



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Doktora Tezi

**STZ ile UYARILMIŞ DİYABETİK SIÇANLARDA HİPOKAMPÜS ve
ÖĞRENME ÜZERİNE KROKİNİN ETKİLERİ**

Neslihan AKARSU

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kadriye AĞÜN DAR**

Nisan, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 28.04.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Kadriye AKGÜN DAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Gülay ÜZÜM
İstanbul Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Canan HÜRDAĞ
Bilim Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Zülal KAPTAN
Beykent Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Elif İlkay ARMUTAK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veterinerlik Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 26610 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın hazırlanmasında, kıymetli bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda bana yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen sevgili danışman hocam Prof. Dr. Kadriye AKGÜN-DAR' a,

Tezimin tamamlanması sürecinde, her türlü yardım ve desteğini gördüğüm, özellikle laboratuvar çalışmalarımda ihtiyacım olduğunda her zaman yanımda olan sevgili hocam Araş. Gör. Dr. Ayşegül KAPUCU'ya,

Lisans ve lisansüstü öğrenimim süresince, değerli bilgileriyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen kıymetli hocalarım, Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL'e, Prof. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Aslı KANDİL'e,

Çalışmalarımın deneysel kısımlarında en zorda kaldığım zamanlarda yanımda olan Biyolog Gözdenur GÜNEŞ'e, tezimin teslim sürecinde desteğini gördüğüm Biyolog Dr. Deniz EROL KUTUCU'ya,

Doktora eğitimim sürecinde bana destek olan, ilgisini benden hiçbir zaman esirgemeyen en değerli varlığım sevgili eşim İhsan AKARSU'ya ve tez yazma sürecinde kucağıma aldığım hayatımın en değerli varlığı olan canım oğlum Çınar AKARSU'ya,

Son olarak tüm hayatım boyunca bana her anımda destek olan, üniversite eğitimim sırasında tüm ihtiyaçlarımı karşılayan, karşıma çıkan olumsuzluklarda beni motive eden, tez yazma sürecimde oğlum Çınar'la ilgilenerek bana vakit yaratan canım babam Burhan FERAH, canım annem Fikret FERAH ve sevgili ablam Esra FERAH' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Nisan 2021

Neslihan AKARSU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. DİYABETİN TANIMI, TİPLERİ, METABOLİZMA VE BEYİN ÜZERİNE ETKİLERİ	3
2.2. DİYABETİN OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SİSTEM İLE İLİŞKİSİ	7
2.2.1. Enzim yapıda olan antioksidanlar	10
2.2.1.1. Süperoksid Dismutaz	10
2.2.1.2. Katalaz	10
2.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz	11
2.3. HİPOKAMPÜS	11
2.4. ÖĞRENME VE HAFIZA OLUŞUMU	12
2.5. ÖĞRENME VE HAFIZA OLUŞUMDA ETKİLİ MOLEKÜLLER	16
2.6. SAFRAN VE BİLEŞENLERİNİN FİZYOLOJİK ETKİLERİ	17
3. MALZEME VE YÖNTEM	23
3.1. DENEY HAYVANLARI	23
3.2. DENEYSEL UYGULAMALAR	23
3.3 PASİF SAKINMA TESTİ	25
3.4 DENEYLERİN SONLANDIRILMASI	26
3.5 HİSTOLOJİK ÇALIŞMALAR	27
3.5.1 Nissl Boyama	27
3.6 İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR	28
3.7 BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR	29
3.7.1 Doku Homojenizasyonu ve Fraksiyonların Ayrılması	29

3.7.2 Hipokampüs ve Plazma Örneklerinde İnsülin, SOD, BDNF, sitokrom-c, TNF- α ve NeuN Düzeylerinin Belirlenmesi.....	29
İÇİNDEKİLER	
3.8 VERİLERİN ANALİZİ VE İSTATİSTİKLERİ.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. KAN GLİKOZ DEĞERLERİ	31
4.3 HAYVANLARIN AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİ.....	32
4.4 PASİF SAKINMA TESTİ SONUÇLARI	33
4.4 BİYOKİMYASAL BULGULAR	34
4.4.1 Hipokampüs Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde İnsülin Düzeyleri.....	34
4.4.2 Hipokampüs Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde BDNF Düzeyleri	35
4.4.3 Hipokampüs Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde SOD Düzeyleri.....	36
4.4.4 Hipokampüs Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde TNF- α Düzeyleri.....	37
4.4.5 Hipokampüs Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde Sitokrom-c Düzeyleri	38
4.4.6 Hipokampüs Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde NeuN Düzeyleri	39
4.5 İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	40
4.5.1 Hipokampüs Dokusunun CA1 Bölgesinde NeuN Anlatımı	40
4.5.2 Hipokampüs Dokusunun CA3 Bölgesinde NeuN Anlatımı	41
4.5.3 Hipokampüs Dokusunun DG Bölgesinde NeuN Anlatımı.....	42
4.6 HİSTOLOJİK BULGULAR	43
4.6.1 Hipokampüs Dokusunun CA1 Bölgesinde Nissl Boyama	44
4.6.2 Hipokampüs Dokusunun CA3 Bölgesinde Nissl Boyama	45
4.6.3 Hipokampüs Dokusunun DG Bölgesinde Nissl Boyama	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
KAYNAKLAR.....	66
EKLER	85
EK 1. Etik Kurul Karar Metni	85
ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Normal, Tip 1 ve Tip 2 Diyabet bireylerde glikozun hücre içine alınması (Satman ve diğ., 2011).....	4
Şekil 2.2: Oksidatif denge (Özcan ve diğ., 2015).	7
Şekil 2.3: Hipokampus bölümleri.	12
Şekil 2.4: Bellek çeşitleri	14
Şekil 2.5: Süreçlerine ve zihinde kalma sürelerine göre hafıza çeşitleri.	15
Şekil 2.6: Safranin farmakokinetik etkileri (Hosseini ve diğ., 2018).....	18
Şekil 2.7: Safranin fizyolojik etkileri (Razavi ve Hosseinzadeh, 2017)	20
Şekil 3.1: Deney hayvanlarının barındırılması ve bakımana ait fotoğraf.....	23
Şekil 3.2: Deney prosedürü şeması.	24
Şekil 3.3: Pasif Sakınma Testi.....	25
Şekil 3.4: Total Beyin	27
Şekil 4.1: Grupların 1., 4., 15. ve 25. günlerdeki glikoz değerleri ile glikoz değerlerinin 4. ile 25. ve 15. ile 25. günlerdeki gruplar arası karşılaştırılması. a kontrol grubuna göre anlamlılık ^a $p<0,001$, b diyabet grubuna göre anlamlılık ^b $p<0,05$, 4. Ve 25. Günler arasındaki anlamlılık ^δ $p<0,05$	32
Şekil 4.2: Gruplar arası ağırlık yüzde değişimi grafiği. A kontrol grubuna göre anlamlılık ^a $p<0,001$, b diyabet grubuna göre anlamlılık ^b $p<0,05$	33
Şekil 4.3: Tüm grupların kısa süreli ve uzun süreli hafıza testi sonuçları.....	34
Şekil 4.4: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu insülin düzeyleri. * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($*p<0,05$, $***p<0,001$).....	35
Şekil 4.5: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu BDNF düzeyleri.	36
Şekil 4.6: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu SOD düzeyleri. * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($**p<0,01$).....	37
Şekil 4.7: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu TNF- α düzeyleri. * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($*p<0,05$, $^{++}p<0,01$).....	38

Şekil 4.8: Gruplara ait plazma ve hipokampüs dokusu sitokrom-c düzeyleri * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($*p<0,05$).....	39
Şekil 4.9: Gruplara ait plazma ve hipokampüs dokusu NeuN düzeyleri.* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($*p<0,05$).....	40
Şekil 4.10: Hipokampüs dokusunun CA1 bölgesinde NeuN anlatımı (Bar:50 μ m) ve H-Skor değerleri. * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($**p<0,01$, $***p<0,001$), + Diyabet grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($^+p<0,05$).....	41
Şekil 4.11: Hipokampüs dokusunun CA3 bölgesinde NeuN anlatımı (Bar:50 μ m) ve H-Skor değerleri.* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($*p<0,05$).....	42
Şekil 4.12: Hipokampüs dokusunun DG bölgesinde NeuN anlatımı (Bar:50 μ m) ve H-Skor değerleri.	43
Şekil 4.13: Hipokampüs dokusunun CA1 bölgesinde nissl boyama (Bar:50 μ m) ve dejenere hücre yüzdesi, * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($**p<0,01$, $***p<0,001$), + Diyabet grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($^{++}p<0,01$)	45
Şekil 4.14: Hipokampüs dokusunun CA3 bölgesinde nissl boyama (Bar:50 μ m) ve dejenere hücre yüzdesi, * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($***p<0,001$)	46
Şekil 4.15: Hipokampüs dokusunun DG bölgesinde nissl boyama (Bar:50 μ m) ve dejenere hücre yüzdesi.* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($***p<0,001$)	47

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Diyabet komplikasyonları.	5
Tablo 2.2: Eksojen antioksidanlar ve etki mekanizmalarına örnekler.....	10
Tablo 2.3: Öğrenme kuramları.	13



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
°C	: Santigrat
μ	: Mikro
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
dl	: Desilitre
g	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Litre
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
M	: Molar
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

AEC	:3-Amino 9-etil karbozol
ALT	:Alanin aminotransferaz
AMPK/ACC	:Asetil-CoA karboksilaz
Apaf-1	:Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
AST	:Aspartat aminotransferaz
ATP	:Adenozin tri fosfat
BDNF	:Beyin kökenli nörotrofik faktör
CaMKII	:Kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz-2
CAT	:Katalaz
CREB	:cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein
DG	:Dentat girus

DM	:Diabetes mellitus
DN	:Diyabetik nefropati
DNA	:Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	:Dünya sağlık örgütü
EDTA	:Etilen diamin tetraasetik asit
ELISA	:Enzim bağlı immunsorbent deneyi
E-LTP	:Erken uzun süreli potansiyel artışı
FTS	:Fizyolojik tuzlu su
GLUT-4	:Glikoz taşıyıcı tip-4
GSH	:Glutasyon
GSH-PX	:Glutasyon peroksidaz
H₂O₂	:Hidrojen peroksit
HCl	:Hidroklorik asit
HRP	:Yabanturbu peroksidaz
H-Skor	:Histolojik skor
i.p.	:İntraperitoneal
i.v.	:İntravenöz
IHC	:İmmunohistokimyasal
IL-1β	:İnterlökin 1-beta
IL-6	:İnterlökin-6
iNOS	:Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
IR	:İnsülin reseptörü
LDL	:Düşük yoğunluklu lipoprotein
L-LTP	:Geç uzun süreli potansiyel artışı
LTP	:Uzun süreli potansiyel artışı
MAP-2	:Mitojen aktive eden protein kinaz-2
MNU	:Metil nitroz üre
mRNA	:Mesajcı ribonükleik asit
MSS	:Merkezi sinir sistemi
NADH	:Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	:Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NeuN	:Nöronal nükleer antijen
NMDA	:N-metil D-aspartat reseptörü
NO	:Nitrik oksit

PBS	:Fosfatlı tuzlu su
PI3K/Akt	:Fosfoinositidil-3-kinaz/Akt sağ kalım yolağı
PKC	:Protein kinaz C
PTZ	:Pentilenetetrazol
ROT	:Reaktif oksijen türleri
SOD	:Süper oksit dismutaz
STZ	:Streptozotosin
TBARS	:Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
TNF-α	:Tümör nekrozis faktör-alfa
VGF	:Sinir büyüme faktörü



ÖZET

DOKTORA TEZİ

STZ ile UYARILMIŞ DİYABETİK SIÇANLARDA HİPOKAMPÜS ve ÖĞRENME ÜZERİNE KROKİNİN ETKİLERİ

Neslihan AKARSU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Kadriye AKGÜN DAR

Diyabette kronik hiperglisemi nörolojik komplikasyonlara yol açmaktadır. Diyabetik hastalarda bilişsel bozuklukların olduğu ve antihiperglisemik ilaçların hafıza sorunları üzerine olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir. Safran ve bileşenlerinden olan krokinin antioksidan, antiinflamatuvar, hafıza ve öğrenme geliştirici, Antidiyabetik etkilerinin olduğu bildirilmektedir. STZ ile uyarılan diyabette bilişsel bozukluklar, hipokampüse bağlı davranışsal görevler, uzamsal hafızada bozulmalar oluşmaktadır. Krokinin diyabetle ilişkili hafıza bozukluklarında oksidatif stresi azaltarak bilişsel işlevleri geliştirdiği bildirilmektedir.

Çalışmamızda STZ ile oluşturulan diyabet modelinde krokin uygulamasının olası hafıza bozuklukları üzerine olan etkilerini ve hipokampüsün ilgili kısımlarını nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık.

Yetişkin 44 adet erkek Wistar albino sıçanlar; Kontrol (%0.9 FTS), Diyabet (tek doz 65 mg/kg STZ), Krokin (50 mg/kg), Tedavi (tek doz 65 mg/kg STZ, 50 mg/kg krokin) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Düzenli olarak hayvanların kan glikoz düzeyleri ve ağırlıkları ölçüldü. STZ enjeksiyonunun 4. gününden itibaren 21 gün boyunca madde uygulamaları yapıldı. Diyabette oluşan kısa ile uzun süreli hafıza değişikliklerini belirlemek için pasif sakınma testi yapılarak sonrasında deney sonlandırıldı. Biyokimyasal çalışmalarda 7; histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalarda 4 hayvanın hipokampüsü kullanıldı. Hipokampüs ve kan örneklerinde süper oksit dismutaz (SOD), insülin düzeyi, öğrenme ve hafıza için beyin türevli

nörotrofik faktör (BDNF), nöronal nüklear antijen (NeuN), inflamatuvar süreçlerde önemli olan tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), apoptotik yolakla ilgili olarak sitokrom-c düzeyi biyokimyasal yöntemle ölçüldü. Histolojik olarak hipokampus dokusu Nissl boyama yöntemiyle incelendi ve immunohistokimyasal olarak NeuN anlatımı incelenerek H-Skor yöntemiyle gruplar arası dağılımları hipokampusün alt bölümleri olan CA1, CA3 ve dentat girus (DG) için belirlendi.

Çalışmamızda diyabetik sıçanlara yirmi bir gün süresince krokin (50 mg/kg) uygulaması sonucunda 15. gün ve 25. günde ölçülen glikoz değerlerinin, diyabetik hayvanların glikoz değerlerine göre anlamlı olarak azalmış olması krokinin hipoglisemik etkilerini desteklemektedir. Deney sonunda, hayvanların ağırlıkları kontrol ve krokin gruplarında artarken; diyabet ve tedavi gruplarında diyabete bağlı olarak azalmıştır. 21 gün süren krokin uygulamasıyla diyabetik hayvanlarda kilo kaybının diyabet grubuna göre daha az olduğu belirlenmiştir. Pasif sakınma testi sonuçlarımızda 21 gün süreyle 50 mg/kg uygulanan krokin latans sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa yol açmıştır ancak bu durum kısa ve uzun süreli hafıza üzerine anlamlı etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Diyabet ve tedavi gruplarında plazma insülin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgu STZ ile tip 1 diyabet modeli oluşturduğumuzu doğrulamaktadır. Bunun yanı sıra biyokimyasal bulgularımızda BDNF ve NeuN düzeyleri plazma ve hipokampus dokusunda bir farklılık göstermemiştir. Öğrenmede etkili olan bu moleküllerin translasyonunun etkilenmesi için daha uzun süre gerekmektedir. Çalışmamızda diyabetin 25 gün sürmesinden dolayı hipokampus insülin, BDNF ve NeuN düzeylerinin etkilenmediğini düşündürmektedir.

Hipokampus doku homojenatı örneklerinde sadece krokin grubunda SOD düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Diyabetik sıçanlara 50 mg/kg krokin uygulamasının hipokampus homojenatı ve plazma örneklerimizde krokin grubundaki SOD düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Krokin grubunun plazma ve homojenat örneklerinde SOD düzeyinin artması, krokinin antioksidan özelliğiyle gerçekleşmiş olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda hipokampus doku homojenatı örneklerinde diyabet oluşturulduktan sonra 21 gün süreyle 50 mg/kg krokin uygulanan tedavi grubunun TNF- α düzeylerinin diyabet grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. Krokin uygulaması tedavi grubunda TNF- α 'yı azaltırken plazma TNF- α düzeyini arttırmıştır. Krokinin yapmış olduğu bu etki farklı fizyolojik koşullar altında farklı etki yapabildiğini düşündürmektedir.

