



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREDİYABETİK HAYVAN MODELİNDE METFORMİN
TEDAVİSİNİN BDNF GEN İFADESİ VE BİLİŞSEL
FONKSİYONLAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

İbrahim Halil ÇİTÇİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Can DEMİREL

Gaziantep
2018

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PREDİYABETİK HAYVAN MODELİNDE METFORMİN TEDAVİSİNİN
BDNF GEN İFADESİ VE BİLİŞSEL FONKSİYONLAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

İbrahim Halil ÇİTÇİ

Tez Savunma Tarihi : 22.06.2018

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışmanın bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr.Sibel OĞUZKAN BALCI
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanları:

I. Prof.Dr.Sibel OĞUZKAN BALCI

II. Doç.Dr. Can DEMİREL

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmza

1.Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

2.Doç.Dr. Özlem İZCİ AY

3.Dr.Öğr.Üyesi Gülper NACARKAHYA

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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 olmadığı beyan ederim.

22.06.2018

İbrahim Halil ÇİTÇİ

TEŞEKKÜR

İlk ve en önemlisi geçtiğimiz üç yıl boyunca beni destekleyen danışmanım Prof.Dr.Sibel OĞUZKAN BALCI'ya şükranlarımı sunmak isterim. Bana tanıdığı bağımsız çalışma özgürlüğü, kendi deneylerimi tasarlama imkanı için de teşekkür ederim. Onun olağanüstü mentorluğu lisansüstü eğitimim boyunca bir çok şey kattı ve onun desteği ve liderliği olmadan bu tez mümkün olmazdı.

İkinci danışmanım ve deney hayvanı çalışmalarında yardımlarını benden esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı başkanı Doç.Dr. Can Demirel'e ayrıca, Dr.Öğr.Üyesi Serkan GÜRGÜL'e teşekkür ederim. Lisansüstü eğitimimde bana destek ve her zaman yardımcı olan Dr.Öğr.Üyesi Shameem SAADAT'a şükranlarımı iletmek isterim.

Tez sürecimde yardımlarını benden esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi Zeynep Ulukütük ve doktora öğrencisi Seçil Eroğlu'na teşekkürlerimi borç bilirim.

Deney hayvanı çalışmalarında bize yardımcı olan Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencileri İbrahim Yılmaz ve Meltem Eskiocak'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu araştırma projesi Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından TF.YLT.17.35 no'lu proje ile desteklenmiştir. Bundan dolayı bu birime ayrıca teşekkürlerimi iletmek isterim.

Bu tez çalışmasında kullandığım Metformin HCl'yi hediye eden BİLİM İLAÇ A.Ş.'ye verdiği desteklerden dolayı şükranlarımı sunarım.

Son olarak aileme, her türlü zorlu zamanlarda maddi-manevi yanımda oldukları ve bana inandıkları için sonsuz şükranlarımı sunmak istiyorum. Benim için her zaman güç kaynağı oldular. Onları ne kadar sevdiğimi anlatacak hiçbir kelime yok.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ ve AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.Prediyabet	5
2.1.1. Prediyabet Nedir?	5
2.1.2. Prediyabet Tanı Kriterleri	5
2.1.3. Prediyabetin Epidemiyolojisi.....	7
2.2.Obezite	11
2.2.1.Obezitenin Prevalansı	13
2.2.2.Obezite Genetiği	14
2.3.Nörotrofinler	16
2.3.1.Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)	18
2.4. Metformin	23
Etki Mekanizması	23
2.5. Öğrenme ve Bellek	26
2.5.1. Öğrenme.....	26
2.5.2.Bellek	27
2.5.3.Mekansal Bellek ve Morris Su Tankı	31
2.6.Hipokampus	32
2.6.1. Hipokampusun Anatomisi	32
2.6.2. Hipokampusun Fonksiyonları.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Hayvan Deneyi	36
3.2. Genetik Çalışmalar	38
4.BULGULAR.....	43
4.1. Açlık Kan Glukoz Değerleri	43
4.2. Haftalık Ağırlık Değişim Sonuçları.....	45
4.3. Morris Su Tankı Sonuçları.....	46
4.3.1 Sıcaklık Haritası (Heat Map) Sonuçları.....	47

4.4. Gen İfade Analizi Sonuçları	52
4.4.1. Hipokampusta kontrol grubu baz alınarak hesaplanan BDNF'in katlı değişim ifade sonuçları.....	53
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	57
6.KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	84



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devleti
ADA	Amerikan Diyabet Derneği
AgRP	Agouti-İlişkili Protein
Akt	Protein Kinaz B
AMP	Adenozin Monofosfat
AMPK	5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase
ARC	Arkuat Nükleus
ATP	Adenozin Trifosfat
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
Ca-CaM	Kalsiyum-Kalmodulin
CaMKII	Kalmodulin Kinaz II
CaMKK	Ca ²⁺ /kalmodülün bağımlı kinaz
Camp	Siklik Adenozin Monofosfat
CART	Kokain ve Amphetamine Düzenleyici Transkript
CDC	Amerika Hastalıkların Kontrolü ve Önlenmesi Merkezi
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
CREB	cAMP Cevap Elementi
CRH(CRTH)	Kortikotropin-Salgılatıcı Hormon
DMH	Dorsomedial Hipotalamus
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü

DVC	Dorsal Vagal Kompleks
EEG	Hipokampus Elektroensefalografi
ERK	Ekstraselüler Sinyal-Düzenleyici Kinaz
FBG	Açlık Kan Glukozu
FPG(APG)	Açlık Plazma Glukozu
GABA	Gamma-Aminobutirik Asit
GLUT-4	Glukoz transporter
HbA _{1c} (a1c)	Hemoglobin a1c
HDL	High Density Lipoprotein (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein)
HFD	Yüksek Yağlı Diyet
I.C.V	Intraserebroventrikuler
IDF	Dünya Diyabet Federasyonu
IFG(BAG)	Bozulmuş Açlık Glukozu
IGT(BGT)	Bozulmuş Glukoz Toleransı
IL-1,IL-6	İnterlökin 1-6
IP3	İnositoltrifosfat
LH	Lateral Hipotalamus
LKB1	Liver Kinase B1
LTP	Uzun Dönem Potansiyel
MAPK	Mitojenle-etkileşen Protein Kinaz
MATE	Multidrug and Toxin Extrusion

MC3R	Melanokortin 3 Reseptörü
MC4R	Melanokortin 4 Reseptörü
MCH	Melanin-Yoğunlaştırıcı Hormon
MetforminHCl	Metformin Hidroklorid
MST	Morris Su Tankı
MTL	Medio Temporal Lop
MTP	Matching To Position
NDDG	Ulusal Diyabet Data Grubu
NGF	Nerve Growth Factor
NHANES	Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi
NMDA	N-methyl-D-aspartate Reseptör
NMTP	Non- Matching To Position
NPY	Nöropeptid Y
Nrf3	Nörotrofin 3
NT-3-4-5	Nörotrofin-3-4-5
NTS	Nucleus Tractus Solitarius
OCT	Organic Cation Transporter
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
p75NTR	Nörotrofin Faktör p75
PC1	Prohormon Konvertaz 1

PC2	Prohormon Konvertaz 2
PI3K	Fosfatidilinositol-3
PLC γ	Fosfolipaz C Gamma
PMAT	Plasma Membrane Monoamine Transporter
PNS	Periferal Sinir Sistemi
POMC	Pro-opiomelanokortin
PVH	Paraventriküler Nükleus
TEKHARF	Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri
Thr	Threonin
TNF α	Tümör Nekroz Faktörü α
TRH	Tirotropin Salgılatıcı Hormon
Trk	Tropomiyozin Reseptör Kinaz
TrkB	Tropomiyozin Reseptör Kinaz B
TrkC	Tropomiyozin Reseptör Kinaz C
TSA	Türkiye Sağlık Araştırması
TURDEP	Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
VMH	Ventromedial Hipotalamus
VTa	Ventral Tegmental Alan
α -MSH	α - Melanosit-Uyarıcı Hormon

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Prediyabet görülme sıklığındaki artış 2007-2010.....	8
Şekil 2.2. 20-79 yaş arasındaki kişilerde yaş ve cinsiyete göre IGT görülme Sıklığı.....	8
Şekil 2.3. Prediyabetin görülme sıklığının cinsiyete göre ve prediyabeti etkileyen faktörlere göre dağılımı.....	9
Şekil 2.4. Diyabet ve Prediyabet değişimi.....	10
Şekil 2.5. Diyabet ve prediyabet komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem klavuzu.....	11
Şekil 2.6. VKİ tablosu.....	12
Şekil 2.7. Nörotrofinlerin biyolojik aktiviteleri ve bağlanma özellikleri	17
Şekil 2.8. Reseptör ile nörotrofinlerin etkileşimi.....	17
Şekil 2.9. BDNF geninin kromozomdaki lokasyonu.....	18
Şekil 2.10. BDNF'in pro-BDNF ve olgun BDNF olarak sentezlenmesi.....	19
Şekil 2.11. BDNF'in TrkB aracılı yolları	20
Şekil 2.12. BDNF'in genel etki mekanizması	20
Şekil 2.13. Beyindeki homeostatik ve hedonik beslenme döngüsü	21
Şekil 2.14. Melanokortin sinyal yolağının önemini vurgulayan hipotalamik beslenme döngüsü.....	22
Şekil 2.15. AMPK alt üniteleri	24
Şekil 2.16. AMPK aktivasyonunun moleküler yapısı.....	25
Şekil 2.17. AMPK aktivasyonu sonucu metforminin organlarda oluşturduğu etkiler	25
Şekil 2.18. Belleğin sınıflandırılması	30
Şekil 2.19. Hafızanın çalışma ve referans hafıza olarak sınıflandırılması.....	30
Şekil 2.20. Morris su tankı sistemi	32
Şekil 2.21. İnsan beyinde hipokampus lokalizasyonunun kadavradaki görünümü	33
Şekil 2.22. Sıçan hippocampus lokalizasyonu	33
Şekil 4.1. Deneye Başlamadan Önce Grupların Ortalama FBG Seviyelerinin Grafikte Gösterimi	43
Şekil 4.2. Deneye Başladıktan 8 hafta Sonraki Grupların Ortalama FBG Seviyelerinin Grafikte Gösterimi	44

Şekil 4.3. Deneye Başladıktan 16 hafta Sonraki Grupların Ortalama	
FBG Seviyelerinin Grafikte Gösterimi	45
Şekil 4.4. 16 Haftalık grupların ağırlık değişim grafiği.....	46
Şekil 4.5. Kontrol Grubu Isı Haritası	48
Şekil 4.6. Kontrol+Metformin Grubu Isı Haritası	48
Şekil 4.7. Prediyabet Grubu Isı Haritası	49
Şekil 4.8. Prediyabet + Metformin Grubu Isı Haritası.....	49
Şekil 4.9. Kontrol Grubu Probe Deneme Isı Haritası	50
Şekil 4.10. Kontrol+Metformin Grubu Probe Deneme Isı Haritası.....	50
Şekil 4.11. Prediyabet Grubu Probe Deneme Isı Haritası.....	51
Şekil 4.12. Prediyabet+Metformin Grubu Probe Deneme Isı Haritası	51
Şekil 4.13. BDNF geninin kontrol grubu ve prediyabet grubu arasındaki kat değişimi.	53
Şekil 4.14. BDNF geninin kontrol grubu ve prediyabet grubu arasındaki kat değişim grafiği	53
Şekil 4.15. BDNF geninin kontrol grubu ve kontrol+metformin grubu arasındaki kat değişimi	54
Şekil 4.16. BDNF geninin kontrol grubu ve kontrol+metformin grubu arasındaki kat değişimi grafiği	54
Şekil 4.17. BDNF geninin prediyabet grubu ve prediyabet+metformin grubu arasındaki kat değişimi.....	55
Şekil 4.18. BDNF geninin prediyabet grubu ve prediyabet+metformin grubu arasındaki kat değişimi grafiği	55
Şekil 4.19. BDNF geninin kat değişimlerinin grafiği	56

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Prediyabet için güncel tanı kriterleri	6
Tablo 2.2. Genç Erkek Wistar Ratlarda Kan Glukoz Seviyeleri	7
Tablo 2.3. Obezitenin tanısında kullanılan ölçüm yöntemleri.....	12
Tablo 2.4. Obezitenin sınıflandırılması	13
Tablo 2.5. Türkiye’de yıllara ve cinsiyete göre obezite verileri	14
Tablo 3.1. Genomik DNA eliminasyon karışım içeriği.....	40
Tablo 3.2. Genomik DNA eliminasyon protokolü	40
Tablo 3.3. Reverse Transcriptase Mix için bileşenler ve miktarlar	41
Tablo 3.4. Kullanılan primerler ve detayları.....	41
Tablo 3.5. qRT-PCR için kullanılan bileşenlerin oranları	41
Tablo 3.6. qRT-PCR Tepkime Koşulları	42
Tablo 4.1. Grupların ilk ortalama FBG seviyeleri.	43
Tablo 4.2. Grupların ikinci ortalama FBG seviyeleri.	44
Tablo 4.3. Deneye Başladıktan 16 hafta Sonraki Grupların Ortalama FBG Seviyeleri	44
Tablo 4.4. Haftalık ağırlık değişim tablosu	45
Tablo 4.5. Kaçış süreleri	46
Tablo 4.6. Morris su tankından elde edilen kaçış sürelerinin (t) anlamlılık değerleri	47
Tablo 4.7. BDNF geninin ortalama Ct değerleri	52
Tablo 4.8. GAPDH geninin ortalama Ct değerleri	53
Tablo 4.9. BDNF geninin kat değişim oranları	56

ÖZET

PREDİYABETİK HAYVAN MODELİNDE METFORMİN TEDAVİSİNİN BDNF GEN İFADESİ VE BİLİŞSEL FONKSİYONLAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

İbrahim Halil ÇİTÇİ

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Haziran 2018, 84 sayfa

Prediyabet, Dünya’da sıklığı artmakta olan bir hastalıktır. Makro ve mikrovasküler komplikasyonlar, glukoz toksisitesi, hiperinsülinemi prediyabette kognitif bozukluklara neden olabilmekte, ayrıca prediyabete sıklıkla eşlik eden obezite gibi hastalıklar da bu duruma katkıda bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar merkezi sinir sisteminin vücut kitlesinin düzenlenmesindeki rolüne dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, prediyabetik hayvan modelinde; hipokampus bölgesinde beyin türevi nörotrofik faktör (BDNF) gen ifadesi ile öğrenme arasındaki olası ilişkinin metformin tedavisi ile karşılaştırmalı olarak analizi yapıldı. Çalışmada 32 Wistar albino rat kullanıldı. Deneysel prediyabet oluşturmak için denekler yüksek yağlı diyet (HFD) ile beslendi. Prediyabetik model oluşturulduktan sonra bir gruba metformin tedavisi uygulandı. Kontrol, prediyabet ve metformin uygulanmış olan deney gruplarına Morris su tankı ile öğrenme testi uygulandı. Deneylerin sonunda hayvanlar sakrifiye edildi ve hipokampus bölgeleri izole edildi. Real-Time PCR kullanılarak hipokampal örneklerde BDNF gen ifadesi analizi yapıldı. Deney sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, HFD diyet ile indüklenmiş ratlarda kontrol gruplarındaki ratlara kıyasla öğrenme performanslarının daha düşük olduğu ve BDNF gen ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir ($p=0.044$). Metformin uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında öğrenme performansları ve BDNF gen ifadelerinde artış görülmüştür ($p=0.042$). Metformin uygulanan prediyabetik grup ile ilaç uygulanmayan prediyabetik grup karşılaştırıldığında ise öğrenme performansları ve BDNF gen ifadelerinde artış saptanmıştır ($p=0.044$). Bu araştırma sonucunda, BDNF geninin prediyabetik hayvanlarda öğrenme performansı ve enerji dengesini düzenlediğine işaret eden bulgular saptandı. Bu çalışma BDNF geninin bilişsel fonksiyonlar ve enerji metabolizmasını düzenlemedeki rolünü inceleyen ilk çalışmadır, BDNF ve ilişkili moleküllerle yapılacak olan diğer araştırmalar için yol gösterici sonuçların elde edildiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Prediyabet, Obezite, BDNF, Bilişsel Fonksiyonlar, Metformin

ABSTRACT

THE EFFECT OF METFORMIN TREATMENT ON BDNF GENE EXPRESSION AND COGNITIVE FUNCTIONS IN PREDIABETIC ANIMAL MODEL

İbrahim Halil ÇİTÇİ

Master of Science Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

June 2018, 84 pages

The prevalence of prediabetes is increasing rapidly in recent years. Prediabetes related factors such as macrovascular and microvascular complications, glucose toxicity, hyperinsulinemia have been suggested to be involved cognitive impairment in prediabetes, additionally risk factors that are linked to prediabetes; obesity can also cause cognitive impairments. In a recent human genome-wide association study, the role of the central nervous system in body mass regulation was strongly emphasized. In the present study, after prediabetes is induced by feeding wistar rats with high fat diets, the possible relationship between BDNF gene expression levels and learning-memory in the hippocampus which is the learning-related area in the brain will be investigated in the prediabetic animals. We assessed the importance of intact endogenous hypothalamic or hindbrain BDNF/TrkB signaling in the central regulation of energy balance with 32 Wistar rats respectively, comparing metabolic parameters and cognitive functions under high-fat diet or chow fed conditions. Our data show that when fed a high-fat diet, rats have significantly increased body weight and adiposity that is likely driven by reduced locomotor activity and core body temperature. In addition, under high fat diet conditions, rats show increased blood glucose levels and decreased cognitive functions ($p=0.044$). When Metformin administration rats show decreased blood glucose levels and increased cognitive functions ($p=0.042$). Taken together, our findings demonstrate that BDNF/TrkB is a novel metabolic and cognitive functions regulator and that enhanced signaling may contribute to the beneficial metabolic effects and cognitive functions.

Keywords: Prediabetes, Obesity, BDNF, Cognitive Functions, Metformin

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Daha önce ‘sınırdaki diyabet’ ya da ‘latent diyabet’ diye anılan bozulmuş glukoz toleransı (IGT) ve bozulmuş açlık glukozu (IFG), günümüzdeki sınıflamada ‘prediyabet’ olarak kabul edilmektedir. Prediyabet toplumda giderek sık görülmekte, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla mortalite ve morbiditede artışa neden olmaktadır. Prediyabet; insülin direnci, hiperinsülinemi, obezite (özellikle abdominal veya viseral obezite), dislipidemi ve hipertansiyonu içeren metabolik sendromlar ile ilişkilidir (1).

Amerika’da 2005-2006 yılları arasında yapılan bir araştırmada 20 yaş ve üzeri bireylerin %25.7’sinde IFG, %13.8’inde IGT saptanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) yetişkin popülasyonun toplamda yaklaşık %30’unda prediyabet, yaklaşık %40’ında hiperglisemi durumlarından biri bulunmaktadır. Türkiye’de ise 20 yaş ve üzeri toplumun %28.7’sinin prediyabetik olduğu saptanmıştır. Prediyabetik kişilerde tip 2 diyabet gelişim riski yüksektir, sıklıkla metabolik sendrom ile birlikte görülmektedir (2).

Obezitenin prediyabet ve metabolik sendroma neden olan moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın, obezite ve prediyabetin ortak metabolik zeminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Prediyabet vakalarının %70-90’nında obezite mevcuttur, aralarındaki bu sıkı korelasyondan dolayı prediyabet ve obezite birlikte değerlendirilmelidir (3).

Obezite, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından sağlığı bozacak ölçüde vücutta anormal veya aşırı yağ birikmesi olarak tanımlanmaktadır. Obezite, dünyada ve ülkemizde hızla artan önemli bir sağlık sorunudur ve dünya genelinde hastalıklar içerisindeki en büyük beşinci risk faktörü olması gerçeği obezite hakkında endişeye sebep olmaktadır (4). Prediyabetin yanı sıra obezite; tip 2 diyabet, koroner arter hastalığı, gastrointestinal problemler, solunum komplikasyonları, osteoartrit ve kanser ile bağlantılıdır. Obezite nedenlerinin ve tedavi seçeneklerinin iyi bilinmesi, prediyabet komplikasyonunun tedavisi açısından önemlidir (5).

Prediyabet, genetik ve çevresel etkileşimleri olan; ciddi ve kronik bir hastalıktır, çok sayıda faktöre bağlıdır ve tıbbi tedavi gerektirir. Prediyabetin en önemli risk faktörlerini; fiziksel aktivitede azalma, beslenme alışkanlıkları, yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi, evlilik, doğum sayısı ve genetik oluşturmaktadır (6).

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalar prediyabet ile kognitif bozulmanın arasında sıkı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. IFG ve IGT ile belirlenen prediyabetin ve prediyabetin neden olduğu komorbiditelerin kognitif bozukluğa yol açtığı, belleği zayıflattığı, beyin fonksiyonlarını olumsuz etkilediği, özellikle öğrenme ve bellek fonksiyonlarını içeren hipokampusun bundan etkilendiği görülmüştür (7).

Çalışmamızda analiz edilen “Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)”, nörotrofin büyüme faktör ailesinin üyesidir, 27 kDa olan bu protein, hipokampus ve hipotalamus başta olmak üzere beyin hücrelerinde sentezlenmektedir. Hipokampus beyinde öğrenme ve bilişsel fonksiyonların gerçekleştiği merkezdir. BDNF molekülü öğrenme, enerji dengesi ve besin alımı gibi olaylarda rol alan bir moleküldür ve beyin öğrenme merkezi olan hipokampusta yüksek oranda sentezlenmektedir (8).

BDNF nöronal sağkalımı, nöronal gelişimi ve farklılaşmayı, sinaptik yenilenmeyi sağlamaktadır (9,10). BDNF bir nörotrofin olmasının yanında metabotrofin olarak da görev almaktadır, leptin salınımını düzenleyerek besin alımını düşürür ve enerji harcanmasını yükseltir. Böylece prediyabet, obezite, hiperglisemi ve hiperinsülinemi ile ilişkilidir (11).

Araştırmamızda kullanılan metformin, tip 2 diyabette, prediyabet ve obezite tedavisinde kullanılmakta olan bir ilaçtır (12).

Literatürde prediyabet, obezite ve diyabet ile bilişsel fonksiyonların ilişkili olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında prediyabet ve bilişsel fonksiyonlar arasındaki ilişkinin moleküler mekanizmalarını aydınlatması amaçlanarak BDNF geni analiz edildi, aynı zamanda klinik kullanımda olan metformin tedavisinin de etkisinin ortaya konması hedeflendi.

Bu doğrultuda prediyabetik hayvan modeli oluşturularak, prediyabetli hayvanların bir grubuna metformin tedavisi uygulandı. Kontrol, prediyabet ve metformin uygulanmış kontrol ve prediyabet gruplarında bilişsel fonksiyonlar ve BDNF gen ifadeleri saptandı.

Sonuç olarak, prediyabette bilişsel fonksiyonların BDNF geni ile ilişkili olduğu belirlendi. Metforminin öğrenmeye etkili olduğu saptandı. Özetle BDNF, prediyabet ve öğrenme fonksiyonları arasında bir ilişki olduğu sonucuna varıldı.

Çalışma sonuçlarımız metabolik hastalıklarda bilişsel fonksiyonların moleküler olarak nasıl etkilendiğini hedefleyecek çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Prediyabet

2.1.1. Prediyabet Nedir?

Prediyabet terimi 1940'lı yılların başlarında ilk olarak Arjantin ve İspanya'da, doğum sonrasında ortaya çıkan anomallikler ile ilerleyen yıllarda diyabetik bireyleri tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Zaman ile değişen bu tanımlama, 1960'lı yılların başlarında açlık kan şekeri normal olan ve glikozüri tanısı olmayan ancak Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)'nde de normal sonuçlar vermeyen kişileri tanımlamak için kullanıldı (13). DSÖ 1965 yılında diyabetle ilgili ilk uzman raporunu yayınladı ve sonra 1979 yılında NDDG (Ulusal Diyabet Data Grubu) bozulmuş glukoz toleransı (IGT) diye adlandırılan ara bir safha tanımlamışlardır. Bu safha "latent (gizli) diyabet" veya "semptomatik olmayan diyabet" olarak adlandırılmıştır (14). Bu durumun tespiti için IGT'nin belirlenmesi amacıyla OGTT ya da tokluk durumunun ikinci saatinde kan örneği alınarak saptanması gerektiği belirtilmiştir. DSÖ 1997 yılında, diyabetik düzeyde olmayan bozulmuş açlık glukozunu (IFG) tarif etmiş olup ve IFG ve IGT kriterlerini de tekrar düzenlemiştir (15). 2011 yılında, IFG ve IGT'nin tip 2 diyabetin gelişimi için yüksek önem taşıdığı ve aynı zamanda kardiyovasküler hastalıkları için de risk faktörü oldukları Amerikan Diyabet Derneği (ADA)'nin kılavuzuna girmiştir (16). Bütün tanımlamaların ardından önceden "sınırdaki diyabet" olarak bilinen IGT-IFG, günümüzde prediyabet olarak adlandırılmaktadır (17).

2.1.2. Prediyabet Tanı Kriterleri

Tipik olarak normalden daha yüksek kan şekeri konsantrasyonuna sahip ancak diyabet eşik değerinden daha düşük olan, diyabet gelişimi için yüksek riskli gruplar prediyabet olarak tanımlanmaktadır (18). Prediyabet tanısı konulması için öncelikle IGT ve IFG değerlerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu risk değerlendirmesinde genellikle bu iki önemli faktör birlikte incelenmektedir ancak bu iki faktörün oluşum mekanizmaları birbirinden tamamen farklıdır (14). Yapılan çoğu çalışmada IFG'nin genellikle beta hücresi disfonksiyonu aracılığı ile gerçekleşmesi, IGT'nin ise insülin direnci mekanizması arasında yakın ilişki olduğu belirlenmiştir (13,19).

IFG’de daha çok karaciğerde, gecikmiş birinci safha insülin salınımı var iken, orta seviyede insülin direnci ile kas dokularında normal düzeye yakın insülin duyarlılığı vardır. IGT’de ise β -hücrelerinin %80’le yakın fonksiyon kaybı, kas dokularında orta veya ileri seviyede insülin direnci gözlenmekte iken, gecikmiş birinci ya da ikinci safha insülin salınımı belirlenmiştir (20,21). Prediyabet için tanı kriterleri zaman içinde değişmiştir ve kurumlar arasında bu değerler değişiklik göstermektedir (18) (Tablo 2.1). Dünya Sağlık Örgütü’ne (DSÖ) göre, bozulmuş açlık glukozu (IFG); bozulmuş glukoz toleransı olmadığı durumlarda (IGT), açlık plazma glukoz (FPG) konsantrasyonu ≥ 6.1 ve < 7.0 mmol/L olarak da tanımlanır. İkinci bir tanımlama da bozulmuş glukoz toleransı (IGT) olup, 75 gr. oral glukoz tolerans testi (OGTT) sırasında ölçülen açlık plazma glukoz (FPG) konsantrasyonu < 7.0 mmol/L ve 2 saatlik yükleme sonrası glukoz konsantrasyonu ≥ 7.8 and < 11.1 mmol/L olarak tanımlanır (22). Amerikan Diyabet Derneği (ADA), IGT için aynı eşik değerini uygulamaktadır ama IFG için daha düşük bir sınır değeri (ayrım değeri) kullanmaktadır (FPG 5.6–6.9 mmol/L). Bunun yanı sıra yüksek diyabet riski için yeni bir kategori olarak hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) değerini %5.7- 6.4 arasında tanımlanmaktadır (23).

Tablo 2.1. Prediyabet için güncel tanı kriterleri (23).

Bozulmuş Açlık Glukozu	100-125 mg/dL (5.6-6.9 mmol/L)
Bozulmuş Glukoz Toleransı	OGTT (75 gr.) sonrasında 2. Saatte Plazma Glukozu 140-199 mg/dL (7.8-11.0 mmol/L)
HbA_{1c}	%5.7-6.4

HbA_{1c}, diyabetli ve prediyabetli hastalarda uzun vadede glukoz seviyesinin kontrolü için önemlidir. Bu HbA_{1c} değeri, son 3 aydaki plazma total glukoz seviyesi hakkında bilgi vermektedir. Önceki yıllarda standardizasyonunda yaşanan sorunlar nedeniyle ve tanı koyma değer aralığının belirsizliği sebebiyle, bu değer tek başına prediyabet tanısı konulması için yeterli değildi. Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu sorunlar aşılmış ve 2008 yılında Uluslararası Diyabet Uzmanlar Komitesi’nin kararı ile HbA_{1c} değerinin diyabet için %6.5 olarak belirlemiştir. Prediyabetik bireyler için ise %5.7-%6.4 arasında kabul edilmiştir (24). Prediyabet terimi, prediyabetli birçok kişide diyabet gelişmemesi nedeniyle eleştirilmiştir (18).

Ratlarda kan glukoz seviyeleri insanlarınkinden farklıdır (25) (Tablo 2.2). Henüz bu seviye konusunda ortak bir kanıya varılmamıştır, bunun sebebi ratlarda bu seviyeyi etkileyen çeşitli faktörler olmasıdır, bunlar:

- Cinsi, cinsiyeti, yaşı
- Uygulanan işlemler (Streptozotosin (STZ), HFD) (25,26)

Tablo 2.2. Genç Erkek Wistar Ratlarda Kan Glukoz Seviyeleri (26).

