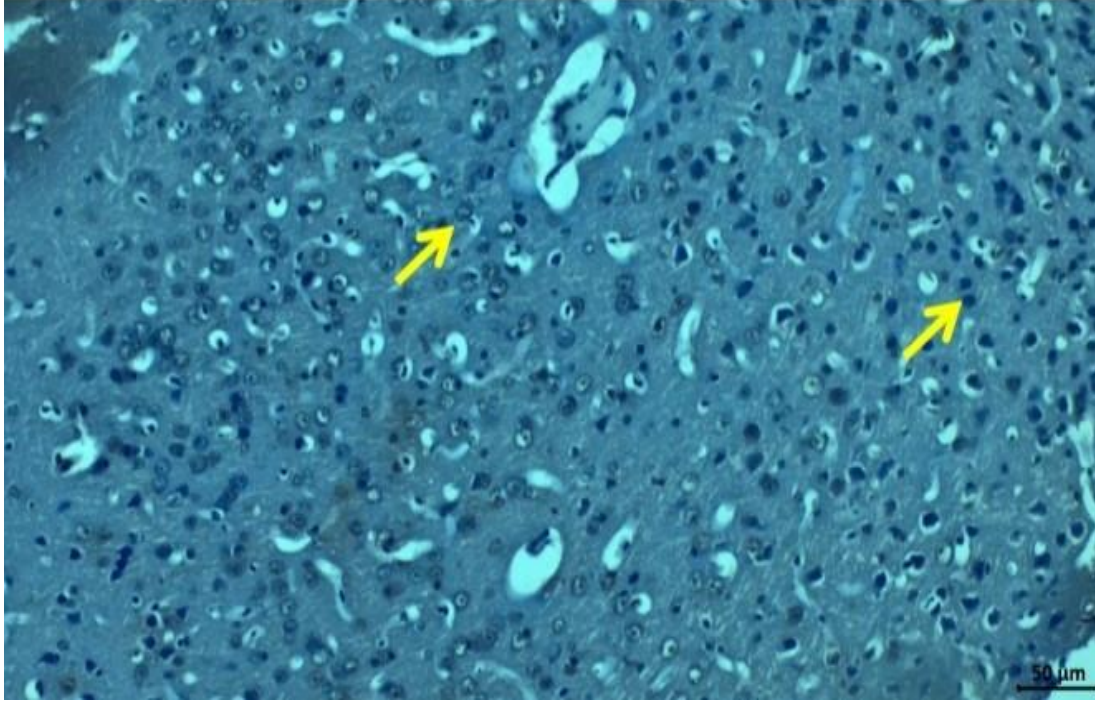


Resim 16. DM+FLU grubu beyin kesiti. Kırmızı ok: vasküler dilatasyon, siyah ok: nöronal dejenerasyon ve piknozisi göstermektedir (H-E, Bar: 50 µm).

5.13.2. İmmünohistokimyasal bulgular

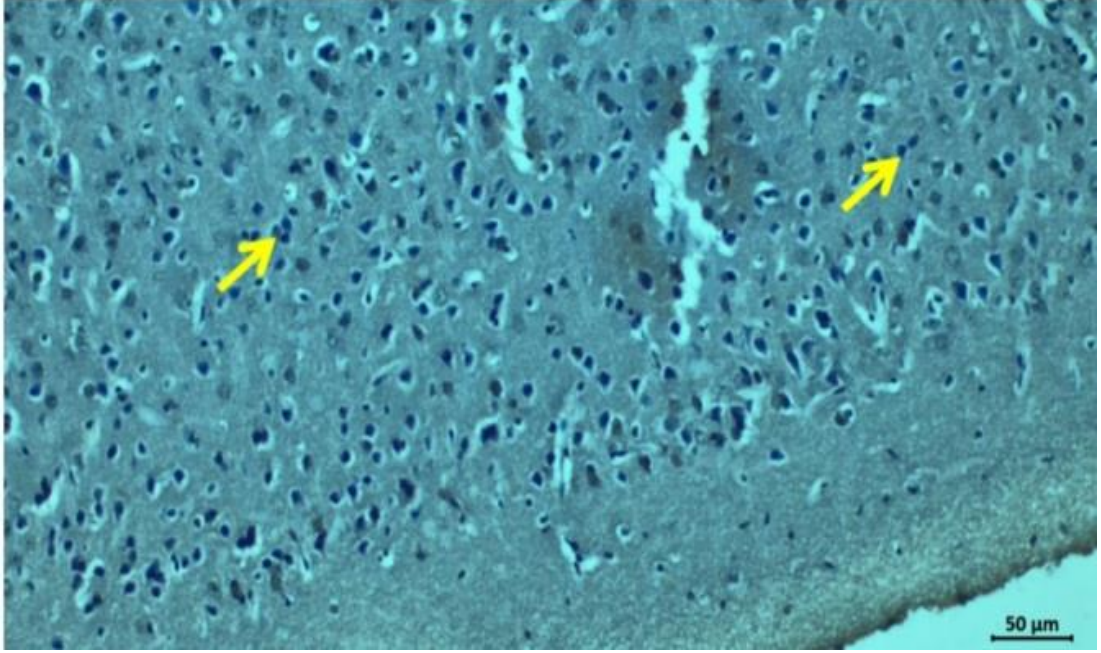
Deneklerden alınıp kesitlere ayrılan beyin dokularında immünohistokimyasal metod ile gerçekleştirilen iba-1 ekspresyon tayinine ait resimler aşağıda sunulmuştur.

Kontrol grubu: beyin kesitlerinde çoğunlukla negatif iba-1 ekspresyonu gözlendi (Resim 17).



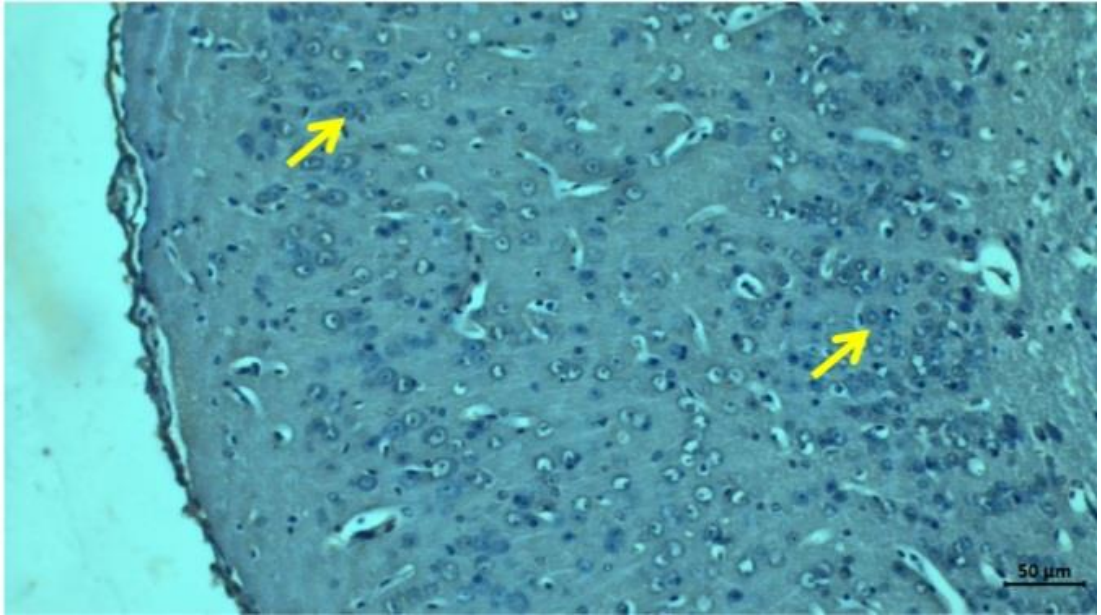
Resim 17. KONTROL grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama. Ekspresyonun negatif olduğu alanlar (sarı ok) (Anti-iba-1, Bar: 20 µm)

MİN grubu: beyin kesitlerinde çoğunlukla negatif iba-1 ekspresyonu gözlemlendi (Resim 18).



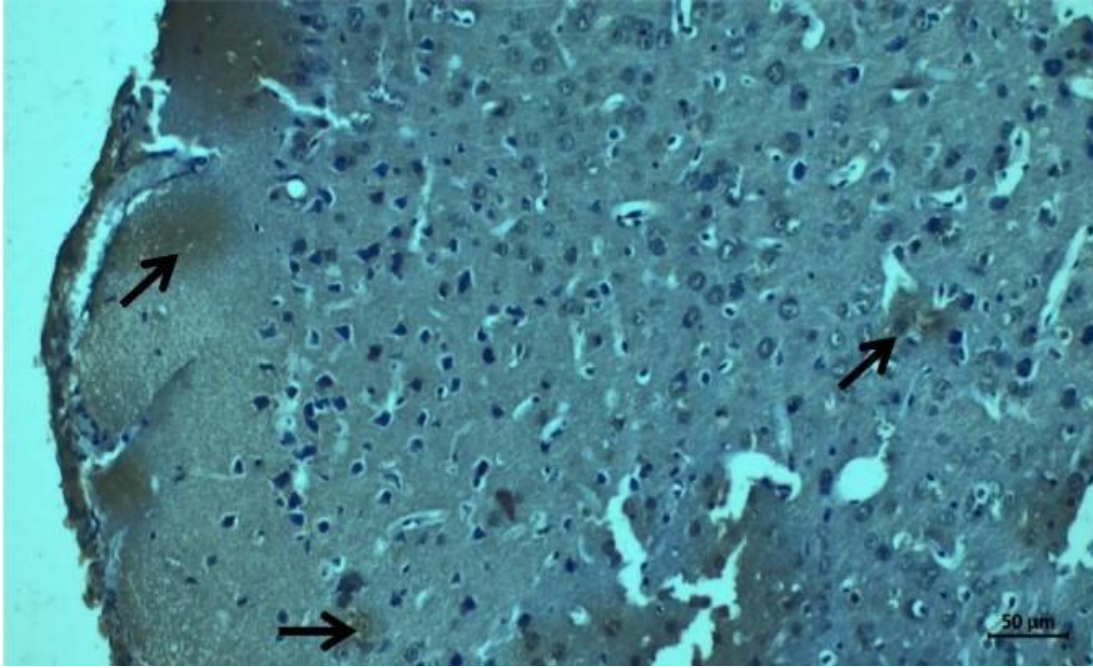
Resim 18. MİN grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama. Ekspresyonun negatif olduğu alanlar (sarı ok) (Anti-iba-1, Bar: 20 µm)

MET grubu: Beyin kesitlerinde çoğunlukla negatif iba-1 ekspresyonu gözlemlendi (Resim 19).



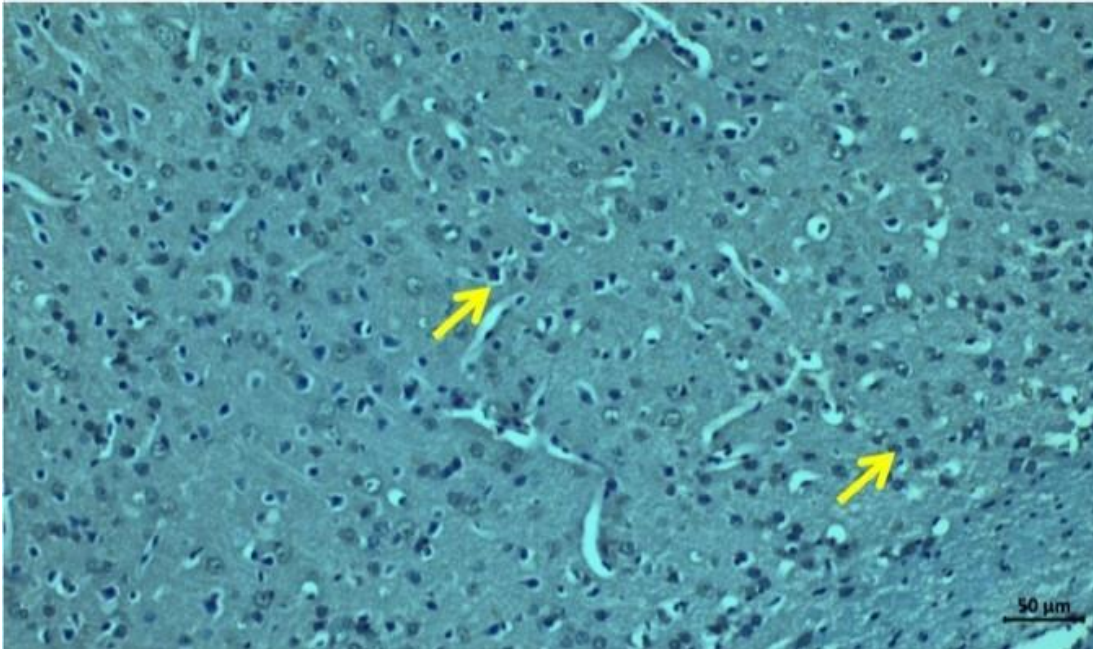
Resim 19. MET grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama. Ekspresyonun negatif olduğu alanlar (sarı ok) (Anti-iba-1, Bar: 20 µm)

DM grubu: Beyin kesitlerinde yoğun pozitif iba-1 ekspresyonu izlendi (Resim 20).