Histolojik incelemelerimizde diyabet grubuna ait CA1, CA3 ve DG bölgesindeki kesitlerde nöron kaybı ve nöronal değişiklikler gözlenmiştir. Dejenere nöronlar, koyu boyanan ve büzülen sitoplazmaları ile ayırt edilmiştir. Diyabet grubundaki CA1, CA3 ve DG bölgelerindeki dejenere nöron yüzdesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Bu histolojik bulgularımız diyabetle birlikte gelişen yapısal bozukluğu desteklemektedir. Ayrıca diyabetik sıçanlara uygulanan krokinin sadece hipokampusün DG bölgesindeki dejenere nöron yüzdesini diyabet grubuna göre anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir. İmmunohistokimyasal olarak incelediğimiz hipokampus dokusunda diyabetik sıçanların sadece CA1 bölgesinde azalan NeuN anlatımını krokin uygulamasının arttırdığını göstermiştir. Krokinin bu etkisini sadece CA1 bölümünde gösterdiği, ilginç olarak krokin grubunun hipokampusünün CA3 bölgesinde NeuN anlatımını azalttığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, diyabetik sıçanlara 50 mg/kg/ip olarak krokin uygulaması antidiyabetik etkisinin olduğu ve kilo kaybını azaltıcı etkilerinin olduğu teyit edilmiş oldu. Hafıza üzerine etkisinin

olmaması diyabet süresine bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir, çünkü hipokampus homojenatlarında insülin ve sitokrom-c seviyeleri, BDNF, NeuN bakımından anlamlı bir farklılık belirlenmedi. İlginç olarak tek başına krokin uygulanması plazma ve hipokampus SOD düzeyleri ile plazma TNF- α düzeyini arttırıcı etki göstermiştir. Sadece krokin uygulanan grupların hipokampuslerinin CA1, CA3 ve DG bölümlerinde dejenere hücre yüzdelerinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca krokin, CA1 bölgesinde NeuN anlatımlarını azaltıcı etki gösterirken CA3 bölgesinde NeuN anlatımlarını azaltıcı etki göstermiştir. Hipokampus dokusunda krokinin daha belirgin olası etkilerinin görülebilmesi için daha uzun süreli diyabet modelinde farklı dozlarda krokin uygulamaları içeren çalışmalar yapılabilir.

Nisan 2021, 104 sayfa.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, öğrenme, hipokampus, krokin



SUMMARY

Ph.D. THESIS

EFFECTS OF CROCIN ON HIPPOCAMPUS and LEARNING IN STZ-INDUCED DIABETIC RATS

Neslihan AKARSU

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Kadriye AKGÜN DAR

Chronic hyperglycemia in diabetes leads to neurological complications. It has been reported that there are cognitive disorders in diabetic patients and that antihyperglycemic drugs have a positive effect on memory problems. It is reported that saffron and crocin among its components have antioxidant, anti-inflammatory, memory and learning enhancing and antidiabetic effects. In STZ-induced diabetes, cognitive disorders, behavioral tasks related to the hippocampus, and spatial memory impairment occur. It has been reported that crocin improves cognitive functions by reducing oxidative stress in diabetes-related memory disorders. In our study, we aimed to investigate the effects of crocin application on possible memory disorders in the diabetes model created with STZ and how it affects the relevant parts of the hippocampus.

Adult 44 male Wistar albino rats were separated to 4 groups as Control (0.9% FTS), Diabetes (single dose 65 mg / kg STZ), Crocin (50 mg / kg), Treatment (single dose 65 mg / kg STZ, 50 mg / kg crocin). Blood glucose levels and weights of the animals were measured regularly. Substance applications were performed for 21 days from the 4th day of the STZ injection. Passive avoidance test was performed to determine the short and long-term memory changes in diabetes, and the experiment was terminated afterwards. Hippocampus of 7 animals were used in biochemical studies, hippocampus of 4 animals were used in histological and immunohistochemical studies. Superoxide dismutase (SOD) in hippocampus and blood samples, insulin level, brain derived neurotrophic factor (BDNF) for learning and memory,

neuronal nuclear antigen (NeuN), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) important in inflammatory processes, cytochrome-c level in relation to apoptotic pathway was measured by biochemical method. Histologically, hippocampus tissue was examined by Nissl staining method, and immunohistochemically, NeuN expression was examined and inter group distribution was determined by H-Score method for CA1, CA3 and dentate gyrus which are sub-sections of hippocampus.

The fact that glucose values measured on the 15th and 25th days as a result of crocin (50 mg / kg) application for twenty-one days in diabetic rats were significantly decreased compared to the glucose values of diabetic animals in our study supports the hypoglycemic effects of crocin. At the end of the experiment, while the weight of the animals increased in the control and crocin groups; decreased in diabetes and treatment groups due to diabetes. It was determined that with crocin application which lasted 21 days, weight loss was less in diabetic animals compared to the diabetic group. In our passive avoidance test results, 50 mg / kg administered crocin for 21 days led to a statistically significant increase in latency times, but this suggests that it has no significant effect on short and long-term memory.

It was determined that plasma insulin levels were significantly decreased in the diabetes and treatment groups compared to the control group. This finding confirms that we have created a type 1 diabetes model with STZ. In addition, BDNF and NeuN levels did not show any difference in plasma and hippocampus tissue in our biochemical findings. Longer time is required for the translation of these molecules that are effective in learning to be affected. Our study suggests that the hippocampus insulin, BDNF and NeuN levels are not affected because diabetes lasts for 25 days.

In the hippocampus tissue homogenate samples, it was determined that the SOD level increased significantly only in the crocin group compared to the control group. It has been shown that administration of 50 mg / kg crocin to diabetic rats increased SOD levels in crocin group in our hippocampus homogenate and plasma samples. The increase in SOD level in plasma and homogenate samples of crocin group indicates that this may have been caused by antioxidant properties of crocin. In our study, it was determined that the TNF- α levels decreased in the hippocampus tissue homogenate samples of the treatment group, in which 50 mg / kg crocin was administered for 21 days after diabetes was induced, compared to diabetes group. Crocin administration decreased TNF- α in the treatment group, while increasing the plasma TNF- α level. This effect of crocin suggests that it may have different effects under different physiological conditions.

In our histological examinations, neuronal loss and neuronal changes were observed in sections of hippocampus CA1, CA3 and DG regions of the diabetes group. Degenerated neurons are distinguished by their dark stained cell and shrunken cytoplasm. It was determined that the percentage of degenerated neurons in the CA1, CA3 and DG regions of the diabetes group increased significantly when compared to the control group. These histological findings support the structural disorder that develops with diabetes. In addition, it was determined that crocin applied to diabetic rats significantly decreased the percentage of degenerated neuron only in the DG region of the hippocampus compared to the diabetes group. It has been shown that in the hippocampus tissue examined by immunohistochemistry, the application of crocin increased the decreased NeuN expression only in the CA1 region of diabetic individuals. It has been shown that crocin shows this effect only in the CA1 part, and interestingly, NeuN expression decreased in the hippocampus CA3 region in the crocin group.

As a result, it was confirmed that the administration of 50 mg / kg / ip crocin to diabetic rats had an antidiabetic effect and reduced weight loss effects. The lack of effect on memory may have occurred depending on the duration of diabetes, because no significant difference was found in hippocampus homogenates in terms of insulin and cytochrome-c levels, BDNF, and NeuN. Interestingly, crocin applicational one increased the plasma and hippocampus SOD levels and plasma TNF- α levels. It was determined that the percentage of degenerated cells increased in the CA1, CA3 and DG sections of the hippocampuses of only crocin-applied groups. In addition, crocin showed a decreasing effect of NeuN expressions in CA1 region, while decreasing effect of NeuN expressions in CA3 region. In order to see more pronounced possible effects of crocin on hippocampus tissue, studies involving different doses of crocin can be performed in a longer-term diabetes model.

April 2021, 104 pages.

Keywords: Diabetes mellitus, learning, hippocampus, crocin

1. GİRİŞ

Bu çalışma, STZ uygulaması sonucunda gelişen deneysel Tip 1 diyabet modelinde beyin dokusunda meydana gelen nöropatolojik değişikliklere safranın etken maddelerinden biri olan krokinin etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

Tezin “Genel Bilgiler” bölümünde, diyabetin tanımı, özellikleri ve fizyolojik etkileri belirtilmiş, diyabet ile oksidatif stresin ilişkisi, diyabetik nöropati ve diyabetin bilişsel fonksiyonlardaki etkisi çeşitli araştırmacıların yaptıkları çalışmaların ışığında ayrıntılı olarak ortaya konmuştur. Öğrenme ve hafızanın oluşumu ile ilgili bilgi verilerek öğrenme sürecinde etkili olan BDNF ve NeuN moleküllerinden bahsedilmiştir. Yapılan çalışmaların ışığında safran ve etken maddelerinden olan krokinin etkileri belirtilmiştir.

“Malzeme ve Yöntem” bölümünde, çalışmada kullanılan hayvan sayısı, özellikleri ve oluşturulan gruplar ile yukarıda anlatılan açıklamalar doğrultusunda bilgi toplamak amacıyla, laboratuvar ortamında yapılan işlemler ayrıntılı bir biçimde anlatılmıştır. Yapılan bu işlemler sonucunda histolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal düzeyde elde edilen veriler tezin “Bulgular” kısmında ayrıntılı olarak verilmiştir.

“Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, çalışmadan elde edilen veriler değerlendirilmiş ve şimdiye kadar bu konuyla ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılıp yorumlanarak bir sonuca varılmıştır.

Çalışmamızda, tüm gruplardaki sıçanlara kısa ve uzun süreli hafızayı değerlendirmek amacıyla öğrenme testinden 1 ve 24 saat sonra pasif kaçınma testi uygulanmıştır. Retansiyon latans sürelerinin diyabetik hayvanlarda nasıl değiştiği ve 21 günlük krokin uygulamasının retansiyon latans süresine etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Sıçanların hipokampus dokusu homojenatlarında ve plazmada, insülin düzeyi, endojen antioksidan düzeylerinin tespit edilmesi için SOD, öğrenme belirteçleri olarak NeuN ve BDNF düzeyleri, apoptotik yolak için sitokrom-c, inflamatuvar belirteç olarak TNF- α düzeyleri biyokimyasal olarak ölçülmüştür. Aynı zamanda beyin dokusundaki NeuN anlatımları hipokampusun alt bölümleri olan CA1, CA3 ve DG bölgelerinde immunohistokimyasal olarak

incelenmiştir. Diyabetin beyin dokusunda meydana getirdiği patofizyolojik değişiklikler ve diyabetik sıçanlarda oluşan bilişsel bozukluklara krokinin etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. DİYABETİN TANIMI, TİPLERİ, METABOLİZMA VE BEYİN ÜZERİNE ETKİLERİ

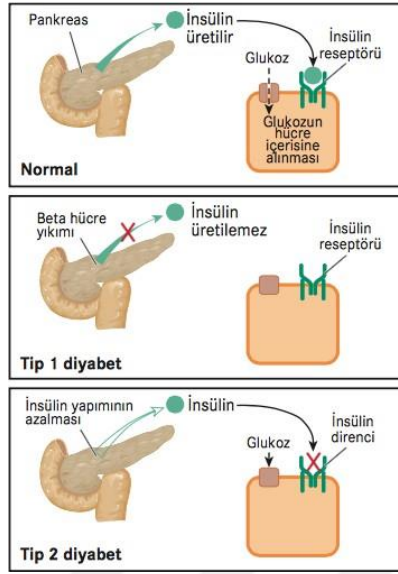
Diabetes mellitus (DM), insülin hormonunun eksikliğine veya dokuların insüline olan duyarlılığında azalmaya bağlı olarak gelişen karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmalarının bozulması ile oluşan patolojik bir durumdur. Diyabetin iki alt tipi vardır (Guyton ve Hall, 2007) (Şekil 2.1).

1) Tip 1 DM: İnsülin hormonunun yokluğuna bağlı olarak gelişir. İnsüline bağımlı DM adını alır. Tip 1 diyabetin en belirgin özelliği pankreas Langerhans adacık hücrelerinin tahrip olup insülin sentezleyememesidir. Bu durumda glikoz, enerji olarak hücrelere ulaştırılamayacağı için kandaki seviyesi yükselmeye başlar. Kanda glikozun aşırı yükselmesi ile diyabetik ketoasidoz gibi yaşamı etkileyen komplikasyonlara sebep olur (Guyton ve Hall, 2007).

2) Tip 2 DM: Vücuttaki dokuların insülinin metabolik etkilerine duyarlılıklarının azalması ile gelişir ve insüline bağımlı olmayan DM adını alır. Azalan bu duyarlılığa insülin direnci denir. İnsülin eksikliğinin veya insülin direncinin glikoz metabolizmasına ilk etkisi, beyin hariç glikozun birçok hücre tarafından alınmasının ve kullanılmasının engellenmesidir (Guyton ve Hall, 2007).

Tip 2 diyabetin nedenleri çok faktörlü bir süreçtir. Beta (β) hücrelerinin fonksiyonunu ve dokulardaki (kas, karaciğer, yağ dokusu, pankreas) insülin duyarlılığını etkileyen hem genetik hem de çevresel unsurları içermektedir (Scheen, 2003). β hücre disfonksiyonu ve azalmış insülin duyarlılığının etkileri ile ilgili önemli tartışmalar olsa da, genel olarak bu faktörlerin her ikisinin de insülin direncinin oluşumunda önemli roller oynadığı kabul edilmektedir (Schenn, 2003).

Mekanizmaları henüz tam aydınlatılmamış olsa da insülin direncinin genellikle hücre içi post reseptör sinyal yollarının aktivasyonundan kaynaklandığı bildirilmektedir. Sinyal aktarım bozuklukları ve glikoz taşıyıcı tip-4 (GLUT-4) mutasyonları ile post reseptör insülin direnci ortaya çıkmaktadır (Savaş ve Gültekin, 2017). Yani insülin hormonu, reseptörüne bağlanmasına rağmen, reseptör sonrası mekanizmalardaki bozukluk olduğu için insülin etkisini gösterememektedir (Savaş ve Gültekin, 2017).



Şekil 2.1: Normal, Tip 1 ve Tip 2 Diyabet bireylerde glikozun hücre içine alınması (Satman ve diğ., 2011).

Dünya genelinde diyabetin görülme sıklığı artmaktadır ve bu artış sosyo-ekonomik, çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi ile yönlendirilmektedir. Kentleşmenin artması, daha yüksek kalori alımı, işlenmiş gıda tüketiminin artması, hareketsiz hayat tarzları gibi değişen alışkanlıklar toplumsal düzeyde tip 2 diyabetin görülme sıklığının artmasına neden olan faktörlerdir. Bunun yanı sıra tip 2 diyabet hastalığında meydana gelen bu artış, obezite seviyeleri, sağlıklı beslenme ve fiziksel hareketsizlik gibi risk faktörlerinden etkilenmektedir. Ayrıca çocukluk döneminde başlayan tip 1 diyabet seviyelerinin de artmakta olduğu bilinmektedir. Kentsel alanlarda küresel diyabetin görülme sıklığının %10,8 olduğu bilinirken kırsal alanlarda bu oran %7,2' ye düşmektedir (<https://diabetesatlas.org/en/sections/worldwide-toll-of-diabetes.html>). Günümüzde 20-79 yaş arasındaki yetişkinlerin % 9,3'ünün yani 463 milyon insanın diyabet hastalığı ile yaşadığı ileri sürülmektedir. 20 yaşın altındaki 1,1 milyon çocuk ve ergenlerde tip 1 diyabet görülmektedir (Satman ve diğ., 2013; Grazyna ve diğ., 2015). Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre 2000 yılında 171 milyon diyabet hastası bulunmaktaydı. Bu sayının 2030'da 366 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Dünya Sağlık Örgütü, 2006).

Ülkemizdeki veriler çok daha endişe vericidir. Türk Diyabet Cemiyeti Başkanı yaptığı açıklamalarda diyabet oranlarındaki artışa dikkat çekmektedir. Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-2'ye göre Türkiye'de diyabet hastalığına sahip birey sayısının 10 yıl içinde %90 arttığı bildirilmektedir. Ayrıca yaş özellikleri

incelendiğinde yaşı ilerledikçe diyabet hastalığının görülme sıklığının da arttığı ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, ülkemizde obezite ve diyabetin en önemli toplum sağlığı sorunlarından biri olduğu görülmektedir (Satman ve diğ., 2013).

Diyabet hastalığı kontrol altına alınmadığında oksidatif stres, apoptoz, protein kinaz C (PKC) izoformları, transkripsiyon faktörleri ve iltihaplanma gibi patofizyolojik mekanizmalar aktive olarak dokuların ve organların düzgün çalışmasını engellemektedir (Domingueti ve diğ., 2016). Uzun dönemde ise diyabetik nefropati (DN), diyabetik retinopati, diyabetik nöropati, ateroskleroz, demans ve kardiyovasküler bozukluklar gibi komplikasyonlara oluşmaktadır (Gonzalez ve diğ., 2016; Maksimov ve diğ., 2016; Putta ve diğ., 2017) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Diyabet komplikasyonları.