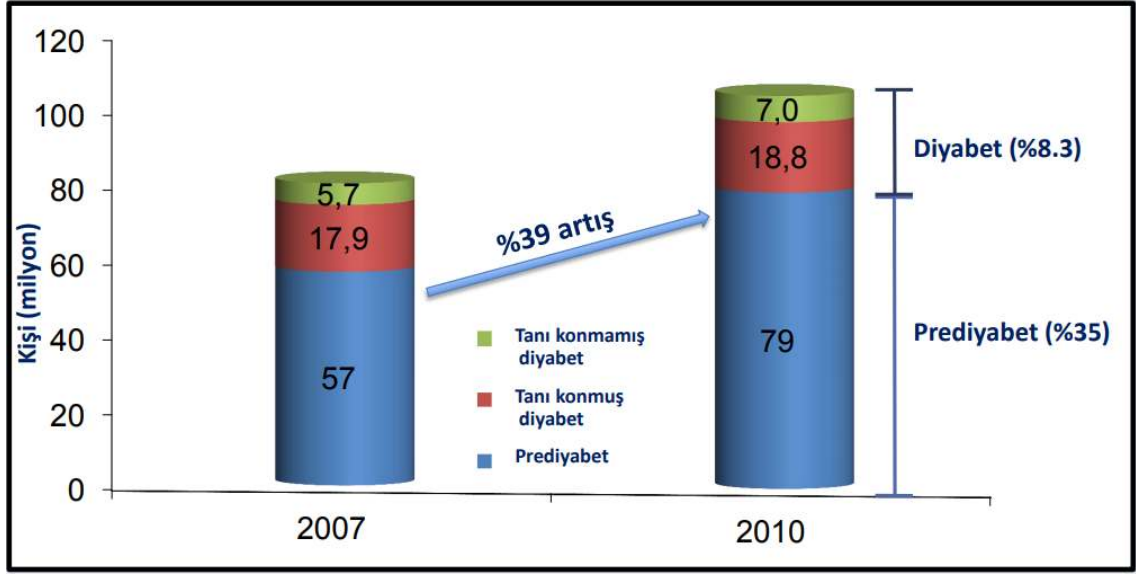
Bozulmuş Açlık Glukozu (Normal)	70-110 mg/dL (3.9-6.1 mmol/L)
Bozulmuş Açlık Glukozu (Diyabetliler)	160-220 mg/dL (8.9-12.2 mmol/L)
Bozulmuş Açlık Glukozu (Prediyabet)	110-160 mg/dL (6.1-8.9 mmol/L)

2.1.3. Prediyabetin Epidemiyolojisi

2.1.3.1. Prediyabetin Dünya'daki Durumu

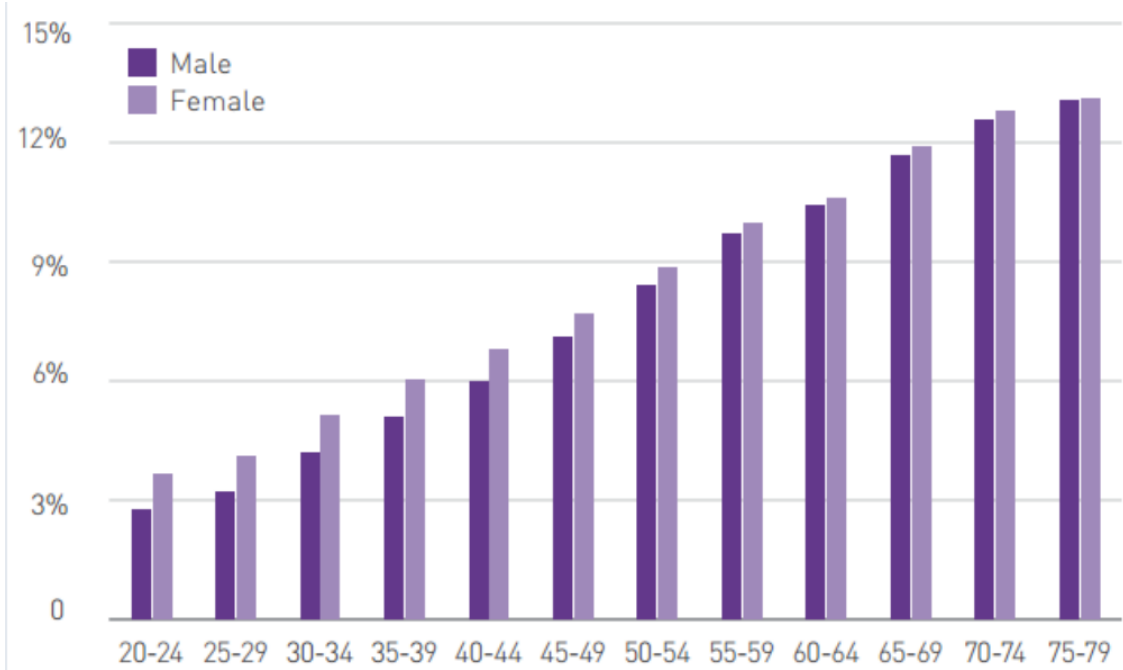
IGT ve IFG görülme sıklığı farklı toplumlar ve çeşitli yaş gruplarında araştırılmıştır. Her ikisinin de görülme sıklığı yaygındır fakat IGT, IFG'ye göre %6,7 daha sık görülmektedir (14,17,27).

Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi (NHANES)'nin 2005-2006 verilerine göre Amerika nüfusunun %34,62'si prediyabet olup bunların, %19,4'ünde IFG, %5,4'ünde IGT karşımıza çıkmaktadır. Bunların %9,8'inde ise iki durumun kombinasyonu olarak karşımıza çıkar (28). 2011 yılında Hastalıkların Kontrolü ve Önlenmesi merkezi (CDC) kontrolü altında Diyabet İşbirliği Topluluğu'nun yaptığı çalışmaya göre, prediyabet görülme sıklığının %14,2 olduğu, aynı zamanda yaklaşık 79 milyon kişinin prediyabet olduğu bildirilmiştir (29,30) (Şekil 2.1). Aynı topluluğun 2014 yılında yayınladığı rapora göre Amerika nüfusunun %37'si prediyabetiktir (30).



Şekil 2.1. Amerika’da prediyabet görülme sıklığındaki artış 2007-2010 (30).

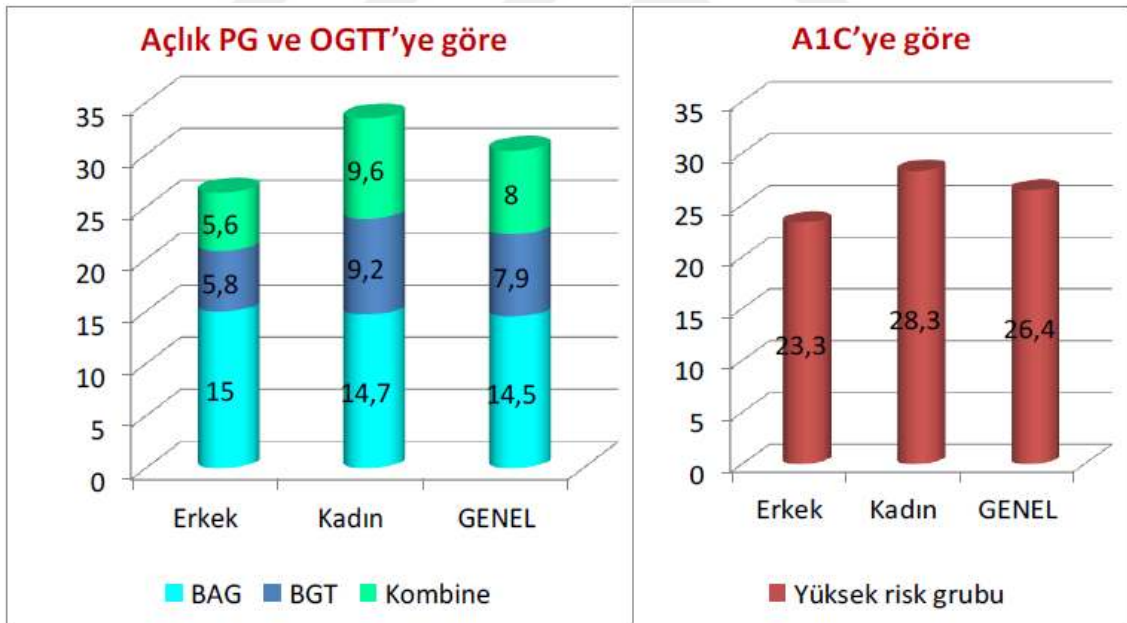
2015 yılında Dünya Diyabet Federasyonu (IDF), yayınladığı diyabet atlasında dünya çapında IGT görülme sıklığı %6,7 olarak belirtilmekte ve tahmini 318 milyon kişinin prediyabet olduğunu varsaymaktadır. Bu sayının 2040 yılında yaklaşık 481 milyon kişiye ulaşacağı düşünülmektedir. Prediyabetin görülme sıklığı yaş ile birlikte artış gösterir (31) (Şekil 2.2).



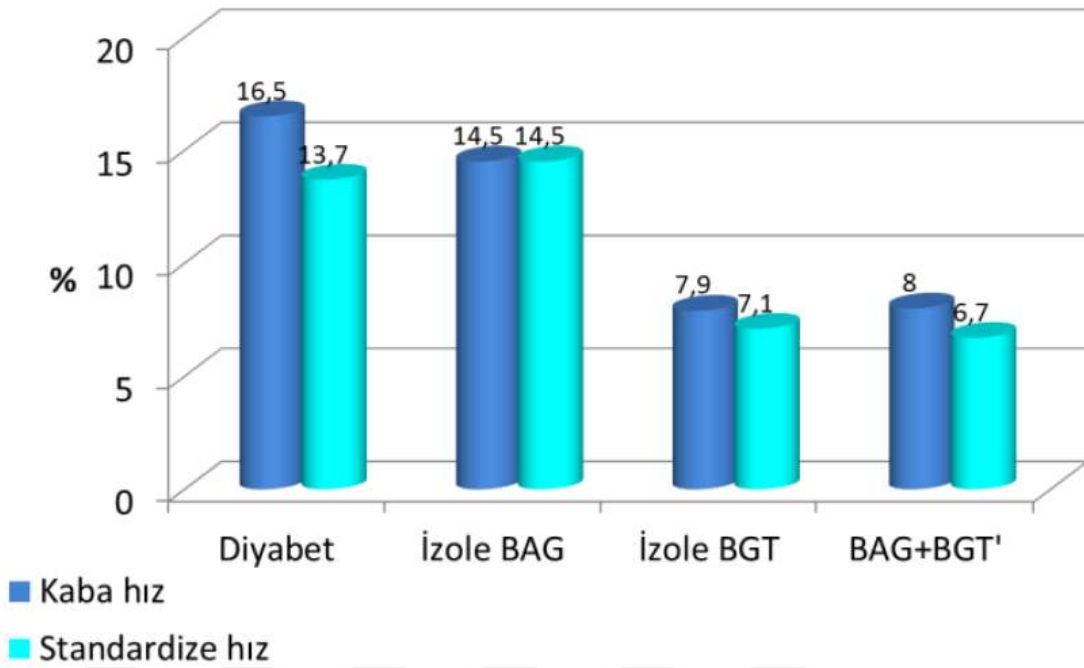
Şekil 2.2. 20-79 yaş arasındaki kişilerde yaş ve cinsiyete göre IGT görülme sıklığı (31).

2.1.3.2. Prediyabetin Türkiye’deki Durumu

2007-2008 yıllarında ülkemizde gerçekleştirilen TEKHARF çalışmasına göre 35 yaş üzeri bireylerde Tip 2 diyabet görülme oranı %11,3 olup, prediyabet görülme oranı ise %13,9’dur. Yine aynı çalışmada Tip 2 diyabetin artış hızının %6,7 olduğu belirtilmiştir (29). Ülkemizde bu alandaki en kapsamlı çalışma TURDEP tarafından yapılmıştır. İlk olarak yapılan TURDEP-I çalışmasında (1997-1998) ülke çapında yaklaşık 25bin kişi taramış ve tip 2 diyabet görülme sıklığı %7,2 olup, IGT %6,7 (aynı zamanda prediyabet oranını temsil ediyor) olarak bulunmuştur (32). Aradan 12 yıl geçtikten sonra yapılan TURDEP-II çalışmasında ise tip 2 diyabet görülme oranı %16,5’e yükselmiş olup, prediyabet görülme oranı ise %30,4’e kadar çıkmıştır ki; bu da, yaklaşık 14 milyon bireyin prediyabetik olduğunu göstermektedir. Yine bu çalışmaya göre IFG %14,5 olup, IGT %7,9 seviyelerindedir (Şekil 2.3). Bu 12 yıllık süreç zarfında tip 2 diyabet %90 oranında, IGT ise %100 oranında artış göstermiştir (Şekil 2.4). Bütün bu veriler, cinsiyet, yaş ve yerleşim alanı durumlarına göre farklılık gösterir (33,34).

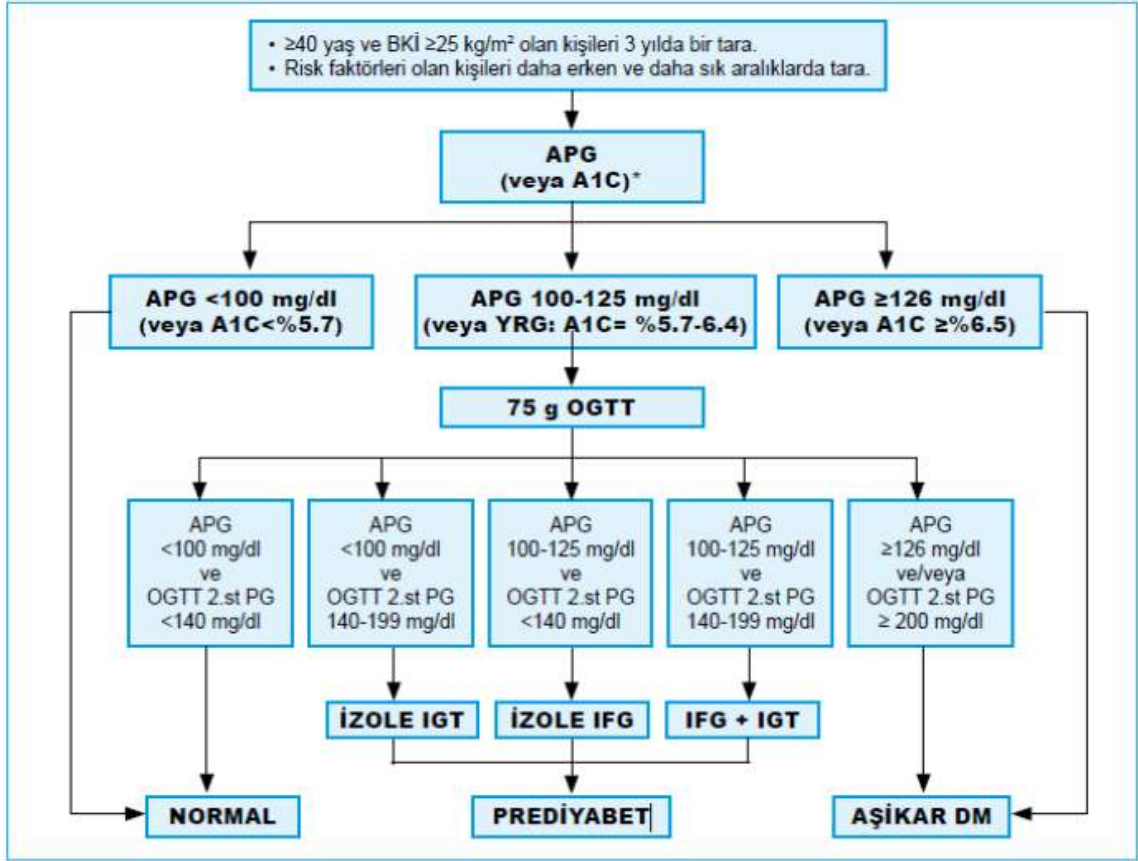


Şekil 2.3. Türkiye’de prediyabetin görülme sıklığının cinsiyete göre ve prediyabeti etkileyen faktörlere göre dağılımı [BAG (IFG): Bozulmuş Açlık Glukozu, BGT (IGT): Bozulmuş Glukoz Toleransı] (34).



Şekil 2.4. Türkiye’de Diyabet ve Prediyabet değişimi [BAG (IFG): Bozulmuş Açlık Glukozu, BGT (IGT): Bozulmuş Glukoz Toleransı] (34).

Dünyada ve ülkemizde prediyabet sıklığının artması hızlı kentleşme neticesinde; artmış yağ tüketimi ve yüksek glisemik yükü olan gıdalarla olan beslenme alışkanlığına yönelme, hareket azalması ve bu durumlara bağlı olarak gelişen artmış obezite ile ilişkilendirilmiştir. Yine stres kaynaklarının artması ve etnik grupsal etkilerinde de rol oynaması muhtemeldir (35). IFG ve IGT’nın temel farklılıkları: IGT daha çok periferik (iskelet kası) insülin direnci ile ilişkili iken IFG artmış glukoneojenez ile ilişkilidir. Kombine durumda hepatik ve ekstrahepatik insülin direnci ve artmış glukoneojenez vardır. IFG’nda izole ilk faz insülin sekresyonu defekti mevcutken, IGT hem ilk hem de ikinci faz salınım defekti ile ilişkilidir (36). IGT gelecekteki diyabet gelişimi ile daha yakından ilişkilidir. IFG ve IGT birlikteliği riski iki katına çıkarır. IGT kardiyovasküler risk artışı ile daha fazla ilişkilidir. IGT, retinopati ve nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonlarla da daha yakından ilişkilidir (37). Diyabet ve prediyabet komplikasyonlarının klavuzu Şekil 2.5’te gösterilmiştir (17).



Şekil 2.5. Diyabet ve prediyabet komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem klavuzu APG (FBG): Açlık Plazma Glukozu(17).

IFG ve IGT'nin normal seviye ile diyabet sınırı arasında olduğu değerlerde, bel çevresinde yağlanma, hipertansiyon, trigliserid seviyesinin yükselmesi ve Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL) kolesterolün düşüklüğü gözlemlenmiştir. Bu da obezite ile prediyabet arasındaki bağların güçlü olduğunu göstermektedir (26).

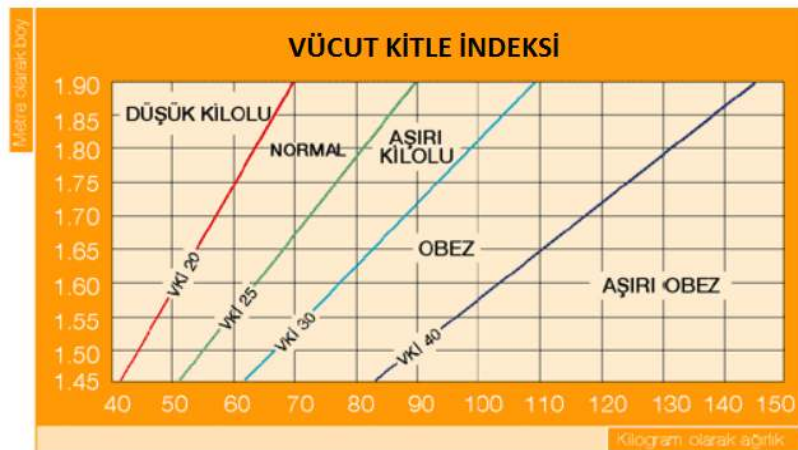
2.2.Obezite

Obezite, genetik ya da çevresel faktörlerin etkileri ile ortaya çıkabilen, vücutta yağ doksunun aşırı birikmesiyle karakterize, bunun yanı sıra psikolojik, sosyal ya da medikal komplikasyonlar gibi birçok hastalıkla beraber görülebilen metabolik bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır (38). Vücutta besinlerle alınan enerji miktarının, metabolizmayla ve fiziksel aktivite yoluyla harcanan enerji miktarından fazla olduğu durumlarda ortaya çıkmaktadır (39,40). Vücuttaki yağ miktarını direkt olarak ölçmek oldukça zordur, bunun yerine dolaylı ölçme yöntemleri kullanılmaktadır (Tablo 2.3). Erişkin bireylerde obezite tanısı, genellikle mortalite ve morbidite ile ilişkilendirilir ve tanı koymak için en pratik yöntem Vücut Kitle İndeksi (VKİ) olarak bilinmektedir (41).

Tablo 2.3. Obezitenin tanısında kullanılan ölçüm yöntemleri (Uyarlanarak alınmıştır) (40).

Obezite Ölçüm Yöntemleri
1. Vücut Kitle İndeksi
2. Vücut Yağ Oranı
3. Bel-Kalça Oranı
4. Deri Kalınlıkları Ölçümü
5. Toplam Vücut Suyu
6. Dual Enerji X-ray Absorbsiyometri
7. Biyoelektrik İmpedans Analizi
8. Potasyum İzotopu
9. Nötron Aktivasyon Analizi
10. Bilgisayarlı Tomografi
11. Manyetik Rezonans Görüntüleme
12. Ultrasonografi

İnsülin direnci, prediyabet ve diyabet obezite ile birlikte görülebilmekte ve bu durumlarda vücutta yağ oranının yüksek olmasından ziyade, karın ve bel çevresinde yağlanma görülmektedir. Obezitenin ileri aşamalarında pankreas, kas, karaciğer gibi diğer organlarda da yağlanma görülebilmektedir. VKİ'nin yanı sıra başka ölçüm yöntemleri de kullanılarak tanı kesinleştirilebilir. Obezite Tablo 2.4'de gösterildiği gibi sınıflandırılmaktadır (42,43). VKİ'nin hesaplanması Beden kitle indeksi, vücut ağırlığının (kg olarak), boy uzunluğunun (metre cinsinden) karesine bölünmesiyle hesaplanır (44) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. VKİ tablosu (44).

Tablo 2.4. Obezitenin sınıflandırılması (DSÖ 2006'dan uyarlanmıştır) (42).

Grup	Vücut Kitle İndeksi (VKİ)
Normal kilo altı (Zayıf)	< 18,5
Normal kilo (Sağlıklı)	18,5 – 24,99
Kilolu (Pre-obez)	25,0 – 29,99
Obez	≥ 30,0
Sınıf 1	30,00 – 34,99
Sınıf 2	35,5 – 39,99
Sınıf 3 (Morbid obez)	≥ 40

Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda obezite tanısı Lee İndeksi ile konulmaktadır ve formülü aşağıdaki gibidir.

$$\frac{(VÜCUT AĞIRLIĞI)^{\frac{1}{3}}}{BOY} \times 1000$$

Yukarıdaki formülde çıkan sonuç 3'den büyük olursa obez kabul edilir. Yapılan çalışmalarda VKİ, Lee indeksi gibi parametrelerin deney hayvanlarında vücut kompozisyonunu belirlemek için kullanılacağı gösterilmiştir. Lee İndeksi, vücuttaki yağ kütlesi ile doğrudan ilişkilendirilmiştir (45).

2.2.1.Obezitenin Prevalansı

OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) verilerine göre 2008 yılında obezite oranı %15,2 olarak tespit edilmişken, 2014 yılında bu oran %31,1 artış göstererek %19,9'a kadar yükselmiştir. Bu artış oranı, kadınlarda %32,3 olarak tespit edilmişken, erkeklerde kadınlara göre daha düşük olup %24 olarak ölçülmüştür (46). Ülkeler çapında değerler incelendiğinde en yüksek obezite oranına %28,7 ile ABD'nin sahip olduğu görülmektedir, ABD'yi %22,2 ile İzlanda izlemektedir ve Türkiye ise %19,9'luk oranla üçüncü sırada yer almaktadır (47).

2016 yılında yapılan Türkiye Sağlık Araştırması (TSA) verilerine göre 2014 yılında %19,9 olan obez birey oranı çok az gerileme göstererek %19,6'ya gerilemiştir. Cinsiyete göre incelendiğinde, kadınlarda obezite oranı %23,9 iken, obez öncesi durumun görüldüğü oran ise %30,1'dir. Erkeklerde obezite oranı 15,2 iken, %38,6'sının da obez öncesi durumda olduğu görülmüştür (48) (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Türkiye’de yıllara ve cinsiyete göre obezite verileri (48).

[15+yaş]

Yıl ve cinsiyet	Toplam	Düşük kilolu	Normal kilolu	Obez öncesi ¹	Obez
2014					
Toplam	100	4,2	42,7	33,7	19,9
Erkek	100	2,8	43,7	38,2	15,3
Kadın	100	5,5	40,7	29,3	24,5
2015					
Toplam	100	4	42,1	34,3	19,6
Erkek	100	2,5	43,8	38,6	15,2
Kadın	100	5,6	40,4	30,1	23,9

Tablodaki rakamlar yuvarlamadan dolayı toplamı vermeyebilir.

(1) “Fazla kilolu ifadesi “obez öncesi” olarak değiştirilmiştir.

2.2.2.Obezite Genetiği

Obezitede kalıtımın rolü ilk olarak tek yumurta ikizlerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Günümüzde obezite genetik ilişkilerine göre üç sınıfa ayrılır. Bunlar; tek gen mutasyonları ile oluşan obezite, poligenik obezite ve sendromik olan obezitelere (49,50). Bazı mutasyonlar sonucu oluşan sendromlarda direkt olarak obezite fenotipi gözlemlenmektedir ve bunlar sendromik obezite olarak bilinmektedirler (51). Tek bir gende ya da kromozomal bölgedeki mutasyonlardan kaynaklanabilen nadir görülen bozukluklar monogenik hastalıklar olarak bilinmektedir. Bu tip mutasyonlar enerjinin dengesinde, adipogenezde ve bunların sebep olduğu vücut ağırlığının düzenlenmesinde monogenik mutasyonlar faaliyet göstermektedir. Leptin ile leptin reseptörü, Pro-opiomelanokortin (POMC), Melanokortin 4 Reseptörü (MC4R), Prohormon Konvertaz 1 (PC1) gibi genlerde meydana gelen mutasyonlar monogenik obezite ile ilişkilendirilmiştir (52,53). Leptin Agouti-ilişkili Protein (AgRP)/melanokortin yolağının enerji dengesinin düzenlenmesinde primer rol oynadığı ortaya koyulmuştur. POMC proteini leptin sinyalinin periferden merkezi homeostatik cevap halinde iletimine katılır. POMC ürünü ve özellikle de α - Melanosit-uyarıcı Hormon (α -MSH) hipotalamus'taki MC4R reseptörlerinde AgRP proteini tarafından antagonize edilir (54). Melanokortinlerin enerji dengesini sağlamadaki rolü ve hipotalamus melanokortin sistemi elemanları, yani özellikle POMC peptidlerinden α -MSH, MC3R, MC4R ve AgRP ön plana çıkmaktadır. Hipotalamustaki POMC ve AgRP nöronlar beslenme ve metabolizmasını modüle eden diğer merkezlerle ilişki halindedir (55).

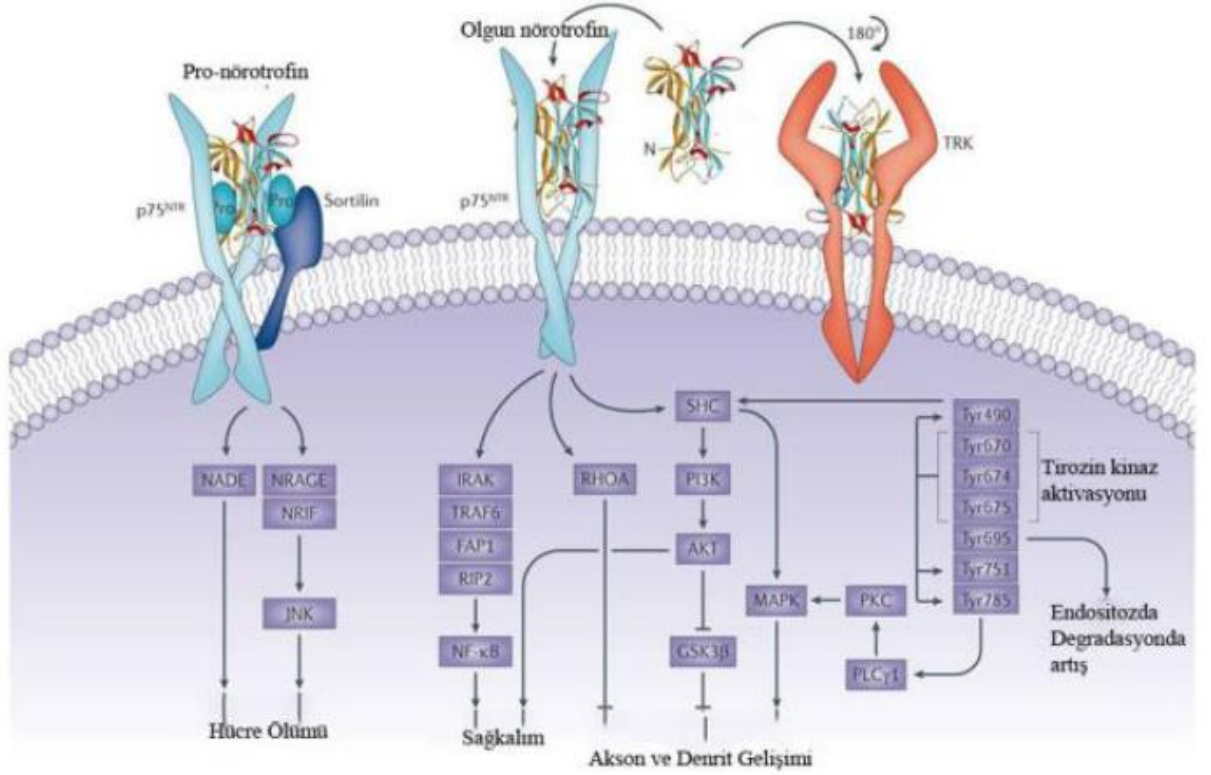
Hipotalamik Melanokortin sistemindeki POMC nöronlarının aktiviteleri leptin, insulin, glukoz, grelin, peptid YY, nöropeptid Y (NPY), β -endorfin, serotonin, Gamma-aminobutirik asit (GABA), Kokain ve Amfetamin düzenleyici transkript (CART) ve oreksinler gibi birçok eleman tarafından direkt veya dolaylı olarak etkilenmektedir. Bunlardan AgRP, NPY, POMC ve CART memelilerde besin alımı ve enerji dengesinde hem gelişimsel olarak hem de erişkin dönemde önemli roller oynadığı bilinmektedir (56). Melanokortin sisteminin beslenme davranışındaki merkezi rolü onu obezite tedavisinde hedef haline getirmiştir, özellikle bu durum MC4R için geçerlidir (57). Adipoz kökenli olan leptinin dolaşımdaki miktarı yağ kitlesi ile orantılı olup, besin alımını azaltıcı ve enerji harcamasını arttırıcı yönde etki gösterdiği ve bu suretle vücut ağırlığı dengesini düzenlediği ortaya konulmuştur. Leptin etkisini NPY, MCH ve AgRP gibi iştah arttırıcı nöropeptidleri “downregüle” ederek ve α -MSH, CART, CTRH gibi bazılarını da upregüle ederek iştahı azaltıcı bir etki ortaya koymaktadır (58). Leptin reseptörü ise, Leptin'in ağırlık-düzenleyici etkisinin hipotalamusta ve özellikle onun uzun izoformuna bağlanması ve aktifleşmesi sonucu ortaya çıkmasında etkili olduğu gösterilmiştir (59). LEPR genindeki varyasyonların da enerji harcaması, fiziksel aktivite düzeyi, abdominal obezite boyutunu etkilediği ve bazı obezite fenotipleri ile ilişkilendirildiği rapor edilmiştir (60). Hipotalamusun arkuat nukleusunda ifade edilen POMC geni, leptin sinyaline cevaben hipotalamusta enerji dengesini kontrolde rol oynayan melanokortin sisteminin önemli bir elemanıdır. Leptin metabolik etkisini kısmen POMC geninin ürünü ve özellikle de α -MSH aracılığı ile Melanokortin 4 Reseptörünü aktifleştirerek ortaya koyar (61). Bu etki onun endojen antagonisti olan AgRP tarafından antagonize edilir. Bu gendeki ve PC1 genindeki polimorfizmler ile vücut yağ dağılımı ve obezite arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (62). MC4R reseptörünün POMC'nin PC1'e bağımlı kesimi ile ortaya çıkan bir melanokortin olan α -MSH ile aktivasyonu hipofajiyi tetiklediği bildirilmiştir. α -MSH, POMC nöronlarından farklı olan ve hipotalamustaki arkuat nukleusta ifade edilen AgRP tarafından MC4R'a bağlanmak için antagonize edilir (63). MC4R'nün obezitedeki rolü farelerde bu genin baskılanması ile gösterildi. İnsanlarda yapılan mutasyon analizi çalışmaları sonucunda MC4R geninde meydana gelen mutasyonları obezite olgularının % 1-6'sında görüldüğü teyit edilmiştir (64). İştah arttırıcı bir nöropeptid olan AgRP lokal olarak beyinde hipotalamusun arkuat nukleusunun yanı sıra, testis ve adrenal bezi gibi perifer dokularında da ifade edilmekte ve besin alımını, enerji dengesinin düzenlenmesi gibi ana role sahiptir (65).