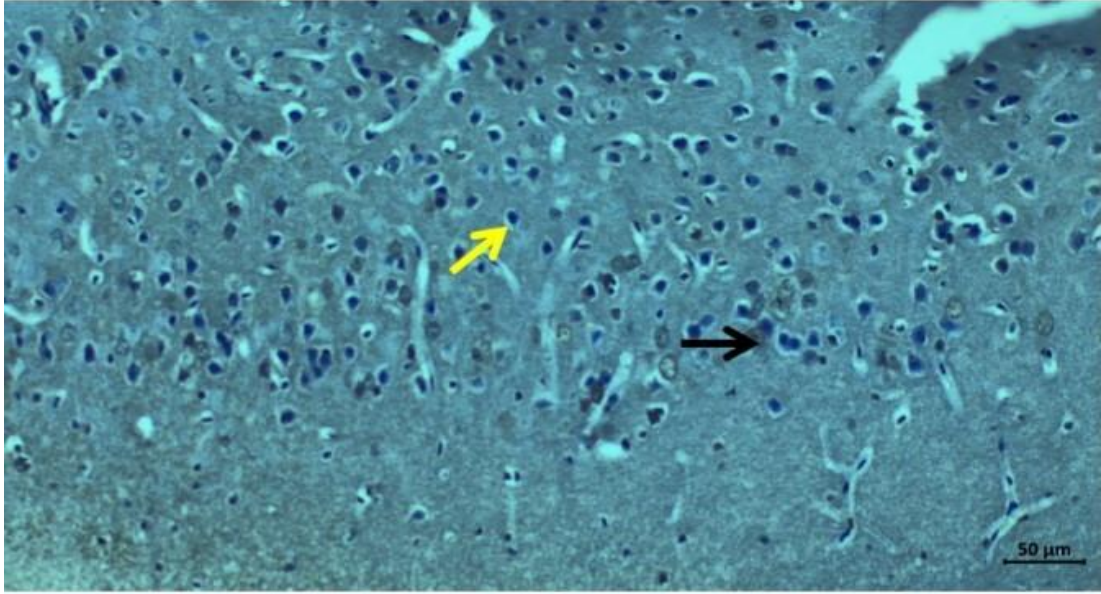
Resim 20. DM grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama. Serebral kortekste yoğun iba-1 immün reaksiyonu (siyah ok). (Anti-iba-1, Bar: 20 µm).

DM+MİN grubu: DM grubuna göre pozitif iba-1 ekspresyonunda önemli oranda azalma görüldü (Resim 21).



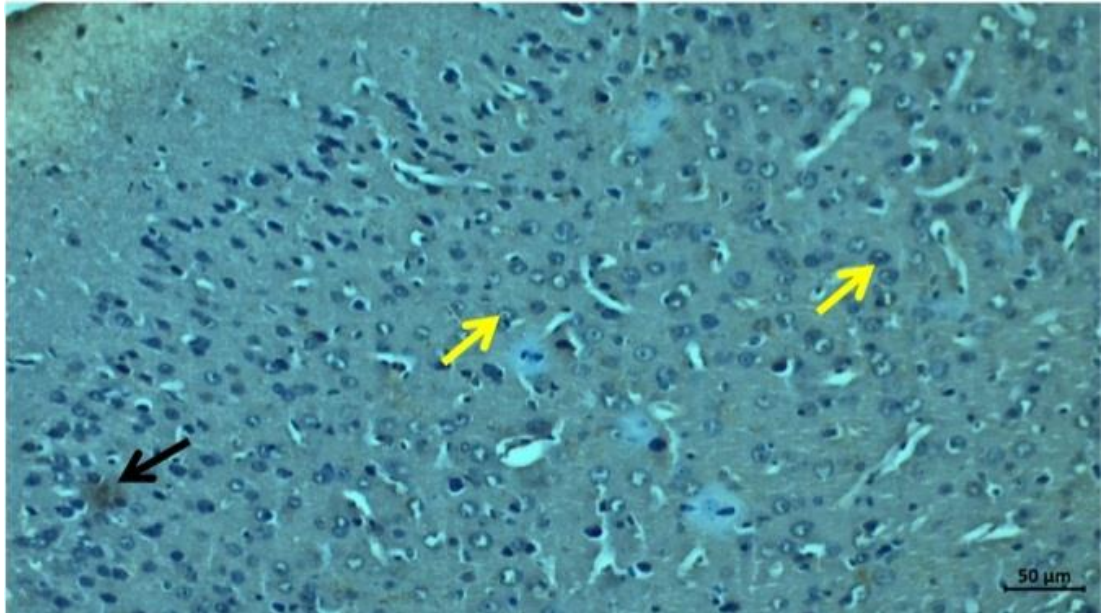
Resim 21. DM+MİN grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama. Ekspresyonun negatif olduğu alanlar (sarı ok) (Anti-iba-1, Bar: 20 µm)

DM+MET grubu: DM grubuna göre pozitif iba-1 ekspresyonunda önemli oranda azalma görüldü (Resim 22).



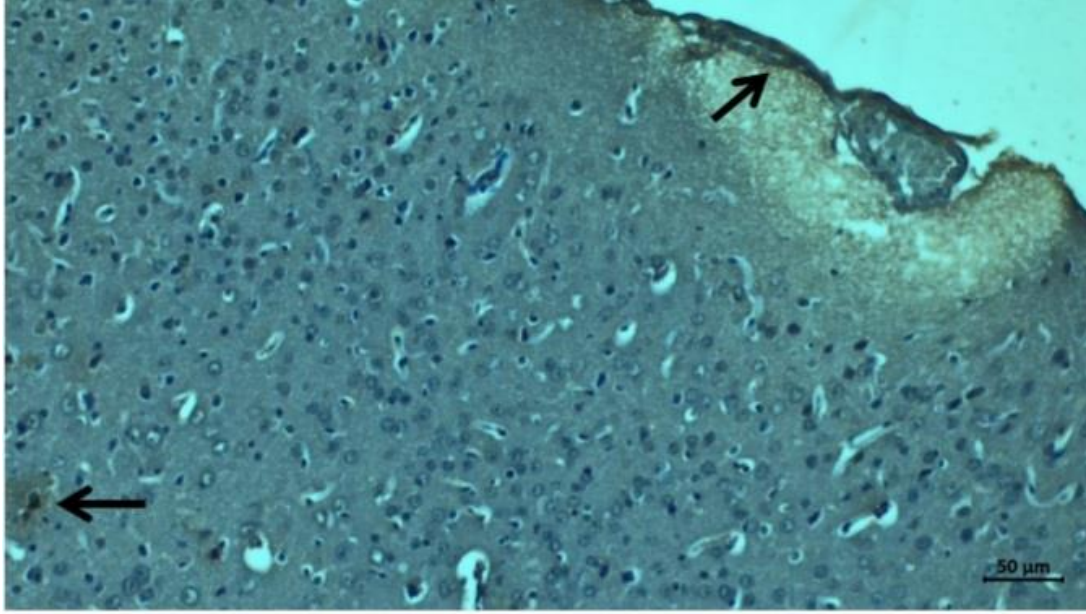
Resim 22. DM+MET grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama. Ekspresyonun negatif olduğu alanlar (sarı ok) (Anti-iba-1, Bar: 20 µm)

DM+MET+MİN grubu: DM grubuna göre pozitif iba-1 ekspresyonunda önemli oranda azalma görüldü (resim 23).



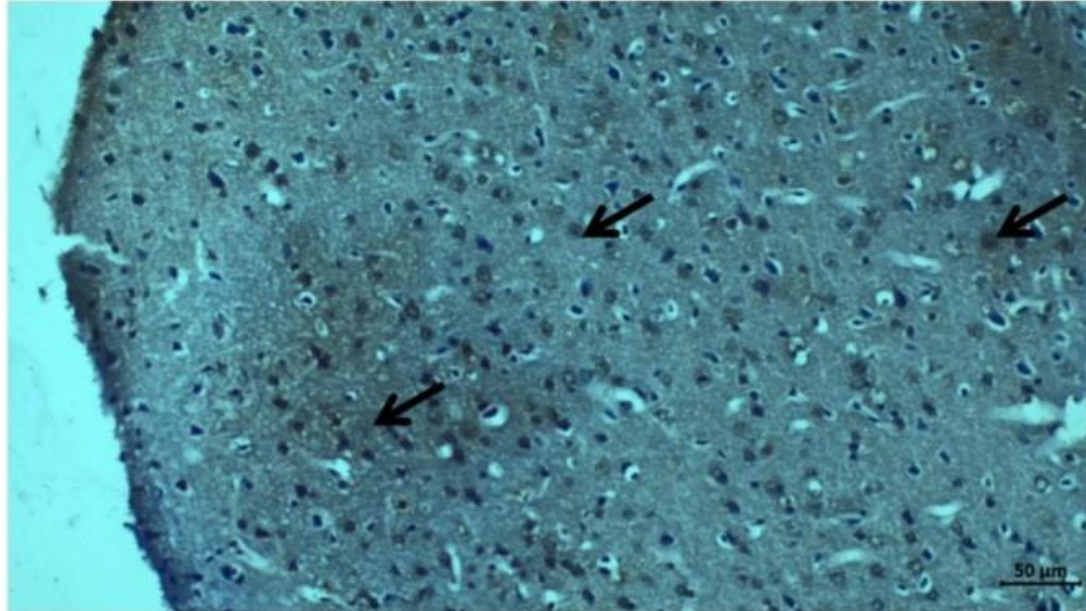
Resim 23. DM+MET+MİN grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama. Ekspresyonun negatif olduğu alanlar (sarı ok), ekspresyonun pozitif olduğu alanlar (siyah ok). (Anti-iba-1, Bar: 20 µm).

DM+FLU grubu: Iba-1 ekspresyonunun DM grubuna göre azaldığı ancak yoğunluğun devam ettiği izlendi (Resim 24).



Resim 24. DM+FLU grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama. Ekspresyonun pozitif olduğu alanlar (siyah ok). (Anti-iba-1, Bar: 20 µm).

DM+PİR grubu: DM grubuna benzer pozitif iba-1 ekspresyonu izlendi (Resim 25)



Resim 25. DM+PİR grubu iba-1 immunohistokimyasal boyama. Ekspresyonun pozitif olduğu alanlar (siyah ok). (Anti-iba-1, Bar: 20 µm).

6.TARTIŞMA

Diyabet kronik hiperglisemi ile seyreden metabolik bir bozukluktur. İnsülin direncinin de görüldüğü tip 2 diyabet, tüm diyabetlilerin %90-95' ini oluşturmaktadır. Diyabet ve mental bozuklukların (depresyon, anksiyete, kognitif bozukluklar) bir arada görülme olasılığı, ayrı ayrı görülmeleri olasılığından oldukça fazla bulunmuştur(44, 306, 307). Diyabete bağlı davranış ve bellek bozukluklarının patofizyolojisinde inflamasyonun önemine dikkat çekilmesi üzerine bu hastalıkların tedavisinde santral sinir sistemine kolayca geçebilmesi sebebiyle, ikinci kuşak tetrasiklin grubu bir antibiyotik olan minosiklin denenmeye başlanmıştır(4, 7, 106, 308). Bu amaçla yapılan çalışmalarda deneysel tip 2 diyabet modeli oluşturmak için, bu çalışmada da kullandığımız yüksek kalorili diyet ve STZ uygulaması sıklıkla tercih edilen ve kabul gören bir yöntem olmuştur(309-311).

Diyabet durumunda görülmesi beklenen kilo kaybı, bu çalışmada yüksek kalorili diyet ve STZ uygulaması ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde yüksek kalorili beslenme sonrası anlamlı bir ağırlık artışı, STZ uygulamasından sonra ise anlamlı bir kilo kaybı şeklinde gözlenmiştir. Bunun yanı sıra DM gruplarında AKG ve HbA1c düzeylerinde görülen artış diyabetik tablo ile bütünleşmektedir. Çalışmada diyabet durumunda fluoksetin haricindeki ilaçların ağırlık değişimi üzerine etkisinin bulunmadığı, metformin haricindeki ilaçların da AKG üzerine etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Ancak, yakın zamanda yapılan bir çalışmada, minosiklinin gümüş nanopartikülünün AKG' yi düşürdüğü bildirilmiştir(312).

Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi için gerçekleştirilen açık alan testinden elde edilen toplam kat edilen mesafe ve hız verisine göre gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu da diyabetin belirgin bir hareket kısıtlaması oluşturmadığını göstermektedir. Yapılan benzer bir çalışmada diyabetin lokomotor aktiviteyi baskıladığı(215), bir diğerinde ise lokomotor aktiviteyi etkilemediği belirtilmiştir(106).

Bu çalışmada, daha önce yapılan çalışmalarla benzer biçimde DM grubunun zorunlu yüzme testinde geçirdiği hareketsiz sürenin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiş(215, 313, 314) ve bu diyabete bağlı depresyon lehine yorumlanmıştır.