Diyabet komplikasyonları	
Akut komplikasyonlar	Kronik komplikasyonlar
Hipoglisemi	Diyabetik retinopati
Akut hiperglisemi	Diyabetik nöropati
Diyabetik ketoasidoz	Diyabetik nefropati ve diyabetik ayak

Diyabetin neden olduğu nörolojik komplikasyonlar hem periferik hem de merkezi sinir sisteminde (MSS) etkili olmaktadır (Manschot ve diğ., 2008). Periferik sinir sisteminde aksonal transport ve sinir rejenerasyonunun bozulması ile birlikte motor sinir iletim hızı azalmaktadır (Kennedy ve Zochodne, 2005). MSS’de nörokimyasal, nörofizyolojik ve yapısal anormallikler olduğu bilinmektedir (Sima ve diğ., 2004). Diyabetik hastalarda hiperglisemiden kaynaklanan bilişsel bozukluklar olduğu tahmin edilmektedir (Brands ve diğ., 2007). Hipergliseminin neden olduğu bilişsel bozuklukların ve depresyonun hipokampal nöron hasarı ile ilişkili olduğu iddiasını destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (Ceretta ve diğ., 2012; Zhou, 2015). Genel olarak yapılan çalışmalarda, beyindeki nöroinflamasyon ve nöronal apoptozun diyabetle ilişkili bilişsel bozukluklar ile ilgili olabileceği kabul edilmektedir (Fazeli, 2009; Stranahan, 2008).

Limbik sistemin bir parçası olan hipokampusün stres, kaygı, epilepsi, ağrı ve bilişsel olaylarda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Lathe, 2001, Ghadrdoost ve diğ., 2011). Diyabetik hayvanlarda hipokampal nöroenezin bozulması ile kronik hipergliseminin ilişkili olduğu bildirilmektedir (Zhang ve diğ., 2008). Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise diyabetik bireylerin beyinlerinde oluşan insülin veya insülin reseptör yetersizliği ile bilişsel bozulmaların ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 2004).

Diyabetik hayvanlarda hipokampus ile ilgili olan davranışsal görevler ve uzamsal hafızada bozulmalar olduğu ve bu bozulmaların hipokampal sinaptik plastisitede meydana gelen değişiklikler sonucunda olduğu bildirilmektedir (Iwai ve diğ., 2009). Yapılan bu çalışmalar diyabette oluşan kronik hiperglisemi ve insülin yetersizliği durumlarının hipokampus ve serebral korteks gibi öğrenme ve hafıza süreçlerinde kritik bir rol oynayan beyin bölgelerinde değişikliğe yol açtığını göstermektedir.

Diyabet hastalığı sürecinde ortaya çıkan bilişsel bozulmaların altında yatan mekanizmalar çok faktörlü bir süreçtir. Glikoz seviyesinin yükselmesi ile glikoz otooksidasyonu uyarılır ve serbest radikal üretimi artar. Bu şekilde diyabetin neden olduğu hiperglisemi birçok beyin bölgesinde antioksidan sistemlerin bozulmasına veya reaktif oksijen türleri (ROT)'nin artmasına sebep olmaktadır (Mastrocola ve diğ., 2005). Beyin bölgelerinde artan oksidatif hasarın morfolojik anormalliklere ve hafıza bozulmalarına neden olduğu bilinmektedir (Fukui ve diğ., 2001).

Deneysel diyabetin oluşturulmasında STZ kullanılmaktadır ve D-glikoz C2 pozisyonuna bağlı metil nitroz üre (MNU) olarak bilinmektedir. MNU, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına yol açan alkilleyici bir ajan gibi etki göstermektedir. Vücutta metabolize olduğunda ise N-nitrozüre serbest kalır ve süperoksit, nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi ROT' nin miktarını arttırarak DNA'ın hasarlanmasına sebep olmaktadır (Szkudelski, 2001; Bolzan ve Bianchi, 2002). Diyabet hastalığı ile yapılan çalışmalarda STZ'nin en uygun diyabetojenik ajan olarak kullanıldığı görülmektedir. STZ'nin yol açtığı hipoinsülinizm durumuna STZ diyabeti denilmektedir (Schein ve diğ., 1967, Lenzen, 2008). STZ, alkilasyon ile β hücrelerinin nekroza uğramasına yol açar ve β hücrelerinin ölmesiyle insüline bağımlı Tip 1 diyabet modeli oluşturur (Lenzen, 2008). Ayrıca STZ' nin glikoz oksidasyonunu ve insülinin biyosentezini azaltıcı etki gösterdiği de bildirilmektedir (Kurçer & Karaoğlu, 2012).

Ahmadi ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada STZ ile diyabet oluşturulan hayvanların Morris su labirentinin hedef bölgesinde daha düşük zaman harcadıkları yani platformun yerini iyi hatırlayamadıkları bildirilmektedir. Ayrıca, bozulan bellek işlevlerine beyinde artan oksidatif stresin eşlik ettiği de gösterilmiştir (Ahmadi ve diğ., 2017). Diyabet hastalığında görülen bu bilişsel bozukluklar sadece diyabetin metabolik bozukluklarından değil, aynı zamanda merkezi sinir sisteminde meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişikliklerden de kaynaklanmaktadır (Cukierman ve diğ., 2005, Kodl ve Seaquist, 2008).

2.2. DİYABETİN OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SİSTEM İLE İLİŞKİSİ

Fizyolojik koşullar altında antioksidan sistem ile serbest radikal oluşumu bir denge durumundadır. Bu hassas denge, serbest radikal yönüne doğru kaydığında hücredeki organeller, zarda bulunan glikoprotein ve glikolipit gibi yapılar olumsuz etkilenir ve hücre içindeki enzimlerin aktiviteleri değişir. Mitokondri organelinde gerçekleşen oksijenli solunum bozulur ve litik enzimlerin aktifleşmesiyle damar geçirgenliği etkilenir. Organizmada gerçekleşen bu fonksiyonel ve yapısal değişikliklere oksidatif stres adı verilmektedir (Tanbek, 2015) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Oksidatif denge (Özcan ve diğ., 2015).

Diyabet, yaşlanma, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok olayın patogeneğinde oksidatif stres rol almaktadır. Pankreasın langerhans adacığındaki β hücreleri de oksidatif stresin vücutta etkilediği dokulardan biridir. Kan glikoz düzeyi yüksek olduğunda veya serbest yağ asitlerinin miktarı arttığında pankreasın β hücrelerinde işlevsel bozukluklar

ortaya çıkmaktadır (Evans ve diğ., 2003).

Hiperglisemiye bağılı serbest radikal üretimi üç mekanizma ile açıklanmaktadır (Bonnefont-Rousselot, 2002).

1) Glikozun oto-oksidasyonu ve süperoksit üretimi

Hücre içinde glikozlar oto-oksidasyona uğradığında nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) molekülleri oluşmaktadır. NADH, oksijenli solunum reaksiyonlarında oksidatif fosforilasyon ile Adenizon Tri-Fosfat (ATP) üretilirken kullanılmaktadır (Brownlee, 2001). Açığa çıkan NADH molekülleri ile oksidatif fosforilasyon gerçekleşirken süperoksit radikali oluşmaktadır (Green ve diğ., 2004). Diabetes mellitusda, kan glikoz düzeyi yükseldiğinde bu yol ile süperoksit radikal üretiminin arttığı bildirilmektedir (Altan ve diğ., 1997).

2) Proteinlerin glikasyonu ve ilerlemiş glikasyon son ürünlerinin oluşumu

Kan glikoz düzeyi yükseldiğinde, glikoz bir enzime ihtiyaç duymadan proteine bağlanır ve kontrolsüz glikasyon reaksiyonları oluşur. Glikasyona uğrayan proteinler ise moleküler oksijene bir elektron verir ve serbest oksijen radikali oluşur (Gillery ve diğ., 1988). Proteinlerin glikasyona uğraması sonucunda serbest oksijen radikallerinin miktarı artmış olur.

3) Poliöl yol

Kanda glikoz seviyesinin yükselmesi poliöl yolunu aktifleştirir ve sorbitol üretilir. Poliöl yolunda aldoz redüktaz enziminin aktifleşmesi için nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) molekülleri gerekmektedir. Yani poliöl yolunda hücre içindeki NADPH molekülleri tüketilmektedir. Hücre içindeki NADPH'ların azalması ise okside durumdaki glutatyonun redükte duruma dönüştürülmesini engellemektedir (Maritim ve diğ., 2003). Poliöl yolu aktifleştğinde hücre içindeki NADPH moleküllerinin miktarı azalır ve glutatyon ile NO metabolizmasında bozukluklar oluşur.

Kan glikoz seviyesinin yüksek olmasından dolayı oluşan oksidatif stresin diyabetik komplikasyonlara neden olduğu yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır (Altan ve diğ., 2006). Diyabette meydana gelen bilişsel bozulmaların altında yatan mekanizmalar pek çok faktör tarafından etkilenmektedir (Kucukatay ve diğ., 2007). Bu faktörler; yüksek kan glikoz düzeyi (Biessels ve diğ., 2007), oksidatif stresin artması (Frier, 2011) ve NO üretimindeki

düzensizlikler olarak belirtilmektedir (Kucukatay ve diğ., 2009; Schmatz ve diğ., 2009). Bunun yanı sıra serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan sistem arasındaki dengesizliğin de diyabetin uzun dönemdeki komplikasyonlarına sebep olabileceği bildirilmektedir (Memisogullari ve diğ., 2003, Memişoğullari ve Bakan, 2004).

Antioksidanlar, bozulan oksidan-antioksidan dengesini düzeltebilmek için çalışmaktadır (Cherubini ve diğ., 2005, Young ve Woodside, 2001, Sözman, 2002). Oksidanları etkisizleştiren 4 farklı antioksidan mekanizması olduğu bildirilmektedir (Taysi ve diğ., 2002, Habif ve diğ., 1997).

1) Temizleme etkisi: Vücutta meydana gelen oksidanların antioksidanlar tarafından zayıf bir moleküle dönüştürüldüğü bir mekanizma ile temizleme etkisi gerçekleşmektedir. Bu etki SOD gibi enzimler tarafından yapılmaktadır.

2) Baskılama etkisi: Oksidan moleküllere bir hidrojen aktarılır ve tepkime sonucunda oksidanlar etkisiz duruma getirilmektedir. Vitaminler (C vitamini) ve flavonoidler (Luteolin) tarafından yapılmaktadır.

3) Onarma etkisi: Biyolojik moleküllerdeki hasarları onaran mekanizmadır.

4) Zincir koparma etkisi: Serbest radikal üreten reaksiyonları zincir koparma etkisi ile durdurmaya çalışan mekanizmadır. Başka bir deyişle oksidan molekülleri bağlayarak işlevlerini yapmasına engel olmaya çalışan mekanizmadır. Hemoglobin ve α -tokoferol tarafından yapılmaktadır.

Antioksidanlar; endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki farklı kategoride sınıflandırılır (Gupta ve diğ., 2014). Örneğin, eksojen bir antioksidan olan askorbik asit hidroksil radikallerini temizleyerek etkisini göstermektedir.

Eksojen antioksidanların etki mekanizmaları Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2: Eksojen antioksidanlar ve etki mekanizmalarına örnekler.

Antioksidan	Etki Mekanizması
Askorbik Asit	Hidroksil radikallerini temizlemektedir.
E Vitamini	Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engeller.
β Karoten	Yağda çözünen radikalleri temizlemektedir.

Endojen antioksidanların enzim yapıda olanları ve enzim yapıda olmayan (melatonin, albumin) çeşitleri bulunmaktadır. Enzim yapıda olmayan endojen antioksidanlardan olan haptoglobini hemoglobini bağlayarak etkisini gösterirken; bilirubin ise peroksil radikallerini temizleyerek antioksidan sistemin görevini yerine getirmektedir (Özcan ve diğ., 2015).

2.2.1. Enzim yapıda olan antioksidanlar

Enzim yapıda olan antioksidanlar, oksidan molekülleri tutarak etkisinin daha zayıf olabileceği moleküllere dönüştürürler.

2.2.1.1. Süperoksid Dismutaz

Vücutta meydana gelen serbest oksijen radikallerine karşı ilk savunma SOD enzimi tarafından yapılmaktadır. Oksijenli solunum yapan hücrelerde bulunan ve metalloprotein olan SOD enzimi süperoksid radikalini tutarak daha az zararlı olan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevirmektedir (Memisogullari ve diğ., 2003). Sonrasında oluşan hidrojen peroksit, katalaz (CAT) enzimi tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Bu şekilde SOD ve CAT enzimleri süperoksit radikallerinin zararlı etkisini ortadan kaldırmaktadır. Diyabet hastalığında SOD düzeylerinin arttığı, değişmediği veya azaldığı şeklinde birbiriyle çelişen çalışmalar bulunmaktadır (Abou-Seif ve Youssef, 2004, Aydın ve diğ., 2001, Komosinska-Vassev ve diğ., 2005).

2.2.1.2. Katalaz

CAT, en çok peroksizom organelinde bulunmaktadır. Bunun yanı sıra mitokondri ve endoplazmik retikulumda da daha az miktarlarda bulunur. SOD'un oluşturduğu H_2O_2 'i,

oksijen ve suya parçalayarak etkisiz hale getirmektedir (Abou-Seif ve Youssef, 2004).

2.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GSH-PX), hücre sitoplazmasında bulunur ve H_2O_2 'nin oluşturduğu oksidatif hasara karşı hücreleri korur. Redükte durumdaki glutasyonu (GSH) yükseltger ve H_2O_2 'i de suya çevirerek zararlı etkilerini ortadan kaldırmaya çalışır (Aydın ve diğ., 2001). H_2O_2 'den hidroksil radikalının oluşmasını engeller ve hücre zarında bulunan proteinler ve lipitleri radikallerin zararlı etkilerine karşı korur (Akkuş ve diğ., 1996).

2.3. HİPOKAMPÜS

Beyinde temporal lobun medial kısmında ve lateral ventrikülün temporal kısmına yakın bölgede hipokampus bulunmaktadır (Amaral ve Insausti, 1990). Isaacson, (2002)'a göre hipokampusün yön bulma, hafıza, duygular, konum bilgileri ve eski bilgileri hatırlamada önemli rolü olduğu bilinmektedir.

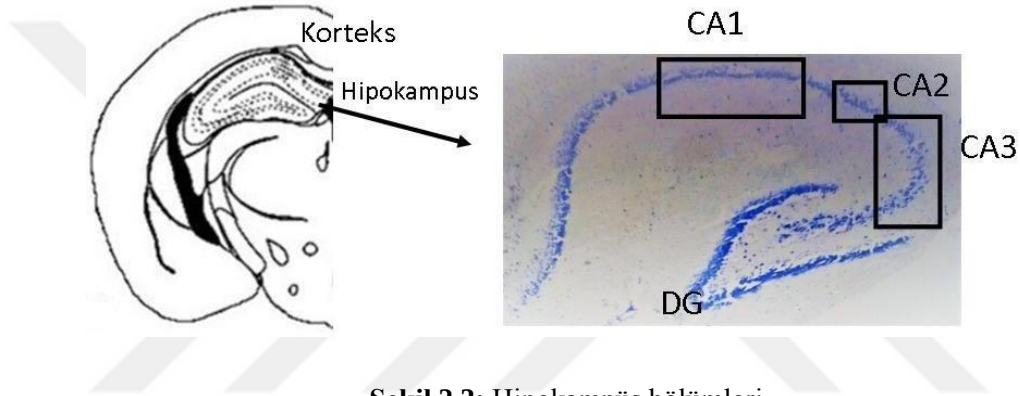
Sinirbilimde üzerine en çok çalışma yapılan beyin bölgelerinden biri hipokampüstür ve fonksiyonlarını anlamak için yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir (Bertram, 2014; Zeidman ve Maguire, 2016). Hipokampus özellikle öğrenme, hafıza ve bilişsel işlevler için kritik bir role sahiptir.

“İzci ve Erbaş (2015), hipokampusün hafıza çalışmalarının merkezinde yer aldığını ve hafızanın kodlanmasını ve geri alınmasını destekleyen bir beyin ağının merkezinde olduğunu belirterek hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinde önemli role sahip bulunan limbik sistemde yer aldığını” yaptığı çalışmada bildirmiştir. Bunun yanı sıra hipokampusün kısa süreli hafızayı, uzun süreli hafızaya aktarmak gibi çok önemli bir görevi olduğu da bildirilmektedir (Kaptan, 2018, <https://evrimagaci.org/amigdala-hipokampus-ve-bellek-uzerine-160>).

Hipokampusün uzaysal yön bulma görevini bulunmaktadır. Yani hareket ederken etrafı üç boyutlu değerlendirmeyi sağlar (<https://evrimagaci.org/amigdala-hipokampus-ve-bellek-uzerine-160>). Yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılan bu bilişsel işlevlerin ötesinde, hipokampusün duygu, korku, kaygı ve stresin düzenlenmesinde de kritik rol oynadığı bildirilmektedir (Bartsch ve Wulff, 2015).