AgRP aktivitesinin en iyi bilinen yönü proteinin besin alınımlarını arttırıcı ve güçlü bir iştah arttırıcı etkisinin bulunmasıdır (66).

Mevcut veriler AgRP'nin melanokortin reseptör antagonisti olduğu ve fizyolojik etkisini α -MSH ve onun reseptörlerini de (MC3R & MC4R) bloke ederek ortaya koyduğunu öngörmektedir. Leptin tarafından “downregülasyonu” ve Ghrelin tarafından da “upregülasyonu” yapılmaktadır (67,68).

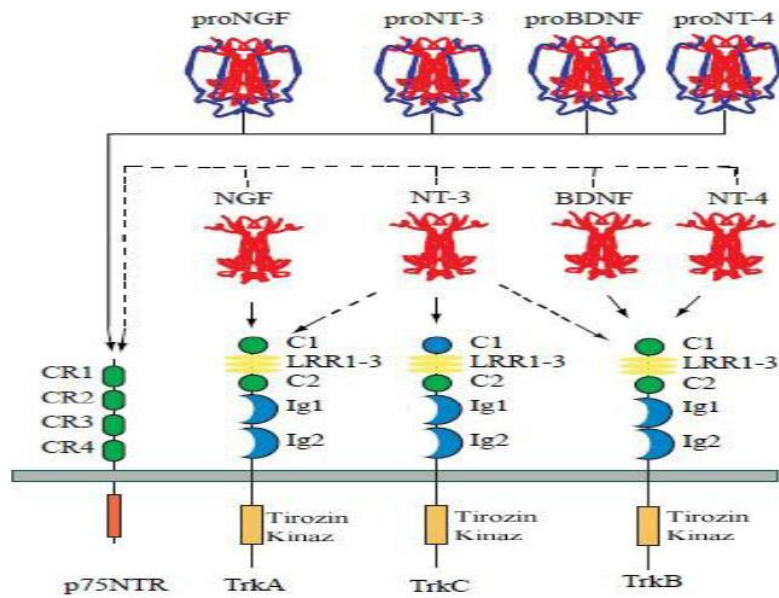
2.3.Nörotrofinler

Nörotrofin ailesi, nöronların sağ kalınımını (plastisite), gelişmesini, farklılaşmasını sağlayarak nöronların fonksiyonlarını etkilemektedir. Sinapsların stabil kalmasını sağlamaktadır, aynı zamanda sinaptik fonksiyonlar ile sinaptik sağkalınımını kontrol ederken, dendrit ile akson dallanmalarını yapılandıran büyüme faktörleridir. Dimerik polipeptid yapıda olan bu aile uzun dönem potansiyel artışını (LTP) da sağlamaktadır (69,70). Nörotrofinler, temel olarak Merkezi Sinir Sistemi (CNS)'den sentezlenmektedir, bunun yanı sıra Periferik Sinir Sistemi (PNS) nöronları ile periferik dokularda nöronal olmayan birçok hücreden de sentezi gerçekleşmektedir (71). Her nörotrofin, CNS ve PNS'nde nöronların alt grupları üzerinde farklı etkilere sahiptirler (72). Her nörotrofin Trk ailesinin proteinlerinden birine veya daha fazlasına bağlanır. Tropomiyozin Reseptör Kinaz A (TrkA) Sinir Büyüme Faktörü (NGF)'nü bağlar, Tropomiyozin Reseptör Kinaz B (TrkB) BDNF ve Nörotrofin 4/5 (NT-4 / 5)'i bağlar, Tropomiyozin Reseptör Kinaz C (TrkC) ise Nörotrofin 3 (NT-3)'ü bağlar. Nörotrofinin reseptöre bağlanması ile ligandla indüklenen Trk reseptörlerinin dimerizasyonuna ve otofosforilasyonuna yol açar. Nörotrofinler hücre içerisinde Mitojenle-etkileşen Protein Kinaz (MAPK), Fosfatidilinositol-3 (PI3K), Fosfolipaz C Gamma (PLC- γ) dahil olmak üzere hücre içi sinyal iletimine yol açar (73,74) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Nörotrofinlerin biyolojik aktiviteleri ve bağlanma özellikleri (74).

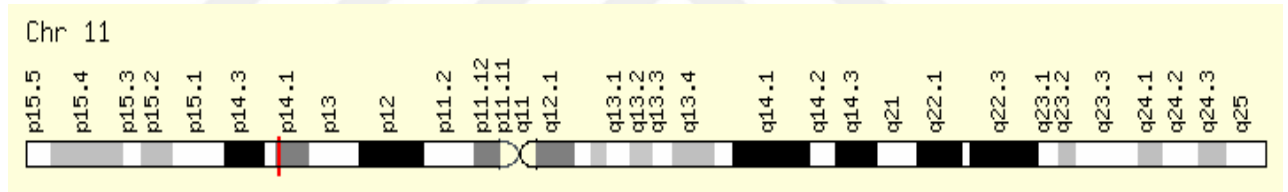
Nörotrofinler etkilerini, genellikle yüksek affiniteli oldukları Trk reseptörleri üzerinden gösterirken, nadir olarak daha düşük affiniteli oldukları Nörotrofin Reseptör p75 (p75^{NTR}) reseptörleri aracılığı ile de gösterebilmektedirler (69,75). Hangi nörotrofinin hangi reseptörü aktive ettiği Şekil 2.8’de gösterilmiştir (70).



Şekil 2.8. Reseptör ile nörotrofinlerin etkileşimi (70).

2.3.1.Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)

İlk kez domuz beyindeki dokudan elde edilen BDNF, nörotrofin büyüme ailesinin NGF'den sonra tanımlanan üyesidir (76). BDNF ifadesi, fetal gelişim esnasında düşük olup, doğumdan sonra artmaktadır ve erişkinlerde ise azaldığı gözlemlenmiştir (77).Gelişim sırasında, BDNF'in diğer dokulara göre sinir sisteminde ifadesi daha fazladır (78). BDNF'in ifadesi genellikle nöronlarla sınırlı olmak üzere en çok hipokampus, hiptalamus, serebral korteks ve amigdalada mevcuttur (79,80). BDNF 11. kromozomun kısa kolunda (11p13) lokalizedir ve 9 ekzon içermektedir (Şekil 2.9) (81). BDNF ilk olarak pre-pro-BDNF olarak sentezlenir, 32 kDa pro-BDNF'i oluşturmak için endoplazmik retikulumda öncül dizi kesilir ve daha sonra trans golgi ağına doğru harekete geçer. Bu oluşan pro-BDNF furin veya pro-konvertaz enzimlerinden biri ile kesim yapılarak 14 kDa olgun BDNF'in oluşması sağlanabilir (Şekil 2.10) (82). BDNF geninin sahip olduğu ekzonlar “alternatif splicing” ile dokuya özgü sentezlenmektedir. Örnek olarak ilk üç ekzonun transkriptleri beyinde daha fazla mevcut iken, 4. ekzonun transkripti en çok kalp ile akciğerde mevcuttur (83).

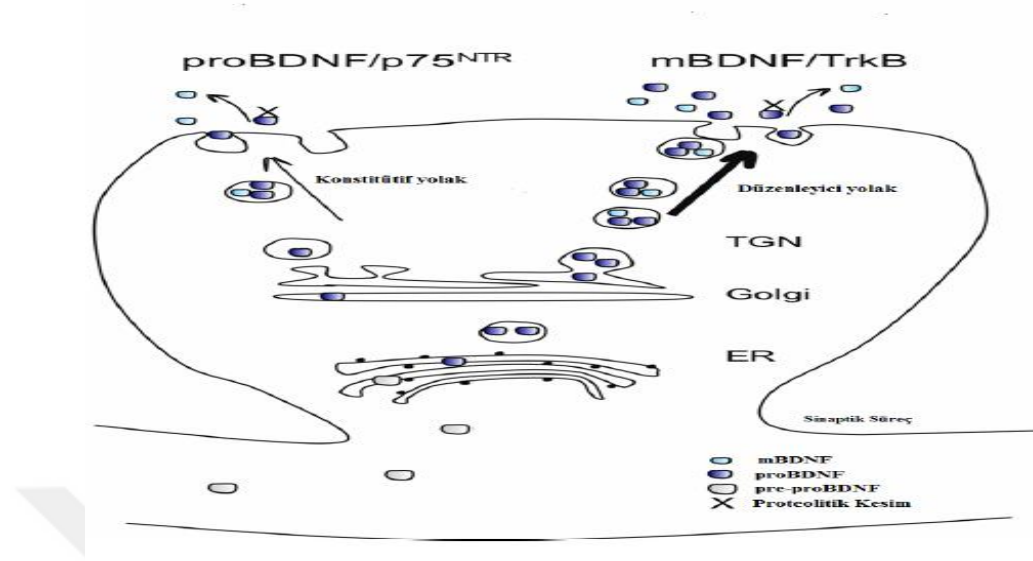


Şekil 2.9. BDNF geninin kromozomdaki lokasyonu (81).

TrkB, insan kromozomunda 9q22 üzerinde lokalizedir ve NTRK2 geni tarafından kodlanmaktadır. NTRK2, 24 ekzona sahiptir ve ilk beş ekzonu potansiyel transkripsiyonun başlama alanı olarak görev yapmaktadır (84). NTRK2 geni alternatif promoter, splicing modelleri ve poliadenilasyon bölgeleri aracılığı ile 100 farklı izoform ve 10 farklı protein üretebilir (85). İnsanlarda tam uzunluktaki TrkB (TrkB.FL.) 822 amino asitlik protein kodlar. TrkB'nin iki tane izoformu bulunmaktadır. Bunlar; TrkB.T1 (ekson 16 kullanılarak üretilen) ve TrkB.Shc (ekson 19 kullanılarak üretilen) olarak adlandırılırlar ve TrkB.FL'nin negatif inhibitörleri olarak rol alırlar. Bu kesilmiş TrkB izoformları, TrkB.FL tarafından aktive edilmeyen farklı hücre içi sinyal yollarına sahiptirler (86).

BDNF homodimerleri TrkB reseptörüne beş sitoplazmik tirozin kalıntısından bağlanarak (Y516, Y702, Y706, Y707, Y817) otofosforilasyon yaparlar (87).

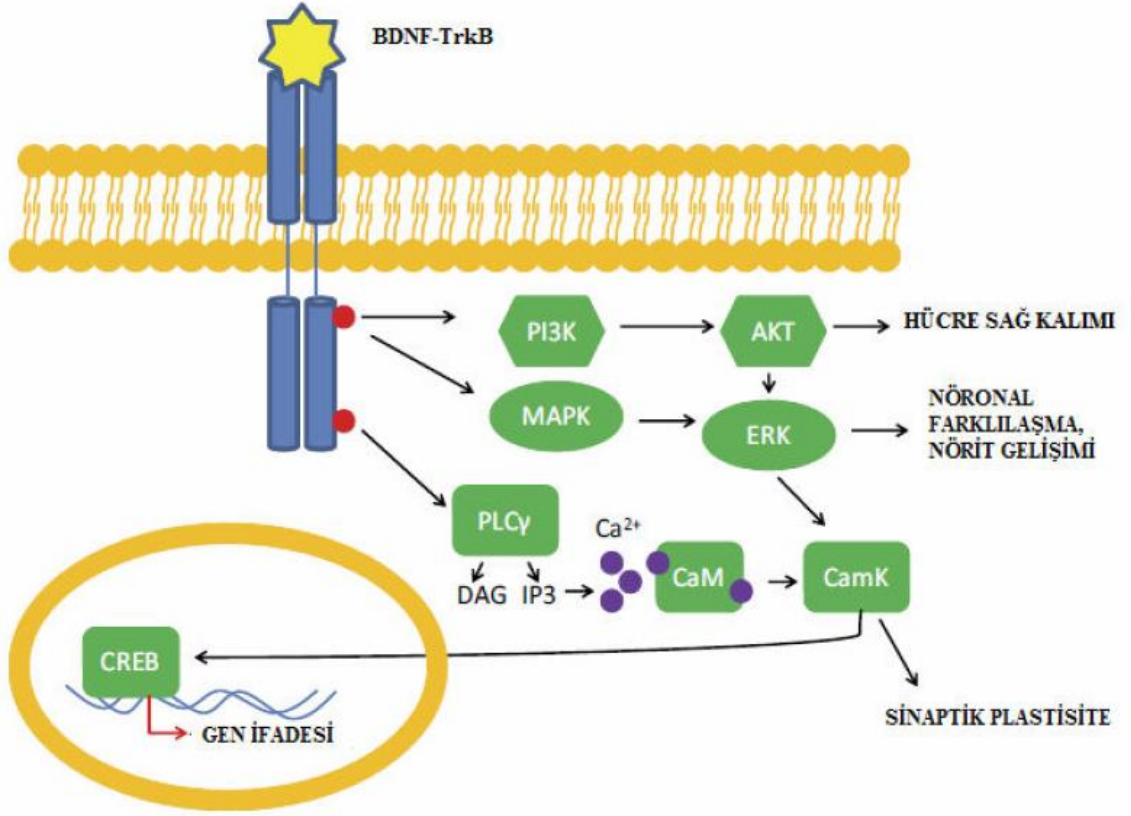
Bunlardan Y702, Y706 ve Y707 tirozin kalıntıları, TrkB reseptörünün tirozin kinaz bölgesindeki aktif tirozin kalıntılarıdır (88).



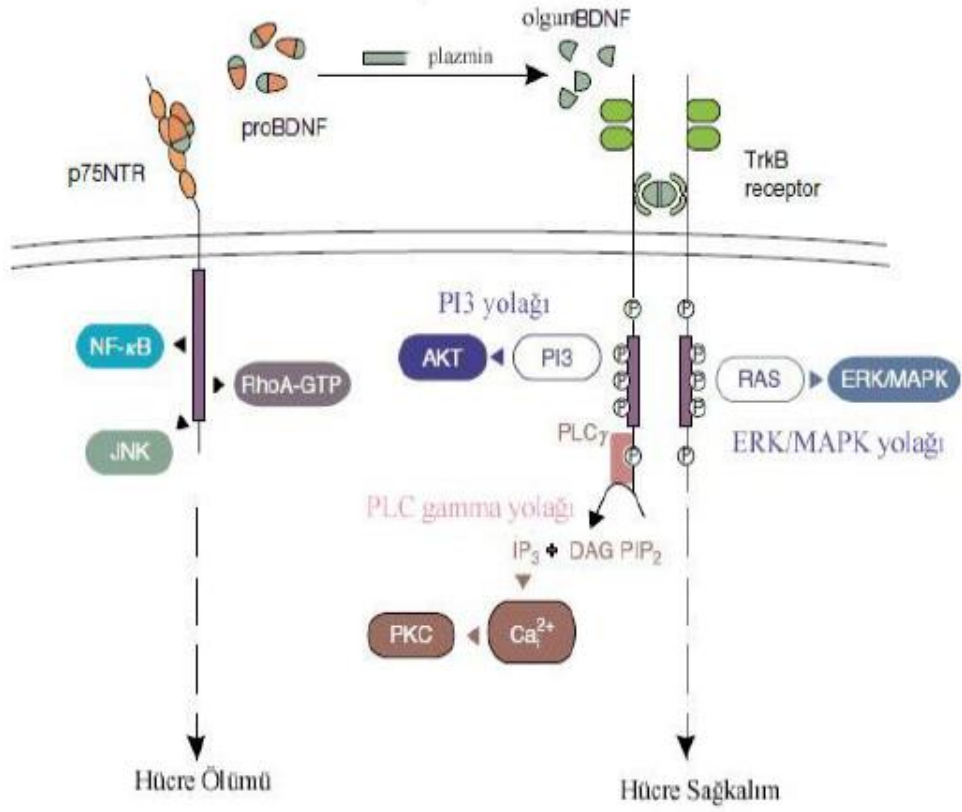
Şekil 2.10. BDNF'in pro-BDNF ve olgun BDNF olarak sentezlenmesi (82).

Olgun BDNF ve pro-BDNF'in her ikisi de biyolojik olarak aktiftirler; pro-BDNF etkisini, düşük afiniteli olarak p75NTR reseptörüne bağlanarak gösterir ve apoptozis ile uzun dönem depresyonu tetikler. Olgun BDNF ise yüksek afiniteli olarak bilinen Tirozin Kinaz B (TrkB) reseptörüne bağlanarak etkisini gösterir ve hücrel hayatta kalma ile LTP'yi sağlar (89).

BDNF TrkB'ye bağlandığında dimerizasyonu indükler ve TrkB'yi otofosforile eder, bu da hücre içi sinyalleme yollarının aktivasyonuna sebep olur. Burada üç farklı yolak bulunmaktadır; PI3K (fosfatidilinositol 3)-Akt (protein kinaz B) aracılı nöronal sağkalım, MAPK-ERK yolağı aracılığıyla nöronal gelişim ve farklılaşmayı sağlar (90). PLC γ (fosfolipaz C gamma)'nin IP3 (inositoltrifosfat)'ı aktive ederek N-methyl-D-aspartate reseptör (NMDA) aracılı hücre içerisine Ca⁺² girişini sağlayarak Ca-CaM (kalmodulin) etkileşimine sebep olur bu da CaMKII (kalmodulin kinaz II)'yi aktiveleştirir, aktif olan CaMKII CREB gen ekspresyonunu sağlar ve BDNF ekspresyonu gerçekleşir ki bu yolak sinaptik yenilenmeyi sağlamaktadır (Şekil 2.11) (91). CREB fosforillenip transkripsiyonel aktifliği başladığında nöronal aktivite başta olmak üzere büyüme faktörleri ve hormonlar gibi uyaranlar için cevap oluşturmaya başlar (92). BDNF'in genel olarak etki mekanizması Şekil 2.12'de gösterilmiştir (93).



Şekil 2.11. BDNF'in TrkB aracılı yolları (91).



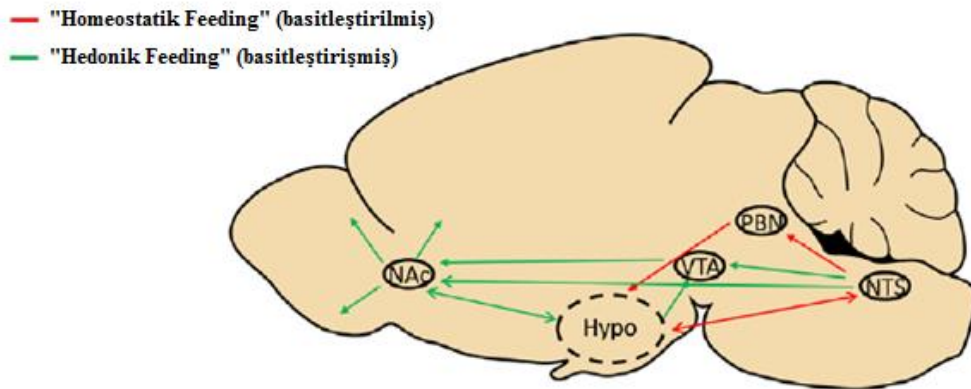
Şekil 2.12. BDNF'in genel etki mekanizması (93).

BDNF'in primidal nöronların dentrik dallanmasında etkili olmasından dolayı, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (94,95). BDNF'in bağışıklık sistemi üzerinde de etkileri olduğu bilinmektedir (96). Ayrıca BDNF'in kas hücrelerindeki lipid oksidasyonunu etkilemesinin yanı sıra, glikoz ile kolesterol metabolizmalarını da etkilediği belirtilmiştir (97,98). Bütün bu etkilerinden dolayı nörotrofin olarak bilinen BDNF'in metabotrofin olarak da tanımlanmasını sağlamıştır (99).

2.3.1.1.BDNF/TrkB sinyal yolağının enerji dengesinin düzenlenmesindeki rolü

Genom çapında yapılan son çalışmaların ışığında, enerji dengesinin düzenlenmesi ve obezite, diyabet gibi metabolik hastalıklara artan yatkınlıkta CNS'nin rolü vurgulanmaktadır (100). Hipotalamus ve arka beyin, periferden dolaşımdaki metabolik sinyalleri algılayan iki önemli beyin bölgesidir. Hipotalamus ve arka beyindeki nöronlar, fizyolojik değişiklikleri etkilemek üzere enerji dengesini korumak için bu metabolik sinyallerin nukleuslara ve diğer beyin bölgelerine aktarılmasını sağlar (Şekil 2.13) (101,102).

Hipotalamus ve arka beyindeki melanokortin sistemi, enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli yeri olan bir sistemdir (Şekil 2.14) (102).



Şekil 2.13. Beyindeki homeostatik ve hedonik beslenme döngüsü (basitleştirilmiş hali) (102).

LH içinde, melanin-yoğunlaştırıcı hormon (MCH) ve orexin-ifade eden nöronlar hiperfajiye yol açabilir (105). POMC+ ve AGRP+ nöronlarının hipotalamusun ventromedial (VMH) ve dorsomedial (DMH) nükleusları ile beslenmeyi arttıran ya da baskılayan sinaptik bağlantıları vardır (106). Bunların hepsi birlikte ele alındığında, hipotalamik MC4R sinyalleme sisteminin enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı görülür (107).

POMC+ nöronları, hipotalamustaki ARC'lerin yanı sıra arka beyindeki nucleus tractus solitarius (NTS)'de de bulunmaktadır. Aslında, bu iki beyin bölgesi, POMC + nöronlarının bulunduğu tek bölgedir (108). Buradaki POMC+ nöronları, ARC'deki POMC + nöronları ile birlikte, enerji dengesini düzenlemek için kaudal beyin sapındaki MC4R + nöronlarına α -MSH salınımını gerçekleştirmektedir (109).

Vagus sinirinin dorsal motor çekirdeğini içeren dorsal vagal kompleksi (DVC), beyin sapında en yüksek MC4R ifadesine sahip alandır. DVC'ye eksojen MC4R agonist uygulanması sonucunda gıda alımı önemli ölçüde baskılanmaktadır (110).

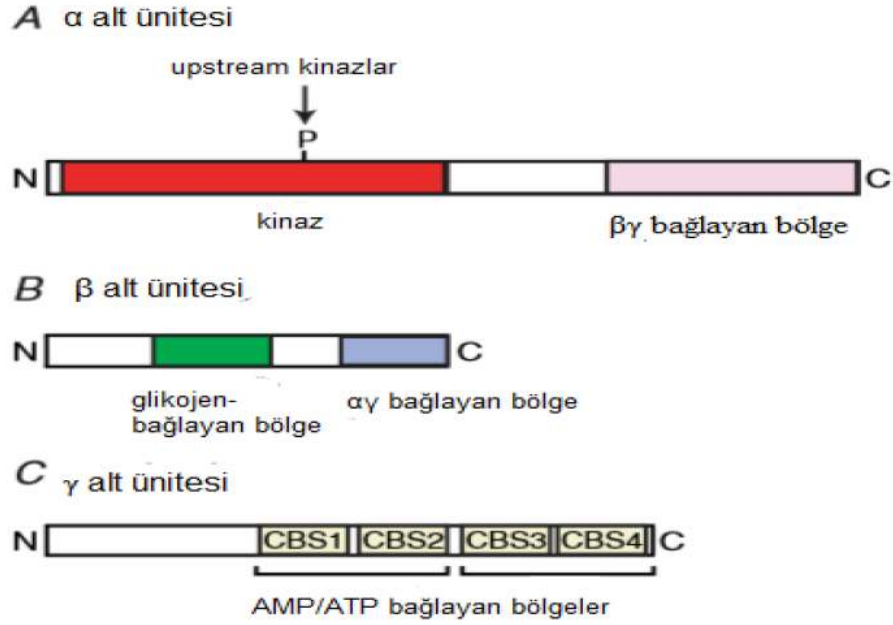
2.4. Metformin

Etki Mekanizması

AMPK reseptörü üzerinden etkisi

5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol alan protein kinaz ana bileşenidir. Bunun yanı sıra yüksek tempolu uzun süreli egzersiz, açlık, ısı şoku, hipoksi gibi hücre içi ATP seviyesini azaltan, beslenme ve çevresel değişimlere, hücre adaptasyonuna aracı olan "metabolik ana şalter" olduğu belirtilmiştir (111).

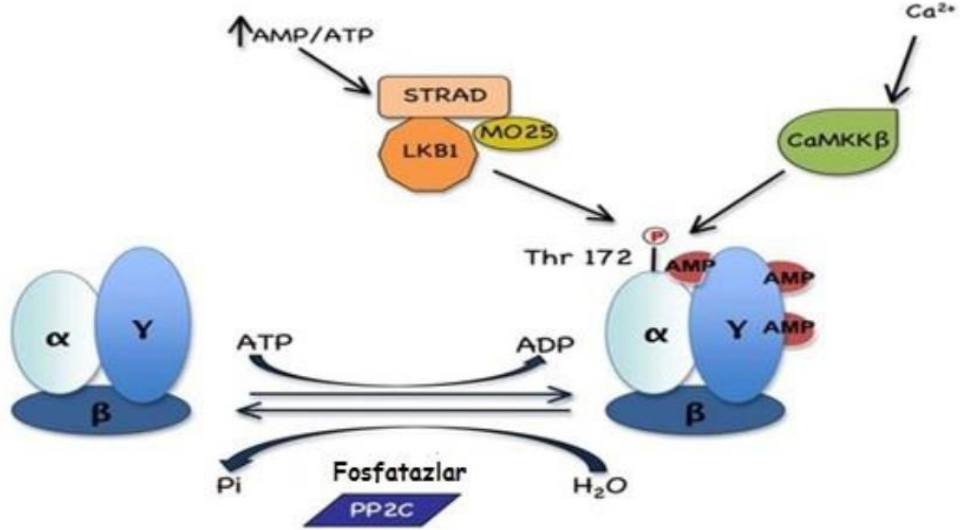
AMPK α , β ve γ olmak üzere üç alt birimden oluşmaktadır (112). α alt ünitesi katalizör bölgeyi bulundurmaktadır aynı zamanda burada başka kinazlar tarafından fosforile edilen önemli bir düzenleyici olan Threonin (Thr172) bulunmaktadır (113). α 1 alt birimi esas olarak böbrek, akciğer ve adipoz dokuda sentezlenirken, α 2 alt birimi kalp ve iskelet kaslarında sentezlenir. β alt ünitesinin iki izoformu (β 1, β 2) glikojen-bağlayan-C terminal bölgesini oluşturmaktadır. γ (γ 1, γ 2, γ 3) alt ünitesi ise N-terminal bölgesini takip eden ve bateman tarafından CBS motifi olarak adlandırılan 60 aminoasit dizilik dört sıralı tekrardan oluşmaktadır (114). Bu motiflerin her bir çifti bateman bölgesi olarak isimlendirilmekte ve bu bölgeler AMP/ATP moleküllerini bağlamaktadır (Şekil 2.15) (115,116).