Zorunlu yüzme testinde DM grubunda görülen hareketsiz süre artışının fluoksetin, minosiklin ve metformin uygulamalarıyla geri çevrildiği gözlenmiştir. Bu da adı geçen ilaç uygulamaları ile antidepresan-benzeri etki oluştuğunu göstermektedir. DM+MET+MIN grubunda hareketsiz geçen sürenin DM+MIN grubundan fazla olmasının sebebi bu çalışmada metforminin lokomotor aktiviteyi az da olsa baskılamasına bağlanabilir. Çalışmada elde edilen veriler ile; diyabetin yol açtığı depresyon üzerine minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun en az fluoksetin kadar etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. STZ uygulanarak diyabet oluşturulan ratlarda kronik minosiklin (80mg/kg, p.o., 3 hafta) tedavisi ile zorunlu yüzme testinde geçirilen hareketsiz zamanın azaldığı gösterilmiştir(7). Başka bir çalışmada da benzer biçimde STZ ile diyabet oluşturulan farelere uygulanan minosiklinin (100mg/kg, p.o, 4 hafta) zorunlu yüzme testinde geçirilen hareketsiz zamanı azalttığı, bu etkinin pro-inflamatuar sitokin ve mikrogial aktivasyonun azalması yolu ile ortaya çıktığı bildirilmiştir(314). Çalışmamızda diyabet durumunda TNF- α , IL-6 pro-inflamatuar sitokinleri ve mikrogial hücrelerin aktive olduğunun göstergesi olan iba-1 ekspresyonu artışının, minosiklin ve minosiklin+metformin kombinasyonu ile geri çevrildiği gözlenmiştir. Bu nedenle, diyabete bağlı depresyonda inflammatuar yolağın ve mikrogial hücrelerin aktive olduğu, antidepresan etkinin bu yolağın baskılanması ile gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

Anksiyete düzeyinin belirlenmesi amacıyla açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirenti testleri yapılmıştır. Açık alan testinde deneklerin merkeze giriş sayıları ve merkezde geçirilen süreler DM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı biçimde düşük bulunmuştur. Yükseltilmiş artı labirenti testinde merkeze giriş sayıları yüzdesi ve merkezde geçirilen süre yüzdesi DM grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşük olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar diyabet ile ilişkili anksiyojenik etkilerin görüldüğü diğer çalışmalar ile örtüşmektedir(5, 206, 315, 316). İlk kez bu çalışma ile minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun diyabetin neden olduğu anksiyete üzerine etkisi araştırılmıştır. Minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonu hem açık alan hem de yükseltilmiş artı labirenti testi ile gösterildiği üzere diyabetin neden olduğu anksiyete üzerine fluoksetin ile benzer düzeyde etkili bulunmuştur. Daha önce yapılan bir çalışmada deneysel inme modelinde farelere uygulanan minosiklinin (30mg/kg, i.p., 14 gün) antidepresan ve

anksiyolitik etkiler gösterdiği bildirilmiş, bu etki minosiklinin nöroprotektif etkisine bağlanmıştır(317). Başka bir çalışmada ise, depresyon modeli oluşturmak için oldukça fazla kullanılan, kabul gören bir yöntem olan kronik hafif stres (8 hafta) uygulanan ratlara verilen minosiklinin (50mg/kg, i.p., 4 hafta) depresyon ve anksiyete benzeri davranış üzerine iyileştirici etkisi stres durumunda artan mikrogial aktiviteyi azaltmasına atfedilmiştir(318). Çalışmamızda da benzer şekilde diyabet durumunda artan mikroglia aktivitesinin göstergesi olan iba-1 ekspresyonu minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonu ile azalmıştır. Bu da anılan ilaçların anksiyolitik etkilerine, artan iba-1 ekspresyonunu azaltmalarının aracılık etmiş olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Emosyonel bellek performansının ölçüldüğü pasif sakınma testinde deneyin ilk günü deneklerin karanlık kısma geçtiklerinde verilen elektrik şokunu hatırlayarak karanlık kısma geçme dürtülerini bastırması ve 2. gün geçiş süresinin artması beklenmektedir. Oysa bu çalışmada diyabetin 2. gün geçiş süresini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da önemli oranda azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuç diyabet durumunda emosyonel belleğin bozulduğunu gösterse de, bu sonuca diyabet durumunda bozulan sinirsel iletilerin de sebep olabileceği düşünülebilir. Yapılan bir çalışmada STZ ve yüksek kalorili diyet ile diyabet oluşturulan ratlarda pasif sakınma testinde 2. gün geçiş süresinin azaldığı ve bu azalmanın beyinde asetilkolinesteraz (AChE), TNF- α , IL-1 β ve MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) düzeyinin artışı, glutatyon düzeyinin azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(4). Başka bir çalışmada da STZ ve yüksek kalorili diyet ile tip 2 diyabet oluşturulan ratlarda emosyonel bellekte görülen bozulma, GSH ve BDNF düzeyindeki azalma, MDA ve AChE düzeyindeki artış ile ilişkilendirilmiştir(319).

Pirasetam, nöroprotektif özelliği ile santral nörotransmitter sistemi etkilediği bilinen, kognitif bozukluk üzerine yapılan birçok araştırmada referans ilaç olarak tercih edilen nootropik bir ilaçtır(320). Bu çalışmada diyabet oluşturulup minosiklin, pirasetam, metformin ve minosiklin+metformin uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da pasif sakınma testinde 2. gün geçiş süresinin önemli oranda arttığı gözlenmiştir. Bahsi geçen ilaçların diyabet durumunda bozulan emosyonel bellek üzerine pirasetam kadar etkili olduğu, minosiklin+metformin kombinasyonunun, minosiklinin tek başına uygulanmasına göre anlamlı bir farklılık oluşturmadığı

sonucuna varılmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada yüksek kalorili diyet ve STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda bozulan emosyonel belleğin minosiklin (50 mg/kg, 15 gün) uygulaması ile düzeldiği gösterilmiş, bu etkiden minosiklinin anti-inflamatuar ve anti-oksidan özellikleri ile hipokampal nöron hasarından koruması sorumlu tutulmuştur(4). Çalışmamızda da emosyonel bellekte gözlenen bozulma ile paralel olarak diyabet grubunda MDA düzeyinde artış ile ifade edilen lipit peroksidasyonu artışı, TNF- α ve IL-6 ile ifade edilen inflamasyon artışı görülmüş, minosiklin ve minosiklin+metforminin anti-inflamatuar ve anti-oksidan etkileri ile bozulan emosyonel bellek performansını iyileştirdiği düşünülmüştür. Anılan parametreler üzerine minosiklin ve minosiklin+metformin kombinasyonunun pirasetamdan daha etkili olması pirasetamın emosyonel bellek üzerine gösterdiği etkiyi farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Yabancı obje tanıma testi, kemirgenlerin herhangi bir pekiştirme olmaksızın, doğal keşif ve merak duyguları ile gösterdikleri davranışları inceleyerek hipokampus bağlantılı kısa süreli görsel öğrenme-bellek düzeylerini değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır(321). Epizodik belleğinde hasar olmayan deneklerin yeni obje etrafında geçirdikleri sürenin artması beklenmektedir. Yaptığımız çalışmada bu test ile eski-yeni obje etrafında geçirilen toplam sürenin, yeni obje etrafında geçirilen süreye oranı şeklinde ifade edilen ayırt etme indeksinin DM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuç literatür ile benzer biçimde diyabetin kısa süreli görsel hafızayı bozduğunu göstermektedir(319, 322). Çalışmamızda yabancı obje tanıma testi ile diyabet durumunda bozulan kısa süreli epizodik belleğin, pirasetam uygulaması ile düzeldiği gösterilmiştir. Ancak, tüm diyabet+ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da diyabet grubuna göre ayırt etme indeksinde belirgin artışlar olduğu gözlenmiş, diyabet durumunda bozulan epizodik bellek üzerine çalışmamızda uygulanan tüm ilaçların etkili olabileceği düşünülmüştür. Daha evvel diyabet durumunda bozulan epizodik bellek üzerine minosiklinin etkisinin incelendiği çalışma bulunmamakla birlikte, önceki bir çalışmada postnatal intrahipokampal lipopolisakkarit enjekte edilerek şizofreni benzeri tablo oluşturulan ratlara uygulanan minosiklinin (40 mg/kg, intagastrik, 14 gün) yabancı obje tanıma testinde hatırlama yetilerini iyileştirdiği gösterilmiştir(323). Bunun nedeni diyabet durumunda artan mikrogial aktivasyon gibi şizofreni benzeri tabloda da mikrogia

aktivitesinin göstergesi olarak kullanılan iba-1 düzeyinin artışı ve bu artışı minosiklinin geri çevirmesi olarak ifade edilmiştir. Çalışmamızda da diyabet durumunda artan iba-1 ekspresyonu, minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonu ile azalmış, bu da literatür ile benzer biçimde epizodik bellek bozukluğunun mikrogliyal aktivitede görülen artış ile ilişkili olduğu ve anılan ilaçların mikrogliyal aktiviteyi azaltmak sureti ile etki gösterdiği şeklinde düşünülmüştür.

Modifiye yükseltilmiş artı labirenti testi uzaysal öğrenme-bellek düzeyini değerlendirmek için kullanılmaktadır. Buna göre, deneyin ilk günü kapalı kolları, kapalı kollara giden yolu ve çevresel işaretleri öğrenen deneklerin, ikinci gün daha kısa sürede kapalı kola geçmeleri beklenmektedir. Çalışmamızda DM grubunun 2. gün kaydedilen kapalı kola geçiş süresi kontrol grubuna göre anlamlı biçimde artmıştır. Bu da literatür ile benzer biçimde diyabet durumunda uzaysal öğrenme-bellekte bozulma meydana geldiğini göstermiştir(324). Çalışmamızda modifiye yükseltilmiş artı labirenti testinde diyabet grubunda artan 2. gün kapalı kola geçiş süresinin; minosiklin, fluoksetin, pırasetam ve metformin+minosiklin uygulamaları ile azaldığı gözlenmiştir. Bu da anılan ilaçların diyabet durumunda bozulan uzaysal bilişsel fonksiyonları iyileştirdiğini göstermektedir. İlk kez bu çalışma ile minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun diyabetin neden olduğu uzaysal öğrenme-bellek üzerine etkisi araştırılmıştır. Önceki bir çalışmada ratlarda nikotin ile oluşturulan nörodejenerasyon ve uzaysal öğrenme-bellek fonksiyonlarını değerlendirmek için kullanılan bir başka test olan morris su labirenti testi ile gösterilen kognitif bozukluk için uygulanan minosiklinin (40mg/kg, i.p., 21 gün) uzaysal öğrenme üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu, bu etkinin oksidatif stres, inflamasyon, apoptotik göstergeleri azaltması ve BDNF düzeyini artırması ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür(325). Yaptığımız çalışma da diyabet ile artan TNF- α ve IL-6 proinflamatuvar sitokinleri ile inflamasyonun, azalan BDNF düzeyi ile nörodejenerasyonun, artan MDA düzeyi ile lipid peroksidasyonunun oluştuğunu, tüm bu parametreleri minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun tersine çevirdiğini göstermektedir. Bu da minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun diyabet durumunda bozulan uzaysal öğrenme bellek üzerine etkisinde bahsi geçen mekanizmaların katkısı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda Hot Plate (HP) testi ile DM grubunda ağrılı uyarandan sakınma süresinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttığı yani ağrı duyumsamasının azaldığı gösterilmiştir. Daha evvel yapılan bir çalışmada STZ uygulanarak diyabet oluşturulan ratlarda da HP testinde sakınma süresinin arttığı, bu durumun demiyelinizasyon, sinir dejenerasyonu ve oksidatif stres ile ilişkilendirilen diyabetik nöropatiye işaret eden sonuçlardan biri olduğu belirtilmiştir(326). Ayrıca çalışmamızda diyabet durumunda artan ağrılı uyarandan sakınma süresinin minosiklin, fluoksetin ve metformin+minosiklin uygulaması ile anlamlı biçimde azaldığı gözlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada da STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda minosiklin (40-80 mg/kg, 14 gün) uygulaması ile ağrılı uyarandan sakınma süresinin azaldığı gösterilmiştir. Bu azalma; TNF- α , IL-1 β gibi pro-inflamatuar sitokin düzeyinde görülen azalma, lipid peroksidasyonunda azalma, SOD ve nitrit konsantrasyonunda artış gibi oksidatif stres ile ilgili parametrelerde görülen iyileşme ile ilişkilendirilmiştir(327).

Hipokampal doku, depresyon, anksiyete ve biliş gibi nörodavranışsal süreçlerde rolü olduğu bilinen limbik yapılardan biridir. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, diyabet durumunda DNA ve proteinleri etkileyerek oksidatif hasara neden olmaktadır(328). Diyabete bağlı görülen kognitif bozukluklar(4, 329), depresyon ve anksiyetede(105, 330) oksidatif stresin rolü olduğu daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hipokampal MDA düzeyinin DM grubunda kontrol grubuna göre belirgin biçimde arttığı, artan MDA düzeyinin DM+MİN ve DM+MET+MİN gruplarında azaldığı gözlenmiştir. Bu da diyabete bağlı görülen davranışsal ve kognitif bozukluklarda etkili mekanizmalardan birinin oksidatif stres artışı olabileceğini, minosiklin ve minosiklin+metformin kombinasyonunun oksidatif stresi azaltarak etki gösterdiğini düşündürmüştür. Minosiklinin santral sinir sistemi bozukluklarındaki nöroprotektif etkisine antioksidan özelliğinin aracılık ettiği bilinmektedir(9). 2019 yılında yapılan bir çalışmada diyabete bağlı kognitif bozukluk oluşturulan ratlara uygulanan minosiklin tedavisinin diyabet durumunda azalan GSH düzeyini arttırmak suretiyle oksidatif stresi normale döndürdüğü, diyabete bağlı kognitif bozuklukta iyileşmenin nedenlerinden birinin de oksidatif stresi önlemek olduğu ileri sürülmüştür(4). Yapılan bir diğer çalışmada

kronik hafif stres uygulanan ratlara verilen minosiklin tedavisinin oksidatif hasarı minimize ettiği, artan MDA düzeyini azalttığı gösterilmiştir(331).

Çalışmamızda DM grubunda kontrol grubuna göre TNF- α ve IL-6 protein ekspresyonunun artışı inflamatuvar yolağın diyabet patojenezindeki önemine işaret etmektedir. Literatür de çalışmamız ile benzer biçimde diyabet durumunda görülen inflamasyon ile depresyon(106, 314), anksiyete(215, 316) ve kognitif bozukluklar(4, 332) arasında bir ilişkinin varlığına dikkat çekmektedir(308, 333). Bu çalışmada diyabet durumunda artan TNF- α ve IL-6 düzeylerinin DM+ilaç gruplarında azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmamıza benzer biçimde 2019 yılında gerçekleştirilen çalışmada diyabete bağlı kognitif bozukluğun tedavisinde kullanılan minosiklinin (50 mg/kg, 15 gün) TNF- α düzeyini düşürdüğü, kognitif bozukluğun anti-inflamatuvar mekanizmalar yoluyla giderildiği belirtilmiştir(4). Başka bir çalışma ile de minosiklinin diyabete bağlı bozulan uzaysal bellekte iyileşme oluşturduğu ve bu iyileşmenin mekanizmalarından birinin diyabet durumunda artan TNF- α ekspresyonunu düşürmek şeklinde olduğu ileri sürülmüştür (334). 2021 yılında yapılan oldukça önemli bir çalışmada diyabet ile ilişkili depresyonun sebeplerinden birinin TNF- α artışı olduğu, zaten deneklere TNF- α verildiğinde depresyon benzeri davranış gözlemlendiğini ve TNF- α artışının minosiklin ile geri çevrilerek anti-depresan benzeri etki görüldüğü bildirilmiştir(314). Başka bir çalışmada da diyabet oluşturulan ratlara uygulanan minosiklinin Alzheimer ile ilişkili olarak artan A β proteini ekspresyonu ve tau proteini hiperfosforilasyonunu; TNF- α , IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinleri azaltıp nöroinflamasyonu inhibe etmek suretiyle azalttığı savunulmuştur(335).