“Pastalkova ve diğ., (2006) öğrenme ve hafıza çalışmaları için hipokampüsün temel bir örnek olduğunu” bildirmiştir. Hipokampüs, uzun süreli potansiyel artışı (LTP) gibi birçok sinaptik plastisite modeli için hipokampal devrelerde önemli bir örnek olarak kabul edilmiştir (Bliss ve Schoepfer, 2004).

“Cramer ve diğ., (2011) nöroplastisite, dokuyu iç veya dış uyaranlara göre değiştirme ve yeniden düzenleyebilme kapasitesi olarak kabul edilmektedir” şeklinde tanımlanmaktadır. Nöroplastisite mekanizmalarının hipokampal nöronların ve devrelerin çalışmaları için önemli olduğu bildirilmektedir (Bartsch ve Wulff, 2015).



Şekil 2.3: Hipokampüs bölümleri.

Hipokampüs koronal beyin kesitlerinde C harfi şeklinde görülmektedir (İzci ve Erbaş, 2015). Dış yüzü koçboynuzuna benzediğinden dolayı “cornu ammonis” olarak anılmaktadır. Bu yüzden hipokampüsün bölümleri CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak adlandırılmıştır (Amaral ve Insausti, 1990).

Nöral bilgilerin işlenmesinde hipokampüsdeki tüm bölgelerin rol oynadığı bilinmektedir (Kaptan, 2018). Spasyal (uzaysal) öğrenme ve bellek için hipokampüsün CA1 bölgesinde bulunan nöronların gerekli olduğu bildirilmektedir. “İzci ve Erbaş (2015) sağlam bir CA1- CA3 bağlantısının hafıza için mutlaka gerekli olduğu ve CA1 bölgesinde bulunan nöronların CA3 bölgesinden bilgileri alıp işlediğini” yaptıkları çalışmada bildirmiştir.

2.4. ÖĞRENME VE HAFIZA OLUŞUMU

“Keleş ve Çepni, (2006) bireyler, bilinçli veya bilinçsiz olarak etkileşimde bulunmaktadır. Bu etkileşimler sonucunda oluşan yaşantılar sonucunda öğrenme meydana gelmektedir. Öğrenme sonucunda bireyde bilişsel, duyuşsal ve psikomotor değişimler ortaya çıkmaktadır”

şeklinde öğrenmenin nasıl gerçekleştiğini tanımlamıştır.

Öğrenmeyi ve öğrenmenin doğasını açıklamaya yönelik günümüzde bilinen kuramlar; davranışçı, bilişsel, duyuşsal ve nörofizyolojik kuramlardır.

Tablo 2.3: Öğrenme kuramları.

Öğrenme Kuramları
Davranışçı Kuram
Bilişsel Kuram
Duyuşsal Kuram
Nörofizyolojik Kuram

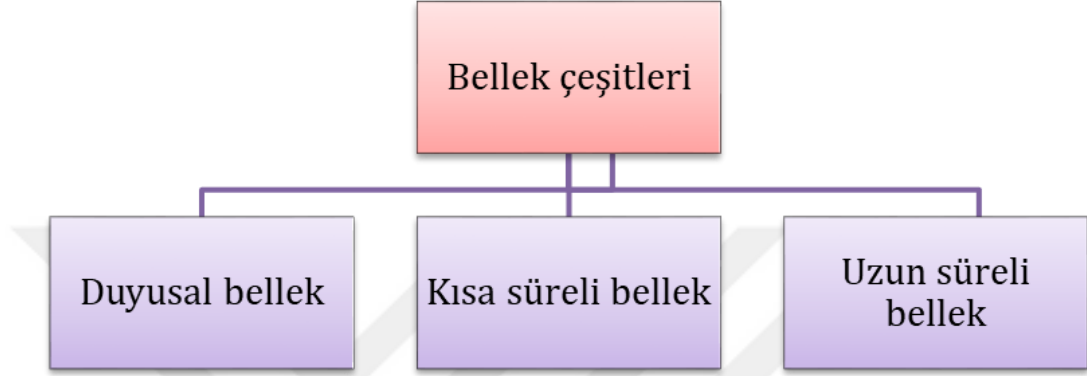
Davranışçı kurama göre öğrenme; dışarıdan gelen bir uyarıcı ile sonucunda ortaya çıkan davranış arasında kurulan bağ sonucu oluşmaktadır (Soylu, 2004). Bilişsel kuramcılara göre öğrenme, doğrudan gözlenemez ve kişinin zihninde meydana gelen bir süreçtir (Özden, 2003). Duyuşsal kuramcılar öğrenmenin doğası ile ilgilenmek yerine yerine duyuşsal sonuçlarını gözlemlemeyi tercih etmişlerdir (Soylu, 2004). Biyokimyasal bir değişimin gerçekleşmesi ise nörofizyolojik kurama göre öğrenmenin tanımıdır (Özden, 2003).

Nörofizyolojik kurama göre öğrenme oluşurken yeni sinaps bağlantılarının meydana geldiği kabul edilmektedir (Wortock, 2002). İnsanın kendi nöral devrelerini öğrenme sayesinde değiştirip geliştirebildiği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Thomas, 2001).

Bilginin depolanabilme ve daha sonra bu bilgilerin yeniden kullanılabilmesi bellek olarak bilinmektedir (Ziylan, 2001). Hücresel olarak tanımlandığında ise bellek, nöron gruplarının ateşlenmesi olarak ifade edilmektedir. Polarize durumda (dinlenme) olan bir nöron yüz milisaniyede bir kez ateşleme oluştururken, herhangi bir bilişsel aktivite ile meşgul olduğunda ise yüz milisaniyede çok sayıda ateşleme oluşturabilmektedir (Wortock, 2002).

Duyusal bellek, kısa süreli bellek ve uzun süreli bellek olmak üzere üç çeşit bellek vardır. Bilgilerin ilk geldiği yer duyusal bellektir. Duyusal bellekte yer alan girdilerin hepsi duyu

organları (göz, kulak vb) aracılığıyla elde edilen bilgilerdir. Bilgileri tutma süresinin birkaç dakikadan daha az olan belleğe kısa süreli bellek adı verilmektedir (Şekil 2.4). Öğrenilmiş olan bilgileri tutma süresi insanın tüm yaşamı boyunca sürebilen belleğe ise uzun süreli bellek adı verilmektedir (<https://psikologterapi.wordpress.com/2010/11/01/bellek-cesitleri-ve-islevleri>).



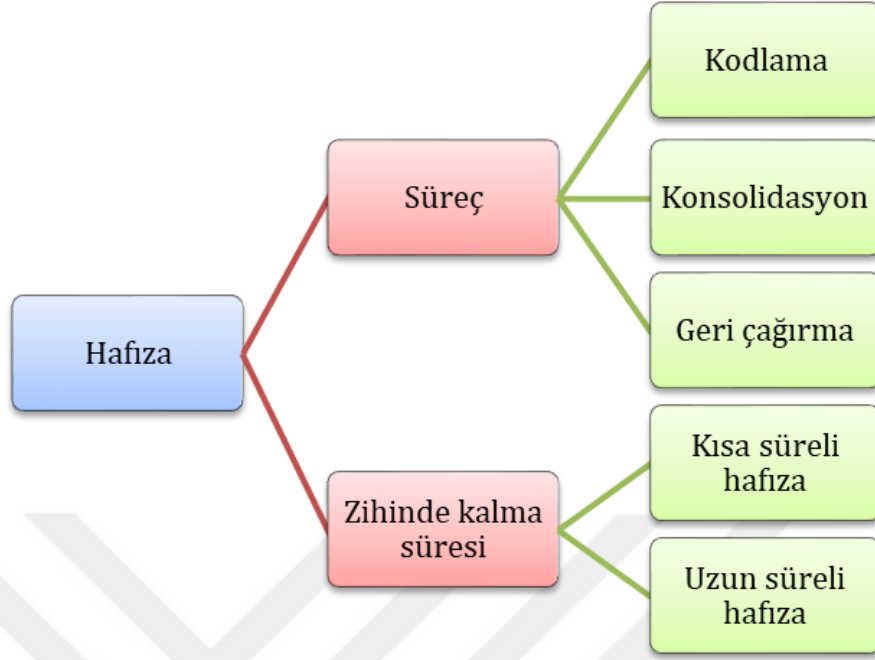
Şekil 2.4: Bellek çeşitleri.

Hafıza süreç açısından kodlama, konsolidasyon ve geri çağırma olarak üç farklı bölümde incelenmektedir (Hall, 2011).

Kodlama, bilgilerin kaydedilerek hafızada olan diğer bilgilerle ilişki kurulmasıdır. Konsolidasyon, sinaps bağlantılarının güçlenmesiyle bilgilerin kalıcı duruma getirilmesidir. Geri çağırma ise bilgilerin hatırlanmasıdır.

LTP'nin öğrenme ve hafıza oluşumunda en önemli mekanizma olduğu ifade edilmektedir (Arisi, 2014). Presinaptik nörona kısa ve yüksek frekanslı bir uyarı geldiğinde postsinaptik nöron zarının kalıcı olarak depolarize duruma gelmesine LTP adı verilmektedir.

Erken uzun süreli potansiyel artışı (E-LTP), diğer bir şekilde kısa süreli hafıza olarak adlandırılmaktadır. Kısa süreli hafıza birkaç dakikadan birkaç saate kadar korunabilmektedir ve protein veya mesajcı ribo nükleik asit (mRNA) sentezi gerektirmediği bilinmektedir. Uzun süreli hafıza yani geç uzun süreli potansiyel artışı (L-LTP) ise uzun süre protein sentezine ihtiyaç duyan hafıza çeşididir (Dudai, 2004).



Şekil 2.5: Süreçlerine ve zihinde kalma sürelerine göre hafıza çeşitleri.

LTP sonucunda nöron zarı depolarize olduğunda sinaptik güçlenmeler oluşmaktadır. Sinaptik bağlantıların güçlenmesi sonucunda ikincil habercilerin içinde bulunduğu bir süreç başlar. Daha sonra postsinaptik nöron zarında yapısal farklılıklar oluşmaktadır (Kolb ve Whiskaw, 2005). Postsinaptik nöron zarında oluşan bu yapısal farklılıklar uzun süreli hafıza ile ilişkilendirilmektedir (Kaptan, 2018).

Hipokampüsün kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya bilgi aktarımından sorumlu olduğu ve mekansal hafızada kritik bir öneme sahip olduğu bilinmektedir (Rice ve diğ., 2015). Hipokampüste insülin sinyalizasyonunun bozulması sonucunda hipokampal hafızada fonksiyon bozukluklarının görüldüğü bildirilmektedir (Agrawal ve diğ., 2011). Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada, insülin direnci olan Tip 2 Diyabetik bireylerin bilişsel bozukluklar, demans ve hatta Alzheimer hastalığı gibi ciddi nörolojik hastalıklara yakalanma riski olduğu gösterilmiştir (Li ve diğ., 2014; de la Monte, 2014).

İnsülin reseptörünün (IR), mekânsal öğrenme, hafıza ve bilişten sorumlu olan hipokampüste anlatımının olduğu bildirilmektedir. Hipokampüste IR'lerin aktivasyonu, sağlıklı insanlarda ve deney hayvanlarında, metabolik, büyüme, sinaptik ve nöronal fonksiyonların korunmasında önemli bir rol oynar (Grillo ve diğ., 2015; Pratchayasakul ve diğ., 2011). IR'nin

otofosforilasyonu, fosfoinositidil-3-kinaz (PI3K)/Akt sağkalım yolağının aktifleşmesine neden olur. Bu olayın sonucunda GLUT-4'ün translokasyonu gerçekleşir ve post-reseptöre bağlı insülin direncinin oluşabileceği bildirilmektedir (Biessels ve Reagan, 2015).

Uzun süren hipergliseminin, hipokampüste bozulmuş bir insülin sinyal işleyişine ve değişmiş bir glikoz homeostazisine yol açabileceği bildirilmiştir (Sadeghi ve diğ., 2016). Ayrıca, Tip 2 diyabet hastalarında, mitokondrinin, Bax aktivasyonu ve sonuçta kaspaz-3'ü aktive eden sitokrom-c salınması ile hipokampus içindeki nöronal hücre ölümünde çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Sadeghi ve diğ., 2016; Ye ve diğ., 2011).

2.5. ÖĞRENME VE HAFIZA OLUŞUMDA ETKİLİ MOLEKÜLLER

Öğrenme ve bellek oluşumu süreçlerinde önemli olan pek çok molekül ve faktör vardır. Yapılan çalışmalarda, öğrenme ve hafıza fonksiyonunun nörobiyolojik temelini oluşturan LTP için BDNF ve NO'nun oldukça önemli olduğu gösterilmiştir.

BDNF, merkezi ve periferik sinir sisteminde nöronların yaşamasını, büyümesini ve işlevlerini düzenleyen, sinapsların stabil durumda kalmasını sağlayan; akson ve dendrit dallanmalarını düzenleyen bir nörotrofindir (Alderson ve diğ., 1990; Leihteinen ve Pitkanan, 2004). BDNF'nin hipokampüste ve diğer beyin bölgelerinde LTP'nin esas düzenleyicisi olduğu ifade edilmektedir (Leal ve diğ., 2015). Uzun süreli bellek oluşumunun temel mekanizması olan LTP'de N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) önemli bir rol oynamaktadır. BDNF, NMDAR'ın aktivasyonuna aracılık etmektedir (Pitkanan, 2004). “Vaynman ve diğ., 2004, BDNF'nin inhibe edildiğinde öğrenme hızında ve hatırlama yeteneğinde kayıplara yol açar” şeklinde ifade etmiştir.

BDNF, nöronların gelişmelerine ve kendilerini yenilemelerine katkıda bulunurken; sinir sistemindeki yolaklarının yapısal olarak korunmalarına ve görevlerini devam ettirmelerine katkıda bulunmaktadır (Chen ve diğ., 2001). Öğrenme gerçekleştiğinde ve hafıza oluştuğunda BDNF'nin mRNA anlatımının arttığı bildirilmektedir (Patterson ve diğ., 1992; Bramham ve diğ., 1996). BDNF'nin mRNA anlatımının vücuttaki fizyolojik ve patolojik durumlara göre değiştiği bilinmektedir (Castrén ve diğ., 1995). Örneğin yapılan bir çalışmada tip 2 diyabette BDNF düzeyinin azaldığı bildirilmektedir (Krabbe ve diğ., 2007, Gonzalez ve diğ., 2016).

Yapılan diğ er bir çalışmada d    k BDNF konsantrasyonlarının, diyabetteki bilişsel bozulma ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (Siresha ve diğ., 2017). Siresha ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, STZ ile uyarılarak tip 1 diyabet olan hayvanların plazma BDNF seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı, interlökin-6 (IL-6) ve TNF- 'nın ise anlamlı olarak yükseldiği ve nöron kayıplarının olduğu gösterilmiştir (Siresha ve diğ., 2017).

NeuN, 1992 yılında bir araştırma ekibinin şimdiye kadar bilinmeyen bu nüklear proteine karşı monoklonal antikorlar (A60 klonu) elde etmesi sonucunda keşfedilmiştir (Mullen ve diğ., 1992). NeuN proteini, memelilerin merkezi sinir sisteminde bulunan nöronların çoğunun nukleuslarında ve perin klear sitoplazmalarında bulunmaktadır.

Yapılan immünohistokimyasal ( HC) analizlerde, NeuN proteininin ekspresyonunun yalnızca sinir dokusu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bazı nöron türlerinde NeuN immünoreaktivitesinin eksikliğinin arkasındaki nedenler hala belirlenememiştir. NeuN, glial hücrelerde hiçbir zaman tespit edilmemiştir, bu verilerle birlikte NeuN'nin spesifik bir nöronal belirteç olduğu kabul edilmiştir (Guselnikova ve Korzhevskiy, 2015). Daha sonra yapılan çalışmalarda, anti-NeuN antikorlarının, bazı istisnalar dışında sinir sistemindeki birçok nöron tipini tanımlayabildiği gösterilmiştir (Cannon ve Greenamyre, 2009). Neokorteksteki Cajal-Retzius hücreleri, bazı serebellar hücreler (Purkinje hücreleri d hil), retinanın i  nüklear tabakasının hücreleri, omurilikteki gama ( )-motor nöronları ve sempatik zincirin ganglion hücrelerinin NeuN antikorları ile immünohistokimyasal olarak pozitif reaksiyon vermediği gösterilmiştir (Kumar ve Buckmaster, 2007).