Şekil 2.15. AMPK alt üniteleri (116)

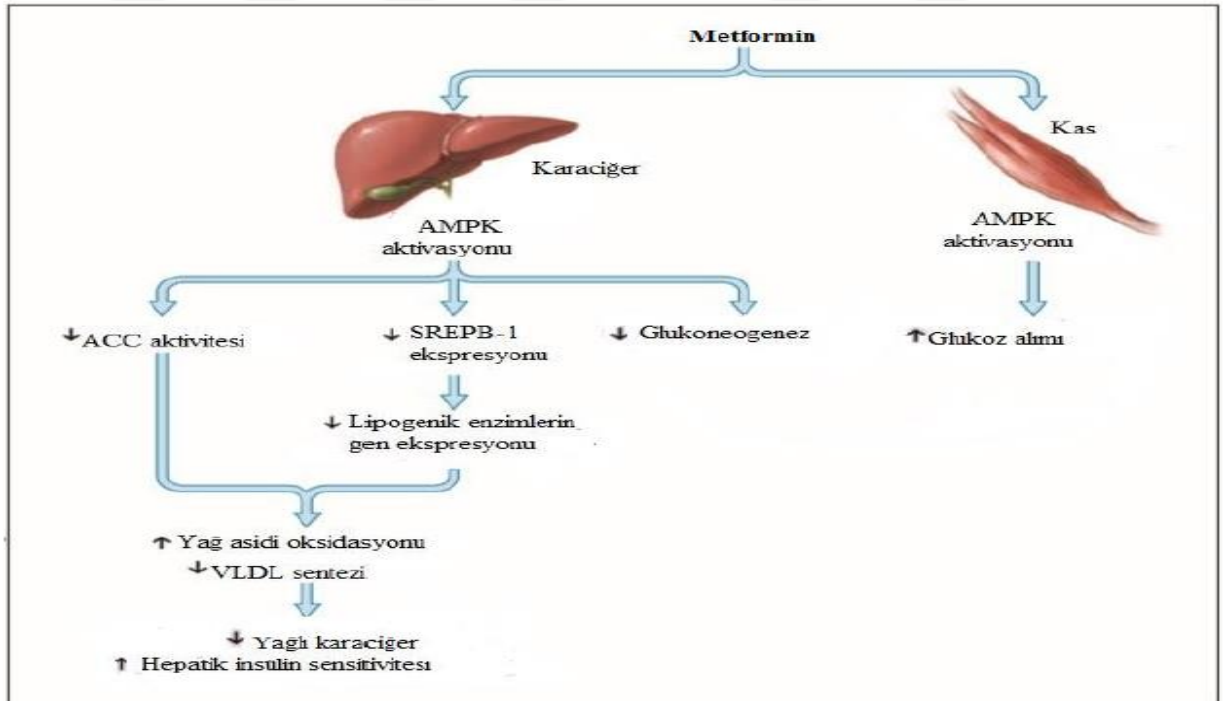
AMPK aktivasyonunun iki farklı şekilde meydana geldiği düşünülmektedir. Bunlardan birincisi AMP'nin bağlanması ile AMPK'nin aktive olması, ikincisi ise AMPK'nın α alt birimine LKB1 (liver kinase B1) kinazın bağlanması ile AMPK'nın fosforile olmasıdır (117). AMPK fosforile olduğunda, en üst seviyede aktiftir (118). AMPK'nın α alt birimindeki Thr172 bölgesini fosforilleyen ana kinaz olan LKB1'in yanı sıra iki yardımcı alt birim olan STRAD ile MO25 olduğu ileri sürülmektedir. Bu iki yardımcı yapıların olmadığı durumda, LKB1'in aktivitesinin zayıf olduğu görülmektedir (119). Yapılan çalışmalar, LKB1'in iskelet kasındaki önemli bir AMPK kinaz olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra karaciğerde LKB1 delesyonu olduğu durumda metforminin AMPK üzerindeki aktivasyon etkilerini de engellediği gözlemlenmiştir (120).

Aynı zamanda yapılan diğer çalışmalarda, beyin hücrelerinde ve LKB1 eksikliği görülen hücrelerde diğer bir alternatif olarak AMPK kinaz Ca^{2+} /kalmodülin bağımlı kinazlar (CaMKK α ve CaMKK β) belirlenmiştir (121,122). AMPK aktivasyonunun moleküler yapısı ise Şekil 2.16'da gösterilmiştir (123).



Şekil 2.16. AMPK aktivasyonunun moleküler yapısı (123).

Kas ve karaciğer dokularında AMPK aktivasyonun glikoz ve yağ metabolizması üzerinde olumlu etkilere neden olduğu görülmüştür. AMPK, iskelet kasında glikozu hücrelere ulaştıran GLUT-4 (Glukoz transporter) ifadesini artırarak glikoz kullanımını da artırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 2.17) (124,125).



Şekil 2.17. AMPK aktivasyonu sonucu metforminin organlarda oluşturduğu etkiler (125).

AMPK'nın iştah mekanizması üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir. Hipotalamus kaynaklı AMPK aktivasyonunun artması sonucu besin alımının artışına ve enerji harcanmasının azalışına sebep olur ve bunun yanı sıra vücut ağırlığında da artışa neden olmaktadır. Metforminin iskelet kaslarında AMPK'ın aktivitesini uyarırken hipotalamusta bunu engellemektedir (126).

Yapılan birkaç çalışmada, inflamasyon sinyal yolları üzerinde AMPK proteinlerinin önemli bir rol aldığı gösterilmektedir. AMPK aktivasyonununa da ifadesinin baskılanması İnterlökin 1-6 (IL-6, IL-1) ve Tümör Nekroz Faktörü α (TNF α) gibi inflamasyona sebep olabilecek proteinlerin üretimini arttırmaktadır (127, 128).

2.5. Öğrenme ve Bellek

2.5.1. Öğrenme

Öğrenme, yeni bilgilerin ve becerilerin eğitim ya da deneyimlerin sonucunda kalıcı değişimler ve bilgiyi elde etme yeteneği olarak tanımlanır. Hafıza ise öğrenme süresince elde edilen bilginin, verinin CNS'de depolanma ve geri çağırılması işlemidir (129). Öğrenme işlemi asosyatif olmayan ve asosyatif olmak üzere 2 gruba ayrılır. Asosyatif olmayan öğrenme, bireyin herhangi bir uyarana cevabı öğrenmesidir (130). Başka bir deyişle ise tekrar eden bir tür uyarana maruz kaldıktan sonra oluşan davranıştaki değişimlerdir (131). Asosyatif olmayan öğrenme de kendi içerisinde iki alt sınıfa ayrılır, bunlar; habitüasyon (alışkanlık) ve sensitizasyon (duyarlılaşma) olarak bilinir (130).

Habitüasyon, canlının tekrar eden bir uyarana karşı tepkisinin azalmasıdır (131). Habitüasyonda, uyarının geldiği nöronun presinaptik zarında uyarının iletilmesini sağlayan kalsiyumun geçeceği kalsiyum kanalını kapatarak daha az kalsiyumun presinaptik zara girmesi, böylece daha az nörotransmitter salgılanması sağlanır, böylece gelen uyarı söndürölmüş, organizma uyarıya alışmış olur (132).

Sensitizasyon, canlının herhangi bir uyarana karşı daha duyarlı hale gelmesidir (130). Sensitizasyonda ise presinaptik uçtaki kalsiyum kanal sayısı arttırılarak uyarı ile salınan nörotransmitter miktarı arttırılmaktadır (132).

Asosyatif öğrenme iki uyarının birbiriyle ilişkilendirilmesi sonucunda meydana gelmektedir (131). Asosyatif öğrenme de iki alt kategoriye ayrılmaktadır, bunlar ise; klasik koşullanma (şartlı refleks) ve enstrümantal koşullanmadır.

Klasik koşullanma (şartlı refleks), genel itibari ile şartlı bir uyaran şartsız bir uyaran ile eşleştirildiği bir işlem tarafından oluşturulmaktadır, yani uyaran tek başına uygulandığı zaman hiçbir cevap alınamazken ya da çok az cevap oluşurken, daha iyi bir uyaran ile tekrardan uyarı oluşturulması sonucunda cevap oluşturmeyen uyaran verildiğinde dahi cevap alınması sonucunda oluşan refleks cevabıdır (133). Örneğin, Rus fizyolog Ivan Pavlov, köpeklerin ağzına et koyarak tükürük salgısı oluşturmuş, bu olayda ağzına et koymadan hemen öncesinde zilin çalınması ve bu işlemin birçok kez tekrarlanması sonucu ile zil çalındığında köpeğin ağzına et konulmasa bile tükürük salgılanması gözlemlenmiştir. Pavlov bu yaptığı deneyde ağza konulan et koşulsuz uyarandır, burada koşullu uyaran ise zilin çalması olayıdır (132).

Enstrümantal koşullanma, diğer bir adı ile operan koşullanma, kendi davranışı ile bunun sonuçlarını bağdaştırmayı öğrenmesi işlemidir (133). Örnek olarak, kafeste bulunan bir fareye kafese temas ettiğinde elektrik şoku uygulanırsa, belli bir süre sonra bu fare elektrik şoku aldığı bölge ile acı veren elektrik şokunu bağdaştıracak ve bu bölgeden uzak duracaktır (131).

2.5.2.Bellek

Bellek; geçmişte kazanılan bilgilerin ve tecrübelerin gerektiği zaman bilinçli veya bilinçsiz bir şekilde tekrar hatırlanmasına denir (134). Fizyolojik açıdan bellek iki grupta incelenir, bunlar; explicit bellek (net bellek, açık bellek, deklaratif bellek) ve implicit bellek (gizli bellek, kapalı bellek)'dir. Çoğu zaman tanıma belleği olarak adlandırılan açık bellek, kazanılan bütün bilgilerin çoğunluğu hipokampus olmak üzere beynin Medio Temporal Lop (MTL)'lerinin diğer birkaç bölümlerinde bilinçli olarak depolanır (132). Açık bellek iki alt gruptan oluşmaktadır, bunlar; anısal hafıza (epizodik) ile anlamsal hafıza (semantik)'dir. Episodik hafıza önemli kişisel deneyimlerin hafızası olup semantik bellek bilinçli olarak önemli kişisel deneyimlere bağlanmayan genel bilgilerin hafızasıdır (135). Anısal belleğe örnek olarak, 17 Ağustos'taki depremde o an nerede olduğunuzu ve ne yaptığınızı hatırlayabilmemiz, anlamsal belleğe örnek olarak ise Türkiye'nin başkenti Ankara'dır gibi Dünya ile ilgili genel bilgileri bilme veya sofranın kimyasal formülünün bilinmesi gibi örnekler verilebilir (136).

Bu iki belleğin tersine, kapalı bellekte, geçmiş olayların etkisi, bilinçten ziyade davranışta görülür.

Örnek olarak bisiklet sürmeyi öğrenme gibi beceriler, kelimelerin aynadaki görüntülerini hızlı ve doğru olarak okumayı öğrenmek gibi algısal beceriler, belli bir tür problemi ya da yap-bozu çözmek için etkili bir yöntem öğrenmek için kognitif beceriler kapalı hafızanın türleridir (135,137).

Bellek tür olarak, bilginin kazanımı ile geri çağırılma arasındaki zamana göre üçe ayrılır, bunlar; kısa süreli hafıza, orta-uzun süreli hafıza ve uzun süreli hafıza (132).

2.5.2.1. Kısa Süreli Bellek

Bu hafıza türünde, kazanılan bilgilerin saniyeler ya da dakikalar gibi kısa bir süre zarfında anımsanabilmesidir (135,138). Kısa süreli bellek oluşumu aynı sinir sinyallerinin bir devre içerisinde sürekli dolaşmasından dolayı meydana geldiği ileri sürülmektedir. Kısa süreli bellek ile ilgili bir başka mekanizma ise presinaptik fasilasyon ve inhibisyonudur. Hipokampal nöronlardaki akso-aksonal sinapslarda rahatsız edici veya haz verici bir duysal uyarıyı getiren akson ucundan salınan serotonin, duysal uyarıyı taşıyan aksonun zarında yer alan reseptörlerine bağlanarak uzun süreli bir depolarizasyonu uyarmaktadır (132). Bu uzun süreli depolarizasyon duysal akson terminaline çok miktarda kalsiyum girişine neden olmaktadır. Kalsiyum girişi salınan nörotransmitter miktarını artırarak sinaptik iletiyi önemli ölçüde kolaylaştırmakta ve fasilasyon meydana getirmektedir (135).

Kısa süreli belleğin olası diğer bir açıklaması sinaptik iletide artış meydana getiren sinaptik potansiyasyondur. Sinaptik potansiyasyon presinaptik uçlarda kalsiyum iyonu birikmesinden kaynaklanabilir (132). Yani, bir presinaptik uçtan bir impuls dizisi geçerken, presinaptik uç içine alınan kalsiyum miktarı ardışık gelen her impulsla biraz daha artar. İçeri giren kalsiyum miktarı mitokondrilerin veya endoplazmik retikulumun alabileceği miktarı aştığında, bu aşırı miktardaki kalsiyum sinapta nörotransmitter salgılanmasına neden olabilir. Örnek olarak, bir telefon numarasını bir kez okuduktan sonra, numarayı çevirip, konuşma yaptıktan sonra unuturuz (135).

2.5.2.2. Orta-Uzun Süreli Bellek

Bu hafıza türünde anılar ile bilginin saatlerce veya günlerce saklandığı hafıza türüdür. Bazı çalışmalarda bu hafızanın pre-sinaptik ya da post-sinaptik zarda bir kaç saatten bir kaç haftaya kadar sürebildiği gösterilmiştir.

Bu bellekte depolanan bilgiler eğer tekrar edilmezse zamanla unutulur; tekrar edilmesi durumunda uzun süreli bellekte depolanmaktadır. Örnek olarak, bu sabah kahvaltıda ne yediğini hatırlamak verilebilir. Bu bilgi açıkça, kısa dönem hafıza gibi geçici değil, ancak bugünün kahvaltısı bir şekilde farklı olmadıkça, birkaç günden fazla bilgiyi taşıyabiliriz (132,139).

2.5.2.3. Uzun Süreli Bellek

Bu tür hafızada ise, bilgilerin uzun zaman boyunca ve hatta çoğu zaman hayat boyunca saklanmasıdır. Bu bellekteki anılar ve bilgiler, travma ve ilaçların etkisi gibi güç durumlarda bile unutulmaya karşı bariz bir şekilde dirençlidir (134). Bu belleğin oluşma sebebi sinapslardaki belirgin yapısal değişikliklerin sonucudur. Elektron mikroskobu ile yapılan bazı çalışmalarda; bu belleğin oluşması sırasında sinapsın yapısında fiziksel değişikliklerin olduğu gözlemlenmiştir. Bu belleğin gelişmesi sinapslardaki sinyal iletiminin duyarlılığını artıran yeniden yapılanma işlemine doğrudan bağlıdır (137).

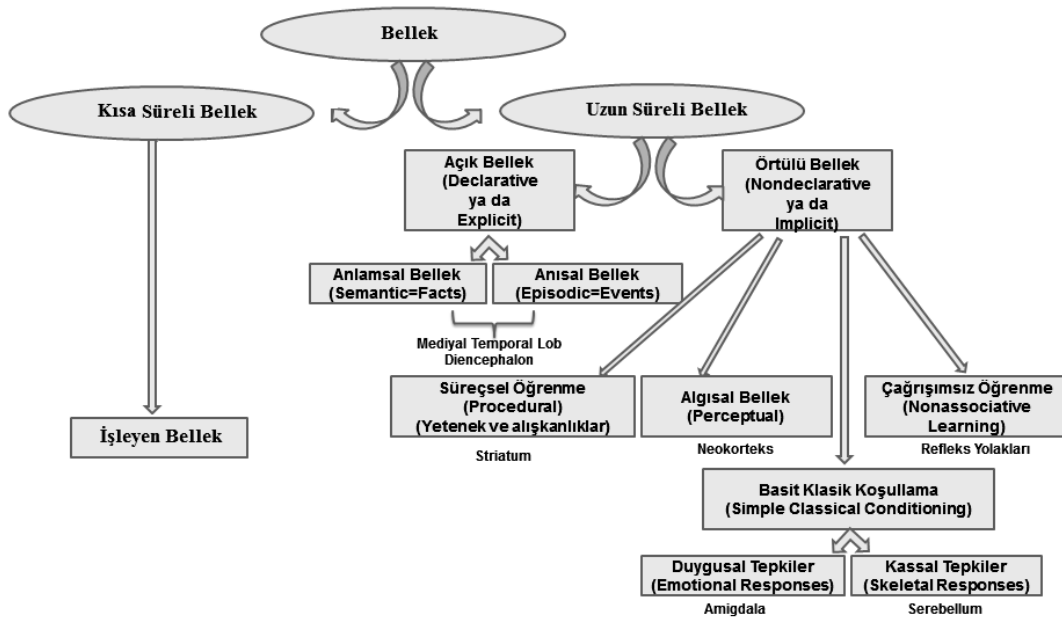
2.5.2.4. Anısal Bellek

Açık hafızanın alt birimi olan bu hafıza türü geçmişteki olaylar ile sınırlanmamıştır. Geçmişteki vakalar ve tecrübeler ile alakalı bilginin şu anki veya yakın gelecekteki planlar ile bir araya getirilerek tekrardan oluşturulmasını da içermektedir. Epizodik hafıza MTL’de aktivasyon göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda bilginin elde edilmesi ve depolanması için MTL’nin gerekliliği gösterilmektedir (140).

Bir olaydan çıkarım yaparken ya da bir olayı takip ederken pre-frontal korteks aktivasyonu gözlemlenir. Bunun dışında kendine bir hedef koyma, bu hedefe ulaşma adına planlar oluşturmak ve etrafı gözlemlemek gibi eylemlerde yine pre-frontal korteks aktif olur. Pre-frontal korteks’in kısa süreli bellek üzerindeki rolü bilinmektedir aynı zamanda herhangi bir şeye karar verme aşamasında beynin en çok aktif olan bölümüdür. Bunun yanı sıra pre-frontal korteks limbik sistemin bir parçası olup açlık, korku gibi durumların adaptasyonunda da görev almaktadır. Örnek olarak korku sebebiyle hava karardığında mezarlıktan geçilememesi durumu (141,142). Navigasyonel öğrenme, canlıların kaybolmadan önce çevreleri boyunca yollarını bulmayı sağlayacak lokasyonlar ve rotalar için hafıza gerektiren öğrenme türüdür. Navigasyonel öğrenmenin iki önemli tipi mevcuttur, bunlar; allosentrik ve egosentrik.

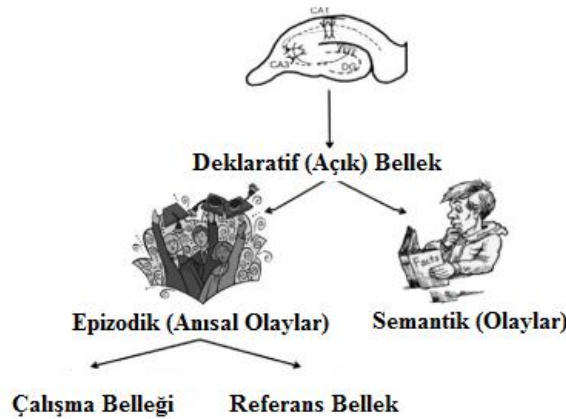
Allosentrik yol bulma, spasyal (uzamsal) olarak da tanımlanır, distal ipuçları kullanılarak yol bulma yeteneği karakterize edilirken, egosentrik yol bulma iç ipuçlarını ve tabelaları kullanarak yol bulma yeteneği olarak karakterize edilir (143).

Spasyal hafıza, objelerin sıralanışı veya spesifik rotalar hakkında spasyal (uzamsal) bilginin tanınmasından, kodlanmasından, saklanmasından sorumlu beyin fonksiyonudur. Spasyal hafızada da bilgi yine egosentrik veya allosentrik yollar ile elde edilir. Spasyal hafıza, episodik hafızanın alt tipi olarak kavramsallaştırılır çünkü spasyal bilgiyi, bir spasyal-temporal çatı içine depolar (Şekil 2.18) (137).



Şekil 2.18. Belleğin sınıflandırılması (Değiştirilerek alınmıştır) (137).

Şekil 2.19'da açık belleğin sınıflandırılması gösterilmiştir. Burada referans ve çalışma belleğinin anısal belleğin alt sınıfı olduğu gösterilmiştir (143).



Şekil 2.19. Belleğin çalışma ve referans bellek olarak sınıflandırılması (143)

2.5.3.Mekansal Bellek ve Morris Su Tankı

Mekansal hafıza ile epizodik hafıza arasında ilişki vardır. Tüm hayvanlar yeni bir mekana bırakıldıklarında ortamı incelemeye başlarlar, güvenli bir sığınak ya da kendilerine yiyecek arayışı içerisine girerler. Bu yüzden bir şeyleri anımsamak, saklamak, kafamızda herhangi bir şeyi kodlamak gibi konularda mekânsal hafızanın önemi büyüktür (144).

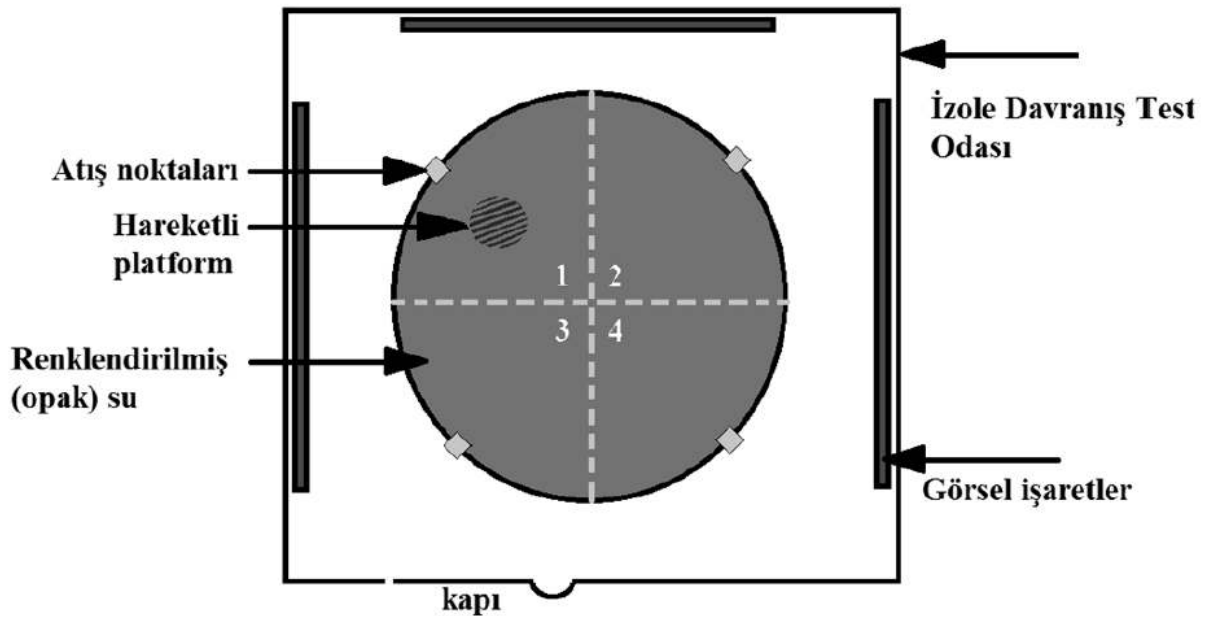
Uzun süreli hatırlamada kemirgenlerin mekânsal hafızaları genellikle zayıftır bu yüzden hafıza ölçümü için bilginin yeniden kazanılması stratejilerinin kullanılması gerekir. Bu genellikle hatırlanması istenen hafıza geri kazanımı ile ilişkili ip uçlarının yardımı sayesinde gerçekleşmektedir (136).

Mekansal hafızanın kontrolü için en çok tercih edilen testlerin başında Morris Su Tankı testi gelmektedir, 1981 yılında Richard Morris tarafından öğrenme ve mekânsal hafızanın kontrol edilmesi amacıyla keşfedilmiştir (145,146). Bu test sayesinde sıçanlardaki mekânsal hafızada proksimal işaretler ile distal işaretlerin rollerinin değerlendirilmesi sağlanmıştır. Su tankının ideal genişliği farelerde 75-150 cm, sıçanlarda 150-180 cm olmalıdır ve testin uygulanması esnasında, tankın içindeki sıçanların göreceği şekilde tankın etrafına bir çeşit ipuçları asılır. Test bitene kadar bu ipuçlarının yeri ve suyun içerisinde gizli olan platformun yerinin değiştirilmemesi gerekmektedir (Şekil 2.20) (137,147). Öğrenmenin güvenilirliği probe deneme ile test edilir, probe denemede gizli platform havuzdan çıkartılır ve hayvanın platformun bulunduğu önceki bölgede harcadığı zaman ölçülür. Morris su tankı testi spasyal çalışma hafızasının, spasyal referans hafızanın ve öğrenmenin çalışmasına izin verir (145). Morris su tankı testinde spasyal çalışma hafızası ile spasyal referans hafızasının kontrolünde kullanılan protokoller farklılık göstermektedir. Arasındaki fark şudur, referans hafıza test edilirken platformun yeri tüm öğrenme denemelerinde sabit tutulurken, spasyal çalışma hafızası test edilirken her deneme günü içinde platformun yeri değişmektedir. Ayrıca spasyal çalışma hafızası testinde probe deneme yapılmamaktadır (148).

Morris su tankı testi, fareleri olaylar ile çevreleri arasında ilişki oluşturmaya zorlar. Önceden kazandığı tecrübe ile platforma çıkma kararını verebilmesi, platformun yerini düşünerek mekânsal hafızayı kullanması, daha önceki deneyimlerini hatırlayıp platformun olduğu yere gitmesi, kısa süreli hafızasını kullanmasını yani hipokampus ile korteksin sürekli ilişki içinde olmasını gerektirir (145).

MST testinde çalışma yaparken kullanılan deney hayvanlarının yüzme hızlarını etkileyecek çeşitli faktörlere dikkat edilmesi gerekmektedir. Bunlardan en önemlileri; vücut ağırlığı, deney hayvanının yaşı ve kondisyonudur. Yapılan araştırmalara göre özellikle ratlarda yaşa bağlı olarak spasyal hafıza becerilerinde önemli derecede azalma gözlemlenmiştir (149,150).

MST testinde gizlenmiş platformu bulma esnasında uzaysal öğrenmenin gerçekleştiği ana yer hipokampustur. Bilginin sağlamlaştırılmasında ve saklanması, mekânsal bilginin elde edilmesi için de hipokampus önemlidir (148).

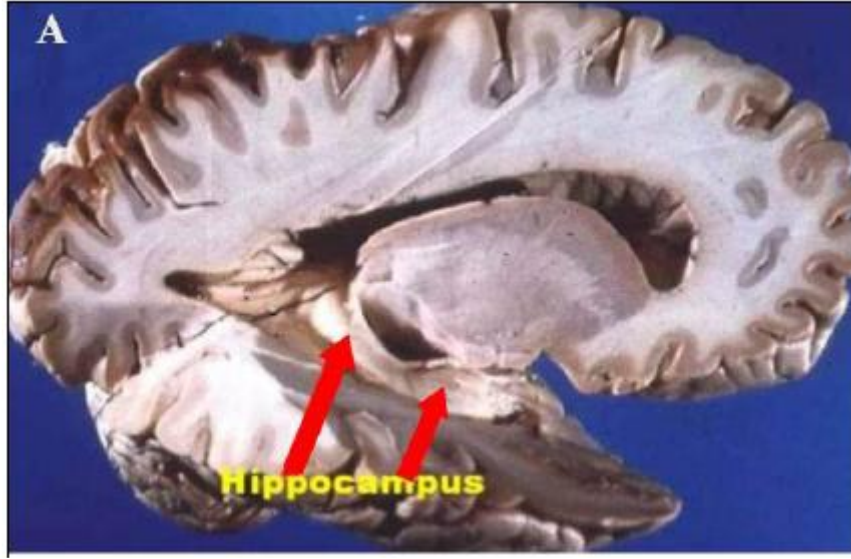


Şekil 2.20. Morris su tankı sistemi (Değiştirilerek alınmıştır) (137).

2.6.Hipokampus

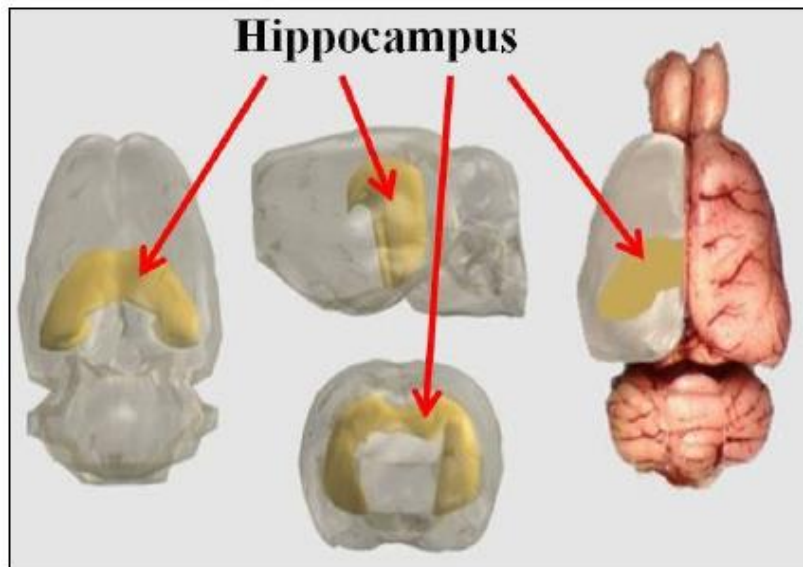
2.6.1. Hipokampusun Anatomisi

Hipokampus limbik sistemin önemli parçalarından biridir. Formatio Hippocampalis; Hipokampus (Cornu Ammonis-Hippocampus proper), gyrus dentatus, subiculum, alveus, ve fimbria hippocampi'den oluşur (Şekil 2.21) (151).



Şekil 2.21. İnsan beyninde hipokampus lokalizasyonunun kadavradaki görünümü (151).

Hipokampus, çift taraflı, temporal korteksin medial bölgesinde ventriculus lateralis'in cornu inferius'unun taban boyunca uzanan, C harfi şeklinde, anterior-posterior yönde yerleşmiş, gri cevher kabartısıdır (152). Hipokampus uzunluğu yaklaşık 6-7 mm, kalınlığı ise 1,5-2 mm'dir. Hipokampus'un arterial kanlanmasını esas olarak arteria cerebralis posterior sağlar (153). Sıçanlarda hipokampal formasyon dört basit kortikal bölgeyi kapsar. Bunlar; gyrus dentatus, hippocampus, subicular kompleks (subiculum, presubiculum, parasubiculum) ve entorhinal korteks'dir. Hipokampus; uzun eksen boyunca kıvrılmış "C" harfi şeklindedir ve temporal lobun cauda-ventralinde uzanır (Şekil 2.22). Hipokampus dört alt bölüme ayrılmıştır; CA1, CA2, CA3 ve CA4 (154).



Şekil 2.22. Sıçan hippocampus lokalizasyonu (154).