BDNF, temel olarak nörojenezis, nöronal apoptozis, rejenerasyon ve sinaptik plastisite ile ilişkili olan nörotrofin alt familyasından bir proteindir. Birçok psikiyatrik hastalık ve çeşitli nörodejeneratif bozukluğun patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Depresif hastaların beyinde BDNF düzeyi düşük ve hipokampus ile prefrontal korteks boyutu küçük bulunmuştur. Diyabete bağlı depresyon durumunda da BDNF düzeylerinin düştüğü, antidepresan ilaçlar ile tedavi sonrası normal seviyeye geldiği görülmüştür(336, 337). Bazı çalışmalar da oksidatif hasar artışının BDNF düzeyinde azalmaya yol açarak kognitif bozukluğa neden olduğunu belirtmiştir(338, 339). Yapılan bu çalışma ile de istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da diyabet durumunda

BDNF düzeyinin düştüğü, azalan BDNF düzeyinin minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonu ile fluoksetinden ve pirasetamdan daha fazla yükseldiği gözlenmiştir. Bu sonuç davranış testleri ile gözlemlediğimiz diyabete bağlı depresyon ve kognitif bozukluğun tedavisinde, minosiklin ve minosiklin+metformin kombinasyonunun fluoksetin ve pirasetam ile benzer düzeyde etki göstermesini açıklayan parametrelerden biri olmuştur. Diyabet durumunda bozulan davranışsal ve kognitif bozuklukların tedavisinde uygulanan minosiklin ve minosiklin+metforminin etkisinin BDNF ile ilişkilendirildiği bir çalışma bulunmamakla birlikte önceki bir çalışmada ratlarda nikotin ile oluşturulan nörodejenerasyon ve kognitif bozukluk tedavisi için uygulanan minosiklinin (40mg/kg, i.p., 21 gün) uzaysal öğrenme üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu, bu etkiye aracılık eden mekanizmalardan birinin azalan BDNF düzeyini arttırmak olduğu ileri sürülmüştür(325). Başka bir çalışmada da diyabetik nöropati oluşturulan ratlara uygulanan minosiklinin etkisine diyabet durumunda azalan BDNF düzeyini arttırmasının aracılık ettiği belirtilmiştir(340).

Yapılan bu çalışmada ile immünohistokimyasal olarak beyin dokusu kesitlerinde izlenen ve western blot yöntemi ile ölçülen iba-1 ekspresyon düzeyinin DM grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde arttığı, artan ekspresyonun minosiklin, metformin, fluoksetin, metformin+minosiklin uygulamaları ile anlamlı şekilde azaldığı, gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür. Önceki çalışmalar daha fazla toksik molekül ve pro-inflamatuar sitokin salınımına neden olan iba-1 ekspresyonunun diyabet durumunda arttığını belirtmiştir(341-343). Bunun yanı sıra diyabette görülen iba-1 ekspresyon artışı; depresyon(314), anksiyete(344) ve kognitif bozukluk(345) ile ilişkilendirilmiştir. Diyabete bağlı anksiyete ve kognitif bozukluk durumunda minosiklin uygulamasının artan mikrogial aktivite ile ilişkisi daha evvel çalışılmamıştır. Ancak önceki bir çalışmada deney hayvanlarında oluşturulan anksiyete modelinde minosiklinin anksiyolitik etkisine artan iba-1 ekspresyonunu azaltmasının aracılık ettiği gösterilmiştir(344). Ayrıca, Sakurai ve ark. 2021 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada oluşturulan deneysel diyabete bağlı depresyonun tedavisinde uygulanan minosiklinin hipokampal dokuda artan mikrogia aktivasyonunu azaltmak sureti ile etki gösterdiği ileri sürülmüştür(314).

Çalışmada gerçekleştirilen histopatolojik incelemelerde DM grubunda izlenen vasküler dilatasyon, dejenerasyon ve apoptotik yolağın indüklendiğine işaret eden piknozis görünümünün metformin, minosiklin ve metformin+minosiklin uygulamaları ile önemli oranda azaldığı izlendi. Bu da diyabet ile oluşan hücresel hasarın anılan ilaç uygulamaları ile iyileşme gösterdiğine işaret etmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada piknotik hasarın da eşlik ettiği dejenerasyonun öğrenme bellek bozukluklarına neden olduğu belirtilmiştir(346). 2020 yılında yapılan bir çalışmada minosiklinin; ratlarda nikotinin CREB/BDNF yolağını inhibe ederek oluşturduğu nörodejenerasyon ve kognitif bozukluğu, oksidatif stres, nörodejenerasyon, inflamasyon ve apoptozu minimize ederek gösterdiği nöroprotektif etkisi ile, iyileştirdiği gösterilmiştir(325). Çalışmamızda minosiklin, metformin, minosiklin+metformin uygulamaları ile iyileşme gösteren piknozis, dejenerasyon ve diyabet ile azalan BDNF düzeylerinde gözlenen artma, artan oksidatif stres ve inflamasyonun azalması birlikte değerlendirildiğinde, gözlediğimiz kognitif iyileşmenin minosiklinin nöroprotektif etkisi aracılığı ile gerçekleşmiş olabileceği düşünülebilir.

7.SONUÇ VE ÖNERİLER

Diyabet, dünyada görülme sıklığı giderek artan metabolik bir bozukluktur. Tip 2 diyabet ve hastalığa bağlı komplikasyonların yüksek kalorili diyet ve streptozotosin uygulaması ile insandakine en yakın biçimde modellenebileceği belirtilmiştir.

Minosiklinin; gerek diyabet durumunda uyarılan gerekse son zamanlarda davranışsal ve bilişsel bozukluk gelişimine zemin hazırladığı işaret edilen inflamasyon, oksidatif stres, mikrogial aktivasyon artışı ve nörodejenerasyon üzerine etki göstermesi, metforminin de diyabete bağlı bozulan metabolizmayı düzenlemesi tek başına minosiklinin ve metformin ile kombinasyonunun diyabete bağlı davranışsal ve bilişsel bozukluklar üzerine iyi bir tedavi alternatifi olabileceğini düşündürmüştür.

Antidepresan etkinin mevcut tedavide yaklaşık 3 haftalık süre sonunda gözlenmeye başladığı klasik antidepresan tedavilerin etki oluşturmaları için haftalar geçmesi gerektiği ve bu süreçte görülen yan etkilerden dolayı hastanın tedaviye uyuncunun azaldığı, tedaviyi sürdürmede sorunlar yaşandığı ve tedavi başarısının azaldığı bilinmektedir. Ayrıca hem diyabetin hem de depresyonun neden olduğu anksiyete ve kognitif bozukluklar, hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Güncel literatürde; diyabete bağlı kognitif bozuklukların ilerleyerek Alzheimer hastalığına zemin hazırladığı, kan glukoz düzeyi yüksekliği ile seyreden Alzheimer' ın tip 3 diyabet olarak nitelendirilebileceği vurgulanmaktadır. Bu sebeptendir ki diyabete bağlı depresyon, anksiyete ve kognitif bozukluğun tedavi edilmesi oldukça önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun diyabete bağlı depresyon, anksiyete ve kognitif bozukluklar üzerine iyileştirici etkiler gösterdiği, minosiklinin tek başına veya metformin ile kombinasyonunun benzer derecede etkili olduğu görülmüştür. Bu etkide, lipit peroksidasyonun, nörodejenerasyonun, mikrogial aktivasyonun azalması ile anti-inflamatuvar etkinin rolü olduğu görülmüştür. Yapılacak ileri çalışmalar ile bu etkiden sorumlu mekanizmalar üzerinden etki gösterebilecek alternatif tedaviler geliştirilebilecektir.

8.KAYNAKLAR

1. Magalhaes DA, Kume WT, Correia FS, Queiroz TS, Allebrandt Neto EW, Santos MPD, et al. High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91(1):e20180314.
2. Siddiqui S. Depression in type 2 diabetes mellitus--a brief review. *Diabetes Metab Syndr.* 2014;8(1):62-5.
3. Cassano V, Leo A, Tallarico M, Nesci V, Cimellaro A, Fiorentino TV, et al. Metabolic and Cognitive Effects of Ranolazine in Type 2 Diabetes Mellitus: Data from an in vivo Model. *Nutrients.* 2020;12(2).
4. Mehta BK, Banerjee S. Minocycline reverses diabetes-associated cognitive impairment in rats. *Pharmacol Rep.* 2019;71(4):713-20.
5. 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.
6. Banerjee S, Walseth TF, Borgmann K, Wu L, Bidasee KR, Kannan MS, et al. CD38/cyclic ADP-ribose regulates astrocyte calcium signaling: implications for neuroinflammation and HIV-1-associated dementia. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008;3(3):154-64.
7. Amorim D, Puga S, Braganca R, Braga A, Pertovaara A, Almeida A, et al. Minocycline reduces mechanical allodynia and depressive-like behaviour in type-1 diabetes mellitus in the rat. *Behav Brain Res.* 2017;327:1-10.
8. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.* 2013;4:e525.
9. Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *J Neurochem.* 2005;94(3):819-27.
10. Noble W, Garwood CJ, Hanger DP. Minocycline as a potential therapeutic agent in neurodegenerative disorders characterised by protein misfolding. *Prion.* 2009;3(2):78-83.

11. Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci.* 2015;38(10):637-58.
12. Kim HS, Suh YH. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res.* 2009;196(2):168-79.
13. Leite LM, Carvalho AG, Ferreira PL, Pessoa IX, Goncalves DO, Lopes Ade A, et al. Anti-inflammatory properties of doxycycline and minocycline in experimental models: an in vivo and in vitro comparative study. *Inflammopharmacology.* 2011;19(2):99-110.
14. Buckner RL, Krienen FM, Castellanos A, Diaz JC, Yeo BT. The organization of the human cerebellum estimated by intrinsic functional connectivity. *J Neurophysiol.* 2011;106(5):2322-45.
15. Van Essen DC, Donahue CJ, Glasser MF. Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex. *Brain Behav Evol.* 2018;91(3):158-69.
16. Jurado MB, Rosselli M. The elusive nature of executive functions: a review of our current understanding. *Neuropsychol Rev.* 2007;17(3):213-33.
17. Teffer K, Semendeferi K. Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. *Prog Brain Res.* 2012;195:191-218.
18. Arushanyan EB, Beier EV. The hippocampus and cognitive impairments. *Neurosci Behav Physiol.* 2008;38(8):751-8.
19. Daumas S, Halley H, Frances B, Lassalle JM. Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem.* 2005;12(4):375-82.
20. Maren S, Quirk GJ. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(11):844-52.
21. Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev.* 2003;83(3):803-34.
22. Delgado MR, Olsson A, Phelps EA. Extending animal models of fear conditioning to humans. *Biol Psychol.* 2006;73(1):39-48.
23. Janak PH, Tye KM. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature.* 2015;517(7534):284-92.
24. Tovote P, Fadok JP, Luthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(6):317-31.

25. Barco A, Bailey CH, Kandel ER. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem.* 2006;97(6):1520-33.
26. Butz M, Worgotter F, van Ooyen A. Activity-dependent structural plasticity. *Brain Res Rev.* 2009;60(2):287-305.
27. Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci.* 2006;100(5):433-42.
28. Morris RG. D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Res Bull.* 1999;50(5-6):437.
29. Bastrikova N, Gardner GA, Reece JM, Jeromin A, Dudek SM. Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):3123-7.
30. Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci.* 2006;9(9):1117-24.
31. De Paola V, Holtmaat A, Knott G, Song S, Wilbrecht L, Caroni P, et al. Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex. *Neuron.* 2006;49(6):861-75.
32. Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, et al. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature.* 2002;420(6917):788-94.
33. Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(9):647-58.
34. Duman RS, Aghajanian GK. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science.* 2012;338(6103):68-72.
35. Toda T, Gage FH. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res.* 2018;373(3):693-709.
36. Kayaalp pdO. Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji ankara: Pelikan Yayıncılık; 2012.
37. Alam U, Asghar O, Azmi S, Malik RA. General aspects of diabetes mellitus. *Handb Clin Neurol.* 2014;126:211-22.

38. Vancampfort D, Correll CU, Gallinger B, Probst M, De Hert M, Ward PB, et al. Diabetes mellitus in people with schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder: a systematic review and large scale meta-analysis. *World Psychiatry*. 2016;15(2):166-74.
39. Biessels GJ, Despa F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(10):591-604.
40. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25.
41. Yaribeygi H, Ashrafizadeh M, Henney NC, Sathyapalan T, Jamialahmadi T, Sahebkar A. Neuromodulatory effects of anti-diabetes medications: A mechanistic review. *Pharmacol Res*. 2020;152:104611.
42. Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2008;8(3):186-200.
43. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomed Pharmacother*. 2017;95:605-13.
44. Holt RI, de Groot M, Golden SH. Diabetes and depression. *Curr Diab Rep*. 2014;14(6):491.
45. Moulton CD, Pickup JC, Ismail K. The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(6):461-71.
46. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(2):81-98.
47. Steiner CA, Janez A, Jensterle M, Reisinger K, Forst T, Pfutzner A. Impact of treatment with rosiglitazone or metformin on biomarkers for insulin resistance and metabolic syndrome in patients with polycystic ovary syndrome. *J Diabetes Sci Technol*. 2007;1(2):211-7.
48. Fasshauer M, Bluher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(7):461-70.
49. Tumminia A, Vinciguerra F, Parisi M, Frittitta L. Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Role of Insulin Signalling and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).