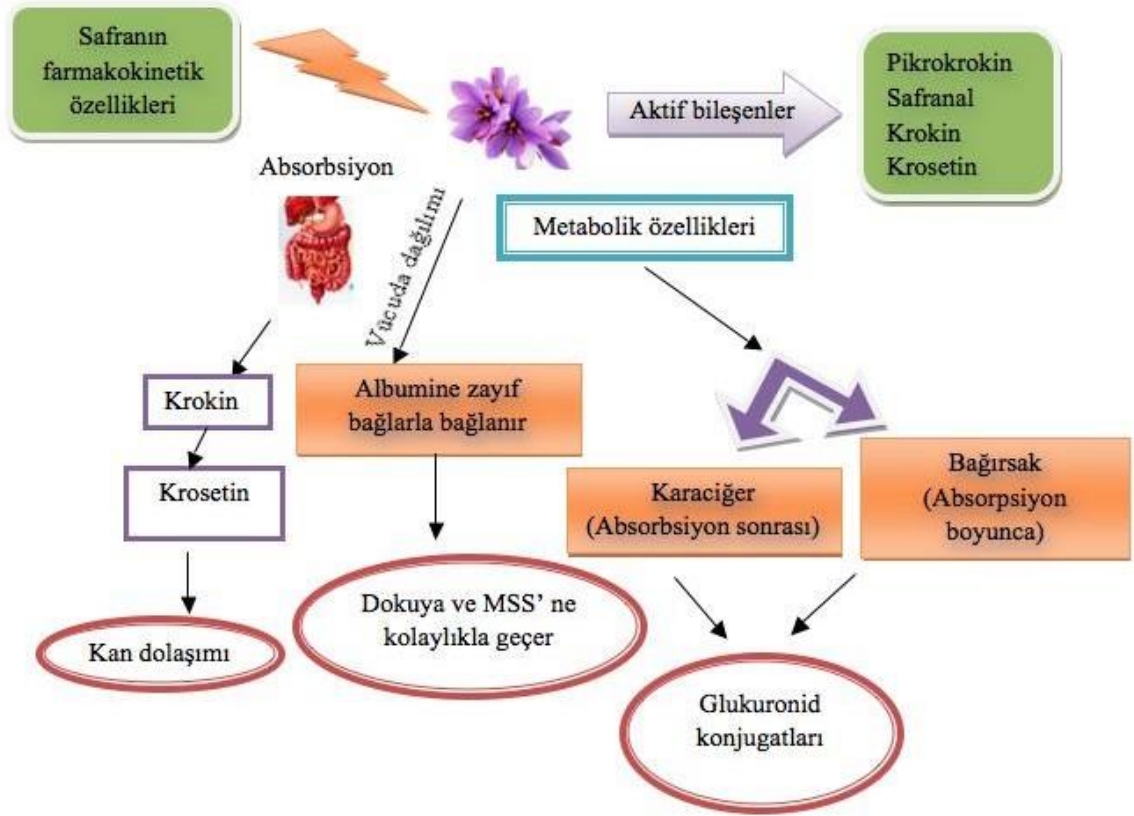
NeuN proteininin nöronal farklılaşma belirteci olarak kullanılmasının birçok avantajı vardır. İlk olarak, NeuN proteini sadece sinir dokusunda bulunurken, diğ er nöronal farklılaşma proteinleri diğ er hücrelerde de bulunmaktadır (Sarnat ve diğ., 1998). Örneğin, mitojenle aktive olan protein kinaz-2 (MAP-2) sadece nöronlarda değil iskelet kaslarında ve epitel hücrelerinde de eksprese edilmektedir (Korzhevskii ve diğ., 2014). İkinci olarak, NeuN, hücre döngüsünün dışında olmadıkları sürece olgunlaşmamış nöral progenitör hücrelerde bulunmamaktadır (Wolf ve diğ., 1996; Weyer ve Schilling., 2003).

2.6. SAFRAN VE B LEŐENLERİNİN F ZYOLOJİK ETK LER 

Crocus sativus (safran),  ridaceae ailesine ait çok yıllık bir bitkidir. Safran, renk ve tat için yaygın olarak kullanılan bir gıda maddesidir ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere

çeşitli hastalıkları tedavi etmek için modern tıbbın yanı sıra geleneksel olarak da tamamlayıcı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Razavi ve Hosseinzadeh, 2017).

Fitokimyasal çalışmalar safranin krokin, krosetin, pikrokrosin ve safranal içeren en az dört aktif bileşenden oluştuğunu bildirmektedir (Hossein ve diğ., 2018). Safranin karotenoidleri oksijene, ışığa, ısıya ve enzimatik oksidasyona duyarlıdır. Bu nedenle safran kalitesi için bu faktörlerin düzenlenmesi gerekmektedir (Hossein ve diğ., 2018). 150'den fazla safran kimyasalı arasında biyolojik olarak en aktif bileşenler, krokin ve krosetin içeren iki karotenoiddir. Farmakokinetik çalışmaların çoğu bu bileşiklerle ilgilidir.



Şekil 2.6: Safranin farmakokinetik etkileri (Hossein ve diğ., 2018).

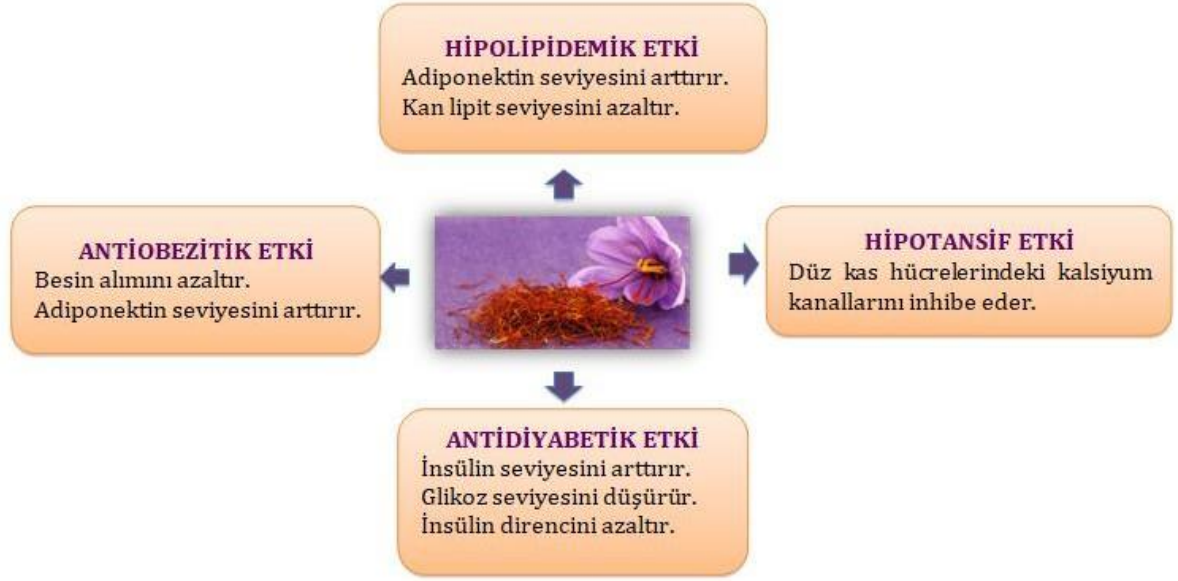
Safranin rengi, krosin ve krosetin varlığıyla ilgilidir. Krokinin yapısındaki glikozilin varlığı suda yüksek oranda çözünbilmesini sağlar (Alavizadeh ve Hosseinzadeh, 2014). Safranin acı tadı pikrokrosinlerden kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler uçucu yağ olan ve safran kokusuna neden olan safranala dönüştürülür (Rios ve diğ., 1996; Rezae ve diğ., 2013). Ayrıca çalışmalar

safranda karbonhidratlar, proteinler, antosiyaninler, flavonoidler, vitaminler (özellikle riboflavin ve tiamin), aminoasitler, mineral maddeler, zamklar ve diğer birçok kimyasal bileşiğin varlığını bildirmiştir (Giaccio, 2004).

Crocus sativus'un kurutulmuş stigmasından elde edilen krokinin doğal karotenoid grubuna ait olduğu bilinmektedir. Koyu kırmızı bir renge sahiptir, erime noktasında (186⁰C) kristaller oluşturur ve suda kolayca çözünür. Krokinin oral yoldan absorbe edilmediği ve bağırsak abrosbsiyonu süresinde krosetine hidrolize olduğu ve absorbe edilen krosetinin mono ve diglukuronid konjüгатlarına metabolize edildiği bildirilmektedir (Asai ve diğ., 2005).

Farmakokinetik çalışmalar, krokinin kan dolaşımında oral uygulamadan sonra mevcut olmadığını göstermiştir. Krokinin bağırsakta krosetine dönüştürüldüğü ancak intravenöz (i.v.) enjeksiyondan sonra plazmadaki krosetin seviyesinin düşük olduğu bildirilmektedir (Hossein ve diğ., 2018). Ayrıca krokinin kan-beyin bariyerini aşabildiği ve pasif transselüler difüzyon yoluyla merkezi sinir sistemine ulaşabildiği, bu nedenle nörodejeneratif bozukluklarda etkili olabildiği yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (Hossein ve diğ., 2018).

Bir gıda boyası ve aromatik baharat olmasının yanı sıra safran, tarihsel olarak terapötik bir ajan olarak kullanılmıştır; eski belgelerde Avicenna gibi bilim adamları, safranın güçlü terapötik özelliklerini vurgulamışlardır (Hosseinzadeh ve Nassiri - Asl, 2013; Javadi, ve diğ.,2013). Safranın aktif etken maddelerinin, antioksidan (Nikbakht-Jam ve diğerleri, 2015; Rahiman ve diğ., 2018; Yaribeygi, Mohammadi, Rezaee ve Sahebkar, 2018), antiinflamatuvar, (Yaribeygi, Mohammadi ve Sahebkar, 2018), bellek artırıcı (Abe & Saito, 2000; Ghadrdoost ve diğ., 2011), antitümöral (Hoshyar ve Mollaei, 2017; Moradzadeh ve diğ., 2018), antidepresan (Jam ve diğerleri, 2017; Lopresti & Drummond, 2014; Shafiee ve diğ., 2017), astım önleyici (Javadi ve diğ., 2017), öksürük kesici (El-Alfy, 2017), kardiyovasküler koruma (Hatziaapiou ve Lambrou, 2018; Sobhani ve diğ., 2017), nörolojik koruma (Wang ve diğerleri, 2015), görsel fonksiyonu geliştirici (Liou ve diğerleri, 2018; Riazi ve diğerleri, 2017) ve cinsel davranış güçlendirici etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Malviya ve diğ., 2016; Sadoughi, 2017).



Şekil 2.7: Safranın fizyolojik etkileri (Razavi ve Hosseinzadeh, 2017).

Safran'ın aktif bileşenlerinin, transkripsiyon faktörlerini, büyüme faktörlerini ve çeşitli hücre içi sinyal yollarını etkileyerek moleküler mekanizmaları değiştirebileceği bildirilmektedir (Samarghandian ve diğ., 2016; Yang ve diğ., 2017; Yaribeygi, Atkin ve Sahebkar, 2018). Ayrıca yapılan çalışmalarda safran ve biyoaktif bileşenlerinin güçlü hipoglisemik etkileri gösterilmiştir (Shirali, ve diğ., 2013). Safran ve bileşenlerinin hiperglisemi kaynaklı patofizyolojik moleküler yolların inhibe edilmesiyle diyabetik komplikasyonları önleyebildiği son yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (Yaribeygi, Mohammadi, Rezaee ve Sahebkar, 2018; Yaribeygi, Atkin ve Sahebkar, 2018). Safran'ın plazma glikoz ve insülin seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü ve serum glisemik profilinde düzelme sağladığı bildirilmektedir (Arasteh ve diğerleri, 2010). Safranın insülin direncinde ve diyabetin gelişiminde rol oynayan inflamatuvar aracılardan regülasyonu ile inflamasyona bağlı insülin direncini önlediği bildirilmektedir (Samarghandian ve diğerleri, 2016; Yaribeygi, Mohammadi, Rezaee ve Sahebkar, 2018).

Krokin, insüline bağımlı dokularda insülin duyarlılığının uyarılması yoluyla hipoglisemik etkilerini sergilemektedir (Kang ve diğ., 2012). Xi ve arkadaşları (2007) yaptıkları bir çalışmada diyabetik sıçanlarda safranın bir başka bileşeni olan krosetin tedavisinin, hem protein hem de mRNA seviyesinde beyaz adipositlerde adiponektin, TNF- α ve leptin ekspresyonunun regüle edilmesiyle insülin duyarlılığını arttırdığı bildirilmektedir (Xi, ve diğ., 2007). Krokinin

plazmada TNF- α ve interlökin 1 β (IL-1 β), pankreatik dokularda TNF- α ve interferon- γ seviyelerini baskılayarak insülin duyarlılığını iyileştirdiği bildirilmektedir (Hazman ve diğ., 2016).

Etanol uygulanarak hasar oluşturulan sıçanlara krokin uygulanmasıyla etanolün hipokampüsdeki uzun süreli potansiyasyon üzerindeki inhibe edici etkisinin engellendiği bildirilmektedir (Abe ve Saito, 2000). İnsülin eksikliğinin; beyin insülin sinyalizasyonunda azalmaya neden olduğu ve diyabetin etkilediği bilişsel eksikliklere katkıda bulunduğu bilinmektedir (Jolivalt ve diğ., 2008).

Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada STZ ile uyarılan diyabetik sıçanların hipokampüslerinde nöronal çoğalma ve sağ kalımlarında azalma olduğu belirtilmektedir (Zhao ve diğ., 2004). Krokin uygulamasının STZ ile uyarılan diyabetik sıçanların hipokampal nöronların sayısındaki azalmayı önlediği ve 15-30 miligram/kilogram/intraperitoneal (mg/kg/ip) krokin uygulandığında öğrenme-hafıza bozulmalarında iyileştirici olduğu Morris'in su labirenti testinde gösterilmiştir (Esmaeal ve diğ., 2013). Bir başka çalışmada ise krokinin kronik stresle uyarılan beyin bölgesi hipokampüste oluşan oksidatif stresi önleyerek öğrenme-hafıza bozukluklarını iyileştirmede etkili olduğu belirtilmektedir (Ghadroost ve diğ., 2011).

Beyin iskemi/reperfüzyon hasarından sonra 10 gün boyunca 40 mg/kg/oral krokin uygulamasının oksidatif ve apoptotik parametreleri bazal değerlere düşürdüğü gösterilmiştir (Oruc ve diğ., 2016). Bir başka çalışmada krokinin beyin hücrelerini koruyan, amiloid- β ve tau proteini birikimini düzenleyen, bilişsel ve hafıza bozulmalarını iyileştiren çok yönlü etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir (Finley ve Gao, 2017). Krokinin antioksidan özelliklere ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Nam ve diğ., 2010; Ochiai ve diğ., 2004; Pham ve diğ., 2000). STZ ile uyarılan diyabetik sıçanlarda, krokinin (50 ve 100 mg/kg/ip) antioksidan etkisiyle serum glikoz ve ileri glikasyon son ürünlerinin düzeyini önemli ölçüde azalttığı belirtilmektedir (Shirali ve diğ., 2013). Başka bir çalışmada ise, STZ ile uyarılan diyabetik sıçanlara 6 haftalık krokin (60 mg/kg/ip) uygulanmasının kan glikoz düzeyini önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (Rajaei ve diğ., 2013).

Krokinin nöroprotektif ve antihiperglisemik etkilere sahip olmasından yola çıkarak; STZ ile uyarılan diyabetik sıçanlarda hafıza eksiklikleri ve öğrenme sürecinde değişiklik gösteren moleküller olan NeuN ve BDNF üzerine krokinin etkisini, kan glikoz düzeyi ile insülin düzeyi

üzerine olan etkisini ve oksidatif hasar belirteçlerini nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık. Ayrıca hipokampusun CA1, CA3 ve DG bölümlerindeki hücrelerde diyabetin meydana getirdiği değişiklikleri nissl boyama yöntemi ile inceleyerek krokinin nasıl bir etkide bulunduğunu göstermeyi amaçladık. İmmunohistokimyasal olarak hipokampus bölümlerindeki NeuN dağılımlarını inceleyerek diyabet olarak geçirilen sürenin ve krokin uygulamasının NeuN üzerine olan etkisini görmeyi amaçladık. Elde edilen sonuçlar krokinin diyabet modelindeki bilişsel eksiklikler ve hafıza üzerine olan etkisini moleküler olarak açıklanmasına katkıda bulunacaktır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI

Bu çalışmada, 3 aylık yetişkin, ağırlıkları 270-320 gram (g) arasında değişen 44 adet erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Hayvanların her biri deney öncesinde ve deney süresince, kontrollü çevresel koşullar altında (12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü ve 22-240C oda ısısı), plastik kafeslerde tutularak, su ve besin kısıtlamasına gidilmeksizin standart pelet yem ve musluk suyu ile beslendiler. Sıçanların düzenli olarak günlük bakımı yapıldı. Deneyler, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu yönergelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Tarih: 22.06.2017, Sayı:141).



Şekil 3.1: Deney hayvanlarının barındırılması ve bakıma ait fotoğraf.

3.2. DENEYSEL UYGULAMALAR

Deneye başlamadan önce tüm gruplara ait hayvanların ağırlıkları ölçülerek, ağırlıkları birbiri ile paralel olacak şekilde 4 grup oluşturuldu. Tüm deneysel uygulamalar, 10.00-12.00 saatleri arasında gerçekleştirildi.