2.6.2. Hipokampusun Fonksiyonları

Mutluluk, memnuniyet, neşe, sevgi, heyecan, üzüntü, depresyon, kırılganlık, küslük gibi pisişik durumlara emasyon adı verilir. Hipokampus, içgüdülerimizi ve emosyonel davranışlarımızı yöneten Limbik sistemi oluşturan Limbik loba dâhil bir yapıdır. Hipokampus'un hem yapısının karmaşıklığı hem de beyindeki birçok bölge ile yakın ilişkisi, fonksiyonunun açıklanmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle, hipokampus'un tek başına yaptığı fonksiyonları tanımlamak yerine, karmaşık fonksiyonlardaki rolü üzerinde durmamız gerekir (155). Hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinde önemli role sahip bulunan Limbik sistem, çok sayıda sinyali hipokampus'tan alır. Hayvanlarda yapılan deneyler, hipokampus'taki birçok sinir hücresinin yer hafızasını taşıdığını ve hayvan bildik yerlerden geçerken bu sinirlerde hareketlenme olduğunu göstermiştir. Yer hafızası hipokampus'un piramidal sinirleri dışında gyrus dentatus'un granüllü hücrelerinde bulunur (156). Hipokampus nöronlarının geri kalan kısmının çoğunu oluşturan inhibitör sinir hücreleri de yere bağlı aktivasyon gösterirler ama bu çok daha zayıftır. 1970'lerde bu yer hücrelerinin keşfi, hipokampus'un, çevre topografyasının sinir sistemindeki temsilini oluşturan bilişsel bir harita olduğu düşüncesini ortaya çıkarttı. Gerçekten de sağlam bir hipokampus olmaksızın insanların nerede olduklarını bilmesi ve gidecekleri yolu saptaması olanaksız hale gelmektedir. Beyin görüntüleme teknikleriyle, yön bulma çabasındaki insanların hipokampus'larının çok daha aktif çalıştığı görülmüştür. Ayrıca hipokampus, bilinen mekânlarda kestirme yolların bulunması konusunda da önemli role sahiptir. Örneğin Londra'daki taksi şoförleri işe başlamadan sıkı bir testten geçerler ve kendilerinden pek çok yeri ve aralarındaki en kısa yolları bilmeleri istenir. London College Üniversitesi'nde yapılan araştırmada taksi şoförlerinin hipokampus'larının ilgili kısımlarının daha büyük olduğu, şoför deneyimi arttıkça bu büyüklüğün de daha fazlalaştığı saptanmıştır (157). Hipokampus kendine özgü yapısı nedeniyle senkronize çalışmaya yatkındır. Hipokampus elektroensefalografi (EEG) kayıtları her 4-7 saniyede görülen ritmik sinüzoidal tipte “teta” dalgalarıdır. Teta dalgaları senkronize nöronal deşarjın belirtisidir. Ancak korteks'in senkronize olduğu durumlarda, hipokampus desenkronizasyon göstermekte, korteksin desenkron olduğu durumlarda da hipokampus senkronize hale geçmektedir. Bu paradoksun fonksiyonel rolü anlaşılmamıştır (158). Derin uykuda EEG kayıtları düzenli ve senkronize ritim gösterirken hipokampal EEG kayıtları de-senkronizedir.

Uyanıklık durumunda ise neokortikal kayıtlar de-senkronize olmasına rağmen, hipokampus yavaş ve düzenli ritim gösterir. Bu durum yapının spontan aktivitesini ve bilincin değişik devrelerle ilişkili olduğunu gösterir (159). Hipokampus'un uyarılmasıyla birçok endokrin ve davranışsal değişiklikler gözlenmiştir. Aşırı kızgınlık, öfke veya sakinlik, halüsinasyonlar, defansif davranışlar ve hiperseksüalite görülebilir. Ayrıca, hipofizin Lobus Anterior'undan hormon salgılanması cevap olarak gelişir (158). Epilepsi tedavisi için, bilateral hipokampus'u çıkarılan kişilerde, yeni bilgilerin öğrenilmesi mümkün olmamaktadır özellikle sözlü (verbal) öğrenim durur çünkü hipokampus yeni edinilen bilgilerin depolandığı yerdir. Bu kişiler her gün gördüğü kişilerin isimlerini ve yüzlerini hatırlayamaz ancak, başka bir faaliyet sırasında anlık bir hatırlama olabilir ayrıca bu kişilerde kısa süreli (yakın) hafıza kaybı oluşur. Anterograd amnezi denilen bu durumda, kısa dönemde kazanılan bilgiler hatırlanmaz. Buna karşılık, uzun süreli hafıza ve önceden öğrenilen bilgiler etkilenmez. Aslında, öğrenme fonksiyonu da yeni bilgilerin basit bir şekilde edinilmesidir. Bu açıdan, bu iki fonksiyon kaybı birbiriyle ilişkilidir. Uzun süreli hafızanın etkilenmemesinin sebebi, uzun süreli hafızanın korteks'te yerleşik olmasındandır (159). Hipokampus, yeni ezberlenen bilgilerin pekiştirilmesi ve bunları ifade etme fonksiyonlarını görür. Hipokampus'un piramidal hücreleri kortikosteroid seviyesindeki değişiklikleri algılar. Bundan başka, hipokampus işitme, görme, dokunma, iç organ duyularını çok az olarak da koku duyusunu alır. Bu duyuları, direkt efektör organa etki etmeden, limbik sistemin diğer bölümlerine iletir ve toplu bir davranış oluşturulmasını sağlar (160). Hipokampus, limbik sistemle otonom sinir sistemi arasında bağları kurarak, heyecanın kontrolünde ve iç organlara ait aktivitenin düzenlemesinde rol oynar (159). Uzun süreli bir sinaptik ilişki türü olan Uzun Dönem Potansiyel (LTP) ve iskemiye seçici duyarlılık gibi konularda oldukça dikkat çeken bir yapıdır. Mekanizma ne olursa olsun sağ ve sol hipokampus olmadan verbal veya sembolik uzun süreli anıların kalıcı olması mümkün değildir. Diğer yandan sağ hipokampus görsel, sol hipokampus ise sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda daha fazla aktivite göstermekte ve bu bölgelerin lezyonlarında da ilgili hafızalarda kayıp gelişmektedir. Hipokampus'un genel olarak uyarılması ile kızgınlık, sakinlik veya hiperseksüalitenin herhangi biri ortaya çıkar. Hafif uyarılmasında ise, uyarım bittikten sonra bile saniyelerce süren bir epileptik nöbet görülür (160,161). Bu nöbetler sırasında birey koku, görme, işitme, dokunma ve benzeri tarzda halüsinasyonlar tanınır. Birey bilinçlidir ve halüsinasyonları gerçek olmadığını bilir (160,161).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Deneyi

3.1.1. Hayvanların Beslenmesi ve Bakımı

Çalışmada 32 Wistar albino yetişkin erkek sıçan kullanılmıştır (Deney hayvanları, Çukurova Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir). Bu hayvanlar çalışmaya uygun olarak rastgele gruplara ayrılmış ve deney grupları oluşturulmuştur.

Deney Grupları

1. **Kontrol grubu (K):** 16 hafta standart yem ile beslendi.
2. **Prediyabet grubu (Predia):** 16 hafta kalorisinin % 70'i yağ içeren yüksek yağlı diyetle beslendi.
3. **Metformin HCl uygulanacak kontrol grubu (K+Met):** 16 hafta standart yem ile beslendi ve metformin tedavisi uygulandı (100mg/kg/gün).
4. **Metformin HCl uygulanacak prediyabet grubu (Predia+Met):** 16 hafta kalorisinin % 70'i yağ içeren yüksek yağlı diyetle beslendi. Prediyabet oluşturulduktan sonra hayvanlara 8 hafta sürecek metformin tedavisi uygulandı (100mg/kg/gün). **Kullanılan ilaç kimyasal formda olup (Metformin Hydrochloride), yeterli miktarda Bilim İlaç San. ve Tic. A.Ş. tarafından hediye edilmiştir.**

Prediyabetik olmasını istediğimiz hayvan gruplarına çalışmanın başlangıcından itibaren başlayıp 8 hafta süre ile kalorisinin % 70'i yağ olan yüksek yağlı diyet (Kazein 200 g, L-sistin 3g, Mısır nişastası 7.8 g, maltodeksrin 100 g, Sükroz 172.8 g, Selüloz 50g, soya yağı 25 g, Hayvansal yağ (iç yağı) 177.5 g, Mineral karışımı S10026, Dikalsiyum fosfat 13 g, Potasyum sitrat (H₂O'lu) 13 g, Vitamin karışımı W10001 10 g, Kolin bitartarat 2 g, Sarı gıda boyası 0.05 g. ARDEN A.Ş.) ile beslenerek prediyabet modeli oluşturuldu ve çalışmanın sonuna kadar yüksek yağlı diyet ile beslenmeye devam edildi. Kontrol grupları, çalışmanın başlangıcından sonuna kadar standart sıçan yemi ile beslendi. Bütün bu çalışmalar sırasında 12:12 saat aydınlık:karanlık döngüsü takip edildi ve oda sıcaklığı 21-22°C olarak ayarlandı. Bu çalışmanın beslenme ve bakımı Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

3.1.2. Öğrenme Deneyleri

Öğrenme deneylerinin yapıldığı ortamda cam bulunmamaktadır ve deney hayvanının etrafı gözlemlememesi için tankın etrafı kapalıdır. Bütün gruptaki hayvanlara, ilk sekiz haftanın sonunda ve bütün çalışmanın biteceği on altıncı haftanın sonunda Morris su tankı kullanarak, yer öğrenme (gizli platform) protokolü uygulanıp spasyal referans bellek testi uygulandı. Öğrenme testi toplam 5 gün sürdü. İlk 4 gün öğrenme denemeleri, son gün ise belleği test edecek probe deneme yapıldı.

Öğrenme denemeleri günde 4 deneme olarak verildi. Öğrenme denemelerine başlamadan önce stresi minimize etmek için her hayvana 3 gün, günde bir defa 1 dakika yüzme alıştırmaları uygulandı. Öğrenme günlerinde, Morris su tankına oda sıcaklığında su dolduruldu, tank farazi 4 kadrana bölünüp platform bunların birinin merkezine su seviyesinin 1-2 cm altına kalacak şekilde yerleştirildi. Kullanılacak platform su tankının çeperleri ve tabanıyla aynı renkte olmalıdır. Suyu içindeki platformun görülmemesi için yeterli miktarda, toksik olmayan boya karıştırıldı. Tankın çevresine hayvanın platformun yerini öğrenmesine yardım edecek ipuçları asıldı.

Öğrenme günleri boyunca (4 gün) platform hep aynı kadranda kaldı. Öğrenme denemelerinde hayvanın bırakılacağı noktalar tayin edildi (Kuzey (K), Doğu (D), Güneydoğu (GD), Kuzeybatı (KB) gibi). Her öğrenme deneme gününde ilk deneme için ilk suya bırakılış noktası bir önceki günden farklı seçildi. Öğrenme denemesinde hayvan seçilen suya bırakılma noktasından suya bırakıldı ve gizli platformu bulması için 120 saniye verildi.

Platformu bulmuş ve üzerine çıkmış hayvanın başarılı olduğu kabul edildi. Öğrenme denemeleri bitip beşinci gün belleği test etme probe denemesine geçildi. Probe denemede platform su tankından çıkarıldı. Hayvan belirlenecek her hangi bir suya bırakılma noktasından suya bırakıldı ve hayvana 60 saniye süre verildi. 60 saniye sonunda hayvan su içerisinden alınıp kurulandı ve kafesine konuldu. Bütün öğrenme denemeleri su tankının üzerinde tavana asılı bir video takip sistemi ile kaydedildi, değerlendirilecek olan öğrenme-bellek parametreleri alındı. Bu işlemler için EthoVision programı kullanıldı.

3.1.3. Metformin HCl Tedavisi

Metformin HCl uygulanan gruplara (**K+ Met, Predia+ Met**), çalışmanın dokuzuncu haftasının başında başlanarak çalışmanın biteceği on altıncı haftanın sonuna kadar, toplam 8 hafta Metformin tedavisi uygulandı (100mg/kg/gün). Metformin tedavisi, gavaj yoluyla günlük olarak uygulandı.

Metformin suda maksimum konsantrasyonda çözülerek kullanıldı. (25°C’de 1.06×10^{-6} mg/L)

3.1.4. Hayvan Deneylerinin Sonlandırılması

On altıncı haftanın sonunda bütün hayvanlar tüm gruplardan elde edilecek hipokampus doku örneklerini almak amacıyla genel anestezi (Ksilazin+ Ketamin; 5-10 mg/kg+ 50-60 mg/kg, i.p) uygulanarak ötenazi yapıldı. Hipokampus doku örnekleri -80°C’de Tıbbi Biyoloji AD.’nda saklandı.

3.2. Genetik Çalışmalar

3.2.1. Total RNA Eldesi (mRNA)

Taze dokudan total RNA izole etmek için RNeasy Mini Kit Protokolü (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya. Cat. No.74104) kullanıldı.

Kitin çalışma prosedürü şu şekildedir:

1. Taze dokular yeterli miktarda lam üzerinde kesilerek uygun tüplere alındı,
2. Elde edilen doku parçaları -80°C 15-20 dakika boyunca muhafaza edilip, üzerine 400 µl RLT buffer ve metal boncuk eklenip, doku parçalayıcı kullanılarak 5-10 dk boyunca parçalandı.
3. Parçalanmış doku örnekleri 3 dakika boyunca 4°C’de 12.000 g’de santrifüj edildi ve orta faz yeni bir tüpe alındı,
4. Tüpteki miktarın 1 katı (yaklaşık 400µl) kadar 70% etanol eklenip, pipet ile iyice karıştırıldı,
5. En fazla 700 µl örnek 2 ml toplama tüpü içerisindeki RNeasy® Mini kolona yüklenip ve oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000 g’de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı atılıp, kalan örnek olduğunda işlem tekrarlandı.

6. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 700 µl Buffer RWT çözeltisi eklenip, oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000 g'de santrifüj uygulandı. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.

7. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklenip, oda sıcaklığında 15 sn 8000 g'de santrifüj uygulandı. (Not: Kullanmadan önce Buffer RWT ve RPE çözeltilerine %96-100 etanol eklendi.) Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.

8. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklenip, oda sıcaklığında 2 dk 8000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.

9. 1,5 ml'lik toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 30-50 µl RNase içermeyen su eklenip, oda sıcaklığında 1 dk 8000g'de santrifüj uygulandı. Toplama tüpündeki birikinti total RNA'yı içermiş oldu. Elde edilen RNA'lar -80 °C'de saklandı.

3.2.2. Elde Edilen RNA'lardan Kalite ve Miktar Tayini

cDNA deneyleri öncesi elde edilen RNA örneklerinin miktarlarını ve kalitesini belirlenmek amacıyla ve tüm örnekleri aynı yoğunlukta reaksiyona tabi tutmak amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı.

Kalite ve miktar tayini Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System (BioTek, Winooski, United States) kullanılarak yapıldı. cDNA deneyleri öncesi RNA konsantrasyonu 200 ng/µl'ye ayarlandı.

3.3.3. mRNA'dan cDNA eldesi

1. cDNA (kalıp, complementary DNA)'lar, Qiagen RT² First Strand Kit (Hilden, Almanya, Cat.No. 330404) kullanılarak sentezlendi.
2. RNA miktarı 25 ng–5 µg arasında olmalıdır, en iyi sonuç ise 0,5-1 µg arasında alınmaktadır.
3. Tablo 1'e göre RT toplam karışımı buz üzerinde hazırlanıp, RNA'nın miktarı 20 µl hacim içerisinde 200ng/µl olacak şekilde ayarlandı.
4. RNA en iyi sonuç alınan aralığa göre ayarlandı, tepkime hacminin geri kalan kısmı ise Nükleaz içermeyen su ile 10 µl'ye tamamlandı.

5. RNA, genomik DNA eliminasyon karışımı içeren her bir tüpe eklenecektir. Kısa süreli santrifüj yapılarak buz üzerine alındı.
6. Karışım oluşturulduktan sonra Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler cihazında aşağıdaki tablo 3.1’de gösterildiği gibi Genomik DNA eliminasyon protokolü uygulandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. Genomik DNA eliminasyon karışım içeriği

Bileşenler	Tepkime Hacmi	Konsantrasyon
Buffer GE	3 µl	5x
Nükleaz içermeyen su	2 µl	
Kalıp RNA	5 µl	1 µg/µl
Toplam Hacim	10 µl	

Tablo 3.2. Genomik DNA eliminasyon protokolü

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)
42 °C	5 dk

7. Süre bittiğinde örnekler hemen buz üzerine alındı ve 1 dakika beklendi.
8. Daha sonra, aşağıdaki tablo 3.3’e göre hazırlanan RT karışımı cihazdan alınan örneklerin üzerine dağıtıldı ve toplam hacim 20 µl oldu.
9. Elde edilen yeni karışım Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) cihazı ile revers transkripsiyon programı çalıştırıldı: 42°C’de 15 dk, 95°C’de 5 dk olan tepkime koşullarına göre RT-PCR yapıldı.
10. Buradan elde edilen cDNA’ların kullanım ömrünü uzatmak için -80°C’de muhafaza edildi.

Tablo 3.3. Reverse Transcriptase Mix için bileşenler ve miktarlar

Bileşenler	Tepkime Hacmi	Konsantrasyon
Buffer BC3	4 µl	5x
Kontrol P2	1 µl	
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl	
RNaz içermeyen su	3 µl	
Toplam Hacim	10 µl	

3.2.4. Primer Seçimi

BDNF primer assay ve “housekeeping” gen olarak GAPDH primer assay kullanıldı. Kullanılan primerler assay’lerin katalog numarası ve özellikleri Tablo.3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Kullanılan primerler ve detayları

PRİMER ASSAY	CAT. NO.	RefSeq Accession No	Band Size (bp)	Reference Position	UniGene No
BDNF	330001 PPR45333A	NM_12513.4	210	1048	Rn.11266
GAPDH	330001 PPR06557B	NM_017008.4	200	1086	Rn.91450

3.2.5.Gen ifade analizi

qRT-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı-PCR)

qRT-PCR için tepkime bileşenleri Qiagen RT² SYBER Green Mastermix (Hilden, Almanya, Cat.No. 330500) kiti kullanılarak hazırlanacaktır. Tablo 3.5’de bileşenlerin tepkime hacimlerine göre kullanıldı.

Tablo 3.5.qRT-PCR için kullanılan bileşenlerin oranları

Bileşenler	Hacim	Konsantrasyon
RT ² SYBER Green Mastermix	12.5 µl	
RT ² qPCR Primer Assay (BDNF)	1 µl	10µM stok
RNaz içermeyen su	10.5 µl	
Kalıp cDNA	1 µl	
Toplam hacim	25 µl	

Buz üzerinde tepkime bileşenleri hazırlandı ve uygun tüplere cDNA'lar ile dağıtılıp, qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazına yüklendi. Tablo 3.6'da verilen qRT-PCR tepkime koşullarına göre tespit işlemleri gerçekleştirildi.

Tablo 3.6. qRT-PCR Tepkime Koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman	
95	10 dk	} 1 döngü
95	15 sn	
60	30 sn	} 40döngü

İstatiksel Analiz

Elde edilen veriler, Qiagen online veri merkezinde Student's t-testi, unpaired t-test, Mann-Whitney U testi, one-way ANOVA çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak analiz edildi. Veriler ortalama ($\pm$ SD) olarak verildi.

Etik Kurul izni: Gaziantep Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 35 protokol no ve 2017/19 karar numaralı etik kurul izni ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Etik kurul araştırma başvuru onay formu ekte verilmiştir.

4.BULGULAR

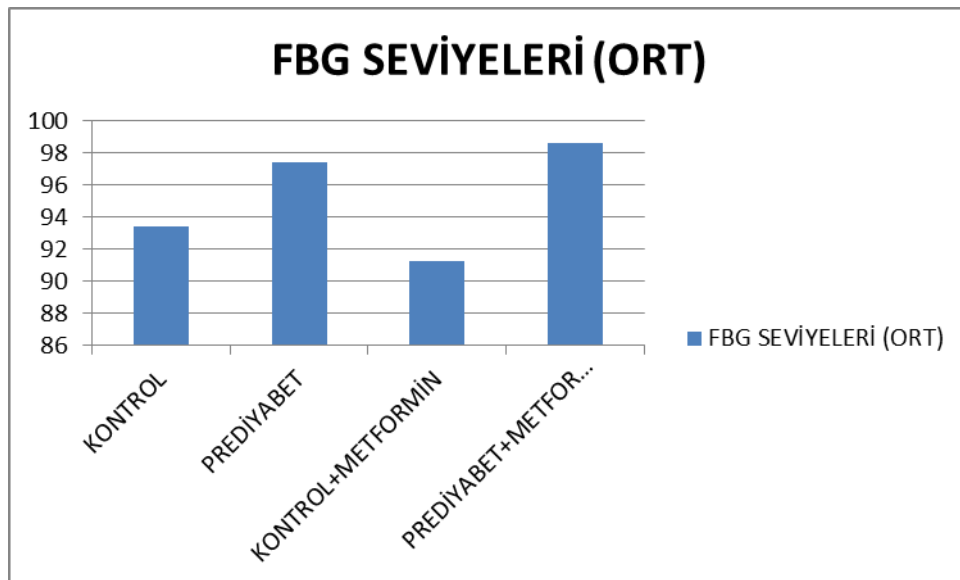
Tedaviye yönelik yeni yaklaşımları geliştirmesi için rat hipokampusundan BDNF etkisinin gen ifadesinin analizleri yapıldı, öğrenme deneylerine tabi tutuldu, açlık kan glukoz seviyelerine bakıldı ve haftalık olarak vücut ağırlıklarının takibi yapıldı.

4.1. Açlık Kan Glukoz Değerleri

Deney hayvanları teslim alındıktan sonra deneylere başlamadan önce açlık kan glukoz (FBG) değeri ölçüldü ve grupların ortalaması alınarak Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Grupların ortalama FBG değerleri daha rahat anlaşılması açısından Şekil 4.1.'de grafik halinde gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Grupların ilk ortalama FBG seviyeleri.

	FBG SEVİYELERİ (ORT)
KONTROL	93,375
PREDİYABET	97,444
KONTROL+METFORMİN	91,25
PREDİYABET+METFORMİN	98,6

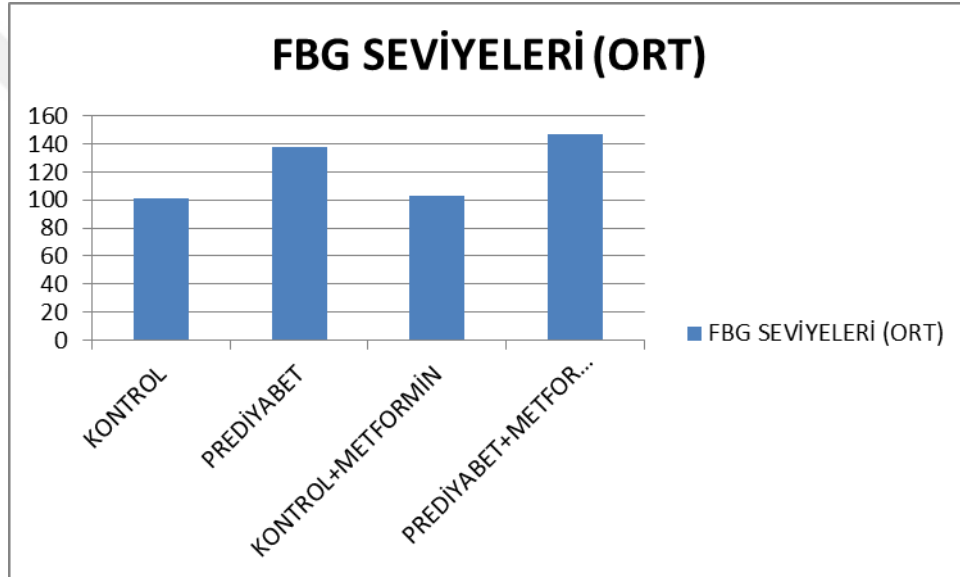


Şekil 4.1. Deneye Başlamadan Önce Grupların Ortalama FBG Seviyelerinin Grafikte Gösterimi.

Deneye başladıktan sonra prediyabet grupları yüksek yağlı diyet ile beslendi ve 8 hafta sonunda ikinci kez açlık kan glukoz değerleri ölçüldü (Tablo 4.2). Artışların daha net bir şekilde görülmesi için ortalama FBG değerleri Şekil 4.2’de grafik halinde gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Grupların ikinci ortalama FBG seviyeleri.

	FBG SEVİYELERİ (ORT)
KONTROL	101,375
PREDİYABET	137,444
KONTROL+METFORMİN	103,25
PREDİYABET+METFORMİN	146,6

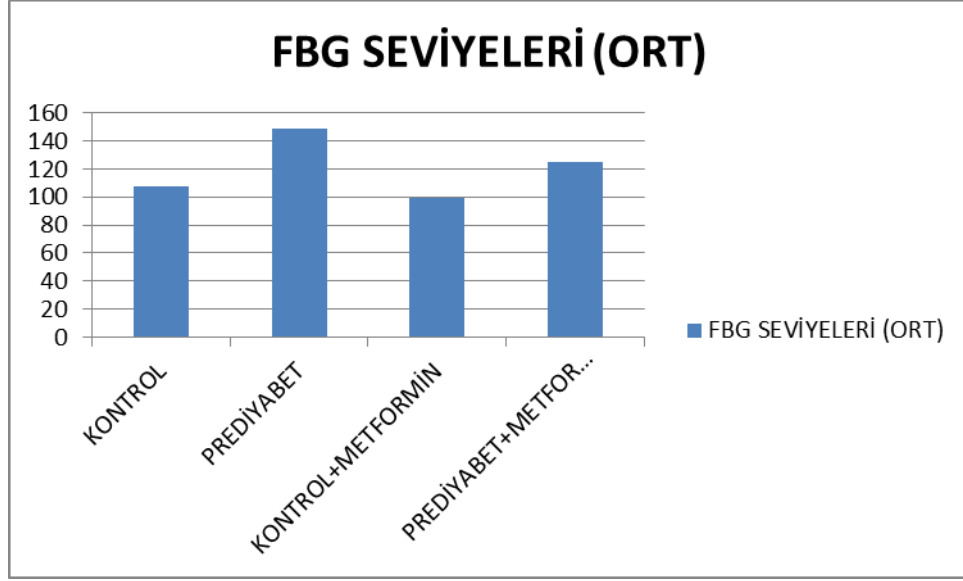


Şekil 4.2. Deneye Başladıktan 8 hafta Sonraki Grupların Ortalama FBG Seviyelerinin Grafikte Gösterimi.

Deney hayvanları on altı hafta yüksek yağlı diyet ile beslendikten sonra, sakrifiye edilmeden önce son kez açlık kan glukoz değerleri ölçüldü ve bu değerler Tablo 4.3’de gösterilmiştir. Değişimlerin görülmesi açısından Şekil 4.3’deki grafik çizilmiştir.

Tablo 4.3. Deneye Başladıktan 16 hafta Sonraki Grupların Ortalama FBG Seviyeleri.

	FBG SEVİYELERİ (ORT)
KONTROL	107,8
PREDİYABET	148,51
KONTROL+METFORMİN	99,6
PREDİYABET+METFORMİN	125,25



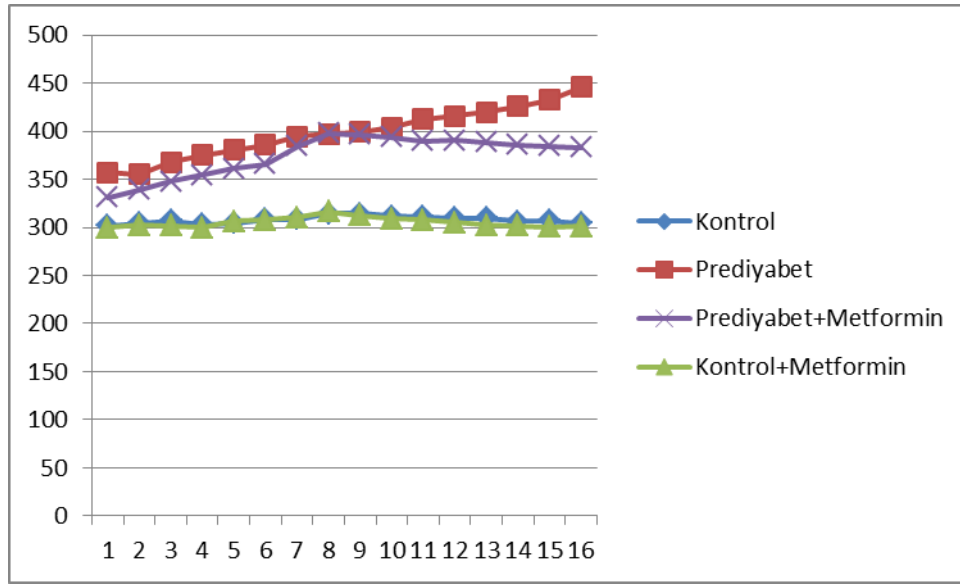
Şekil 4.3. Deneye Başladıktan 16 hafta Sonraki Grupların Ortalama FBG Seviyelerinin Grafikte Gösterimi.

4.2. Haftalık Ağırlık Değişim Sonuçları

Hayvan gruplarının 16 hafta süresiyle ağırlık ölçümleri yapıldı ve değerler Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. Gruplar arasındaki değişimlerin daha iyi görülmesi için bu değerler Şekil 4.4'de grafik halinde gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Haftalık ağırlık değişim tablosu

Hafta	Kontrol (gr.)	Prediyabet (gr.)	Kontrol+Metformin (gr.)	Prediyabet+Metformin (gr.)
1	301,375	356,875	299,375	330,875
2	304,125	354,875	302,125	338,875
3	306,75	367,75	301,75	347,75
4	303	375,125	300	354,125
5	304,125	380,375	306,125	361,375
6	308,625	385,875	307,625	365,875
7	308,125	394,375	310,125	384,375
8	314,5	397,25	316,5	397,86
9	314,5	399	312,5	396,52
10	311,75	404	308,96	393,87
11	310,875	412,125	307,9	389,85
12	309,875	415,625	304,85	390,12
13	309,5	419,8	302,5	388,52
14	306,5	425,9	301,78	385,41
15	306,75	432,6	300,63	384,69
16	304,25	445,6	300,78	383,15



Şekil 4.4. 16 Haftalık grupların ağırlık değişim grafiği

4.3. Morris Su Tankı Sonuçları

On altı haftanın sonunda deney hayvanları sakrifiye edilmeden önce bütün gruplar Morris su tankında öğrenme deneylerine tabi tutuldu. Bu deneyde hayvanlara 2 dakika süre verildi ve platforma kaçış süreleri ile standart sapmaları hesaplandı. Tablo 4.5'e bakıldığında metformin uygulanan kontrol grubunun, kontrol grubuna göre platformu daha hızlı bulduğu görülmektedir. Diğer yandan metformin uygulanan prediyabetik grubun, prediyabetik gruba göre platformu bulma süresinin daha az olduğu görülmektedir. Bütün bu değerler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile analiz edildi ve gruplar arasındaki anlamlılık değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Kaçış süresi (t), verileri Morris su tankından gizli platform protokolü uygulanarak elde edilmiştir. Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) analiz edildi ve ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Platforma kaçış süresi

	K	Predia	K+M	Predia+M
t(s)	68,660 $\pm$ 2,248 ^{abc}	86,250 $\pm$ 9,290 ^{ade}	12,375 $\pm$ 5,660 ^{bdf}	37,690 $\pm$ 13,810 ^{cef}

^a Kontrol grubunun (K) prediyabet grubu (predia) arasındaki anlamlılık sonucu tabloda gösterilmiştir: One way Anova $p < 0,05$.