50. Podell BK, Ackart DF, Richardson MA, DiLisio JE, Pulford B, Basaraba RJ. A model of type 2 diabetes in the guinea pig using sequential diet-induced glucose intolerance and streptozotocin treatment. *Dis Model Mech.* 2017;10(2):151-62.
51. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46.
52. Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiol Hung.* 2014;101(4):408-20.
53. Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2008;Chapter 5:Unit 5 47.
54. Kashfi K, Cagen L, Cook GA. Diabetes and proteolysis: effects on carnitine palmitoyltransferase-I and malonyl-CoA binding. *Lipids.* 1995;30(5):383-8.
55. Sampath C, Rashid MR, Sang S, Ahmedna M. Green tea epigallocatechin 3-gallate alleviates hyperglycemia and reduces advanced glycation end products via nrf2 pathway in mice with high fat diet-induced obesity. *Biomed Pharmacother.* 2017;87:73-81.
56. Asrafuzzaman M, Cao Y, Afroz R, Kamato D, Gray S, Little PJ. Animal models for assessing the impact of natural products on the aetiology and metabolic pathophysiology of Type 2 diabetes. *Biomed Pharmacother.* 2017;89:1242-51.
57. Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012;237(5):481-90.
58. Ozturk Y, Altan VM, Yildizoglu-Ari N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev.* 1996;48(1):69-112.
59. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev.* 1987;3(3):751-78.
60. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;70:5 47 1-5 20.
61. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim.* 2011;45(3):131-40.

62. Candela S, Hernandez RE, Gagliardino JJ. Circadian variation of the streptozotocin-diabetogenic effect in mice. *Experientia*. 1979;35(9):1256-7.
63. van Zwieten PA. Diabetes and hypertension: experimental models for pharmacological studies. *Clin Exp Hypertens*. 1999;21(1-2):1-16.
64. Tay YC, Wang Y, Kairaitis L, Rangan GK, Zhang C, Harris DC. Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? *Kidney Int*. 2005;68(1):391-8.
65. King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012;166(3):877-94.
66. Flanagan AM, Brown JL, Santiago CA, Aad PY, Spicer LJ, Spicer MT. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. *J Nutr Biochem*. 2008;19(8):505-13.
67. Tierney AC, Roche HM. The potential role of olive oil-derived MUFA in insulin sensitivity. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(10):1235-48.
68. Karbaschi R, Sadeghimahalli F, Zardooz H. Maternal high-fat diet inversely affects insulin sensitivity in dams and young adult male rat offspring. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2016;17(9):728-32.
69. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(4):798-808.
70. Bevan P. Insulin signalling. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 8):1429-30.
71. Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15(2):161-70.
72. Sakamoto K, Holman GD. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(1):E29-37.
73. Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(1):35-42.
74. Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol*. 1999;19(9):6286-96.

75. Grundler ML, Thenen SW. Decreased insulin binding, glucose transport, and glucose metabolism in soleus muscle of rats fed a high fat diet. *Diabetes*. 1982;31(3):232-7.
76. Youngren JF, Paik J, Barnard RJ. Impaired insulin-receptor autophosphorylation is an early defect in fat-fed, insulin-resistant rats. *J Appl Physiol* (1985). 2001;91(5):2240-7.
77. Zierath JR, Houseknecht KL, Gnudi L, Kahn BB. High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. *Diabetes*. 1997;46(2):215-23.
78. Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(5):E1039-44.
79. Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, et al. Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br J Nutr*. 2003;90(5):953-60.
80. Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF, Gertler A, et al. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology*. 2003;144(11):4773-82.
81. Yasuhara R, Miyamoto Y, Akaike T, Akuta T, Nakamura M, Takami M, et al. Interleukin-1 β induces death in chondrocyte-like ATDC5 cells through mitochondrial dysfunction and energy depletion in a reactive nitrogen and oxygen species-dependent manner. *Biochem J*. 2005;389(Pt 2):315-23.
82. Pan DA, Storlien LH. Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats. *J Nutr*. 1993;123(3):512-9.
83. Yaqoob P, Sherrington EJ, Jeffery NM, Sanderson P, Harvey DJ, Newsholme EA, et al. Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995;27(3):297-310.
84. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med*. 2005;11(2):183-90.

85. Hansen PA, Han DH, Marshall BA, Nolte LA, Chen MM, Mueckler M, et al. A high fat diet impairs stimulation of glucose transport in muscle. Functional evaluation of potential mechanisms. *J Biol Chem*. 1998;273(40):26157-63.
86. Liu Z, Patil IY, Jiang T, Sancheti H, Walsh JP, Stiles BL, et al. High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. *PLoS One*. 2015;10(5):e0128274.
87. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res*. 2008;2008:704045.
88. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*. 2000;49(11):1390-4.
89. Wilson RD, Islam MS. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol Rep*. 2012;64(1):129-39.
90. Nath S, Ghosh SK, Choudhury Y. A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2017;84:20-30.
91. Gheibi S, Bakhtiarzadeh F, Jeddi S, Farrokhfall K, Zardooz H, Ghasemi A. Nitrite increases glucose-stimulated insulin secretion and islet insulin content in obese type 2 diabetic male rats. *Nitric Oxide*. 2017;64:39-51.
92. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res*. 2007;125(3):451-72.
93. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*. 2005;52(4):313-20.
94. Danda RS, Habiba NM, Rincon-Choles H, Bhandari BK, Barnes JL, Abboud HE, et al. Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2005;68(6):2562-71.
95. Clegg DJ, Benoit SC, Reed JA, Woods SC, Dunn-Meynell A, Levin BE. Reduced anorexic effects of insulin in obesity-prone rats fed a moderate-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(4):R981-6.

96. Pecoraro N, Ginsberg AB, Warne JP, Gomez F, la Fleur SE, Dallman MF. Diverse basal and stress-related phenotypes of Sprague Dawley rats from three vendors. *Physiol Behav.* 2006;89(4):598-610.
97. Peckham SC, Entenman C. The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *Res Dev Tech Rep.* 1962:23.
98. Wang HJ, Jin YX, Shen W, Neng J, Wu T, Li YJ, et al. Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16 Suppl 1:412-7.
99. Baxter LC. Appetite Changes in Depression. *Am J Psychiatry.* 2016;173(4):317-8.
100. Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, Baxter AJ, Ferrari AJ, Erskine HE, et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2013;382(9904):1575-86.
101. Gaynes BN, Warden D, Trivedi MH, Wisniewski SR, Fava M, Rush AJ. What did STAR*D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. *Psychiatr Serv.* 2009;60(11):1439-45.
102. Park M, Katon WJ, Wolf FM. Depression and risk of mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis and systematic review. *Gen Hosp Psychiatry.* 2013;35(3):217-25.
103. Alzoubi A, Abunaser R, Khassawneh A, Alfaqih M, Khasawneh A, Abdo N. The Bidirectional Relationship between Diabetes and Depression: A Literature Review. *Korean J Fam Med.* 2018;39(3):137-46.
104. Golden SH, Lazo M, Carnethon M, Bertoni AG, Schreiner PJ, Diez Roux AV, et al. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. *JAMA.* 2008;299(23):2751-9.
105. de Moraes H, de Souza CP, da Silva LM, Ferreira DM, Werner MF, Andreatini R, et al. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behav Brain Res.* 2014;258:52-64.

106. da Silva Dias IC, Carabelli B, Ishii DK, de Moraes H, de Carvalho MC, Rizzo de Souza LE, et al. Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. *Mol Neurobiol*. 2016;53(10):6997-7009.
107. Oxenkrug G, Ratner R, Summergrad P. Kynurenines and vitamin B6: link between diabetes and depression. *J Bioinform Diabetes*. 2013;1(1).
108. Rogers KS, Higgins ES, Kline ES. Experimental diabetes causes mitochondrial loss and cytoplasmic enrichment of pyridoxal phosphate and aspartate aminotransferase activity. *Biochem Med Metab Biol*. 1986;36(1):91-7.
109. Tagliari B, Noschang CG, Ferreira AG, Ferrari OA, Feksa LR, Wannmacher CM, et al. Chronic variable stress impairs energy metabolism in prefrontal cortex and hippocampus of rats: prevention by chronic antioxidant treatment. *Metab Brain Dis*. 2010;25(2):169-76.
110. Regenold WT, Pratt M, Nekkalapu S, Shapiro PS, Kristian T, Fiskum G. Mitochondrial detachment of hexokinase 1 in mood and psychotic disorders: implications for brain energy metabolism and neurotrophic signaling. *J Psychiatr Res*. 2012;46(1):95-104.
111. Oxenkrug G. Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. *Mol Neurobiol*. 2013;48(2):294-301.
112. Gold PW. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Mol Psychiatry*. 2015;20(1):32-47.
113. Leonard BE. Impact of inflammation on neurotransmitter changes in major depression: an insight into the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014;48:261-7.
114. Downs CA, Faulkner MS. Toxic stress, inflammation and symptomatology of chronic complications in diabetes. *World J Diabetes*. 2015;6(4):554-65.
115. Dobos N, de Vries EF, Kema IP, Patas K, Prins M, Nijholt IM, et al. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of neuroinflammation-induced depression. *J Alzheimers Dis*. 2012;28(4):905-15.
116. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977;266(5604):730-2.

117. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995;121(1):66-72.
118. Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):547-69.
119. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc*. 2012;7(6):1009-14.
120. Ramakrishnan R, Sheeladevi R, Suthanthirarajan N, Namasivayam A. An acute hyperglycemia or acidosis-induced changes of indolamines level correlates with PKC- α expression in rat brain. *Brain Res Bull*. 2005;67(1-2):46-52.
121. Ezzeldin E, Souror WA, El-Nahhas T, Soudi AN, Shahat AA. Biochemical and neurotransmitters changes associated with tramadol in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:238780.
122. Li JX, France CP. Food restriction and streptozotocin treatment decrease 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor-mediated behavioral effects in rats. *Behav Pharmacol*. 2008;19(4):292-7.
123. Umeda Y, Amano M, Suemaru K, Yamaguchi T, Kitamura Y, Gomita Y, et al. The Influence of hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and hyperglycemia on the 5-HT_{2A} receptor-mediated wet-dog shake responses in rats. *Acta Med Okayama*. 2007;61(6):311-7.
124. Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Suppl 6:7-11.
125. Prabhakar V, Gupta D, Kanade P, Radhakrishnan M. Diabetes-associated depression: the serotonergic system as a novel multifunctional target. *Indian J Pharmacol*. 2015;47(1):4-10.
126. Boldrini M, Santiago AN, Hen R, Dwork AJ, Rosoklija GB, Tamir H, et al. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(6):1068-77.

127. Ledo JH, Azevedo EP, Clarke JR, Ribeiro FC, Figueiredo CP, Foguel D, et al. Amyloid-beta oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. *Mol Psychiatry*. 2013;18(10):1053-4.
128. van Mierlo TJ, Chung C, Foncke EM, Berendse HW, van den Heuvel OA. Depressive symptoms in Parkinson's disease are related to decreased hippocampus and amygdala volume. *Mov Disord*. 2015;30(2):245-52.
129. Ghosh S, Choudhury S, Chowdhury O, Mukherjee S, Das A, Sain A, et al. Inflammation-induced behavioral changes is driven by alterations in Nrf2-dependent apoptosis and autophagy in mouse hippocampus: Role of fluoxetine. *Cell Signal*. 2020;68:109521.
130. Knol MJ, Heerdink ER, Egberts AC, Geerlings MI, Gorter KJ, Numans ME, et al. Depressive symptoms in subjects with diagnosed and undiagnosed type 2 diabetes. *Psychosom Med*. 2007;69(4):300-5.
131. Mezuk B, Eaton WW, Albrecht S, Golden SH. Depression and type 2 diabetes over the lifespan: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2008;31(12):2383-90.
132. Lin EH, Rutter CM, Katon W, Heckbert SR, Ciechanowski P, Oliver MM, et al. Depression and advanced complications of diabetes: a prospective cohort study. *Diabetes Care*. 2010;33(2):264-9.
133. Knol MJ, Twisk JW, Beekman AT, Heine RJ, Snoek FJ, Pouwer F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. *Diabetologia*. 2006;49(5):837-45.
134. Furuya M, Hayashino Y, Tsujii S, Ishii H, Fukuhara S. Comparative validity of the WHO-5 Well-Being Index and two-question instrument for screening depressive symptoms in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2013;50(2):117-21.
135. Asghar S, Hussain A, Ali SM, Khan AK, Magnusson A. Prevalence of depression and diabetes: a population-based study from rural Bangladesh. *Diabet Med*. 2007;24(8):872-7.
136. Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet*. 2007;370(9590):851-8.

137. Egede LE. Diabetes, major depression, and functional disability among U.S. adults. *Diabetes Care*. 2004;27(2):421-8.
138. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(3):813-23.
139. Katon W, Russo J, Lin EH, Heckbert SR, Ciechanowski P, Ludman EJ, et al. Depression and diabetes: factors associated with major depression at five-year follow-up. *Psychosomatics*. 2009;50(6):570-9.
140. Lysy Z, Da Costa D, Dasgupta K. The association of physical activity and depression in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2008;25(10):1133-41.
141. Balhara YP, Sagar R. Correlates of anxiety and depression among patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011;15(Suppl 1):S50-4.
142. Luijendijk HJ, Stricker BH, Hofman A, Witteman JC, Tiemeier H. Cerebrovascular risk factors and incident depression in community-dwelling elderly. *Acta Psychiatr Scand*. 2008;118(2):139-48.
143. Ali S, Stone MA, Peters JL, Davies MJ, Khunti K. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med*. 2006;23(11):1165-73.
144. Khuwaja AK, Lalani S, Dhanani R, Azam IS, Rafique G, White F. Anxiety and depression among outpatients with type 2 diabetes: A multi-centre study of prevalence and associated factors. *Diabetol Metab Syndr*. 2010;2:72.
145. Black SA. Increased health burden associated with comorbid depression in older diabetic Mexican Americans. Results from the Hispanic Established Population for the Epidemiologic Study of the Elderly survey. *Diabetes Care*. 1999;22(1):56-64.
146. Gonzalez JS, Peyrot M, McCarl LA, Collins EM, Serpa L, Mimiaga MJ, et al. Depression and diabetes treatment nonadherence: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2008;31(12):2398-403.
147. Schram MT, Baan CA, Pouwer F. Depression and quality of life in patients with diabetes: a systematic review from the European depression in diabetes (EDID) research consortium. *Curr Diabetes Rev*. 2009;5(2):112-9.
148. Penckofer S, Quinn L, Byrn M, Ferrans C, Miller M, Strange P. Does glycemic variability impact mood and quality of life? *Diabetes Technol Ther*. 2012;14(4):303-10.