1. Kontrol Grubu (n=11): 11 adet sıçandan oluşan bu gruba deneyin ilk günü ve 4.günden itibaren 21 gün boyunca her gün 0,5 mililitre (ml)/kg/i.p. fizyolojik tuzlu su (FTS, %0.09) verildi.

2. Diyabet Grubu (n=11): 11 adet sıçandan oluşan bu gruba STZ 65 mg/kg/i.p. olacak şekilde 0.1 molar(M) sitrat tamponunda (pH:4.5) çözündürülerek tek doz olarak ilk gün uygulandı. Hayvanlara 4. günden itibaren 21 gün boyunca her gün 0,5 ml/kg/i.p. FTS enjeksiyonu yapıldı.

3. Krokin Grubu (n=11): 11 adet sıçandan oluşan bu gruba deneyin ilk günü tek doz 0,5 ml/kg/i.p. FTS ve 4.günden itibaren 21 gün boyunca her gün krokin serum fizyolojik suda çözündürülerek 0.5 ml'de 50 mg/kg/i.p. olacak şekilde enjeksiyonla uygulandı.

4. Tedavi Grubu (n=11): STZ grubunda olduğu gibi diyabetik hale getirilen 11 adet sıçana deneyin ilk günü tek doz 65 mg/kg/i.p. STZ ve 4. günden itibaren krokin 21 gün boyunca her gün serum fizyolojik suda çözündürülerek 0.5 ml'de 50 mg/kg/i.p. olacak şekilde verildi.



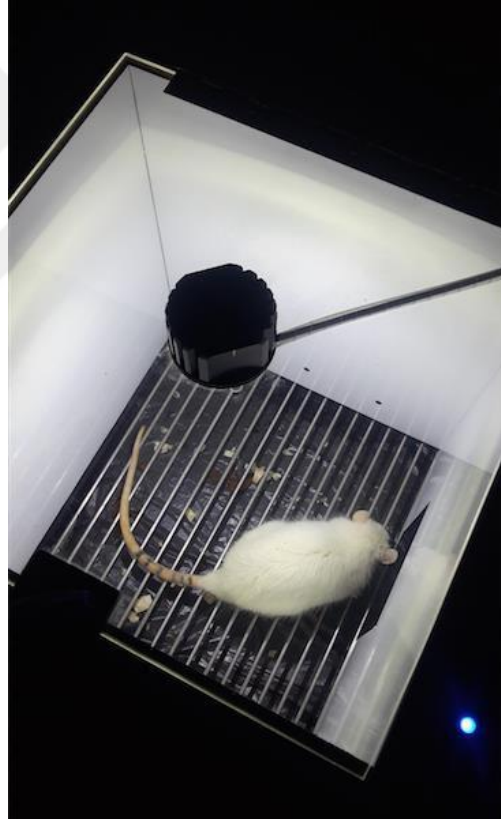
Şekil 3.2: Deney prosedürü şeması.

Tüm gruplardaki sıçanların 1. gün, STZ enjeksiyonundan sonraki 3. gün, 15. gün ve deneyin son günü olmak üzere toplam 4 kez kan şekeri ve ağırlıkları ölçüldü. STZ uygulanmasından sonraki üçüncü günde kuyruk veninden alınan kanda glukometre cihazı (Lifescan, One Touch Select) ile glikoz düzeyi ölçüldü ve glikoz seviyesi 180 miligram/desilitre (mg/dl)'yi geçen sıçanlar, diyabetik olarak kabul edildi.

3.3 PASİF SAKINMA TESTİ

Pasif kaçınma, zararlı bir uyaran ile ilişkili bağlamsal belleği ölçmeye dayanan kısa ve uzun süreli hafızayı değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan korku güdülü testtir. Zararlı bir uyarının (ayak şoku) deneyimlendiği karanlık bir ortama girme latansını ölçer (Uzum ve diğ., 2010). Hipokampus bağlamsal bellekte önemli rol oynadığından hipokampal bölgelerin hasarı pasif sakınma testinde performansı düşürmektedir (Hirsh, 1974).

Pasif sakınma düzeneği aydınlık ve karanlık olmak üzere iki odadan oluşur ve odalar arası açılıp kapanabilen bir kapı ile birbirine bağlıdır. Karanlık odanın tabanında bulunan ızgara bir elektrik üretecine bağlıdır.



Şekil 3.3: Pasif Sakınma Testi.

Öğrenme için, sıçanlar aydınlık bölüme konulduktan 10 saniye sonra iki bölme arasındaki kapı açıldığında, sıçanların karanlığı tercih etmeleri nedeniyle sıçanlar karanlık bölüme geçerler, kapı kapanır ve 3 saniye süre ile 0,3 miliamper (mA) elektrik şoku verilir ve kapı açılır. Sıçanların aydınlık bölüme geçmeleri sağlanır.

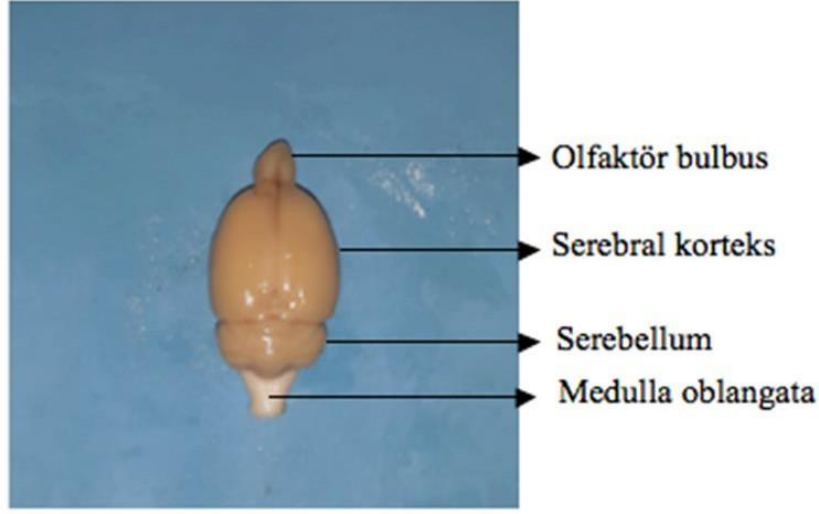
Sıçanların karanlık bölüme geçiş latansları kaydedildi. Hafıza testi için 1 saat (konsolidasyon)

ve 24 saat (uzun süreli hafıza) sonra aydınlık bölüme konulan sıçanların kapı açıldıktan sonra karanlık bölüme geçiş süreleri kaydedildi. Öğrenme konsolide edilip ve uzun süreli hafızaya aktarıldı ise aydınlık bölümde donma davranışı sergiledikleri ve karanlık bölüme geçemedikleri gözlemlendi. Aydınlık bölüme bırakıldıktan sonra 300 saniye süre ile beklendi. Karanlık bölüme girmediyse aydınlık bölümden alındı ve latans 300 olarak kaydedildi.

3.4 DENEYLERİN SONLANDIRILMASI

Tüm gruptaki hayvanlar 24. ve 25. günlerde kısa ve uzun süreli hafızayı değerlendirmek amacıyla pasif kaçınma testine tabi tutuldu. Deneyin 25. günü her gruptan 7 hayvan ketalar-hidroklorikasit (HCl) anestezisi altında kalplerinden kan alınıp hemen dekapite edildi. Kan örnekleri etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere konulduktan sonra 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Ependorflara alınan plazma örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Total beyin serebellum kısmından ayrıldıktan sonra serebral korteksin iç yüzeyinden hızla hipokampuslar çıkarıldı. Deney sonunda total beyinleri alındıktan sonra hipokampus dokuları ayrılarak biyokimyasal çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı. 4 hayvanın hipokampusu ise histolojik ve immunohistokimyasal çalışmalarda kullanılmak üzere önce sağ ventrikülünden iğne ucuna bağlı FTS ile perfüze etmeye başlandı ve sağ atriuma çentik atıldı. Daha sonra %4 formaldehit ile perfüzyon yöntemiyle fiksasyona devam edildi. Dokuların bu şekilde ön fiksasyonu sağlandıktan sonra %10 nötral formalinde son olarak fikse edildi.



Şekil 3.4: Total Beyin

3.5 HİSTOLOJİK ÇALIŞMALAR

Işık mikroskobu incelemeleri için her gruptan 4'er hayvanın beyinleri perfüzyon yöntemiyle kısmi olarak fikse edilerek alındı, %10'luk nötral formalinde hipokampusleri tespit edildikten 48 saat sonra, %70 alkole alındı ve alkol birkaç defa değiştirilerek fiksatifin dokulardan çıkması sağlandı. Daha sonra, yükselen alkol serilerinden geçirilerek ksilolde saydamlaştırılan dokular, 58°C' lik parafine gömüldü. Parafin bloklardan Cut-Slee 2125 mikrotomu aracılığı ile 5 µm kalınlığında alınan kesitlere histolojik boyalar uygulandı ve immunohistokimyasal yöntem çalışmalarında kullanılacak olan kesitler poli-L-lizin ile kaplı lamlara yapıştırıldı.

3.5.1 Nissl Boyama

Parafin bloklardan alınan 5 mikrometre (µm) kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon ile suya kadar indirildi. Kesitler daha önceden 37.5°C olacak şekilde ısıtılmış % 0.1'lik kristal viyole boyasında 30 dakika boyandı. Sonrasında yükselen alkol serisinden geçirilerek ksilolde saydamlaştırıldı ve entellan damlatarak lamlar kapatıldı.

Mikroskopta incelenen kesitlerde, incelenen alandaki hücreler ve koyu renkli boyanan hücreler sayılarak yüzde hesaplaması ile dejenere hücre yüzdesi belirlendi. İstatistiksel analizler sonucunda kontrol ve deney grupları arasında belirgin farklılıklar olduğu görüldü. Açık renkli olarak boyanan oval hücreler sağlıklı olarak kabul edildi. Koyu renkli olarak boyanan ve hücre

zar bütünlüğü ovalden büzülmüş şekile dönen hücreler dejenere hücreler olarak kabul edildi.

Kristal viyole boyasının hazırlanması: 0,1 g kristal viyole 100 ml saf su içinde 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ertesi gün üzerine 300 mikrolitre (µl) glisiyal asetik asit eklenerek 10 dakika boyunca karıştırıldı ve süzülerek karanlık ortamda saklandı.

3.6 İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Hipokampüsten alınan kesitlerde NeuN'nin varlığı ve dağılımları immünohistokimyasal yöntem ile incelendi. Bu amaçla alınan kesitler, bir gece 56 °C'de tutulduktan sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek suya kadar getirildi. Kesitler, sitrat tamponu (pH 6.0) içerisinde mikrodalgada 2x5 dakika kaynatıldıktan sonra, 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğuma işlemini takiben distile suya alınan kesitlerin etrafı pap pen ile işaretlendi. Endojen peroksidaz aktivitesi, %3 H₂O₂ (Lab Vision, TA-060-HP) ile 10 dakika oda sıcaklığında tutularak bloklandı. Kesitler, distile sudan geçirildikten sonra her birinde üç defa olacak şekilde fosfat tamponu (PBS)' nda 10'ar dakika yıkandı. Yıkamadan sonra kesitlere, oda sıcaklığında 10 dakika Ultra V (Lab vision, TA-60-UB) blok uygulandı. Antikorlar antikor sulandırıcısında (Lab vision, TA-125-UD) 1:100 oranında sulandırıldı. Daha sonra hipokampus kesitleri, rabbit anti-mouse NeuNantikorları (Cell Signaling Technology, 1:200) ile +4 °C'de 18 saat inkübe edildi. Kesitler, PBS'de yıkandıktan sonra biotinlenmiş goat anti-rabbit (Lab vision, TR-060-BN) ile oda sıcaklığında 30 dakika bırakıldı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere, 30 dakika streptavidin peroksidaz label reagent (Lab vision, TS-060-HR) uygulandı ve ardından kesitler PBS ile yıkandı. Beş dakika 3-amino 9-etil karbazol (AEC) (Lab vision, TA-004-HAC) inkübasyonu ile renkli reaksiyon ürünü sağlandı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra, Mayer hematoksislen ile zıt boyanma yapıldı ve su bazlı kapatıcı ile kapatıldı.

Kontrol ve deney hayvanlarının hipokampus kesitlerinde CA1, CA3 ve DG bölümlerindeki NeuN dağılımları incelenerek histolojik skor (H-Skor) yapıldı. H-Skor= S Pi (i + 1); i:pozitif reaksiyon şiddeti (yoğunluğu) değeri (3: güçlü pozitif reaksiyon, 2: orta şiddette pozitif reaksiyon, 1: az şiddette pozitif reaksiyon, 0: negatif reaksiyon), Pi ise reaksiyon veren hücre yüzdesidir. Elde edilen hipokampusün alt bölümlerindeki H-skor değerleri gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Kesitler Kameram 390CU sistemi ile fotoğraflandı.

3.7 BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

3.7.1 Doku Homojenizasyonu ve Fraksiyonların Ayrılması

Deney sonrasında tüm gruplara ait hipokampus örnekleri yaş olarak tartıldıktan sonra 1/10 (w/v) oranında nötral fosfat tamponu içinde sulandırıldı ve hızla parçalanarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar ependorflara alınarak soğutmalı santrifüjde 4 °C’de 6000 x rpm’de 20 dakika boyunca santrifüjlenerak süpernatant ve pelet olmak üzere 2 farklı fraksiyon elde edildi ve bu işlemlerin ardından, mikrotüplerdeki fraksiyonlar kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı.

Biyokimyasal çalışmalar immünoenzimatik yöntemle dayalı test kitleri (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) kullanılarak yapıldı. Hipokampus dokusu homojenatlarında ve kanda insülin düzeyi, endojen antioksidan düzeylerinin tespit edilmesi için SOD, öğrenme belirteçleri olarak NeuN ve BDNF düzeyleri, apoptotik yolak için sitokrom-c, inflamatuvar belirteç olarak TNF- α düzeyleri biyokimyasal olarak ölçüldü.

3.7.2 Hipokampus ve Plazma Örneklerinde İnsülin, SOD, BDNF, sitokrom-c, TNF- α ve NeuN Düzeylerinin Belirlenmesi

Yöntemde eliza kitlerinin (YL Bioassay Technology Laboratory, Shanghai) içerisinde bulunan 96 kuyucuklu ve ölçülecek parametreye özgül antikolar ile kaplanmış mikropalaklar kullanıldı ve aşağıdaki aşamalar her parametre için sırasıyla uygulandı.

- Deney kitinin içerisindeki standart solüsyonları mikropalaklar üzerindeki uygun kuyucuklara 50 μ l olacak şekilde konuldu.
- Mikropalaklar üzerindeki kuyucuklara sırasıyla homojenize edilen örnekler 40 μ l olacak şekilde eklendi.
- Standart kuyucukları hariç diğer kuyucuklara biyotinle konjuge edilmiş poliklonal antikor 10 μ l olacak şekilde ilave edildi.
- Kontrol kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara avidinle konjuge edilmiş yabanturpu peroksidaz (HRP) eklendi ve mikropalakların üzeri kapatılarak 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyondan sonra tüm mikropalaklar 5 kez 1 dk süreyle yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- İnkübasyondan sonra yine tüm kuyucuklara deney kitinin içerisindeki 50 µl A solüsyonu ve 50 µl B solüsyonu ilave edilerek 37 °C’de 10 dakika inkübasyon sağlanarak renk değişimi gözlemlendi.
- Oluşan reaksiyon, ortama 50 µl durdurma solüsyonunun eklenmesi ile sonlandırıldı ve mavi rengin sarıya döndüğü belirlendi.
- Son olarak mikropalakları kuyucukların içerisinde bulunan örnekler ve standartlar eliza okuyucusu ile 450±10 nm dalga boyunda ölçüldü.
- Elde edilen optik yoğunluk verileri standartlara ait optik yoğunluk ve konsantrasyon değerleri ile karşılaştırılarak örnekler için konsantrasyon değerleri belirlendi.