^b Kontrol grubunun (K) metformin kontrol grubu (K + M) arasındaki anlamlılık sonucu tabloda gösterilmiştir: One way Anova $p < 0,05$.

^c Kontrol grubunun (K) metformin prediyabet grubu (Predia + M) arasındaki anlamlılık sonucu tabloda gösterilmiştir: One way Anova $p < 0,05$.

^d Prediyabet grubunun (Predia) metformin kontrol grubu (K + M) arasındaki anlamlılık sonucu tabloda gösterilmiştir: One way Anova $p < 0,05$.

^e Prediyabet grubunun (Predia) metformin prediyabet grubu (Predia + M) arasındaki anlamlılık sonucu tabloda gösterilmiştir: One way Anova $p < 0,05$.

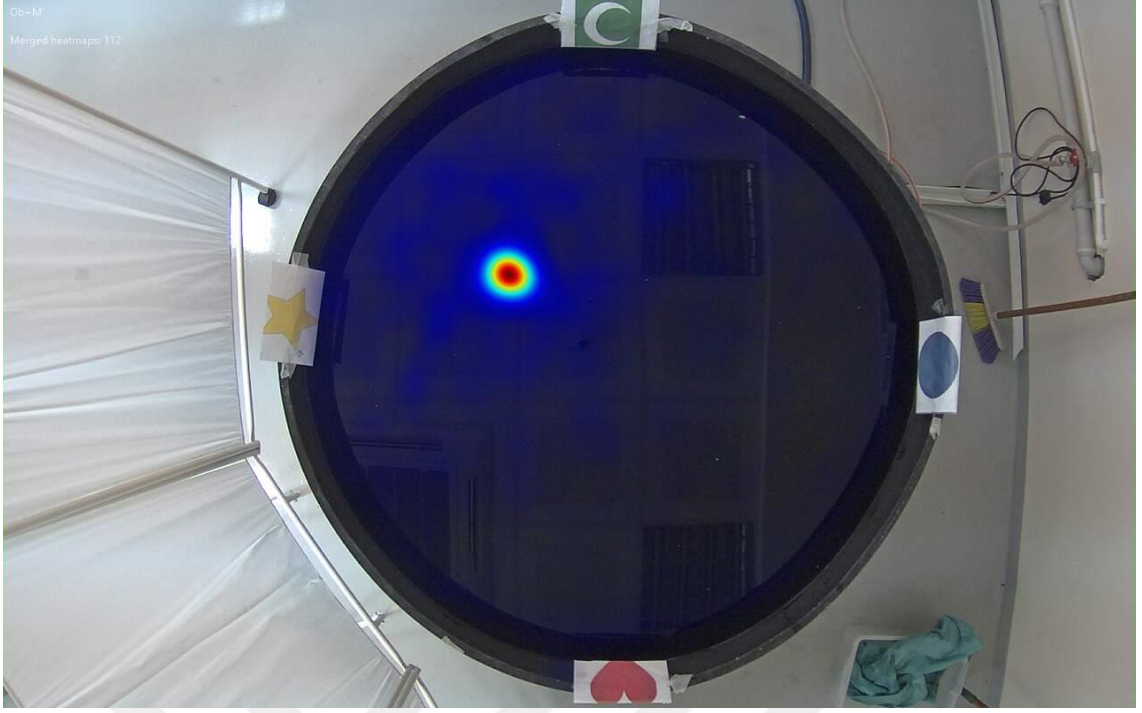
^f Metformin prediyabet grubun (Predia+M) metformin kontrol grubu (K+M) arasındaki anlamlılık sonucu tabloda gösterilmiştir: One way Anova $p < 0,05$

Tablo 4.6. Morris su tankından elde edilen kaçış sürelerinin (t) anlamlılık değerleri.

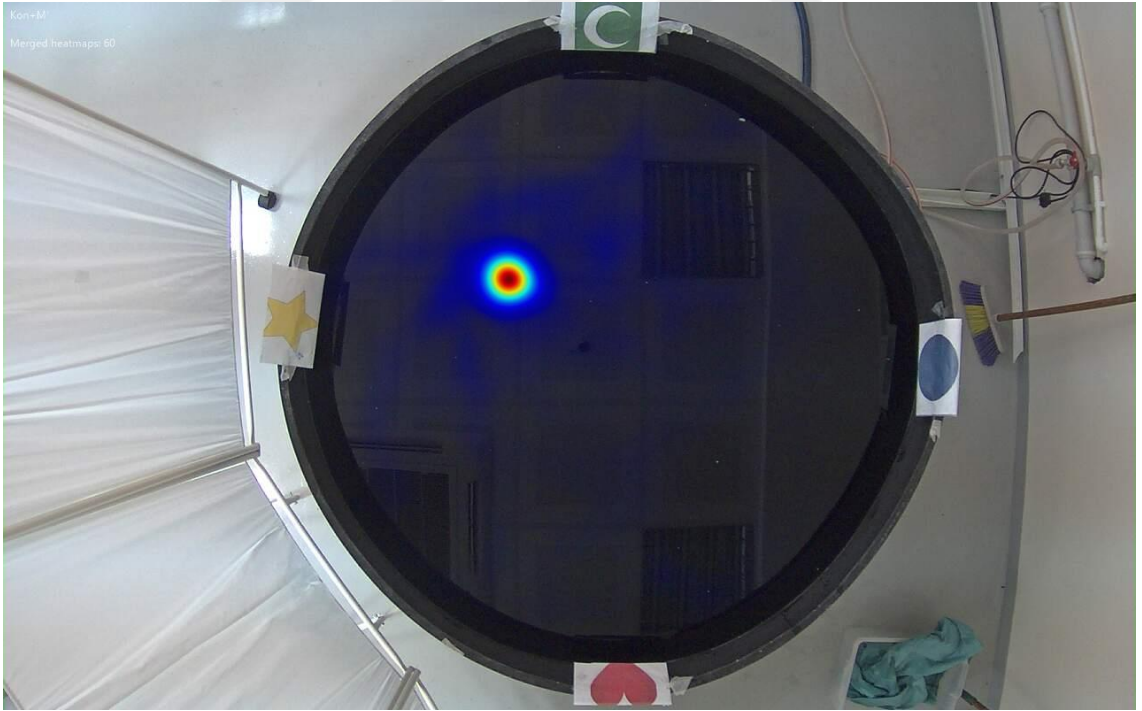
GRUP	P (süre)
Kon	Predia 0,002 [*]
	Kon+M 0,001 [*]
	Predia+M 0,001 [*]
Predia	Kon 0,002 [*]
	Kon+M 0,001 [*]
	Predia+M 0,001 [*]
Kon+M	Kon 0,001 [*]
	Predia 0,001 [*]
	Predia+M 0,001 [*]
Predia+M	Kon 0,001 [*]
	Predia 0,001 [*]
	Kon+M 0,001 [*]

4.3.1 Sıcaklık Haritası (Heat Map) Sonuçları

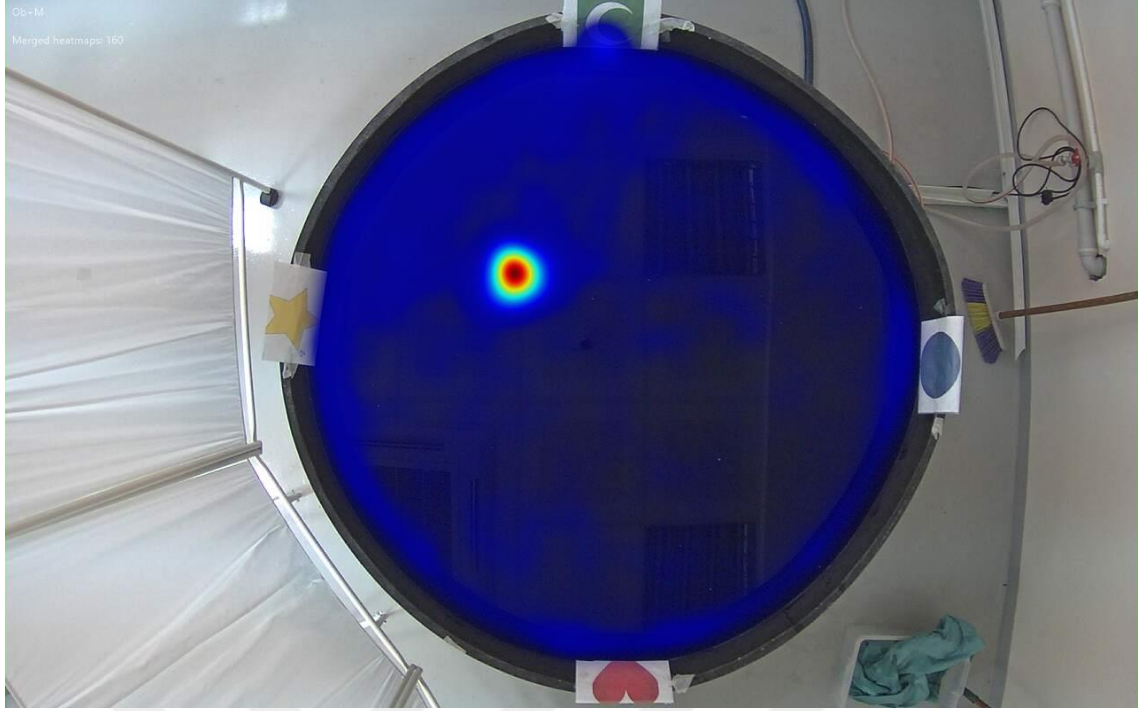
Öğrenme deneyleri uygulanan ratların platformu bulma çabaları sırasında EthoVision yazılımı ile 4 farklı grubun sıcaklık haritaları elde edilmiştir. Haritalarda mavi yerler ratların az bulunduğu bölgeleri temsil ederken renk kırmızıya doğru ilerledikçe yoğun bulunduğu yerleri göstermektedir. İlk 4 gün platform sabit tutularak öğrenme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Buradaki sonuç yine platforma kaçış sürelerini destekler yöndedir. Metformin uygulanan kontrol grubunun, kontrol grubuna göre platformu daha hızlı bulduğu görülmektedir. Prediyabetik gruplara bakıldığında, metformin uygulanan prediyabetik grubun, metformin uygulanmayan prediyabetik gruba göre platformu bulma hızının artmış olduğu görülmektedir (Şekil 4.5-Şekil 4.8).



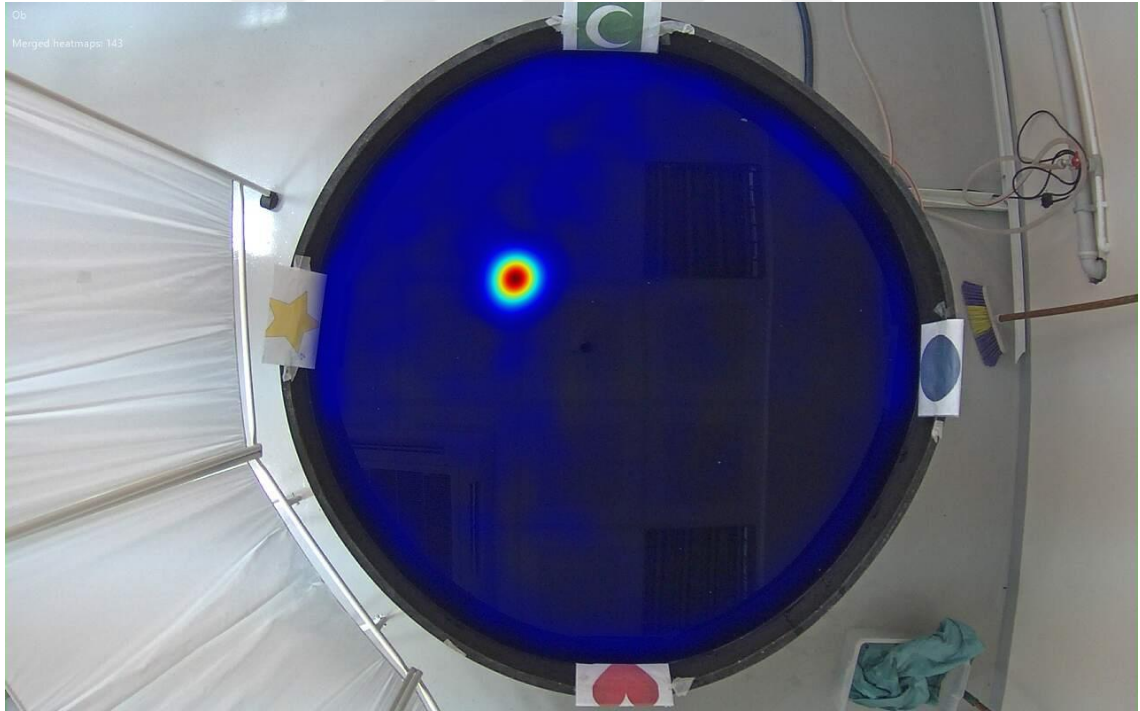
Şekil 4.5. Kontrol Grubu Isı Haritası



Şekil 4.6. Kontrol+Metformin Grubu Isı Haritası

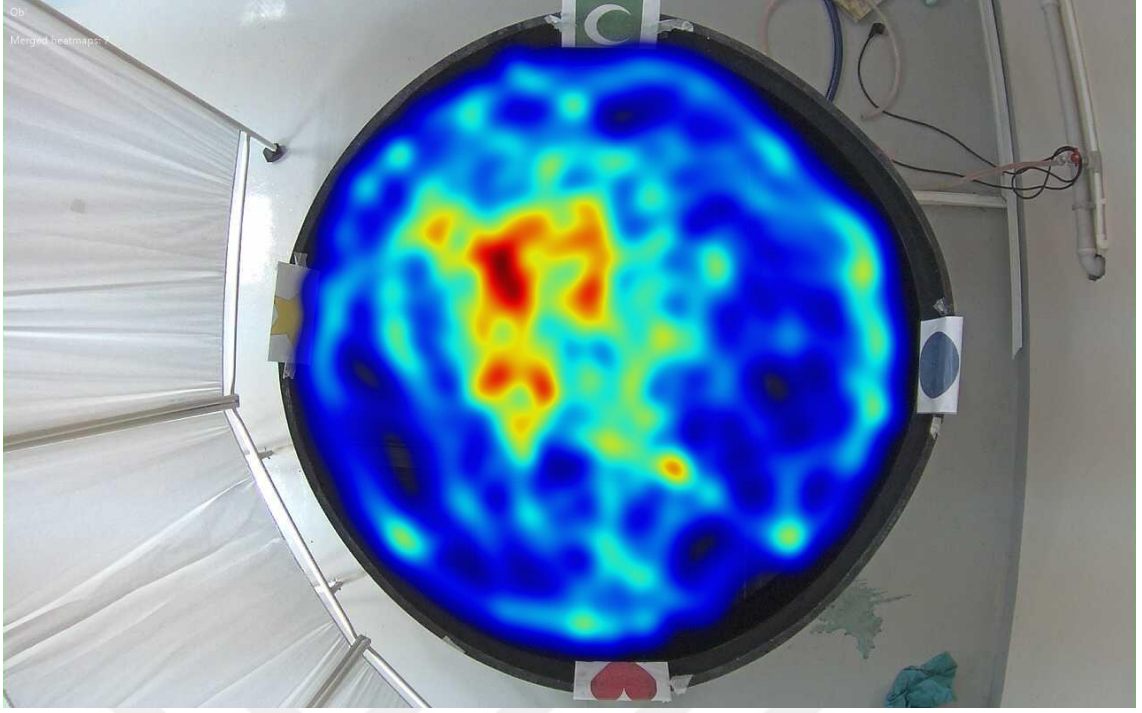


Şekil 4.7. Prediyabet Grubu Isı Haritası

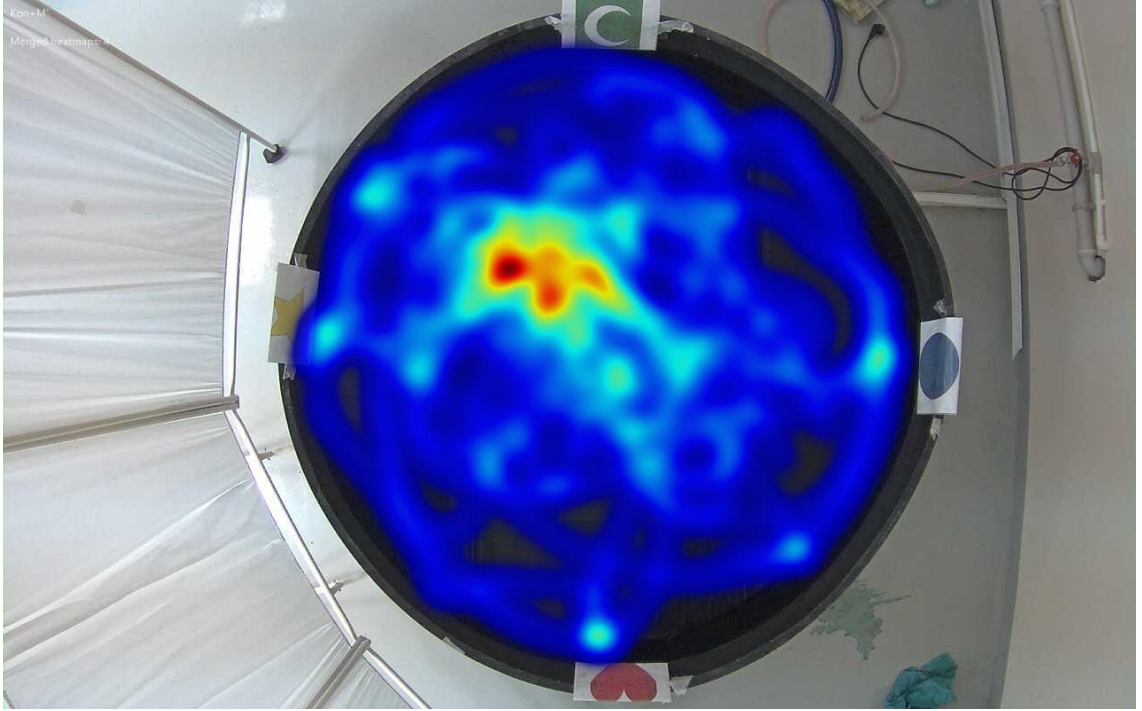


Şekil 4.8. Prediyabet + Metformin Grubu Isı Haritası

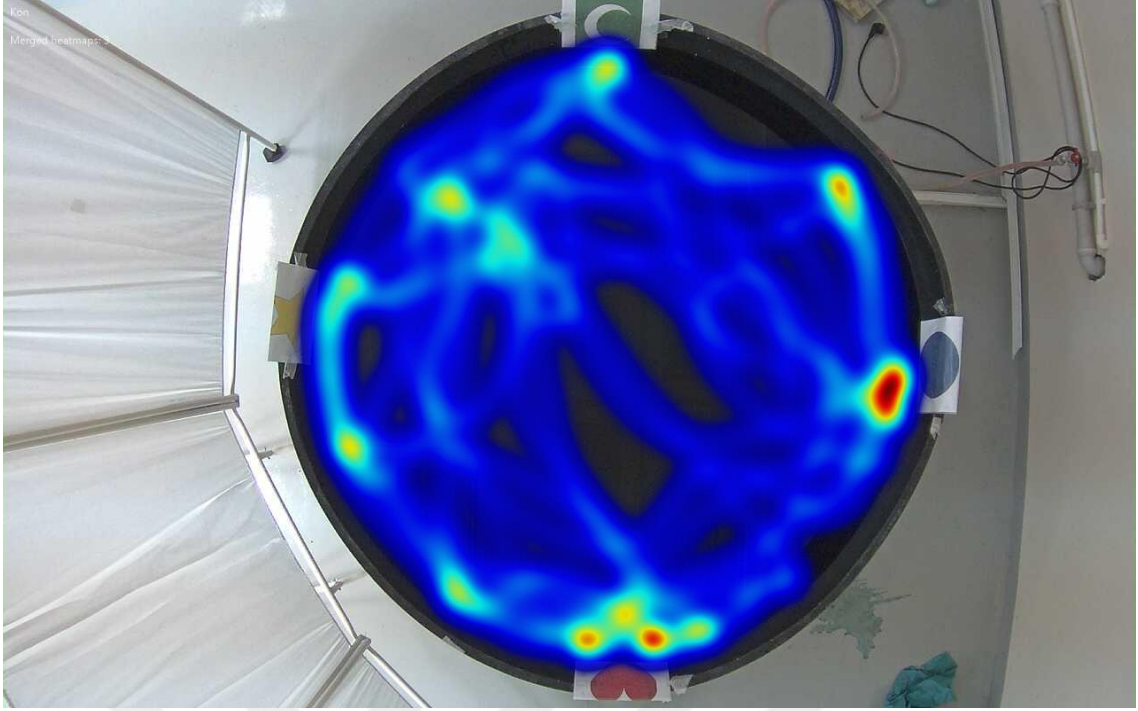
İlk dört gün platform ile gerçekleştirilen öğrenme deneyi bittikten sonra beşinci gün platform tankın içinden alınarak ratlar probe denemeye tabi tutulup sıcaklık haritaları elde edilmiştir. Buradaki sonuçlar ilk elde edilen sıcaklık harita sonuçlarını destekler niteliktedir (Şekil 4.9-Şekil 4.12).



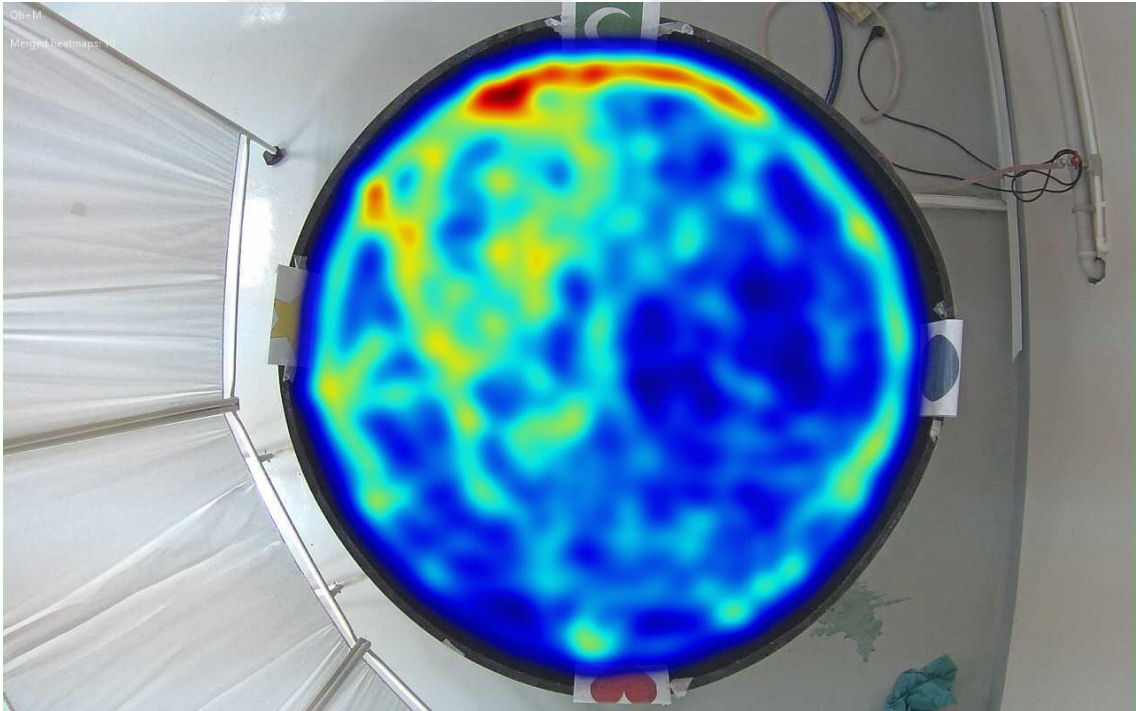
Şekil 4.9. Kontrol Grubu Probe Deneme Isı Haritası



Şekil 4.10. Kontrol+Metformin Grubu Probe Deneme Isı Haritası



Şekil 4.11. Prediyabet Grubu Probe Deneme Isı Haritası



Şekil 4.12. Prediyabet+Metformin Grubu Probe Deneme Isı Haritası

4.4. Gen İfade Analizi Sonuçları

Farklı gruplara ait hipokampus doku örneklerinden elde edilen BDNF gen ifade analizi sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bunun için microsoft office excel programı kullanılmıştır.

Hipokampus dokusunda yapılan gen ifade analizlerinde, elde edilen BDNF gen ifade değerleri GAPDH gen ifade değerleri ile normalize edilmiştir. Referans olarak alınan GAPDH geni belirli şartlar altında ifade düzeyi değişmeyen, her doku ya da hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden ifade edilen “housekeeping” genidir.

qRT-PCR deneylerinde Cp (Crossing points) değerleri elde edilmiştir (Tablo 4.7-Tablo4.8) . qRT-PCR sonuçlarında, hipokampus örnekleri arasında istatistiksel analiz yapılırken $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır ve bu formül aşağıda gösterilmiştir. Bu değer bize deneklerin doku örneğindeki gen ifade düzeyinin, kontrol örneklerine göre kıyaslanmasını sağlar; yani katsayı bilgisi edinilir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{örnek } \Delta Ct (\text{Gen- Referans}) - \text{kontrol } \Delta Ct (\text{Gen- Referans})]}$$

qRT-PCR sonuçlarında ilgili genin referans gene göre kıyaslaması için $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır ve bu formül aşağıda gösterilmiştir. Bu değer bize o genin referans gene göre hangi oranda ifade düzeyinin değiştiğini gösterir; yani, göreceli ifade bilgisi edinilir.

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-\Delta(\text{Gen Ct- Referans Ct})}$$

Tablo 4.7. BDNF geninin ortalama Ct değerleri

Deney Grupları	Kontrol	Obez	Kontrol+Metformin	Obez+Metformin
Ort.BDNFCt (1.tekrar)	26,31666667	29,85142857	22,975	24,44
Ort.BDNFCt (2.tekrar)	25,48666667	29,78	21,9625	25,8814286
Ort.BDNFCt (3.tekrar)	24,40166667	29,98571429	21,8175	24,16
Ort. Ct Değerleri	25,40167	29,87238	22,25167	24,82714

Tablo 4.8. GAPDH geninin ortalama Ct değerleri

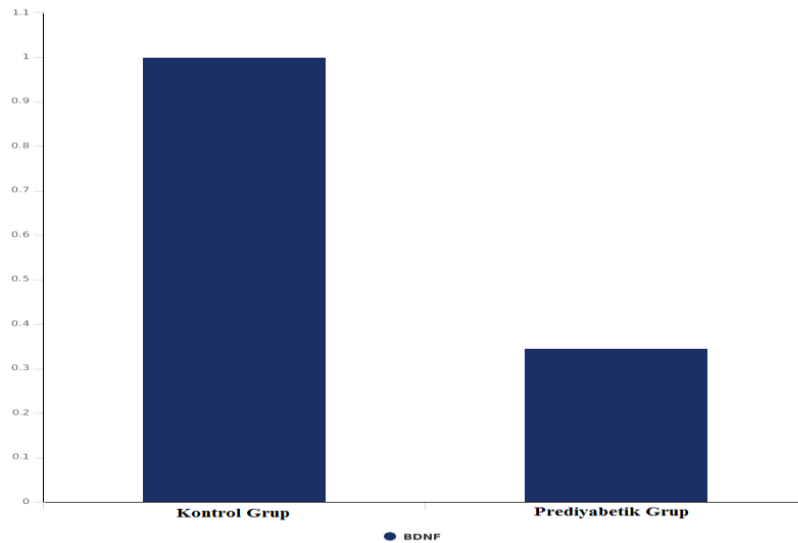
Deney Grupları	Kontrol	Obez	Kontrol+Metformin	Obez+Metformin
Ort.GAPDHCt (1.tekrar)	14,8625	16,3385714	12,49	14,3485714
Ort.GAPDHCt (2.tekrar)	13,1491667	15,5457143	11,65	14,32
Ort.GAPDHCt (3.tekrar)	12,5008333	17,4171429	10,57	13,3271429
Ort. Ct Değerleri	13,50416667	16,4338095	11,57	13,99857

4.4.1. Hipokampusta kontrol grubu baz alınarak hesaplanan BDNF'in katl değişim ifade sonuçları

BDNF geninin kontrol grubu ve obez grubu arasındaki kat değişimi ve p değeri Şekil 4.13'de verilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere “down-regüle” olmuştur yani obezlerde BDNF ifadesi kontrollere göre 2.9 kat azalmıştır, $p < 0,05$ olduğu için anlamlıdır. Şekil 4.14'de bu iki grup arasındaki değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.