149. Hermanns N, Kulzer B, Krichbaum M, Kubiak T, Haak T. How to screen for depression and emotional problems in patients with diabetes: comparison of screening characteristics of depression questionnaires, measurement of diabetes-specific emotional problems and standard clinical assessment. *Diabetologia*. 2006;49(3):469-77.
150. Hermanns N, Scheff C, Kulzer B, Weyers P, Pauli P, Kubiak T, et al. Association of glucose levels and glucose variability with mood in type 1 diabetic patients. *Diabetologia*. 2007;50(5):930-3.
151. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*. 1998;41(10):1241-8.
152. Wang X, Bao W, Liu J, Ouyang YY, Wang D, Rong S, et al. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2013;36(1):166-75.
153. Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, Chen YD, Tipton L, Staten MA, et al. Salicylate (salsalate) in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2013;159(1):1-12.
154. Hoyó-Becerra C, Schlaak JF, Hermann DM. Insights from interferon-alpha-related depression for the pathogenesis of depression associated with inflammation. *Brain Behav Immun*. 2014;42:222-31.
155. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010;67(5):446-57.
156. Na KS, Lee KJ, Lee JS, Cho YS, Jung HY. Efficacy of adjunctive celecoxib treatment for patients with major depressive disorder: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014;48:79-85.
157. Laake JP, Stahl D, Amiel SA, Petrak F, Sherwood RA, Pickup JC, et al. The association between depressive symptoms and systemic inflammation in people with type 2 diabetes: findings from the South London Diabetes Study. *Diabetes Care*. 2014;37(8):2186-92.
158. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001;286(3):327-34.

159. Khandaker GM, Pearson RM, Zammit S, Lewis G, Jones PB. Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: a population-based longitudinal study. *JAMA Psychiatry*. 2014;71(10):1121-8.
160. Sullivan MD, Katon WJ, Lovato LC, Miller ME, Murray AM, Horowitz KR, et al. Association of depression with accelerated cognitive decline among patients with type 2 diabetes in the ACCORD-MIND trial. *JAMA Psychiatry*. 2013;70(10):1041-7.
161. Marioni RE, Strachan MW, Reynolds RM, Lowe GD, Mitchell RJ, Fowkes FG, et al. Association between raised inflammatory markers and cognitive decline in elderly people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes*. 2010;59(3):710-3.
162. Lu S, Peng H, Wang L, Vasish S, Zhang Y, Gao W, et al. Elevated specific peripheral cytokines found in major depressive disorder patients with childhood trauma exposure: a cytokine antibody array analysis. *Compr Psychiatry*. 2013;54(7):953-61.
163. Wang D, Couture R, Hong Y. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2014;728:59-66.
164. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell*. 2014;158(1):15-24.
165. Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):214-25.
166. Silva M, Costa-Pereira JT, Martins D, Tavares I. Pain modulation from the brain during diabetic neuropathy: Uncovering the role of the rostroventromedial medulla. *Neurobiol Dis*. 2016;96:346-56.
167. Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain*. 2007;3:33.
168. Frick LR, Williams K, Pittenger C. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:608654.
169. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37.

170. Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. *Curr Diab Rep.* 2013;13(3):435-44.
171. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(6865):799-806.
172. Yang RH, Lin J, Hou XH, Cao R, Yu F, Liu HQ, et al. Effect of docosahexaenoic acid on hippocampal neurons in high-glucose condition: involvement of PI3K/AKT/nuclear factor-kappaB-mediated inflammatory pathways. *Neuroscience.* 2014;274:218-28.
173. Hwang IK, Choi JH, Nam SM, Park OK, Yoo DY, Kim W, et al. Activation of microglia and induction of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus of type 2 diabetic rats. *Neurol Res.* 2014;36(9):824-32.
174. Maedler K, Fontana A, Ris F, Sergeev P, Toso C, Oberholzer J, et al. FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(12):8236-41.
175. Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, Tadros JH, Chakraborty G, Toney JH. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. *Lipids Health Dis.* 2009;8:25.
176. Emanuelli B, Glondou M, Filloux C, Peraldi P, Van Obberghen E. The potential role of SOCS-3 in the interleukin-1beta-induced desensitization of insulin signaling in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 3:S97-S103.
177. Ando Y, Shinozawa Y, Iijima Y, Yu BC, Sone M, Ooi Y, et al. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha-induced repression of GKAP42 protein levels through cGMP-dependent kinase (cGK)-Ialpha causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2015;290(9):5881-92.
178. Kyrou I, Tsigos C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(6):787-93.
179. Coderre L, Vallega GA, Pilch PF, Chipkin SR. In vivo effects of dexamethasone and sucrose on glucose transport (GLUT-4) protein tissue distribution. *Am J Physiol.* 1996;271(4 Pt 1):E643-8.

180. Chrousos GP. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24 Suppl 2:S50-5.
181. Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, et al. Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol*. 2006;18(6):393-411.
182. Moulton CD, Costafreda SG, Horton P, Ismail K, Fu CH. Meta-analyses of structural regional cerebral effects in type 1 and type 2 diabetes. *Brain Imaging Behav*. 2015;9(4):651-62.
183. Stetler C, Miller GE. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom Med*. 2011;73(2):114-26.
184. Carpenter LL, Ross NS, Tyrka AR, Anderson GM, Kelly M, Price LH. Dex/CRH test cortisol response in outpatients with major depression and matched healthy controls. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(8):1208-13.
185. Wu TC, Chen HT, Chang HY, Yang CY, Hsiao MC, Cheng ML, et al. Mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents chronic corticosterone induced depression-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(6):871-83.
186. Otte C, Hinkelmann K, Moritz S, Yassouridis A, Jahn H, Wiedemann K, et al. Modulation of the mineralocorticoid receptor as add-on treatment in depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled proof-of-concept study. *J Psychiatr Res*. 2010;44(6):339-46.
187. Khambaty T, Stewart JC, Muldoon MF, Kamarck TW. Depressive symptom clusters as predictors of 6-year increases in insulin resistance: data from the Pittsburgh Healthy Heart Project. *Psychosom Med*. 2014;76(5):363-9.
188. Reutrakul S, Van Cauter E. Interactions between sleep, circadian function, and glucose metabolism: implications for risk and severity of diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1311:151-73.
189. Germain A, Kupfer DJ. Circadian rhythm disturbances in depression. *Hum Psychopharmacol*. 2008;23(7):571-85.

190. Prather AA, Vogelzangs N, Penninx BW. Sleep duration, insomnia, and markers of systemic inflammation: results from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *J Psychiatr Res*. 2015;60:95-102.
191. Karthikeyan R, Marimuthu G, Spence DW, Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, et al. Should we listen to our clock to prevent type 2 diabetes mellitus? *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;106(2):182-90.
192. Stamenkovic JA, Olsson AH, Nagorny CL, Malmgren S, Dekker-Nitert M, Ling C, et al. Regulation of core clock genes in human islets. *Metabolism*. 2012;61(7):978-85.
193. Bunney BG, Li JZ, Walsh DM, Stein R, Vawter MP, Cartagena P, et al. Circadian dysregulation of clock genes: clues to rapid treatments in major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2015;20(1):48-55.
194. Engum A, Mykletun A, Midthjell K, Holen A, Dahl AA. Depression and diabetes: a large population-based study of sociodemographic, lifestyle, and clinical factors associated with depression in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(8):1904-9.
195. de Groot M, Anderson R, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. *Psychosom Med*. 2001;63(4):619-30.
196. Talbot F, Nouwen A. A review of the relationship between depression and diabetes in adults: is there a link? *Diabetes Care*. 2000;23(10):1556-62.
197. Kinder LS, Katon WJ, Ludman E, Russo J, Simon G, Lin EH, et al. Improving depression care in patients with diabetes and multiple complications. *J Gen Intern Med*. 2006;21(10):1036-41.
198. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1:S11-63.
199. Yoshida S, Hirai M, Suzuki S, Awata S, Oka Y. Neuropathy is associated with depression independently of health-related quality of life in Japanese patients with diabetes. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2009;63(1):65-72.
200. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62(6):593-602.

201. Eren I, Erdi O, Sahin M. The effect of depression on quality of life of patients with type II diabetes mellitus. *Depress Anxiety*. 2008;25(2):98-106.
202. Katon W, Von Korff M, Lin E, Simon G, Ludman E, Bush T, et al. Improving primary care treatment of depression among patients with diabetes mellitus: the design of the pathways study. *Gen Hosp Psychiatry*. 2003;25(3):158-68.
203. Evans DL, Charney DS. Mood disorders and medical illness: a major public health problem. *Biol Psychiatry*. 2003;54(3):177-80.
204. Cowie CC, Rust KF, Ford ES, Eberhardt MS, Byrd-Holt DD, Li C, et al. Full accounting of diabetes and pre-diabetes in the U.S. population in 1988-1994 and 2005-2006. *Diabetes Care*. 2009;32(2):287-94.
205. Nichols GA, Brown JB. Unadjusted and adjusted prevalence of diagnosed depression in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(3):744-9.
206. Bickett A, Tapp H. Anxiety and diabetes: Innovative approaches to management in primary care. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(15):1724-31.
207. Kohen D, Burgess AP, Catalan J, Lant A. The role of anxiety and depression in quality of life and symptom reporting in people with diabetes mellitus. *Qual Life Res*. 1998;7(3):197-204.
208. Cohen BE, Panguluri P, Na B, Whooley MA. Psychological risk factors and the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease: findings from the Heart and Soul Study. *Psychiatry Res*. 2010;175(1-2):133-7.
209. Damian JP, Acosta V, Da Cuna M, Ramirez I, Oddone N, Zambrana A, et al. Effect of resveratrol on behavioral performance of streptozotocin-induced diabetic mice in anxiety tests. *Exp Anim*. 2014;63(3):277-87.
210. Vostrikov VM, Uranova NA, Orlovskaya DD. Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. *Schizophr Res*. 2007;94(1-3):273-80.
211. Arnett PA, Barwick FH, Beeney JE. Depression in multiple sclerosis: review and theoretical proposal. *J Int Neuropsychol Soc*. 2008;14(5):691-724.
212. Cermenati G, Abbiati F, Cermenati S, Brioschi E, Volonterio A, Cavaletti G, et al. Diabetes-induced myelin abnormalities are associated with an altered lipid pattern: protective effects of LXR activation. *J Lipid Res*. 2012;53(2):300-10.

213. Gordoys A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA. The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US. *Diabetes Care*. 2003;26(6):1790-5.
214. 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.
215. Zhou X, Gan T, Fang G, Wang S, Mao Y, Ying C. Zeaxanthin improved diabetes-induced anxiety and depression through inhibiting inflammation in hippocampus. *Metab Brain Dis*. 2018;33(3):705-11.
216. Kale M, Nimje N, Aglawe MM, Umekar M, Taksande B, Kotagale N. Agmatine modulates anxiety and depression-like behaviour in diabetic insulin-resistant rats. *Brain Res*. 2020;1747:147045.
217. Sharma G, Parihar A, Talaiya T, Dubey K, Porwal B, Parihar MS. Cognitive impairments in type 2 diabetes, risk factors and preventive strategies. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2020;31(2).
218. Millan MJ, Agid Y, Brune M, Bullmore ET, Carter CS, Clayton NS, et al. Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(2):141-68.
219. Johnston H, McCrimmon R, Petrie J, Astell A. An estimate of lifetime cognitive change and its relationship with diabetes health in older adults with type 1 diabetes: preliminary results. *Behav Neurol*. 2010;23(4):165-7.
220. Biessels GJ, Strachan MW, Visseren FL, Kappelle LJ, Whitmer RA. Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(3):246-55.
221. Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol*. 2004;61(5):661-6.
222. Ravona-Springer R, Luo X, Schmeidler J, Wysocki M, Lesser G, Rapp M, et al. Diabetes is associated with increased rate of cognitive decline in questionably demented elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2010;29(1):68-74.
223. Munshi MN. Cognitive Dysfunction in Older Adults With Diabetes: What a Clinician Needs to Know. *Diabetes Care*. 2017;40(4):461-7.

224. Ruis C, Biessels GJ, Gorter KJ, van den Donk M, Kappelle LJ, Rutten GE. Cognition in the early stage of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(7):1261-5.
225. Kivipelto M, Mangialasche F, Ngandu T. Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(11):653-66.
226. Afshin A, Reitsma MB, Murray CJL. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries. *N Engl J Med*. 2017;377(15):1496-7.
227. Zheng H, Lin Q, Wang D, Xu P, Zhao L, Hu W, et al. NMR-based metabolomics reveals brain region-specific metabolic alterations in streptozotocin-induced diabetic rats with cognitive dysfunction. *Metab Brain Dis*. 2017;32(2):585-93.
228. Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*. 2015;309:84-99.
229. Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Short-term exposure to a diet high in fat and sugar, or liquid sugar, selectively impairs hippocampal-dependent memory, with differential impacts on inflammation. *Behav Brain Res*. 2016;306:1-7.
230. Denver P, Gault VA, McClean PL. Sustained high-fat diet modulates inflammation, insulin signalling and cognition in mice and a modified xenin peptide ameliorates neuropathology in a chronic high-fat model. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20(5):1166-75.
231. Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Correa M, et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2009;610(1-3):42-8.
232. McNeilly AD, Williamson R, Sutherland C, Balfour DJ, Stewart CA. High fat feeding promotes simultaneous decline in insulin sensitivity and cognitive performance in a delayed matching and non-matching to position task. *Behav Brain Res*. 2011;217(1):134-41.
233. Mehta BK, Banerjee S. Characterization of Cognitive Impairment in Type 2 Diabetic Rats. *Indian J Pharm Sci*. 2017;79(5):785-93.
234. Zhang T, Pan BS, Zhao B, Zhang LM, Huang YL, Sun FY. Exacerbation of poststroke dementia by type 2 diabetes is associated with synergistic increases of beta-

secretase activation and beta-amyloid generation in rat brains. *Neuroscience*. 2009;161(4):1045-56.