3.8 VERİLERİN ANALİZİ VE İSTATİSTİKLERİ

Elde edilen biyokimyasal ve immünohistokimyasal tüm veriler InStat İstatistiksel Paket Programı (InStat Graphad Software, San Diego, CA, SA) aracılığı ile analiz edildi. Grupların dağılımının normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben, plazma ve doku homojenitesi örneklerine ait sonuçlar ile immünohistokimyasal sonuçlar tek yönlü varyans analizi uygulanarak Bonferroni’nin çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Değerler, ± standart hata olarak verildi ve tüm analizlerde $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

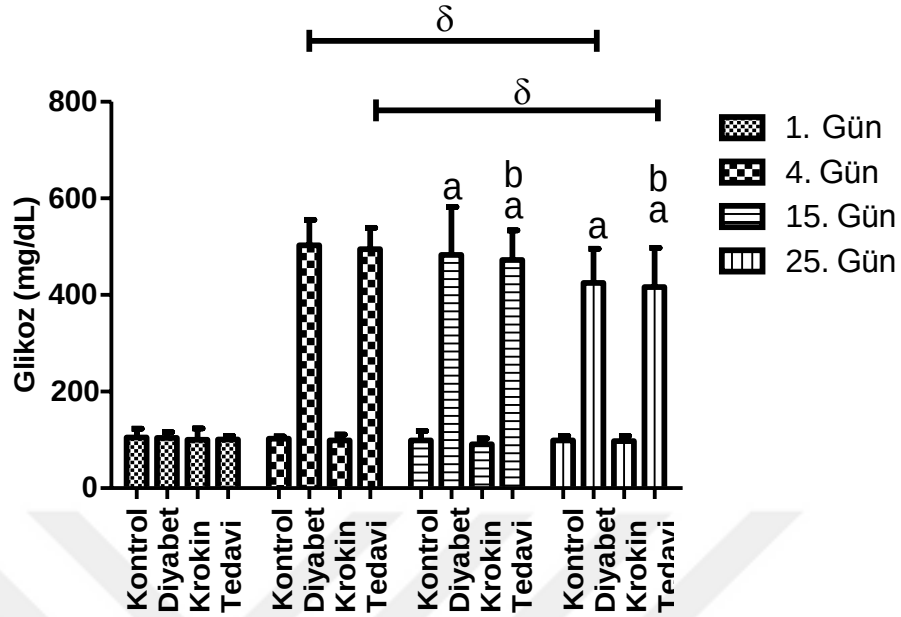
Çalışmamızda, 3 aylık yetişkin, ağırlıkları 230-330 g arasında değişen 44 adet erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Ağırlıkları birbiri ile paralel olarak oluşturulan tüm gruplardaki sıçanların 1. gün, STZ enjeksiyonundan sonraki 3. gün, 15. gün ve deneyin son günü olmak üzere toplam 4 kez kan glikoz değerleri ve ağırlıkları ölçüldü. Deney sonunda kan glikoz seviyelerinde ve ağırlıklarındaki değişiklikler karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

4.1. KAN GLİKOZ DEĞERLERİ

STZ ile diyabet oluşturulan hayvanların ve diyabet oluşturulduktan sonra krokin uygulanan hayvanların 4. gün, 15. gün ve 25. günlerde ölçülen kan glikozlarının kontrol grubundaki hayvanların aynı gün ölçülen kan glikoz değerlerine göre anlamlı olarak ($p<0,001$) yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.1).

Deneyin 15. gününde ölçülen kan glikoz düzeyleri değerlerine baktığımızda, diyabet ve tedavi grubundaki hayvanların kan glikoz değerlerinin kontrol grubundaki hayvanların kan glikoz değerlerine göre anlamlı olarak ($p<0,001$) arttığı tespit edildi. Krokin uygulanan gruptaki hayvanların kan glikoz değerlerinin ise diyabetik hayvanların kan glikoz değerlerine göre anlamlı olarak ($p<0,05$) azaldığı belirlendi (Şekil 4.1).

Deneyin 25. gününde ölçülen kan glikoz düzeylerine baktığımızda, diyabet oluşturulan hayvanların ve diyabet oluşturulduktan sonra krokin uygulanan hayvanların glikoz değerlerinin kontrol grubundaki hayvanların glikoz değerlerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Krokin uygulanan diyabetik hayvanların kan glikoz değerlerinin ise diyabetik hayvanların glikoz değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.1). 21 gün süren krokin uygulamasının kan glikoz değerlerini düşürücü etki gösterdiği belirlendi.

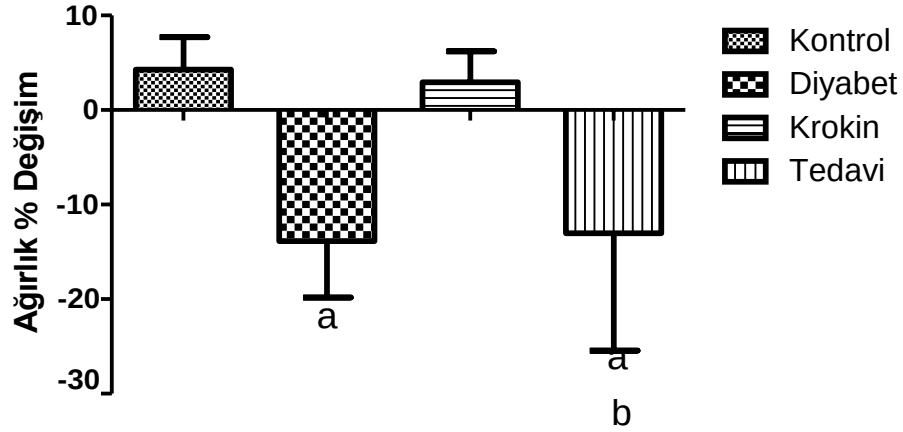


Şekil 4.1: Grupların 1., 4., 15. ve 25. günlerdeki glikoz değerleri ile glikoz değerlerinin 4. ile 25. ve 15. ile 25. günlerdeki gruplar arası karşılaştırılması. a kontrol grubuna göre anlamlılık $p < 0,001$, b diyabet grubuna göre anlamlılık $p < 0,05$, δ 4. Ve 25. Günler arasındaki anlamlılık $p < 0,05$.

4.3 HAYVANLARIN AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİ

Tüm gruplardaki hayvanların 1. Gün, 15. Gün ve 25.gün olmak üzere ağırlıkları ölçüldü. Yapılan bu ölçümlere göre kontrol grubundaki hayvanlarda deney başlangıcı ve deney sonu arasında $4,3 \pm 3,3$ oranında kilo artışı, krokin grubundaki hayvanlarda ise $2,8 \pm 3,3$ oranında kilo artışı olduğu görüldü (Şekil 4.2). Diyabet grubundaki hayvanların $13,8 \pm 5,9$ oranında kilo kaybettiği gözlenirken, tedavi grubundaki hayvanlarda ise $13,0 \pm 12,0$ oranında kilo kaybı olduğu belirlendi.

Diyabetik gruptaki hayvanların ve tedavi grubundaki hayvanların ağırlıklarının kontrol grubundaki hayvanların ağırlıklarına göre anlamlı olarak ($p < 0,001$) azaldığı belirlendi (Şekil 4.2). Diyabet oluşturulduktan sonra krokin uygulanan hayvanların ağırlıklarının diyabet grubundaki hayvanların ağırlıklarına göre anlamlı olarak ($p < 0,05$) daha az kilo kaybettiği tespit edildi (Şekil 4.2). 21 gün süren krokin uygulamasının vücut ağırlığı üzerinde arttırıcı etki gösterdiği belirlendi.



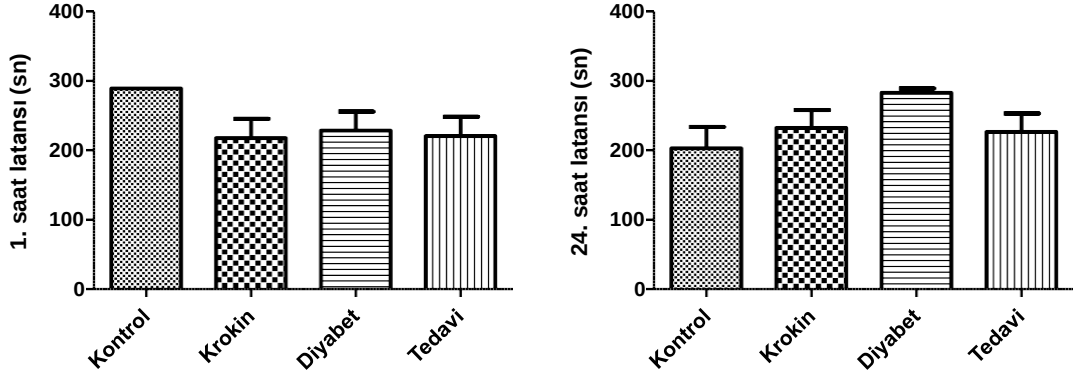
Şekil 4.2: Gruplar arası ağırlık yüzde değişimi grafiği. A kontrol grubuna göre anlamlılık ^a $p < 0,001$, b diyabet grubuna göre anlamlılık ^b $p < 0,05$.

4.4 PASİF SAKINMA TESTİ SONUÇLARI

Deney sonunda, STZ ile indüklenen diyabet modelinde ve krokin uygulanan hayvanların kısa ve uzun süreli hafızalarını belirlemek için pasif sakınma testi yapıldı, 1. saat ve 24. saat latanslarının gruplara göre karşılaştırılmasının sonuçları aşağıdaki grafiklerde verildi

Diyabet grubundaki hayvanlar öğrenme sürecinden 1 saat sonra, kısa süreli hafızayı değerlendirmek için aydınlık bölmeye koyulduğunda retansiyon latans sürelerinin kontrol grubu hayvanlarının 1 saat sonraki değerlerine göre azalma eğiliminde olduğu ancak anlamlı olmadığı tespit edildi. Benzer şekilde diyabet oluşturulduktan sonra krokin uygulanan grubun 1. saat latans değerlerinin diyabet grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

Uzun süreli hafızayı değerlendirmek için hayvanlar öğrenme sürecinden 24 saat sonra aydınlık bölmeye bırakıldığında diyabetik hayvanların retansiyon latans sürelerinin kontrol grubuna göre arttığı ancak anlamlı olmadığı tespit edildi. Diyabet oluşturulduktan sonra krokin uygulanan hayvanların 24. saat latans değerleri diyabet grubuyla karşılaştırıldığında bir azalma olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.



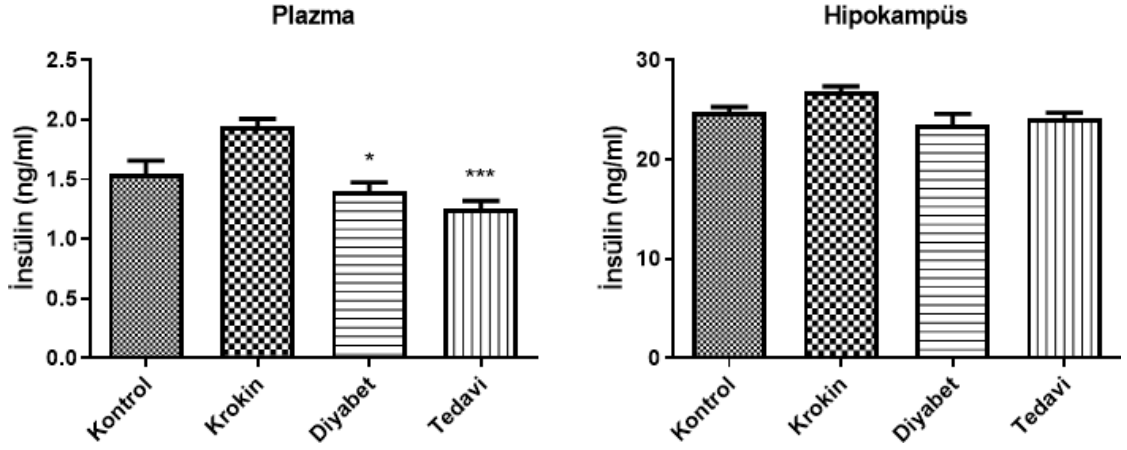
Şekil 4.3: Tüm grupların kısa süreli ve uzun süreli hafıza testi sonuçları.

4.4 BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.4.1 Hipokampus Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde İnsülin Düzeyleri

Plazma örneklerinde insülin düzeyleri incelendiğinde; diyabet ($p<0,05$) ve tedavi ($p<0,001$) gruplarındaki insülin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (Şekil 4.4). Diyabetik hayvanlara uygulanan krokinin ise insülin düzeyleri üzerine anlamlı bir etkiye neden olmadığı görüldü (Şekil 4.4).

Hipokampus doku homojenatı örneklerinde insülin düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.4). Krokin grubunun insülin düzeyinde kontrol grubuna göre artış olduğu ancak bu artışın anlamlı olmadığı belirlendi. Diyabetik hayvanlara krokin uygulamasının hipokampus insülin düzeylerine azaltıcı veya arttırıcı bir etki yapmadığı tespit edildi. Diyabet ve tedavi gruplarının insülin düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (Şekil 4.4).

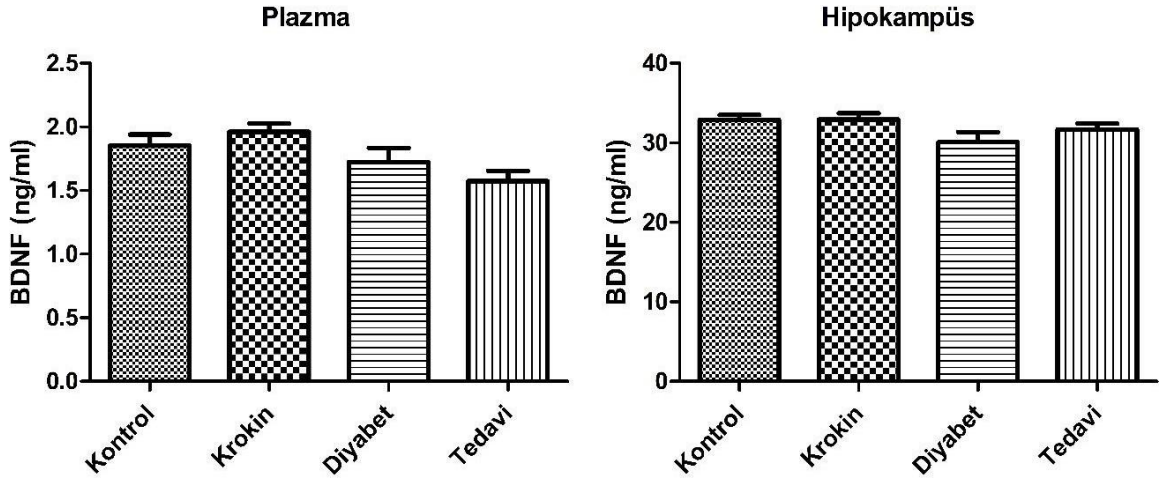


Şekil 4.4: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu insülin düzeyleri. * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (* $p<0,05$, *** $p<0,001$).

4.4.2 Hipokampus Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde BDNF Düzeyleri

Plazma örneklerinde BDNF düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.5). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diyabet grubunun BDNF düzeylerinin azaldığı ancak anlamlı olmadığı belirlendi. Diyabetik sıçanlara krokin uygulamasının diyabet grubuna göre plazma BDNF düzeyini azaltma eğiliminde olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edildi (Şekil 4.5).

Hipokampus doku homojenatı örneklerinde BDNF düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.5). Diyabet ve tedavi grupları hipokampus doku homojenatları örneklerinde BDNF düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik belirlenmedi (Şekli 4.5).

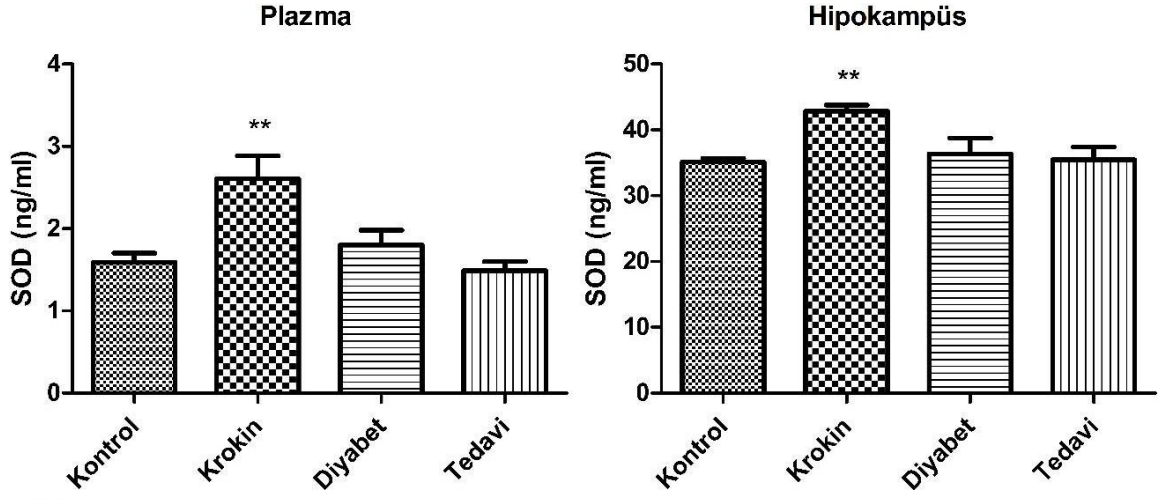


Şekil 4.5: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu BDNF düzeyleri.

4.4.3 Hipokampus Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde SOD Düzeyleri

Plazma örneklerinde SOD düzeylerinin krokin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı ($p<0,01$) belirlendi (Şekil 4.6). Diyabet grubu ile kontrol grubu SOD düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi. Diyabetik sıçanlara krokin uygulanmasının plazma SOD düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edildi (Şekil 4.6).