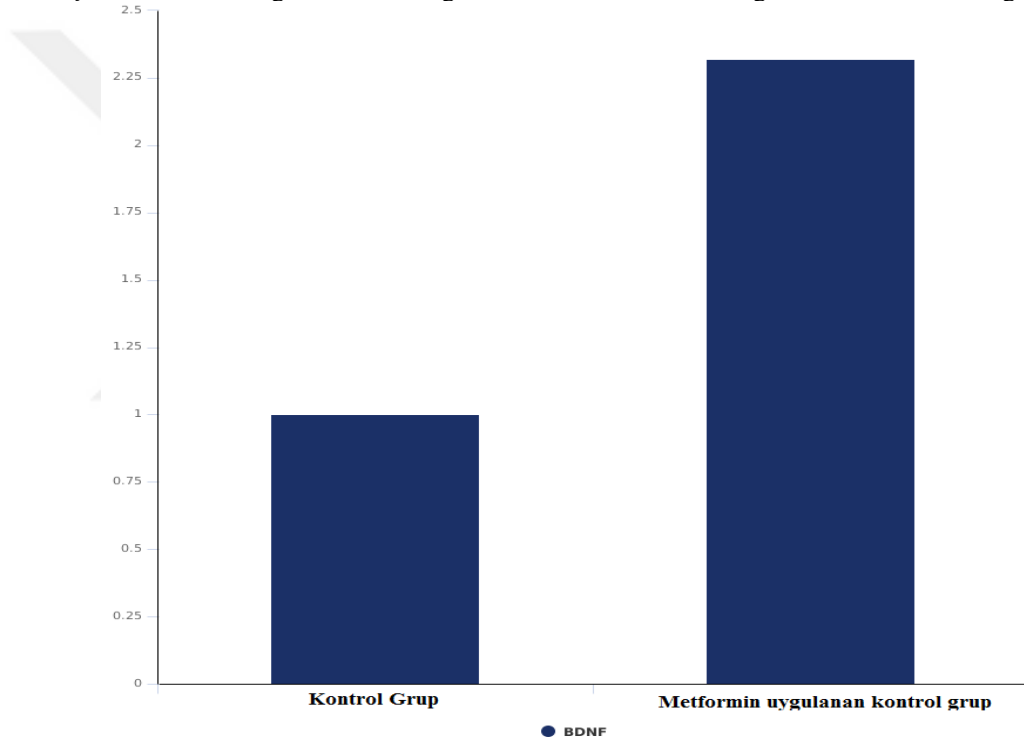
Position	Gene Symbol	AVG ΔC_t		$2^{-\Delta C_t}$		Fold Change		p-value	Fold Up- or Down-Regulation
		Group 1	Control Group	Group 1	Control Group	Group 1/Control	Comments	Group 1/Control	Group 1/Control
1	BDNF	13.43	11.90	0.000091	0.000262	0.35		0.044448	-2.90
2	GAPDH								

Şekil 4.13. BDNF geninin kontrol grubu ve prediyabet grubu arasındaki kat değişimi.**Şekil 4.14.**BDNF geninin kontrol grubu ve prediyabet grubu arasındaki kat değişim grafiği

BDNF geninin kontrol grubu ve kontrol+metformin grubu arasındaki kat değişimi ve p değeri Şekil 4.15’de gösterilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere “up-regüle” olmuştur yani kontrol+metformin grubunda BDNF ifadesi kontrollere göre 2.32 kat artmıştır ve $p < 0,05$ olduğu için anlamlıdır. Bu artış Şekil 4.16’da grafiksel olarak gösterilmiştir.

Upload data Analysis setup Analysis Plots & charts Export data What's next									
Position	Gene Symbol	AVG ΔC_t		$2^{-\Delta\Delta C_t}$		Fold Change		p-value	Fold Up- or Down-Regulation
		Group 1	Control Group	Group 1	Control Group	Group 1/Control	Comments	Group 1/Control	Group 1/Control
1	BDNF	10.68	11.90	0.000608	0.000262	2.32		0.042373	2.32
2	GAPDH								

Şekil 4.15. BDNF geninin kontrol grubu ve kontrol+metformin grubu arasındaki kat değişimi

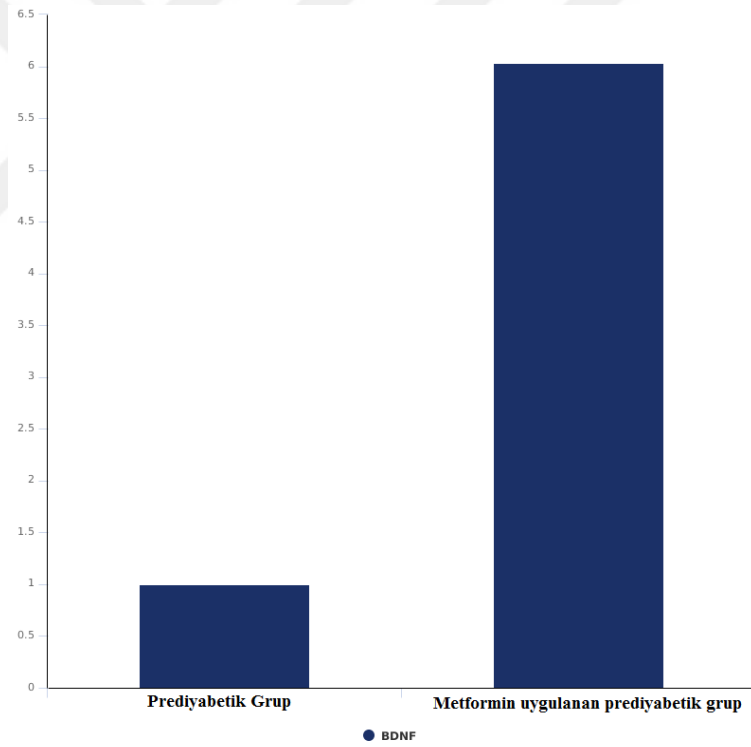


Şekil 4.16.BDNF geninin kontrol grubu ve kontrol+metformin grubu arasındaki kat değişim grafiği

BDNF geninin obez grubu ve obez+metformin grubu arasındaki kat değişimi ve p değeri Şekil 4.17’de gösterilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere “up-regüle” olmuştur yani obez+metformin grubunda BDNF ifadesi obez gruba göre 6.03 kat artmıştır, $p < 0,05$ olduğu için anlamlıdır. Bu bariz artış Şekil 4.18’de grafiksel olarak da gösterilmiştir.

Position	Gene Symbol	AVG ΔC_t		$2^{-\Delta C_t}$		Fold Change		p-value	Fold Up- or Down-Regulation
		Group 1	Control Group	Group 1	Control Group	Group 1/Control	Comments	Group 1/Control	Group 1/Control
1	BDNF	10.84	13.43	0.000547	0.000091	6.03		0.044180	6.03
2	GAPDH								

Şekil 4.17. BDNF geninin prediyabet grubu ve prediyabet+metformin grubu arasındaki kat değişimi

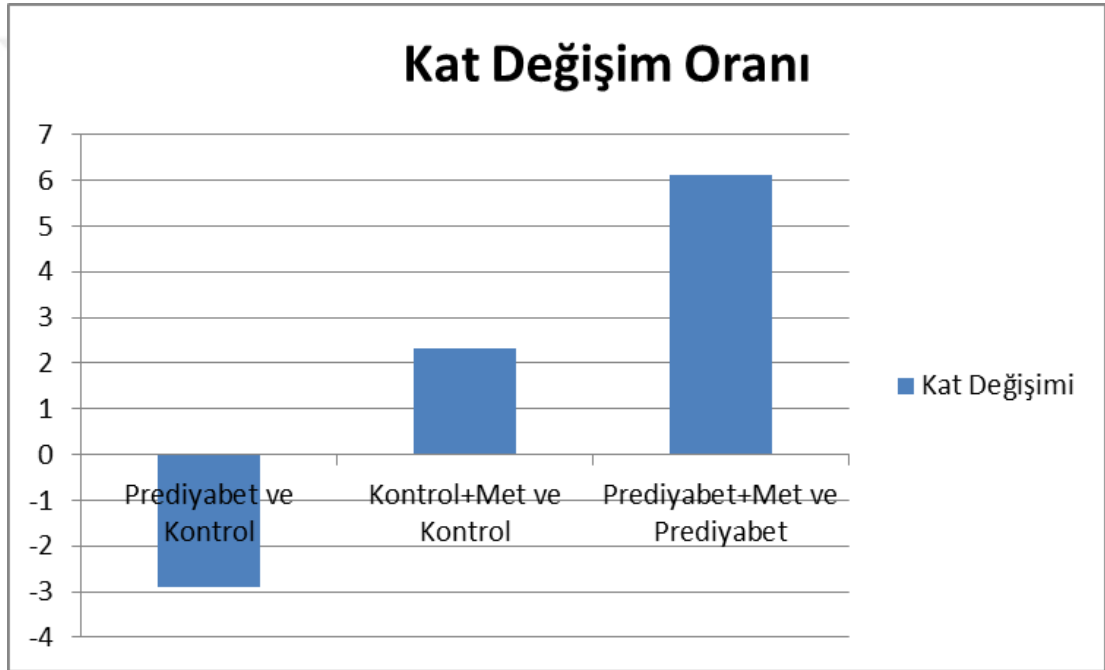


Şekil 4.18. BDNF geninin prediyabet grubu ve prediyabet+metformin grubu arasındaki kat değişimi grafiği

Yukarıda tek tek ifade edilen kat değişim oranları Tablo 4.9’da daha iyi anlaşılması açısından toplu halde verilmiştir. Bütün bu kat değişimleri daha rahat görülmesi ve karşılaştırılabilmesi için Şekil 4.19’da tek grafik halinde gösterilmiştir.

Tablo 4.9. BDNF geninin kat değişim oranları.

Prediyabet ve Kontrol	Kontrol + Metformin ve Kontrol	Prediyabet + Metformin ve Prediyabet
-2,901054445	2,322749114	6,034036836
BDNF İfadesi Azaldı	BDNF İfadesi Arttı	BDNF İfadesi Arttı



Şekil 4.19. BDNF geninin kat değişimlerinin grafiği.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Normal glikoz toleransı üst sınırı ile aşıkâr diyabet arasındaki süreç "prediyabetik dönem" olarak adlandırılır. Prediyabet, insülin direnci, hiperinsülinemi, obezite (özellikle abdominal veya visceral obezite), yüksek trigliserid ve/veya düşük HDL şeklinde dislipidemi ve hipertansiyonu içeren metabolik sendromlar ile ilişkilidirler.

Prediyabetik deneysel hayvan modeli oluşturarak yapılmış olan çalışmamızda; deneklerin kan glikoz seviyeleri, ağırlıkları, obez olma durumları, bilişsel performansları, hipokampus gen ifade düzeyleri ve metforminin prediyabet üzerindeki etkisi değerlendirildi. Deneye başlamadan önce randomize bir şekilde oluşturulan gruplardaki hayvanların kan glukoz seviyeleri ortalaması 95 mg/dL olarak tespit edilmiştir. HFD ile 8 hafta beslenmesi sonucu prediyabetik grupların (prediyabet ve prediyabet+metformin) ortalama kan glukoz seviyeleri 141 mg/dL olduğu görülmüştür. Süreç değerlendirildiğinde HFD ile beslenme süresi uzatıldığında bu grupların tip 2 diyabete doğru ilerlediği görülmüştür. Aynı süre zarfında kontrol gruplarının kan glukoz seviyeleri ortalamaları 102 mg/dL olarak ölçülmüştür. Bu değer normal kabul edilen aralıktadır, artış olması beklenen bir durumdur çünkü zaman geçtikçe hayvanlar yaşlanmakta ve bu da ratlar için kan glukoz seviyelerini etkilemektedir. Sekizinci haftadan itibaren metformin gruplarına ilaç tedavisi uygulanmaya başlanmış ve 16. haftanın sonunda kan glukoz değerlerinin ilaç uygulanan bu gruplarda düşmüş olduğu saptanmıştır. Metformin uygulanan kontrol grubunda kan glukoz seviyesi ~99 mg/dL'ye gerilerken metformin uygulanan prediyabetik deney grubunda 146 mg/dL'den ~ 125 mg/dL'ye kadar gerilediği gösterilmiştir. Bu bize metforminin deneysel prediyabette tedavi etkisinin olduğunu göstermiştir.

Ratların ağırlıklarına bakıldığında, HFD ile beslemeye başladıktan sonra kilolarında ivmeli bir artış görülmektedir. Deney sürecinin sonunda HFD ile beslenen prediyabetik gruplarda obezite olduğu saptanmıştır. Buradan obezite ve prediyabetin büyük oranda birlikte görüldüğü kanısına varılabilir. Bu iki metabolik hastalık arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Prediyabet obezitenin nedeni mi sonucu mu tam olarak anlamak için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hipokampusun enerji dengesinin düzenlenmesindeki rolü bilinmektedir fakat bu iki metabolik hastalık arasındaki ilişkinin anlaşılması için pankreas, karaciğer gibi organların da incelenmesi gerekmektedir.

Bunların arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi için insülin ve leptin seviyeleri takip edilebilir, bunları kodlayan genlerin ve obezite prediyabet gibi hastalıklarda etkili olduğu düşünülen PTP1B, UCP-2, SOCS3 gibi genlerin ifadeleri incelenip bu genlerin ifade yollarının düzenlenmesi takip edilebilir.

Yapılan benzer çalışmalarda;

Metformin kullanımı ile ilgili kapsamlı klinik deneyime rağmen, ilacın moleküler etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Daha önce tartışıldığı gibi, metformin öncelikle hepatik insülin duyarlılığını artırır ve AMPK aktivasyonu yoluyla hepatik glukoz üretimini azaltır (162).

Yapılan çalışmalar, prediyabette metforminin olumlu etkileri olduğunu göstermiştir (163,164).

Çin Diyabet Önleme Çalışmasında (CDPS), IGT'ye sahip ve obez hastalar kontrol grubu, metformin grubu (günde iki kez 250 mg) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Çalışma süresi üç yıl olup metforminin, diyabetin ilerlemesini kontrollere göre % 76.8 azalttığı gösterilmiştir. Metformin grubunda kilo kaybı gözlenmemesi veya az görülmesi, muhtemelen ilacın düşük dozda olmasına bağlı olduğu bildirilmiştir (165).

Hint Diyabet Önleme Programı (IDPP), CDPS çalışmasına benzer bir çalışma gerçekleştirmiştir, metformin aynı dozda uygulanmış (günde iki kez 250 mg) ve metforminin yanı sıra yaşam tarzında değişiklik de yapılmış (beslenme, spor). IGT'ye sahip olan 531 Hintli denek (BMI = 25.8 kg/m²) otuz ay boyunca takip edilmiş ve araştırmacılar, hem metformin hem de yaşam tarzı modifikasyonunun, kontrollerle karşılaştırıldığında diyabet gelişimini önlediğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, yaşam tarzı değişikliği ve metformin kombinasyonu, diyabetin önlenmesinde herhangi bir ek yarar sağlanmadığı bildirilmiştir (164).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, düşük veya yüksek dozlarda yapılan metformin tedavisinin, etiyolojiden bağımsız olarak IGT'ye sahip olan hastalarda prediyabetin diyabete dönüşüm oranını azalttığı gösterilmiştir (166).

Çeşitli çalışmalar metforminin bozulmuş glukoz toleransı olan deneklerde insülin direncini azalttığını göstermiştir. Metformin öncelikle karaciğerden glikoz çıkışını azaltır ve periferel dokulardan glukoz alımını artırır, aynı zamanda yemek sonrası glisemik etkiyi azaltır ve insülinin etkisini artırır. (167-171).

Metformin ile tedavi edilen hastalarda insülin duyarlılığında ve pro-insülinin sekresyonunda olumlu değişiklikler bildirilmiştir (172).

Metformin, AMPK'ya bağlı olarak vasküler endotelial fonksiyonları iyileştirerek, diabetes mellitusun mikro ve makrovasküler komplikasyonlarını da önlediği bulunmuştur. Bu komplikasyonların başlıcaları, beyin infarktı ve iskemidir (173).

Araştırmamızda Morris su tankında yaptığımız deneylerin sonuçlarına bakıldığında, kontrol ve prediyabetik gruplar karşılaştırıldığında, HFD ile beslenen prediyabetik grubun platformu bulma sürelerinin daha uzun olduğu bulunmuştur bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır ($p= 0,002$). Hipokampus beyinde bilişsel fonksiyonlardan sorumlu alan olduğundan bu sonuç bize HFD ile beslenen hayvanların hipokampuslarının etkilendiğini açıkça göstermektedir. Metformin uygulanan gruplar kıyaslandığında ilaç uygulanmayan gruplara göre platformu bulma süreleri oldukça kısa olduğu görüldü ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p= 0,001$). Sadece prediyabetik grupta değil kontrol grubunda da metforminin olumlu etkisi açıkça görülmektedir. Isı haritalarına bakıldığında, ilk dört günde grupların ortalama ısı haritaları verilmiştir. Burada açıkça görülüyor ki kontrol grubu, prediyabetik gruba göre platformu daha hızlı bulmuş ya da platform çevresinde daha çok zaman geçirmiştir. Metformin tedavisi uygulanan gruplara bakıldığında prediyabetin yol açtığı bozuklukta düzelmeler görülmekte hatta kontrol grubunda dahi bilişsel fonksiyonları geliştirdiği gözlenmiştir. Öğrenme deneyinin beşinci günü platform çıkarılarak yapılan probe denemelerde prediyabetik grubun öğrenme işlevindeki azalma belirgin olarak gözlemlenmiştir. Prediyabetik grup platformun olduğu yerden çok uzaklarda dolaşırken kontrol grubunun platformu olduğu yerde aradıkları saptanmıştır. Yine metformin uygulanan gruplarda platform bulma süresinin ilaç uygulanmayan gruplara kıyasla azaldığı belirlenmiştir.

Prediyabetik ve kontrol grupları platformun yerini hatırlayıp olması gereken yerde aradıkları farklı alanlara yönelmedikleri görülmüştür. Ayrıca bu öğrenme deneylerinde metformin uygulanan grupların su içerisinde daha hareketli olduğu ve platformu aramaya daha meyilli oldukları tespit edilmiştir. İlaç tedavisi uygulanmayan prediyabetik grubun platformu aramayıp su yüzeyinde hareketsiz bir şekilde bekledikleri görülmüştür. Buradan şu kaniya varılabilir, metforminin bilişsel fonksiyonları iyileştirmede, LTP'nin geri kazanılmasında, öğrenme becerilerinin gelişmesi gibi potansiyel bir koruyucu ajan olabileceğini işaret etmektedir.

Metforminin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri ve potansiyel rolü hakkındaki mevcut literatür bilgileri oldukça sınırlıdır. Ağırlıklı olarak in vitro çalışmalar mevcuttur ve nispeten genç hayvanlarda kısa süreli tedaviyi inceleyen birkaç in vivo çalışma bulunmaktadır.

Bazı çalışmalar, metforminin bilişsel bozukluk ve hafıza kaybı üzerinde yararlı etkileri olabileceğini gösterirken, bazıları ise metforminin nöronal sağkalımı azaltabileceğini göstermektedir. Metforminin bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkisi daha önceki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (174,188).

Prediyabetik evrede başlayan glukoz intoleransının kognitif fonksiyonlarda bozulmalara yol açtığı gösterilmiştir. İnsülin duyarlılığı ve glukoz metabolizması prediyabetik evreden itibaren bozulmaktadır. Prediyabet hastalarında kognitif bozukluklar, tip 2 diyabet hastaları kadar olmasa da arttığı bilinmektedir (174).

Beyin de prediyabet için hedef organlardan birisidir (175). Prediyabette mikrovasküler endotelial hücreleri etkileyerek, kan-beyin bariyerinde bozulmalara yol açmakta ve bu durum da nöroinflamatuvar reaksiyonlar ve nörodejenerasyonla sonuçlanmaktadır (176). Endotel hücreleri nöron, glial ve vasküler bağlantılarda kritik rol oynamakta ve nörovasküler üniteleri oluşturmaktadır. Nörovasküler ünite meydana gelen bozukluklar da kognitif fonksiyonlarda bozulmaya yol açmaktadır (177).

Örneğin, Zhao ve ark. metforminin pentiletetrazolle indüklenmiş epilepsi hayvan modelinde görülen nöbetler, kognitif bozukluk ve beyin oksidatif stres belirteçleri üzerindeki iyileştirici etkilerini değerlendirmiştir. Bu çalışmada metforminin bilişsel bozukluğu iyileştirdiği ve beyin oksidatif stresini azalttığı doğrulanmıştır.

Bu sonuçlar, metforminin kognitif bozukluğa karşı potansiyel bir koruyucu ajan olabileceği sonucuna yol açmıştır (178).

Benzer şekilde, kronik L-metionin hafıza bozukluğu modelinde, metforminin, muhtemelen hipokampusta oksidatif stresi normalize ederek kognitif hasarı önlediği gösterilmiştir (179).

Başka bir çalışmada, metforminin sıçanlarda yüksek yağlı diyetlerle ilişkili uzamsal referans belleğin bozulmasını önlediği gösterilmiştir (180).

Ashrotaghi ve ark. çalışmasında 36 gün boyunca oral olarak metformin uygulanan sıçanlarda, Morris su labirentindeki uzaysal bellek performansı üzerinde olumlu bir etki gösterdiğini vurgulamıştır (181).

Chen'e göre, 6 haftalık bir metformin tedavisi, LTP'nin geri kazanılması dahil olmak üzere farelerdeki bellek bozukluğunu önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir (182).

Başka bir çalışmada McNeilly, metformin tedavisinin, insülin duyarlılığını artırarak HFD'in uyandırdığı bilişsel bozukluğu azaltıp azaltmayacağını araştırmıştır (183). İlacın insülin direncini ve HFD beslemesi ile ilişkili kilo alımını azalttığı, fakat tanıma belleği üzerinde etkisi olmadığını bulmuştur (183).

En güncel çalışmalardan birinde, Allard ve ark. uzun süreli metformin uygulamasının yaşlı erkek C57Bl/6 farelerinde nörotrofinler ve bilişsel fonksiyon üzerindeki etkisini incelemiştir (Çalışmada hayvanlar üç gruba ayrılmıştır, bunlar; kontrol, yüksek yağlı diyet ile beslenen ve metformin uygulanan yüksek yağlı diyet grubu). Metforminin, HFD ile ilişkili mekansal referans belleğin bozulmasını önlediği bildirmişlerdir. BDNF'in, NGF'nin ve nörotrofin 3'ün (Nrf3) transkripsiyonunu azalttığı, fakat protein seviyelerinin değişmediği gösterilmiştir. Araştırmaya göre, metforminin uzun süreli tedavisi ve beyin biyokimyasının değiştirilmesindeki potansiyel rolü hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (184).

Bazı klinik çalışmaların sonuçları, metformin ile uzun süreli tedavinin bilişsel gerileme riskini azaltabileceğini göstermektedir (185).

Guo ve ark. Tip 2 diyabetli depresif hastalarda metformin ile 24 haftalık bir tedavinin bilişsel performansı artırdığı doğrulanmıştır (186).

Bir başka klinik çalışmada, diyabet tedavisinde 4 yıl boyunca belirli bilişsel alanlardaki etkisi incelendiğinde sadece metformin kullanan hastaların, diğer anti diyabetik ilaçları kullananlar ile karşılaştırıldığında daha iyi bilişsel performanslarının (sözel öğrenme, çalışma belleği ve yönetici işlevleri) daha iyi olduğunu göstermişlerdir (187).

Moore ve ark. 2013 yılında, metforminin hastalarda bilişsel performans üzerindeki etkisinin, bilişsel gerilemenin ana nedeni olarak kabul edilen B12 vitamini eksikliğine bağlı olmasından da etkilenebileceği belirtilmiştir (188).

Bununla birlikte, Khattar ve ark. metformin kullanan diyabet hastalarında B12 vitamini düzeylerinin az olmasının, bilişsel bozukluğun ardındaki neden olmadığını göstermişlerdir (189).

Çalışmamızda gen ifade düzeyi analiz edilen BDNF'in nörotrofin olmasının yanında metabotrofin de olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Deneysel çalışmamızın sonunda; BDNF gen ifadesinin, prediyabetik grupta ifadesinin kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır ($p=0,0444$).

Buradan BDNF'in ifadesinin azalmasından dolayı prediyabet, obezite gibi metabolik hastalıkların oluşabileceği düşüncesine varılabilir. Bu sonuç bize BDNF'in vücuttaki enerji dengesinin düzenlenmesinde bir rol aldığını göstermektedir.

Sinaptik plastisite, nöronal sağkalım, nöronal farklılaşma ve gelişimi ile ilişkili olan BDNF gen ifadesinin azalmış olması prediyabetik koşullarda bilişsel fonksiyonların bozulması ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

Kontrol grubu ile metformin uygulanan kontrol grubu karşılaştırıldığında ise ilaç tedavisi uygulanan grupta BDNF gen ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p=0,0423$), bilişsel fonksiyonlarda iyileşme ve kan glukoz seviyesinde gerileme olduğu saptanmıştır. Prediyabetik grup ile metformin uygulanan prediyabetik grubu kıyasladığımızda ise ilaç tedavisi uygulanan grupta BDNF'in ifadesinin bir önceki karşılaştırmaya göre aşırı arttığı saptanmıştır ve bu anlamlıdır ($p=0,0441$). Bu da bize metforminin kontrollere kıyasla hasta gruplarına daha çok etki ettiğini düşündürmektedir.

Yapılan benzer çalışmalarda;

BDNF mRNA'sı, korteks, hipokampus, ventral tegmental alan (VTA), PVH, DMH, VMH, LH, NTS, substantia nigra ve amigdala dahil olmak üzere sıçan beyinde bir çok yerde tespit edilmiştir, ayrıca TrkB'nin de bu bölgelerde ifadesi oldukça yüksektir. (190).

Daha önceki çalışmalarda, ekzojen BDNF uygulanmasında, kemirgenlerde vücut ağırlığının, besin alımının ve enerji harcanmasının düzenlendiği rapor edilmiştir. Intracerebroventricular (i.c.v.) BDNF uygulaması, sıçanlarda besin alımını baskılamakta ve vücut ağırlığını azaltmaktadır (191).

Db/db farelerde, i.c.v. BDNF uygulaması, termojenezi güçlendirir, nörepinefrin döngüsünü indükler ve ayrılmayan protein 1 (Ucp1) ekspresyonunu artırır, bu da sempatik sinir sisteminin aktivasyonu yoluyla oluşan enerji harcamalarında BDNF'in düzenleyici bir rol aldığı anlamına gelmektedir. BDNF ifadesinin artması ayrıca gıda alımını azaltır ve db/db farelerde glukoz dengesini iyileştirir (192).

Periferal BDNF uygulaması, db/db ve DIO farelerde kan şekerini düşürüp insülin seviyesini eski haline getirerek glikoz dengesini iyileştirir (193).

BDNF ve TrkB, nöronal gelişim için hayati derecede önemlidir. Bu yüzden BDNF ya da TrkB-null farelerde ölümlere sebep olmaktadır (194).

BDNF heterozigot farelerde (*Bdnf*^{+/-}), vücut ağırlığında artış, adipoz hücre hipertrofisinden dolayı adiposite (yağlılık, şişmanlık) ve şiddetli hiperfaji görülür. Bu farelerde ayrıca kontrollere kıyasla serumda yüksek leptin ve insülin seviyeleri görülmektedir (195).

Yetişkin fare beyinlerindeki BDNF'in bazı delesyonları (*CaMKII-Cre-Bdnf*^{-/-}) sonucu, obezite, hiperfaji, yüksek kan glukozu ile serumda artmış leptin ve insülin seviyeleri görülmektedir (196).

TrkB reseptörünün ilk kodlanan ekzonunda görülen bir insersiyon sonucunda TrkB'nin ifadesinin normal seviyenin çeyreğine düştüğü saptanmıştır. Bu da yine aynı şekilde, farelerde, vücut ağırlığının artmasına ve hiperfajiye sebep olmaktadır.

Bütün bu çalışmalar enerji dengesinin düzenlenmesinde BDNF/TrkB yolağının önemini göstermektedir (197).

Metforminin AMPK'yı aktive ettiği bilinmektedir ve metforminin AMPK üzerinden BDNF genine etki ettiği düşünülmektedir. Metformin ile BDNF arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılmamış olsa da CREB – AMPK arasındaki ilişkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aslında, CREB bir AMPK substratıdır ve CREB'nin aktivasyonu AMPK tarafından fosforilasyona bağlıdır (198).

AMPK aktivitesinin BDNF gen ifadesini azaltmış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (199,200). Buradaki BDNF ifadesinin *PTP1B* tarafından düzenlenmiş olması muhtemeldir (201).

Sonuç olarak BDNF gen ifadesinin artmasında farklı yolların işlev gördüğü düşünülebilir ve bu yolların aydınlatılması için daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bütün bu verilerden varılacak sonuçlar şöyledir;

- Prediyabet, obezite gibi metabolik hastalıklar bilişsel fonksiyonların bozulmasına yol açabilir,
- Genellikle tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan metformin öğrenme becerilerinin gelişmesine ve bilişsel fonksiyonların iyileşmesine katkı sağlayabilir,
- BDNF gen ifadesinin artması, sinaptik plastisiteyi ve bilişsel fonksiyonların gelişimini sağlarken enerji dengesini de düzenleyerek prediyabet, obezite, tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıkların önlenmesini sağlayabilir.

Yapılan bu çalışmanın, insülin salınımı ile ilişkili metabolik hastalıklarda karşılaşılan bilişsel sorunların patogeneze ışık tutabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bilişsel sorunların patogenezendeki rolünün incelenmiş olması, bu konuda önemli bir boşluğu dolduracak ve yeni çalışmalar için bir temel oluşturacaktır. Toplumumuzda yaygın görülen bir hastalık olan prediyabetin önlenmesi sosyal güvenlik kurumları üzerindeki mali yükü azaltacak, aynı zamanda bireylerin yaşam kalitelerinin arttırarak bu bireylerin topluma kazandırılması bakımından katkı sağlayabilecektir.

Yine ülkemizde ve Dünya’da önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkan prediyabetin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ile buna yönelik yeni ilaç geliştirme hedefleri belirlenebilecektir. Maliyeti yüksek yöntemler yerine prediyabet tedavisinde farklı ilaç yaklaşımlarının ortaya çıkarılması sorunun çözümünde önemli katkı sağlayacaktır.

Yapılan bu çalışmada prediyabette, BDNF, bilişsel fonksiyonlar ve enerji metabolizması arasındaki olası ilişkilerin aydınlatılmış olması daha sonraki çalışmalar için literatüre önemli katkı sağlayacaktır ve tedavi edici yöntemlere ışık tutacaktır.



6.KAYNAKLAR

1. International Diabetes Federation. Diabetes atlas. 5th ed. Bruxelles:IDF Publication; 2011.
2. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N, Karsidag K, Genc S, Telci A, Canbaz B, Turker F, Yilmaz T, Cakir B, Tuomilehto J. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol.* 2013;28:169–180.
3. Wylie-Rosett J. Paradigm shifts in obesity research and treatment:introduction. *Obes. Res.* 2004;2 Suppl:85–87.
4. WHO. Obesity and Overweight. World Health Organization. [Electronic Journal]. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Mart 2016.
5. Flegal, KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2013;309:71–82.
6. Li G, Zhang P, Wang J. The long-term effect of lifestyle interventions to prevent diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: a 20-year follow-up study. *Lancet.* 2008;371:1783–1789.
7. Gray J, Yeo GS, Cox JJ. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes.* 2006;55(12):3366-3371.
8. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K and Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics.* 2007;90(3):397-406.
9. Zhang F, Kang Z, Li W, Xiao Z and Zhou X. Roles of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B (BDNF/TrkB) signalling in Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci.* 2012;19(7):946-949.