235. Stahl SM. Stahl'ın Temel Psikofarmakolojisi 2015.

236. Rossi A, Barraco A, Donda P. Fluoxetine: a review on evidence based medicine. *Ann Gen Hosp Psychiatry*. 2004;3(1):2.

237. Sun DS, Gao LF, Jin L, Wu H, Wang Q, Zhou Y, et al. Fluoxetine administration during adolescence attenuates cognitive and synaptic deficits in adult 3xTgAD mice. *Neuropharmacology*. 2017;126:200-12.

238. Mowla A, Mosavinasab M, Haghshenas H, Borhani Haghighi A. Does serotonin augmentation have any effect on cognition and activities of daily living in Alzheimer's dementia? A double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Psychopharmacol*. 2007;27(5):484-7.

239. Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*. 2009;71(2):171-86.

240. Tying S, Gottlieb A, Papp K, Gordon K, Leonardi C, Wang A, et al. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet*. 2006;367(9504):29-35.

241. Kohler O, Benros ME, Nordentoft M, Farkouh ME, Iyengar RL, Mors O, et al. Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Psychiatry*. 2014;71(12):1381-91.

242. Kohler O, Krogh J, Mors O, Benros ME. Inflammation in Depression and the Potential for Anti-Inflammatory Treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(7):732-42.

243. Benros ME, Waltoft BL, Nordentoft M, Ostergaard SD, Eaton WW, Krogh J, et al. Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for mood disorders: a nationwide study. *JAMA Psychiatry*. 2013;70(8):812-20.

244. Dahl J, Ormstad H, Aass HC, Malt UF, Bendz LT, Sandvik L, et al. The plasma levels of various cytokines are increased during ongoing depression and are reduced to normal levels after recovery. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;45:77-86.

245. Valkanova V, Ebmeier KP, Allan CL. CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Affect Disord.* 2013;150(3):736-44.
246. Setiawan E, Wilson AA, Mizrahi R, Rusjan PM, Miler L, Rajkowska G, et al. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. *JAMA Psychiatry.* 2015;72(3):268-75.
247. Friebe A, Horn M, Schmidt F, Janssen G, Schmid-Wendtner MH, Volkenandt M, et al. Dose-dependent development of depressive symptoms during adjuvant interferon- α treatment of patients with malignant melanoma. *Psychosomatics.* 2010;51(6):466-73.
248. Sarkar S, Schaefer M. Antidepressant pretreatment for the prevention of interferon alfa-associated depression: a systematic review and meta-analysis. *Psychosomatics.* 2014;55(3):221-34.
249. Nagarakanti S, Bishburg E. Is Minocycline an Antiviral Agent? A Review of Current Literature. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016;118(1):4-8.
250. Shutter MC, Akhondi H. Tetracycline. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2021.
251. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol.* 2013;169(2):337-52.
252. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(2):232-60 ; second page, table of contents.
253. Colton B, McConeghy KW, Schreckenberger PC, Danziger LH. I.V. minocycline revisited for infections caused by multidrug-resistant organisms. *Am J Health Syst Pharm.* 2016;73(5):279-85.
254. Sanchez AR, Rogers RS, 3rd, Sheridan PJ. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *Int J Dermatol.* 2004;43(10):709-15.
255. Nazarian S, Akhondi H. Minocycline. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2021.
256. Smith K, Leyden JJ. Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. *Clin Ther.* 2005;27(9):1329-42.
257. Garner SE, Eady A, Bennett C, Newton JN, Thomas K, Popescu CM. Minocycline for acne vulgaris: efficacy and safety. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(8):CD002086.

258. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011;377(9770):1019-31.
259. Romero-Miguel D, Lamanna-Rama N, Casquero-Veiga M, Gomez-Rangel V, Desco M, Soto-Montenegro ML. Minocycline in neurodegenerative and psychiatric diseases: An update. *Eur J Neurol*. 2021;28(3):1056-81.
260. Keller WR, Kum LM, Wehring HJ, Koola MM, Buchanan RW, Kelly DL. A review of anti-inflammatory agents for symptoms of schizophrenia. *J Psychopharmacol*. 2013;27(4):337-42.
261. Giovanoli S, Engler H, Engler A, Richetto J, Feldon J, Riva MA, et al. Preventive effects of minocycline in a neurodevelopmental two-hit model with relevance to schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2016;6:e772.
262. Levkovitz Y, Levi U, Braw Y, Cohen H. Minocycline, a second-generation tetracycline, as a neuroprotective agent in an animal model of schizophrenia. *Brain Res*. 2007;1154:154-62.
263. Miyaoka T, Yasukawa R, Yasuda H, Hayashida M, Inagaki T, Horiguchi J. Possible antipsychotic effects of minocycline in patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(1):304-7.
264. Chaudhry IB, Hallak J, Husain N, Minhas F, Stirling J, Richardson P, et al. Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard treatment. *J Psychopharmacol*. 2012;26(9):1185-93.
265. Kelly DL, Sullivan KM, McEvoy JP, McMahon RP, Wehring HJ, Gold JM, et al. Adjunctive Minocycline in Clozapine-Treated Schizophrenia Patients With Persistent Symptoms. *J Clin Psychopharmacol*. 2015;35(4):374-81.
266. Zhang L, Zheng H, Wu R, Kosten TR, Zhang XY, Zhao J. The effect of minocycline on amelioration of cognitive deficits and pro-inflammatory cytokines levels in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2019;212:92-8.
267. Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet*. 2018;392(10146):508-20.
268. Siller SS, Broadie K. Matrix metalloproteinases and minocycline: therapeutic avenues for fragile X syndrome. *Neural Plast*. 2012;2012:124548.

269. Siller SS, Broadie K. Neural circuit architecture defects in a *Drosophila* model of Fragile X syndrome are alleviated by minocycline treatment and genetic removal of matrix metalloproteinase. *Dis Model Mech*. 2011;4(5):673-85.
270. Pardo CA, Buckley A, Thurm A, Lee LC, Azhagiri A, Neville DM, et al. A pilot open-label trial of minocycline in patients with autism and regressive features. *J Neurodev Disord*. 2013;5(1):9.
271. Leigh MJ, Nguyen DV, Mu Y, Winarni TI, Schneider A, Chechi T, et al. A randomized double-blind, placebo-controlled trial of minocycline in children and adolescents with fragile x syndrome. *J Dev Behav Pediatr*. 2013;34(3):147-55.
272. Schulz PE, Arora G. Depression. *Continuum (Minneap Minn)*. 2015;21(3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry):756-71.
273. Rosenblat JD, McIntyre RS. Bipolar Disorder and Inflammation. *Psychiatr Clin North Am*. 2016;39(1):125-37.
274. Soczynska JK, Mansur RB, Brietzke E, Swardfager W, Kennedy SH, Woldeyohannes HO, et al. Novel therapeutic targets in depression: minocycline as a candidate treatment. *Behav Brain Res*. 2012;235(2):302-17.
275. Levine J, Cholestoy A, Zimmerman J. Possible antidepressant effect of minocycline. *Am J Psychiatry*. 1996;153(4):582.
276. Jin LJ, Schlesinger F, Guan Q, Song YP, Nie ZY. The two different effects of the potential neuroprotective compound minocycline on AMPA-type glutamate receptors. *Pharmacology*. 2012;89(3-4):156-62.
277. Pae CU, Marks DM, Han C, Patkar AA. Does minocycline have antidepressant effect? *Biomed Pharmacother*. 2008;62(5):308-11.
278. Pusic KM, Pusic AD, Kemme J, Kraig RP. Spreading depression requires microglia and is decreased by their M2a polarization from environmental enrichment. *Glia*. 2014;62(7):1176-94.
279. Suarez-Pereira I, Carrion AM. Updating stored memory requires adult hippocampal neurogenesis. *Sci Rep*. 2015;5:13993.
280. Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*. 2011;476(7361):458-61.

281. Lu Y, Giri PK, Lei S, Zheng J, Li W, Wang N, et al. Pretreatment with minocycline restores neurogenesis in the subventricular zone and subgranular zone of the hippocampus after ketamine exposure in neonatal rats. *Neuroscience*. 2017;352:144-54.
282. Yau SY, Lee TH, Li A, Xu A, So KF. Adiponectin Mediates Running-Restored Hippocampal Neurogenesis in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes in Mice. *Front Neurosci*. 2018;12:679.
283. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci*. 2001;21(8):2580-8.
284. Blum D, Chtarto A, Tenenbaum L, Brotchi J, Levivier M. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. *Neurobiol Dis*. 2004;17(3):359-66.
285. Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW, et al. Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2005;54(5):1559-65.
286. Hunter CL, Bachman D, Granholm AC. Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome. *Ann Neurol*. 2004;56(5):675-88.
287. Min KJ, Jou I, Joe E. Plasminogen-induced IL-1beta and TNF-alpha production in microglia is regulated by reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312(4):969-74.
288. Tangpong J, Sompol P, Vore M, St Clair W, Butterfield DA, St Clair DK. Tumor necrosis factor alpha-mediated nitric oxide production enhances manganese superoxide dismutase nitration and mitochondrial dysfunction in primary neurons: an insight into the role of glial cells. *Neuroscience*. 2008;151(2):622-9.
289. Ledebor A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain*. 2005;115(1-2):71-83.
290. Zhang L, Zheng H, Wu R, Zhu F, Kosten TR, Zhang XY, et al. Minocycline adjunctive treatment to risperidone for negative symptoms in schizophrenia: Association with pro-inflammatory cytokine levels. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;85:69-76.

291. Molina-Hernandez M, Tellez-Alcantara NP, Perez-Garcia J, Olivera-Lopez JI, Jaramillo-Jaimes MT. Antidepressant-like actions of minocycline combined with several glutamate antagonists. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(2):380-6.
292. Zheng LS, Kaneko N, Sawamoto K. Minocycline treatment ameliorates interferon-alpha- induced neurogenic defects and depression-like behaviors in mice. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:5.
293. Husain MI, Chaudhry IB, Husain N, Khoso AB, Rahman RR, Hamirani MM, et al. Minocycline as an adjunct for treatment-resistant depressive symptoms: A pilot randomised placebo-controlled trial. *J Psychopharmacol*. 2017;31(9):1166-75.
294. Emadi-Kouchak H, Mohammadinejad P, Asadollahi-Amin A, Rasoulinejad M, Zeinoddini A, Yalda A, et al. Therapeutic effects of minocycline on mild-to-moderate depression in HIV patients: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Int Clin Psychopharmacol*. 2016;31(1):20-6.
295. Miyaoka T, Wake R, Furuya M, Liaury K, Ieda M, Kawakami K, et al. Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: an open-label study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;37(2):222-6.
296. Guex CG, Reginato FZ, de Jesus PR, Brondani JC, Lopes GHH, Bauermann LF. Antidiabetic effects of *Olea europaea* L. leaves in diabetic rats induced by high-fat diet and low-dose streptozotocin. *J Ethnopharmacol*. 2019;235:1-7.
297. Chen JL, Luo C, Pu D, Zhang GQ, Zhao YX, Sun Y, et al. Metformin attenuates diabetes-induced tau hyperphosphorylation in vitro and in vivo by enhancing autophagic clearance. *Exp Neurol*. 2019;311:44-56.
298. Kudryashov NV, Kalinina TS, Shimshir AA, Korolev AO, Volkova AV, Voronina TA. Antidepressant-like effect of fluoxetine may depend on translocator protein activity and pretest session duration in forced swimming test in mice. *Behav Pharmacol*. 2018;29(4):375-8.
299. Naderi Y, Sabetkasaei M, Parvardeh S, Zanjani TM. Neuroprotective effect of minocycline on cognitive impairments induced by transient cerebral ischemia/reperfusion through its anti-inflammatory and anti-oxidant properties in male rat. *Brain Res Bull*. 2017;131:207-13.

300. Pompella A, Maellaro E, Casini AF, Ferrali M, Ciccoli L, Comporti M. Measurement of lipid peroxidation in vivo: a comparison of different procedures. *Lipids*. 1987;22(3):206-11.
301. Cohen SJ, Stackman RW, Jr. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res*. 2015;285:105-17.
302. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322-8.
303. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977;229(2):327-36.
304. Herrnstein RJ. Method and theory in the study of avoidance. *Psychol Rev*. 1969;76(1):49-69.
305. Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology (Berl)*. 1990;101(1):27-33.
306. Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. WHO International Consortium in Psychiatric Epidemiology. *Bull World Health Organ*. 2000;78(4):413-26.
307. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;94(3):311-21.
308. Hajebrاهيمi B, Kiamanesh A, Asgharnejad Farid AA, Asadikaram G. Type 2 diabetes and mental disorders; a plausible link with inflammation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016;62(13):71-7.
309. Zhang C, Deng J, Liu D, Tuo X, Xiao L, Lai B, et al. Nuciferine ameliorates hepatic steatosis in high-fat diet/streptozocin-induced diabetic mice through a PPARalpha/PPARGgamma coactivator-1alpha pathway. *Br J Pharmacol*. 2018;175(22):4218-28.
310. Path G, Mehana AE, Pilz IH, Alt M, Baumann J, Sommerer I, et al. NUPR1 preserves insulin secretion of pancreatic beta-cells during inflammatory stress by multiple low-dose streptozotocin and high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020;319(2):E338-E44.

311. Cheng Y, Yu X, Zhang J, Chang Y, Xue M, Li X, et al. Pancreatic kallikrein protects against diabetic retinopathy in KK Cg-A(y)/J and high-fat diet/streptozotocin-induced mouse models of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2019;62(6):1074-86.
312. Kazmi SAR, Qureshi MZ, Sadia, Alhewairini SS, Ali S, Khurshid S, et al. Minocycline-Derived Silver Nanoparticles for Assessment of Their Antidiabetic Potential against Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Pharmaceutics*. 2021;13(10).
313. Zhu X, Zhang YM, Zhang MY, Chen YJ, Liu YW. Hesperetin ameliorates diabetes-associated anxiety and depression-like behaviors in rats via activating Nrf2/ARE pathway. *Metab Brain Dis*. 2021;36(7):1969-83.
314. Sakurai M, Iwasa R, Sakai Y, Morimoto M. Minocycline prevents depression-like behavior in streptozotocin-induced diabetic mice. *Neuropathology*. 2021;41(2):109-17.
315. Komsuoglu Celikyurt I, Mutlu O, Ulak G, Uyar E, Bektas E, Yildiz Akar F, et al. Exenatide treatment exerts anxiolytic- and antidepressant-like effects and reverses neuropathy in a mouse model of type-2 diabetes. *Med Sci Monit Basic Res*. 2014;20:112-7.
316. Yuan P, Zhang J, Li L, Song Z. Fluoxetine Attenuated Anxiety-Like Behaviors in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Mitigating the Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:4315038.
317. Camargos QM, Silva BC, Silva DG, Toscano ECB, Oliveira BDS, Bellozi PMQ, et al. Minocycline treatment prevents depression and anxiety-like behaviors and promotes neuroprotection after experimental ischemic stroke. *Brain Res Bull*. 2020;155:1-10.
318. Wang YL, Han QQ, Gong WQ, Pan DH, Wang LZ, Hu W, et al. Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):21.
319. Kamdi SP, Badwaik HR, Raval A, Ajazuddin, Nakhate KT. Ameliorative potential of phloridzin in type 2 diabetes-induced memory deficits in rats. *Eur J Pharmacol*. 2021;913:174645.
320. Can OD, Ucel UI, Demir Ozkay U, Ulupinar E. The Effect of Agomelatine Treatment on Diabetes-Induced Cognitive Impairments in Rats: Concomitant Alterations in the Hippocampal Neuron Numbers. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).

321. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988;31(1):47-59.
322. Jabbarpour Z, Shahidi S, Saidijam M, Sarihi A, Hassanzadeh T, Esmaeili R. Effect of tempol on the passive avoidance and novel object recognition task in diabetic rats. *Brain Res Bull.* 2014;101:51-6.
323. Zhu F, Zheng Y, Ding YQ, Liu Y, Zhang X, Wu R, et al. Minocycline and risperidone prevent microglia activation and rescue behavioral deficits induced by neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide in rats. *PLoS One.* 2014;9(4):e93966.
324. Gumuslu E, Mutlu O, Celikyurt IK, Ulak G, Akar F, Erden F, et al. Exenatide enhances cognitive performance and upregulates neurotrophic factor gene expression levels in diabetic mice. *Fundam Clin Pharmacol.* 2016;30(4):376-84.
325. Motaghinejad M, Farokhi N, Motevalian M, Safari S. Molecular, histological and behavioral evidences for neuroprotective effects of minocycline against nicotine-induced neurodegeneration and cognition impairment: Possible role of CREB-BDNF signaling pathway. *Behav Brain Res.* 2020;386:112597.
326. Ostovar M, Akbari A, Anbardar MH, Iraj A, Salmanpour M, Hafez Ghoran S, et al. Effects of *Citrullus colocynthis* L. in a rat model of diabetic neuropathy. *J Integr Med.* 2020;18(1):59-67.
327. Pabreja K, Dua K, Sharma S, Padi SS, Kulkarni SK. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2011;661(1-3):15-21.
328. 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.
329. Rahmati M, Keshvari M, Mirnasouri R, Chehelcheraghi F. Exercise and *Urtica dioica* extract ameliorate hippocampal insulin signaling, oxidative stress, neuroinflammation, and cognitive function in STZ-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother.* 2021;139:111577.
330. 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.

331. Reus GZ, Abelaira HM, Maciel AL, Dos Santos MA, Carlessi AS, Steckert AV, et al. Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. *Metab Brain Dis.* 2015;30(2):545-53.
332. Piatkowska-Chmiel I, Gawronska-Grzywacz M, Popiolek L, Herbert M, Dudka J. The novel adamantane derivatives as potential mediators of inflammation and neural plasticity in diabetes mice with cognitive impairment. *Sci Rep.* 2022;12(1):6708.
333. Ghaderi S, Rashno M, Nesari A, Khoshnam SE, Sarkaki A, Khorsandi L, et al. Sesamin alleviates diabetes-associated behavioral deficits in rats: The role of inflammatory and neurotrophic factors. *Int Immunopharmacol.* 2021;92:107356.
334. Cai Z, Zhao Y, Yao S, Bin Zhao B. Increases in beta-amyloid protein in the hippocampus caused by diabetic metabolic disorder are blocked by minocycline through inhibition of NF-kappaB pathway activation. *Pharmacol Rep.* 2011;63(2):381-91.
335. Cai Z, Yan Y, Wang Y. Minocycline alleviates beta-amyloid protein and tau pathology via restraining neuroinflammation induced by diabetic metabolic disorder. *Clin Interv Aging.* 2013;8:1089-95.
336. Lenart L, Hodrea J, Hosszu A, Koszegi S, Zelena D, Balogh D, et al. The role of sigma-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor in the development of diabetes and comorbid depression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2016;233(7):1269-78.
337. Kamdi SP, Raval A, Nakhate KT. Phloridzin ameliorates type 2 diabetes-induced depression in mice by mitigating oxidative stress and modulating brain-derived neurotrophic factor. *J Diabetes Metab Disord.* 2021;20(1):341-8.
338. Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Braz J Psychiatry.* 2008;30(3):243-5.
339. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci.* 2004;19(7):1699-707.

340. Ismail CAN, Suppian R, Aziz CBA, Long I. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathy by modulating DREAM and BDNF protein expression in rat spinal cord. *J Diabetes Metab Disord*. 2019;18(1):181-90.
341. Hai-Na Z, Xu-Ben Y, Cong-Rong T, Yan-Cheng C, Fan Y, Lei-Mei X, et al. Atorvastatin ameliorates depressive behaviors and neuroinflammatory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2020;237(3):695-705.
342. Hu P, Thinschmidt JS, Yan Y, Hazra S, Bhatwadekar A, Caballero S, et al. CNS inflammation and bone marrow neuropathy in type 1 diabetes. *Am J Pathol*. 2013;183(5):1608-20.
343. Sun JS, Yang YJ, Zhang YZ, Huang W, Li ZS, Zhang Y. Minocycline attenuates pain by inhibiting spinal microglia activation in diabetic rats. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2677-82.
344. Schmidtner AK, Slattery DA, Glasner J, Hiergeist A, Gryksa K, Malik VA, et al. Minocycline alters behavior, microglia and the gut microbiome in a trait-anxiety-dependent manner. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):223.
345. Nagayach A, Patro N, Patro I. Astrocytic and microglial response in experimentally induced diabetic rat brain. *Metab Brain Dis*. 2014;29(3):747-61.
346. Mora-Gutierrez A, Guevara J, Rubio C, Calvillo-Velasco M, Silva-Adaya D, Retana-Marquez S, et al. Clothianidin and Thiacloprid Mixture Administration Induces Degenerative Damage in the Dentate Gyrus and Alteration in Short-Term Memory in Rats. *J Toxicol*. 2021;2021:9983201.

9.ÖZGEÇMİŞ

Adı	MERVE	Soyadı	İNİÇİ ÇAMÇI
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu	TC	Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD, Diyarbakır	2016
Lisans	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İzmir	2012
Lise	Manisa Anadolu Öğretmen Lisesi, Manisa	2007

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	Eczacı	Mardin Savur Devlet Hastanesi	2013
	Eczacı	Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi	2013-2015
	Araş. Gör.	Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2015-

Yabancı Dil Sınav Notu

KPDS/ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
65								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	88,27274	86,13623	70,30355

10.EKLER

10.1. Makale

Ankara Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Ankara, 46(2): 432-443, 2022
Doi: 10.33483/jfpau.1098642



ÖZGÜN MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

DENEYSEL DİYABETİN NEDEN OLDUĞU DEPRESYON TEDAVİSİNDE MİNOSİKLİN VE MİNOSİKLİN+METFORMİN KULLANIMI

EFFECT OF MINOCYCLINE AND MINOSCYCLINE+METFORMIN ON EXPERIMENTAL
DIABETES-RELATED DEPRESSION

Merve İNCİ ÇAMÇI^{1*}, Meral ERDİNÇ², Emre UYAR³, İlker KELLE²

¹Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

²Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

³İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 44000, Malatya, Türkiye

ÖZ

Amaç: Minosiklin, santral sinir sistemine geçebilen, ikinci kuşak tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Minosiklinin anti-inflamatuar, mikrogial aktivasyonu azaltma, anti-apoptotik, antioksidan özellikleri olduğu bilinmektedir. Son yıllarda diyabet ve depresyon arasında çift yönlü bir ilişki olduğu ve fizyopatolojilerinde ortak yollardan birinin inflamasyon olduğu ileri sürülmesi ile minosiklinin depresyon üzerine etkileri çalışmaya başlanmıştır. Bu çalışmada minosiklinin tek başına ve diyabet tedavisinde kullanılan metformin ile kombinasyonu şeklinde kullanımının, diyabet ile ilişkili depresyon üzerine etkilerinin ortaya konması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Farelerde insandakine benzer tip 2 diyabet modeli oluşturmak için 4 haftalık yüksek kalorili diyetin ardından ardışık beş gün, günde 1 defa streptozotosin (50mg/kg) uygulandı, uygulamadan 1 hafta sonra açlık kan glukoz düzeyi 200 mg/dl'nin üzerinde olan deneklerde diyabetin olduğu kabul edilip deneye dahil edildi. Streptozotosin (STZ) enjeksiyonundan iki hafta sonra minosiklin (40mg/kg), fluoksetin (20mg/kg) ve metformin (200mg/kg) 7 gün süre ile günde bir defa uygulandı. İlaç uygulamaları tamamlandıktan sonra; lokomotor aktivitenin belirlenmesi için açık alan testi, depresyon düzeyinin belirlenmesi için zorunlu yüzme testi yapıldı.

Sonuç ve Tartışma: Diyabetin ve uygulanan ilaçların lokomotor aktivitede anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı, minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun ise depresyon tedavisinde en az fluoksetin kadar etkili olduğu sonucuna varıldı. Antidepresan etkinin kısa sürede başlamasının hastanın tedaviye uyuncu ve diyabetin prognozu açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle de minosiklin uygulamasının gösterdiği antidepresan etki üzerine yapılan çalışmalar derinleştirilmeli, etkinin mekanizması araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Depresyon, diyabet, minosiklin

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Merve İnci Camçı
e-posta / e-mail: merveinci21@hotmail.com, Tel. / Phone: +905069394595

Gönderilme / Submitted: 04.04.2022

Kabul / Accepted: 21.04.2022

10.2.Etik Kurul Kararı



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
PROF.DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DÜHADEK)

ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	31/03/2022	KARAR NO	14	TOPLANTI SAYISI	3
KARAR : Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi/Farmakoloji A.B.D Prof. Dr. Meral ERDİNÇ'in yürütücüsü olduğu, 'Farelerde Oluşturulan Diyabet Modelinde Bozulan Davranışsal ve Kognitif Fonksiyonların Tedavisinde Minosiklin Kullanımının Araştırılması' başlıklı 2019/09 protokol numaralı projede yardımcı araştırmacı olarak Arş. Gör. Merve İNCİ ÇAMÇI, Dr. Öğr. Üyesi Emre UYAR, Doç. Dr. İlker KELLE, Prof. Dr. Levent ERDİNÇ ve Doç. Dr. Selçuk TUNİK yer almaktadır. Ancak 12/11/2019 tarihli toplantımız ve 1 no' lu kurul karar yazımızda Prof. Dr. Levent ERDİNÇ ve Doç. Dr. Selçuk TUNİK isimleri tarafımızca sehven unutulmuş olup araştırmacıların eklenerek hatanın giderilmesine ve önceki başvuruda yer almayan Arş. Gör. Meryem Şeyda KAYA' nın moleküler analizleri yürütmek üzere çalışmaya dahil edilmesi talebinin onaylanmasına karar verilmiştir.					
KATILIMCILARIN					
ÜNVANI	ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA		
Doç. Dr.	Mehmet BOĞA	(BAŞKAN)			
Prof. Dr.	Sema ÇELENK	(ÜYE)			
Prof. Dr.	Ahmet KILIÇ	(ÜYE)			
Prof. Dr.	Köksal BEYDEMİR	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Duygu Neval SAYIN İPEK	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Fesih AKTAR	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Ulaş ALABALIK	(ÜYE)			
Dr. Öğr. Üyesi	Diren SARISALTIK YAŞIN	(ÜYE)			
Dr. Öğr. Üyesi	Zelal KARAKOÇ	(ÜYE)			
Dr. Öğr. Üyesi	Zeynep ERDOĞMUŞ ÖZGEN	(ÜYE)			
Dr. Öğr. Üyesi	İsmail YILDIZ	(ÜYE)			
Dr. Öğr. Üyesi	İsmet Rezani TOPTANCI	(ÜYE)			
Dr. Öğr. Üyesi	Selim KARAHAN	(ÜYE)			
Arş. Gör.	Nazan BAKSI	(ÜYE)			
Avukat	Erhan ÇİFTÇİ	(ÜYE)			
Öğretmen	M. Yavuz KAHRAMAN	(ÜYE)			

KYK-FRM-387/00

İletişim: DÜBTAM binası, Zemin Kat, DÜSAM laboratuvarları (İlahiyat Fak. Karşısı) 21280 Sur /DİYARBAKIR
E-posta: dusam@dicle.edu.tr Sekreteryaya: 0 412 248 8431 (3956) Vet.Hekim: 0 412 2488001-16 hat (4423)

10.3. Tez İntihal Raporu

FARELERDE OLUŞTURULAN DİYABET MODELİNDE BOZULAN DAVRANIŞSAL VE KOGNİTİF FONKSİYONLARIN TEDAVİSİNDE MİNOSİKLİN KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 18	% 18	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	% 8
2	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 5
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Izmir Katip Āelebi Āniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
5	acikerisim.dicle.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
7	es.scribd.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	m.villasepeti.com İnternet Kaynağı	<% 1