10. Jeon SJ, Rhee SY, Seo JE, Bak HR, Lee SH, Ryu JH, Cheong JH, Shin CY, Kim GH, Lee YS and Ko KH. Oroxylin A increases BDNF production by activation of MAPK-CREB pathway in rat primary cortical neuronal culture. *Neurosci Res.* 2011;69(3):214-222.
11. Gomez-Pinilla F, Vaynma S, Ying Z. Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci.* 2008;28:2278–2287.
12. Moutzouri E, Tsimihodimos V, Rizos E, Elisaf M. Prediabetes: To treat or not to treat. *Eur J Pharmacol.* 2011;672:9–19.
13. Aydın Y, Berker D, Güler S. Bozulmuş açlık glukozu, bozulmuş glukoz toleransı ve ateroskleroz. *İç Hastalıkları Dergisi.* 2007;14(2):98-104.
14. Ceyhan K, Altunkaş F. Prediyabet koroner arter hastalığı eşdeğeri olma yolunda. *Arch Turk Soc Cardiol.* 2012;40(5):458-465.
15. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. International Diabetes Federation: A consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabet Med.* 2007;24:451–463.
16. American Diabetes Association (ADA). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care.* 2010;34:11-61.
17. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. [Electronic Journal]. http://www.temd.org.tr/admin/uploads/tbl_gruplar/20180517113926-2018-05-17tbl_gruplar113924.pdf. Mayıs 2018, Ankara.
18. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet.* 2012;379:2279–2293.
19. Mutlu A. Şişman kadınlarda prediyabetes ve prehipertansiyon. 2007, İstanbul Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 50 sayfa, İstanbul, (Doç. Dr. Adil Doğan Azezli).
20. Kural Aydın F. Prediyabetik bireylerde yoğun yaşam tarzı değişimi ile klinik diyabetin önlenmesi: İnflamatuvar belirteçlerin (CRP, ADMA ve Visfatin) prediktif değeri ve önemi. 2009, İstanbul Üniversitesi / Tıp Fakültesi / İç Hastalıkları Anabilim Dalı / Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 140 sayfa, İstanbul, (Prof. Dr. İlhan Satman).
21. Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry R.R, Pratley R. Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance: Implications for Care. *Diabetes Care.* 2007;30:753–759.

22. WHO, International Diabetes Foundation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation. [Electronic Journal]. http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf. Geneva: World Health Organization, Nisan 2006.
23. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2011;34 1 suppl:62–69.
24. Sato A. Indicators of glycemic control—hemoglobin A1c (HbA1c), glycated albumin (GA) and 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG). *Rinsho Byori*. 2014;62(1):45-52.
25. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi Sh, Farhangi A, Allah Verdi A, Mofidian SMA and Lame Rad B. Induction of Diabetes by streptozotocin in Rats. *Indian J Clin Biochem*. 2007;22(2):60-64.
26. Tawfik SH, Haiba MM, Saad MI, Abdelkhalek TM, Hanafi MY, Kamel MA. Intrauterine diabetic milieu instigates dysregulated adipocytokines production in F1 offspring. *J Anim Sci Technol*. 2017;9:59.
27. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Sıklığı Çalışması. [Electronic Journal]. <https://sbu.saglik.gov.tr/ekutuphane/kitaplar/khrfat.pdf>. 2013, Ankara.
28. Karve A, Hayvard RA. Prevalence, diagnosis, and treatment of impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in nondiabetic U.S. adults. *Diabetes Care*. 2010;33;2355-2359.
29. James C, Bullard KM, Rolka DB, Geiss LS, Williams DE, Cowie CC. Implications of alternative definitions of prediabetes for prevalence in U.S. adults. *Diabetes Care*. 2011;34:387-391.
30. CDC. National diabetes statistics report. [Electronic Journal]. <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/statsreport14/national-diabetes-report-web.pdf>. 2014.
31. International Diabetes Federation. [Electronic Journal]. www.idf.org/iddiabetes-atlas-seventh-edition-2015. 2015.
32. Satman I, Yilmaz T, Sengül A. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*. 2002;25:1551-1556.

33. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N, Karsidag K, Genc S, Telci A, Canbaz B, Turker F, Yilmaz T, Cakir B, Tuomilehto J. TURDEP-II Study Group. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol.* 2013;28(2):169-180.
34. Satman İ. Türkiye diyabet, hipertansiyon, obezite ve endokrinolojik hastalıklar prevelans çalışması-II (TURDEP-II). Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği.[ElectronicJournal].http://www.temd.org.tr/admin/uploads/tbl_gruplar/20180517113926-2018-05-17tbl_gruplar113924.pdf. 2011.
35. Lam DW, LeRoith D. The worldwide diabetes epidemic. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19:93-96.
36. Faerch K, Borch-Johnsen K, Holst JJ, Vaag A. Pathophysiology and aetiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance: does it matter for prevention and treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2009;52(9):1714-1723.
37. Abdul-Ghani M, DeFronzo RA, Jayyousi A. Prediabetes and risk of diabetes and associated complications: impaired fasting glucose versus impaired glucose tolerance: does it matter. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016;19:394-399.
38. Alıkaşıfoğlu A, Yordan N. Obezitenin tanımı ve prevalansı. *Katkı Pediatri Dergisi.* 2000;21:475–481.
39. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril.* 2008;90:897-904.
40. World Health Organization. Obesity and Overweight Fact Sheet. [Electronic Journal]. <http://www.who.int/media-centre/factsheets/fs311/en/>. 2013.
41. Strock GA, Cottrell ER, Abang AE, Buschbacher RM, Hannon TS. Childhood obesity: a simple equation with complex variables. *J Long Term Eff Med Implants.* 2005;15(1):15-32.
42. World Health Organization. Childhood Obesity and Overweight. [Electronic Journal]. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/>. 2006.
43. Després JP. Dyslipidemia and obesity. *Bailliere Clin Endoc.* 1994;8:629-660.
44. <https://vucut-kitle-endeksi.hesaplama.net/> Erişim Tarihi: 04.05.2018.
45. Simson EL, Gold RM. The Lee Obesity Index Vindicated. *Physiol Behav.* 1982;29(2):371-376.

46. OECD. Health Statistics Frequently Requested Data. [Electronic Journal]. <http://www.oecd.org/els/health-systems/oecd-health-statistics-2014-frequently-requested-data.htm>. 2014.
47. TÜİK. Türkiye Sağlık Araştırması. [Electronic Journal]. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18854>. 2014.
48. TÜİK. Türkiye Sağlık Araştırması. [Electronic Journal]. www.tuik.gov.tr/PdfGetir.do?id=24573. Sayı: 24573. Mayıs 2017.
49. Bougneres, P. Genetics and obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51 3 suppl:295-303.
50. Clement K, Boutin P, Froguel P. Genetics of obesity. *Am J Pharmacogenomic*. 2002;2(3):177-187.
51. Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic human obesity 9. syndromes. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:409-424. Review.
52. Mutch DM, Clement K. Genetics of human obesity. *Best Pract Res Cl En*. 2006;20(4):647-664.
53. O'Rahilly S. and Farooqi I.S. Genetics of obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(1471):1095–1105.
54. Stutz AM, Morrison CD, Argypoulos G. The Agouti-related protein and its role in energy homeostasis. *Peptides*. 2005;26(10):1771-1781.
55. Wilson BD, Bagnol D, Kaelin CB, Ollmann MM, Gantz I, Watson SJ, Barsh GS. Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology*. 1999;140(5):2387-2397.
56. Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, Fan W, Low MJ, Smart JL, Rubinstein M, Tatro, Marcus IN, Hoistegge H, Lee CE, Cone RD, Elmquist JK. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science*. 2002;297(558 I):609 II.
57. Munzberg H, Jobst EE, Bates SH, Jones J, Villanueva E, Leshan R, Bjornholm M, Elmquist J, Sleeman M, Cowley MA, Myers MG Jr. Appropriate inhibition of orexigenic hypothalamic arcuate nucleus neurons independently of leptin receptor/STAT3 signaling. *J Neurosci*. 2007;27(1):69-74.
58. Tritos NA, Mantzoros CS. Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia*. 1997;40(12):1371-1379.

59. Chung WK, Belfi K, Chua M, Wiley J, Mackintosh R, Nicolson M, Boozer CN, Leibel RL. Heterozygosity for Lep(ob) or Lep(rdb) affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *Am J Physiol.* 1998;274(4):985-990.
60. Stefan N, Vozarova B, Del Parigi A, Ossowski V, Thompson DB, Hanson RL, Ravussin E, Tataranni PA. The Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor in Pima Indians: influence on energy expenditure, physical activity and lipid metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(12):1629-1632.
61. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agoutirelated protein. *Science.* 1997;278(5335):135-138.
62. Krude H, Biebermann H, Luck W, Hom R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* 1998;19(2):155-157.
63. Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, la Fleur SE, Kas MJ, de Krom M. The MC4 receptor and control of appetite. *Br J Pharmacol.* 2006;149(7):815-827.
64. Lubrano-Berthelier C, Cavazos M, Dubem B, Shapiro A, StunffCL, Zhang S, Picart F, Govaerts C, Froguel P, Bougneres P, Clement K, Vaisse C. Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;994:49-57. Review.
65. Brown AM, Mayfield DK, Volaufova J, Argyropoulos G. The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein. *Gene.* 2001;277(12):231-238.
66. Lu XV, Nicholson JR, Akil H, Watson SJ. Time course of short-term and long-term orexigenic effects of Agouti-related protein (86-132). *Neuroreport.* 2001;12(6):1281-1284.
67. Argyropoulos G, Rankinen T, Neufeld DR, Rice T, Province MA, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. A polymorphism in the human agouti-related protein is associated with late-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(9):4198-4202.
68. LeRoith D, Taylor SL and Olefsky JM. *Diabetes Mellitus A Fundamental and Clinical Text* (3rd Ed.) Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2004.
69. Yano H, Chao MV. Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv.* 2000;74:253-260.

70. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1473):1545-1564.
71. Vega JA, Suarez OG, Hannestad J, Perez MP, Germana A. Neurotrophins and the immune system. *J Anat.* 2003;203:1-19.
72. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(4):299-309.
73. Patapoutian A and Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(3):272-280.
74. Longo FM, Massa SM. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:507-525.
75. Hallböök F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9:616-621.
76. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1(5):549-553.
77. Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science.* 1990 b; 247(4949):1446-1451.
78. Bartkowska K, Turlejski K, Djavadian RL. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp.* 2010;70:454-467.
79. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A. Regional distribution of brain derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 1990;9:2459-2464.
80. Tang S, Machaalanı R, Waters KA. Immunolocalization of pro-and mature-brain derived neurotrophic factor (BDNF) and receptor TrkB in the human brainstem and hippocampus. *Brain Res.* 2010;1354:1-14.
81. Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P. The brain-derived neurotrophic secretion of wild-type BDNF In neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci.* 2002;24:4401–4411.
82. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG and Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 2001;276(16):12660-12666.

83. Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem.* 2003;10(2):86-98.
84. Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, White PS, Yamashiro DJ, Nycum LM, Biegel JA and Brodeur GM. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics.* 1995;25(2):538-546.
85. Stoilov P, Castren E and Stamm S. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(3):1054-1065.
86. Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, Light JE, Kolla V and Evans AE. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15(10):3244-3250.
87. Cunha C, Brambilla R and Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory. *Front Mol Neurosci.* 2010;3:1.
88. Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R and Korte M. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron.* 2002;36(1):121-137.
89. Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Lume M, Matsumoto T, Hara T, Yamawaki S, Takahashi M, Shiosaka S, Itami C, Uegaki K, Saarma M and Kojima M. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(23):3067-3074.
90. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A and Hempstead BL. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* 2005;25(22):5455-5463.
91. Anita EA and Monteggia LM. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacol Rev.* 2012;64:238–258.
92. Jeon SJ, Rhee SY, Seo JE, Bak HR, Lee SH, Ryu JH, Cheong JH, Shin CY, Kim GH, Lee YS and Ko KH. Oroxylin A increases BDNF production by activation of MAPK-CREB pathway in rat primary cortical neuronal culture. *Neurosci Res.* 2011;69(3):214-222.

93. Woo NH, Lu B. BDNF in Synaptic Plasticity and Memory. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA by Elsevier Ltd. pp: 135-143. [Electronic Journal]. <http://pdf.document3.com/bdnf-in-synaptic-plasticity-and-memory-the-university-of-south-download-w1253/>. 2009.
94. McAllister AK, Lo DC, Katz LC. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*. 1995;15:791-803.
95. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2001;63:71-124.
96. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation. *J Exp Med*. 1999;189(5):865-870.
97. Matthews VB, Astrom MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerström T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA. Brain derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP activated protein kinase. *Diabetologia*. 2009;52:1409-1418.
98. Suzuki S, Kiyosue K, Hazama S, Ogura A, Kashiwara M, Hara T, Koshimizu H, Kojima M. Brain-derived neurotrophic Factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J Neurosci*. 2007;27(24):6417-6427.
99. Chaldakov GN, Tonchev AB, Manni L. Comment on: Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50:431-438.
100. Locke AE, Kahali B. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015;518(7538): 197-206.
101. Coll AP and Yeo GS. The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(6):970-976.
102. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ and Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-671.

103. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD and Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(6836):480-484.
104. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M and Elmquist JK. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*. 1998;402(4):442-459.
105. Konturek PC, Konturek JW, Czesnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sito E and Konturek SJ. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *J Physiol Pharmacol*. 2005;56 6 Suppl:5-25.
106. Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS and Saper CB. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(2):741-746.
107. De Jonghe BC, Hayes MR and Bence KK. Melanocortin control of energy balance: evidence from rodent models. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(15):2569-2588.
108. Skibicka KP and Grill HJ. Hypothalamic and hindbrain melanocortin receptors contribute to the feeding, thermogenic, and cardiovascular action of melanocortins. *Endocrinology*. 2009;150(12):5351-5361.
109. Zheng H, Patterson LM, Rhodes CJ, Louis GW, Skibicka KP, Grill HJ, Myers MG Jr and Berthoud HR. A potential role for hypothalamomedullary POMC projections in leptin-induced suppression of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(3):720-728.
110. Williams DL, Kaplan JM and Grill HJ. The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation. *Endocrinology*. 2000;141(4):1332-1337.
111. Bozkurt E. Metforminin kolon kanseri hücre hattında tek başına, 5-florourasil ve oksaliptatin ile kombinasyonunun etkilerinin araştırılması. 2016, Abant İzzet Baysal Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, 90 sayfa, Bolu, (Prof. Dr. Özge Uzun ; Yrd. Doç. Dr. Recep Bayram).
112. Cantó C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(20):3407-3423.

113. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007;100(3):328-341.
114. Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2007;449:496–500.
115. Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J.* 2007;403(1):139-148.
116. Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J.* 2003;375(1):1-16.
117. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1996;271:27879–27887.
118. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, Hardie DG. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2003;2:8-14.
119. Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, Green KA, Grahame Hardie D, Ashworth A, Alessi DR. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *Embo J.* 2005;24:1810–1820.
120. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* 2005;310:1642–1646.
121. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2005;2:21–33.
122. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2005;2:9–19.

123. Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci-Landmark*. 2009;14:3380-3400.
124. Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*. 1999;48:1667–1671.
125. Cheng AY, Fantus IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*. 2005; 172(2):213-26.
126. Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homoeostasis. *Biochem J*. 2003;375(1):1-16.
127. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase- development of the energy sensor concept. *J.Physiol*. 2006;574:7-15.
128. Viollet B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, Giri S, Andreelli F. AMPK inhibition in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010;45(4):276-295.
129. Tortora GJ, Derrickson B, Sensory, Motor, and Integrative Systems, Roesch B (ed.). *Principles of Anatomy and Physiology*, United State of America: John Wiley & Sons Inc, 2009: p. 589.
130. Sembulingam K, Sembulingam P. *Higher Intellectual Functions, Essentials of Medical Physiology*, India: Jaypee Brothers medical Publishers(P) LTD, 2012: p. 938.
131. Siverthorn DU, *The Central Nervous System*, Volker KK. *Human Physiology An Integrated Approach*, Pearson education Inc, 2012: p. 315.
132. Guyton AC, Hall JE. *Medical Physiology*. Tıbbi Fizyoloji, 1.baskı, Çavusoglu H, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001:673–686.
133. Squire L, Berg D, Bloom F, Lac, SD, Ghosh A, Spitzer N. *Learning and Memory: Basic Mechanism*, Squire L, *Fundemental Neuroscience*, Acedemic Press (AP), 2008: p. 1133.
134. Ganong WF. *Medical Physiology*. Tıbbi Fizyoloji, 1. baskı, Türk Fizyolojik Bilimler Dernegi, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:259–263.
135. Rains GD, *Memory Systems, Principles of Human Neuropsychology*, McGraw-Hill Higher Education, 2012: p 257.

136. Eyuboğlu Dinç S. Dişi Sıçanlarda Kisspeptin Ve Aromataz İnhibisyonunun Kognitif Fonksiyonlar Ve Davranış Üzerine Etkileri. 2013, Karadeniz Teknik Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, 70 sayfa, Trabzon, (Doç. Dr. Sinan Canpolat).
137. Paul CM, Magda G and Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. Behav Brain Res. 2009;203:151-164.
138. Yıldırım BD. Davranış Bilimlerine Giriş. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 1998; 83–153.
139. Anderson JR. Learning and memory: An integrated approach, New York: John Wiley & Sons, 2000.
140. Nyberg L, Persson J, Habib R, Tulving E, McIntosh AR, Cabeza R and Houle S. Large scale neurocognitive networks underlying episodic memory. J Cognit Neurosci. 2000;12:163-173.
141. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. Neuron. 2002;35:625-641.
142. Hayes SM, Ryan L, Schnyer DM and Nadel L. An fMRI study of episodic memory: Retrieval of object, spatial, and temporal information. Behav Neurosci. 2004;118:885-896.
143. Vorhees CV, Williams MT. Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents. ILAR J. 2014;55(2):310-332.
144. Kessels RPC, de Haan EHF, Kappelle LJ and Postma A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. Brain Res Rev. 2001;35:295-303.
145. Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. Life Sci. 2010;23:87(17-18) 521-536.
146. Morris RGM. Spatial localisation does not depend on the presence of local cues. Learning Motivation. 1981;12:239-260.
147. Morris RGM. An attempt to dissociate 'spatial mapping' and 'workingmemory' theories of hippocampal function, In W. Siefert (Ed.) Molecular, Cellular and Behavioural Neurobiology of the Hippocampus, London: Academic Press, 1983:405-432.

148. Cassel JC, Cassel S, Galani R, Kelche C, Will B and Jarrard L. Fimbria- Fornix vs Selective Hippocampal Lesions in Rats: Effects on Locomotor Activity and Spatial Learning and Memory. *Neurobiol Learn Mem.* 1998;69:22-45.
149. Ingram DK. Analysis of age-related impairments in learning and memory in rodent models. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;444:312-331.
150. Gallagher M, Pelleymounter MA. Spatial learning deficits in old rats: a model for memory decline in the aged. *Neurobiol Aging.* 1988;5(6):549-556.
151. Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH and Lohman AHM. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev.* 1990;70:453-511.
152. Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi, Ankara, ODTÜ yayıncılık, 1998:226-229.
153. Duvernoy HM. The human hippocampus: an atlas of applied anatomy, 3rd Edition. New York: Springer Verlag, 2005.
154. Williams PL (Ed.). Gray's Anatomy, 38th Edition. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Tokyo, Madrid, Melbourne: 1995.
155. Aaron M, White PhD. What happened? Alcohol, Memory Blackouts, and the Brain. *Alcohol Research & Health.* 2003;27:2.
156. Brodal A. Neurological Anatomy, 3rd ed. Oxford University Press, 1981.
157. Jensen O. and John E. Hippocampal sequence-encoding driven by a cortical multiitem working memory buffer. *Trends Neurosci.* 2005;28:2.
158. Müller U. Learning in honeybees: from molecules to behaviour. *Zoology.* 2002;105:313-320.
159. Paxinos G. The Rat Nervous System, 4th Edition, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 2015.
160. Williams PL (Ed.). Gray's Anatomy, 40th Edition, New York, 2008.
161. Barry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous System. In: Williams PL, editor. Gray's Anatomy, 38th Edition. London: Churchill Livingstone, 1121 -5, 1995.
162. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 2001;108: 1167–1174.

163. Li G, Zhang P, Wang J, Gregg EW, Yang W, Gong Q, Li H, Jiang Y, An Y, Shuai Y, Zhang B, Zhang J, Thompson TJ, Gerzoff RB, Roglic G, Hu Y, Bennett PH. The long-term effect of lifestyle interventions to prevent diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: a 20-year follow-up study. *Lancet*. 2008;371:1783–1789.
164. Ramachandran A, Snehalatha C, Mary S, Mukesh B, Bhaskar AD, Vijay V. The Indian Diabetes Prevention Programme shows that lifestyle modification and metformin prevent type 2 diabetes in Asian Indian subjects with impaired glucose tolerance (IDPP-1). *Diabetologia*. 2006;49:289–297.
165. Wenying Y, Lixiang L, Jinwu C, Zhiqing Y, Haicheng P, Guofeng H, Zaojun Y, Fan W, Guangwei L, Xiaoren P. The Chinese Diabetes Prevention Trial: preventive effect of metformin on the progression to diabetes mellitus in the IGT population: a 3-year multicenter prospective study. *Chin. J. Endocrinol. Metab.* 2001;17:131–136.
166. Lilly M, Godwin M. Treating prediabetes with metformin: systematic review and meta-analysis. *Can. Fam. Physician*. 2009;55:363–369.
167. Lehtovirta M, Forsen B, Gullstrom M, Hagglom M, Eriksson JG, Taskinen MR, Groop L. Metabolic effects of metformin in patients with impaired glucose tolerance. *Diabet. Med.* 2001;18:578–583.
168. Morel Y, Golay A, Perneger T, Lehmann T, Vadas L, Pasik C, Reaven GM. Metformin treatment leads to an increase in basal, but not insulin-stimulated, glucose disposal in obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabet. Med.* 1999;16:650–655.
169. Scheen AJ, Letiexhe MR, Lefebvre PJ. Effects of metformin in obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Metab. Rev.* 1995a;11 1 Suppl:69–80.
170. Scheen AJ, Letiexhe MR, Lefebvre PJ. Short administration of metformin improves insulin sensitivity in android obese subjects with impaired glucose tolerance. *Diabet. Med.* 1995b;12:985–989.
171. Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81:4059–4067.

172. Lachin JM, Christophi CA, Edelstein SL, Ehrmann DA, Hamman RF, Kahn SE, Knowler WC, Nathan DM. Factors associated with diabetes onset during metformin versus placebo therapy in the diabetes prevention program. *Diabetes*. 2007;56:1153–1159.
173. Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscl Throm Vas*. 2006;26:611–617.
174. Yaffe K, Blackwell T, Kanaya AM, Davidowitz N, Barrett-Connor E, Krueger K. Diabetes, impaired fasting glucose, and development of cognitive impairment in older women. *Neurology*. 2004;63:658–663.
175. Selvin E, Bolen S, Yeh HC. Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review. *Arch Intern Med*. 2008;168:2070–2080.
176. Strachan MWJ, Deary IJ, Ewing FME, Frier BM. Is type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus associated with an increased risk of cognitive dysfunction. *Diabetes Care*. 1997;20:438–445.
177. Gold SM, Dziobek I, Sweat V. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50:711–719.
178. Zhao RR, Xu XC, Xu F, Zhang WL, Zhang WL, Liu LM. Metformin protects against seizures, learning and memory impairments and oxidative damage induced by pentylenetetrazole-induced kindling in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448:414–417.
179. Alzoubi KH, Khabour OF, Al-Azzam SI, Tashtoush MH, Mhaidat NM. Metformin eased cognitive impairment induced by chronic L-methionine administration: potential role of oxidative stress. *Curr Neuropharmacol*. 2014;12:186–192.
180. Allard JS, Perez EJ, Fukui K, Carpenter P, Ingram DK, Cabo R. Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*. 2015;301:1–9.
181. Ashroostaghi Z, Ganji F, Sepehri H. Effect of metformin on the spatial memory in aged rats. *Nat J Phys Pharm Pharmacol*. 2015;5(5):416–421.

182. Chen F, Dong RR, Zhong KL, Ghosh A, Tang SS, Long Y. Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid-beta across the blood-brain barrier and memory impairment in db/ db mice. *Neuropharmacology*. 2016;101:123–136.
183. McNeilly AD, Williamson R, Balfour DJK, Stewart CA, Sutherland C. A high-fat-diet-induced cognitive deficit in rats that is not prevented by improving insulin sensitivity with metformin. *Diabetologia*. 2012;55:3061–3070.
184. Allard JS, Perez EJ, Fukui K, Carpenter P, Ingram DK, Cabo R. Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice. *Behav Brain res*. 2015;301:1–9.
185. Ng TP, Feng L, Yap KB, Lee TS, Tan CH, Winblad B. Longterm metformin usage and cognitive function among older adults with diabetes. *J Alzheimers Dis*. 2016;41:61–68.
186. Guo M, Mi Y, Jiang QM, Xu JM, Tang YY, Tian G. Metformin may produce antidepressant effects through improvement of cognitive function among depressed patients with diabetes mellitus. *Clin Exp Pharm Phys*. 2014;41:650–656.
187. Herath PM, Cherbuin N, Eramudugolla R, Anstey KJ. The Effect of Diabetes Medication on Cognitive Function: Evidence from the PATH Through Life Study. *BioMed Res. Int*. 2016; Article ID 7208429, doi.org/10.1155/2016/7208429.
188. Moore EM, Mander AG, Ames D, Kotowicz MA, Carne RP, Brodaty H. Increased risk of cognitive impairment in patients with diabetes is associated with metformin. *Diabetes Care*. 2013;36:2981–2987.
189. Khattar D, Khaliq F, Vaney N, Madhu SV. Is metformin-induced vitamin B12 deficiency responsible for cognitive decline in type 2 diabetes. *Indian J Psychol med*. 2016;38:285–290.
190. Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L and Welcher AA. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*. 1997;78(2):431–448.
191. Pelleymounter MA, Cullen MJ and Wellman CL. Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp Neurol*. 1995;131(2):229–238.

192. Nonomura T, Tsuchida A, Ono-Kishino M, Nakagawa T, Taiji M and Noguchi H. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy expenditure through the central nervous system in obese diabetic mice. *Int J Exp Diabetes Res*. 2001;2(3):201-209.
193. Nakagawa T, Ogawa Y, Ebihara K, Yamanaka M, Tsuchida A, Taiji M, Noguchi H and Nakao K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent models of leptin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(5):557-565.
194. Ernfors P, Lee KF and Jaenisch R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*. 1994;368(6467): 147-150.
195. Kernie SG, Liebl DJ and Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J*. 2000;19(6):1290-1300.
196. Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM and Jaenisch R. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*. 2001;15(10):1748-1757.
197. Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH and Reichardt LF. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci*. 2003;6(7):736-742.
198. Mair W, Morantte I, Rodrigues AP, Manning G, Montminy M, Shaw RJ. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB. *Nature*. 2011;470:404–408.
199. Ghadernezhad N, Khalaj L, Pazoki-Toroudi H, Mirmasoumi M. & Ashabi G. Metformin pretreatment enhanced learning and memory in cerebral forebrain ischaemia: the role of the AMPK/BDNF/P70SK signalling pathway. *Pharm Biol*. 2016;54(10):2211–2219.
200. Huang W, Cao J, Liu X, Meng F, Li M, Chen B, Zhang J. AMPK Plays a Dual Role in Regulation of CREB/BDNF Pathway in Mouse Primary Hippocampal Cells. *J Mol Neurosci*. DOI 10.1007/s12031-015-0500-2.
201. Ozek C, Kanoski SE, Zhang ZY, Grill HJ and Bence KK. Protein-tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) is a Novel Regulator of Central Brain-derived Neurotrophic Factor and Tropomyosin Receptor Kinase B (TrkB) Signaling. *J Biol Chem*. 2014;289(46):31682–31692.



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
UNIVERSITY OF GAZİANTEP
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
LOCAL ETHICS COMMITTEE OF ANIMAL EXPERIMENTS
ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI
RESEARCH APPLICATION CONSENT



TOPLANTI TARİHİ (Meeting Date)	TOPLANTI SAYISI (Meeting No)	TOPLANTI YERİ (Meeting Place)
07.06.2017	6	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ Application Information	Araştırmanın Başlığı Research Title	Prediyabetik hayvan modelinde metformin tedavisinin BDNF gen ifadesi ve bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkisi
	Başvuru Tarihi Application Date	31.05.2017
	Protokol no Protocol no	35

KARAR BİLGİLERİ Decision	Karar No: 2017/19 Decision No: 2017/19
	☒ Kabul (Accepted) ☐ Red (Not Accepted) Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI'nın yürütücüsü olduğu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, başvurunun "uygun" olduğuna toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

Yürütücü Coordinator	Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
-------------------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU YÖNERGESİ

Ünvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	İlişki	Katılım	İmza
Prof. Dr. A. Tuncay Demiryürek (Başkan)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	H	E	
Yrd. Doç. Dr. Davut Sinan Kaplan (Başkan Yardımcısı)	GAÜN Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Behçet Al (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Acil Tıp AD.	H	H	KATILMADI
Doç. Dr. İbrahim Halil Kılıç (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat F. Biyoloji	H	H	KATILMADI
Doç. Dr. Mehmet Kahraman (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat F. Kimya	H	E	
Yrd. Doç. Dr. Ebru Deniz Karslı (Üye)	GAÜN Diş Hekimliği F. Çene Cerrahisi AD.	H	E	
Yrd. Doç. Dr. Berna Kaya Uğur (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon AD.	H	H	KATILMADI
Öğr. Gör. Ahmet Sarper Bozkurt (Üye)	GAÜN Teknik Bilimler MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim	H	E	
Veteriner Hekim Celal Özsoyler (Üye)	Gaziantep Büyükşehir Belediyesi Hayvanat Bahçesi	H	E	
Tekniker Ahmet Özkul (Üye)	Serbest, Dernek Üyesi	H	E	

E: Evet, H: Hayır

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep merkezde tamamladı. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik bölümü’nde lisans eğitime başladı. 2015 yılında buradan mezun oldu. 2015 Güz döneminde Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı.