Hipokampus doku homojenatı örneklerinde kontrol grubuna göre krokin ($p<0,01$) grubunda SOD düzeyinin anlamlı derecede arttığı belirlendi (Şekil 4.6). Diyabetik sıçanlara krokin uygulaması hipokampus SOD düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı.

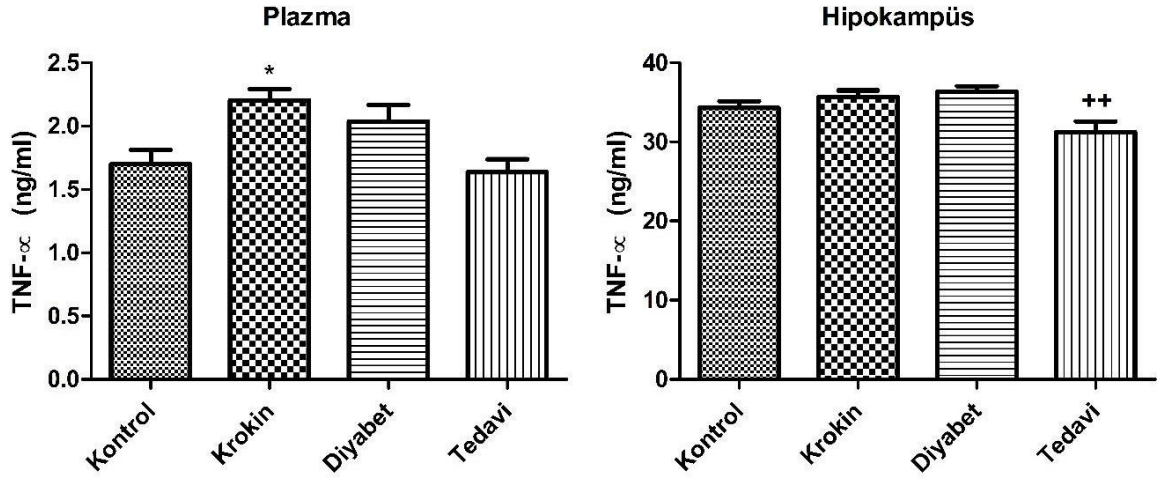


Şekil 4.6: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu SOD düzeyleri. * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (** $p<0,01$).

4.4.4 Hipokampus Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde TNF- α Düzeyleri

Plazma örneklerinde TNF- α düzeyleri incelendiğinde; krokin grubunun TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı ($p<0,05$) belirlendi (Şekil 4.7). Diyabet grubunun TNF- α düzeyleri de kontrol grubuna göre artış eğiliminde olmasına rağmen anlamlı olmadığı belirlendi. Diyabetik sıçanlara krokin uygulamasının plazmadaki TNF- α düzeyini azaltma eğiliminde olduğu ancak bu azalışın anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi (Şekil 4.7).

Hipokampus doku homojenatı örneklerinde TNF- α düzeyleri incelendiğinde; diyabet grubuna göre tedavi grubunun TNF- α düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı ($p<0,01$) belirlendi (Şekil 4.7).

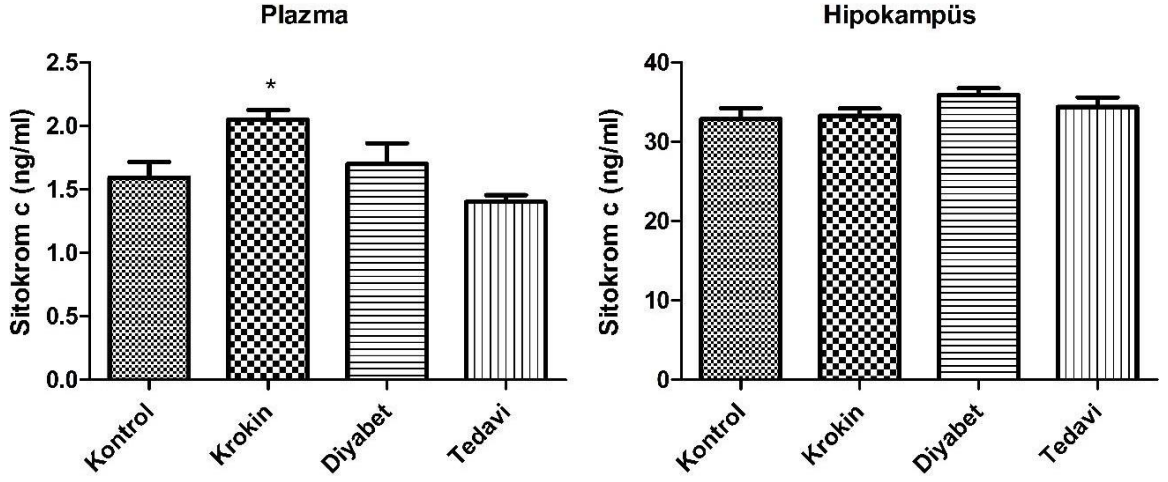


Şekil 4.7: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu TNF- α düzeyleri. * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.4.5 Hipokampus Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde Sitokrom-c Düzeyleri

Plazma örneklerinde sitokrom-c düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre krokin grubunun sitokrom-c düzeyinin anlamlı olarak arttığı ($p < 0,05$) belirlendi (Şekil 4.8). Kontrol grubuyla diyabet grubunun sitokrom-c düzeyleri karşılaştırıldığında diyabet grubunda bir artış olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Diyabetik sıçanlara krokin uygulamasının diyabet grubuna göre plazma sitokrom-c düzeyini azaltma eğiliminde olduğu ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı görüldü.

Hipokampus doku homojenatı örneklerinde sitokrom-c düzeyleri incelendiğinde kontrol, krokin, diyabet ve tedavi gruplarında anlamlı bir değişiklik görülmedi (Şekil 4.8). Diyabet grubunun sitokrom-c düzeylerinde kontrol grubuna göre artış eğilimi olduğu, tedavi grubunda ise diyabet grubuna göre azalma eğilimi olduğu ancak bu sonuçların anlamlı olmadığı belirlendi.

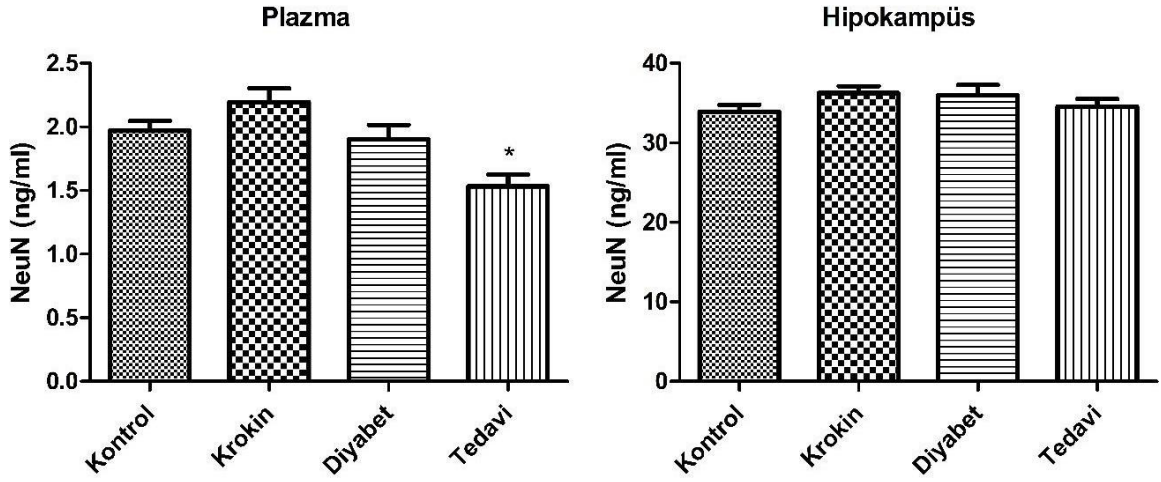


Şekil 4.8: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu sitokrom-c düzeyleri * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (* $p<0,05$).

4.4.6 Hipokampus Doku Homojenat ve Plazma Örneklerinde NeuN Düzeyleri

Plazma örneklerinde NeuN düzeyleri incelendiğinde; tedavi grubunun NeuN düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken ($p<0,05$), bu azalmanın diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı belirlendi (Şekil 4.9). Krokin grubunun plazma NeuN düzeyinin kontrol grubunun NeuN düzeyine göre artma eğiliminde olduğu ancak bu artışın anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.9).

Hipokampus doku homojenatı örneklerinde NeuN düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. (Şekil 4.9). Krokin grubunun NeuN düzeyinin kontrol grubunun NeuN düzeyine göre artma eğiliminde olduğu ancak bu artışın anlamlı olmadığı belirlendi.



Şekil 4.9: Gruplara ait plazma ve hipokampus dokusu NeuN düzeyleri.* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (* $p<0,05$).

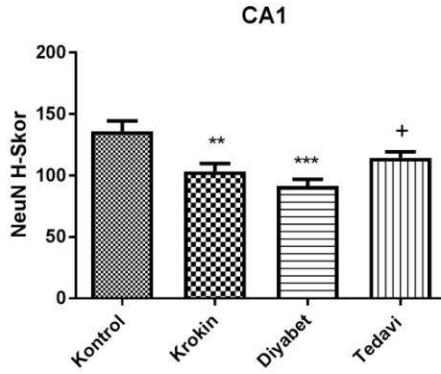
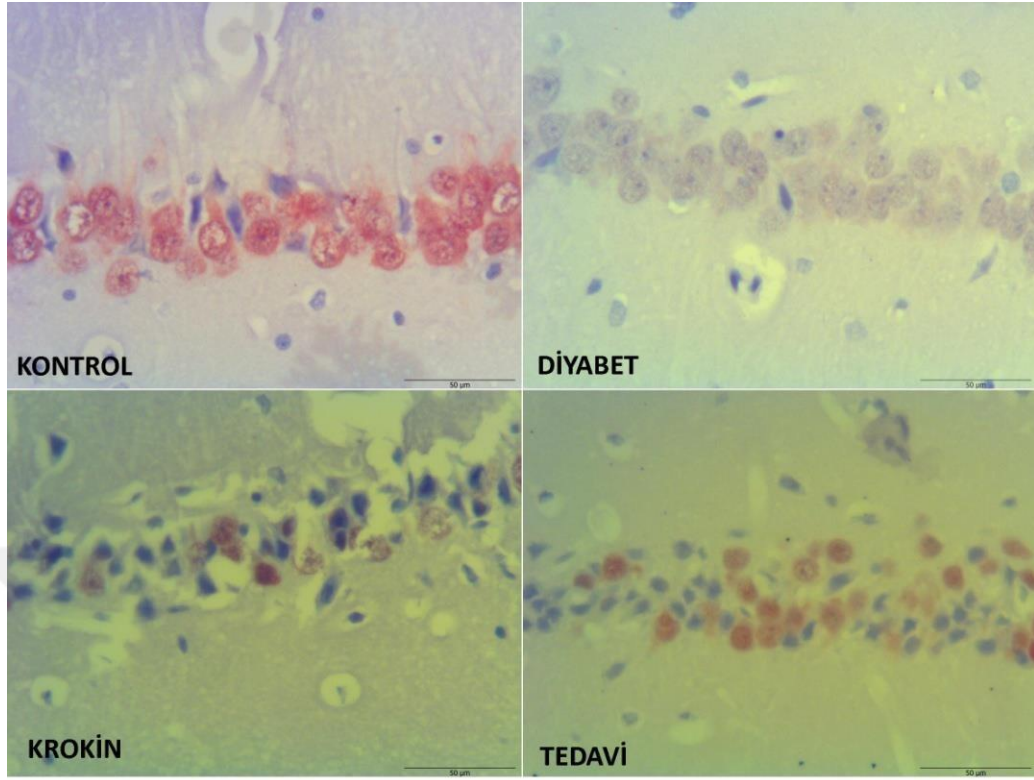
4.5 İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Hipokampusun CA1, CA3 ve DG bölgelerindeki NeuN dağılımları ve yoğunlukları incelenerek gruplar arası farklılıklar karşılaştırılarak istatistiksel değerlendirmeleriyle beraber verildi.

4.5.1 Hipokampus Dokusunun CA1 Bölgesinde NeuN Anlatımı

Hipokampus dokusundaki CA1 bölgesindeki NeuN pozitif reaksiyonu kontrol grubuna göre krokin ($p<0,01$) ve diyabet ($p<0,001$) gruplarında anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Diyabetik sıçanlara uygulanan krokin uygulaması sonucunda hipokampusun CA1 bölgesindeki NeuN anlatımının diyabet grubuna göre anlamlı olarak arttığı ($p<0,05$) ve kontrole yaklaştığı görüldü.

Hipokampusun CA1 bölgesindeki kesitleri mikroskopta incelediğimizde en yoğun NeuN anlatımının kontrol grubunda olduğu görüldü. Diyabet ve krokin grubunda ise NeuN anlatımlarının yoğunluğu kontrol grubuna göre azalmıştı. Tedavi grubunda ise NeuN anlatımının diyabet grubuna göre arttığı görüldü. Bu bulgulara göre sadece krokin uygulandığında NeuN anlatımlarını azaltıcı etki gösterdiği görülürken, diyabetik gruba krokin verildiğinde NeuN anlatımlarını arttırıcı etki gösterdiği tespit edildi.



Şekil 4.10: Hipokampus dokusunun CA1 bölgesinde NeuN anlatımı (Bar:50 µm) ve H-Skor değerleri.

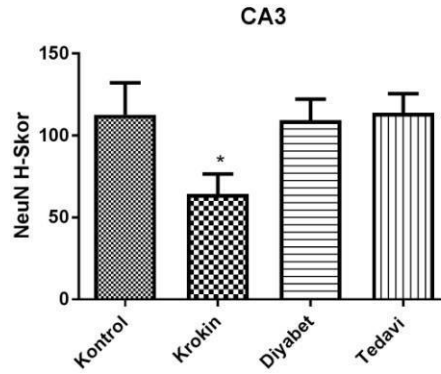
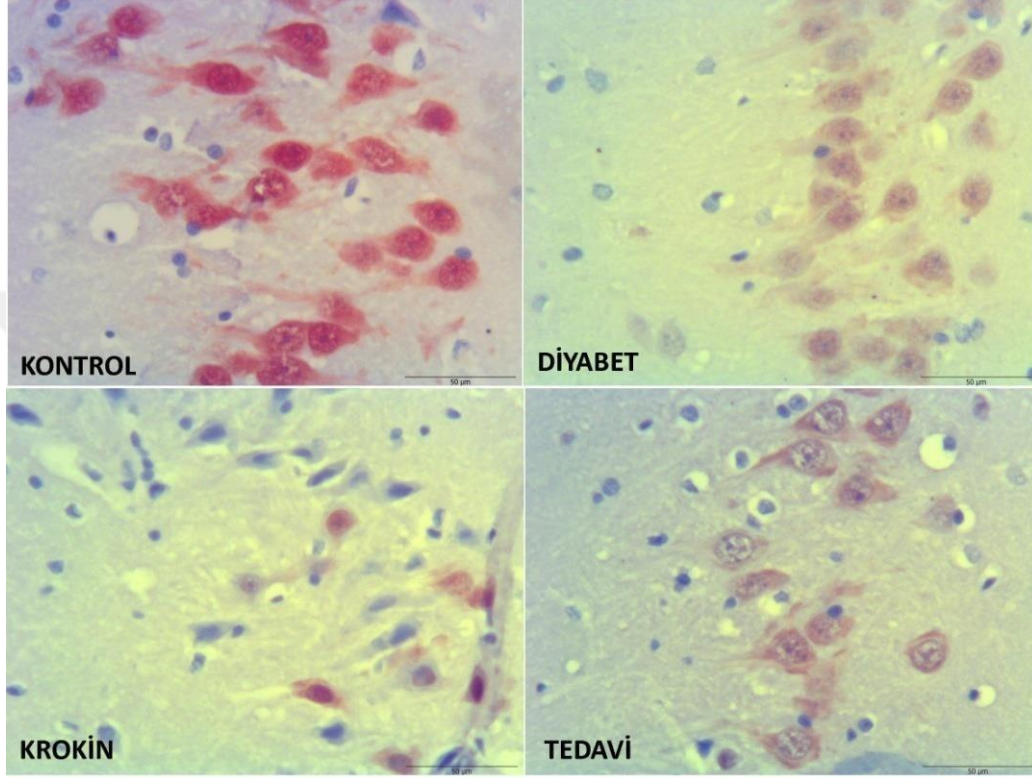
* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (** $p<0,01$, *** $p<0,001$), + Diyabet grubuna göre istatistiksel anlamlılık (* $p<0,05$).

4.5.2 Hipokampus Dokusunun CA3 Bölgesinde NeuN Anlatımı

Krokin uygulamasının hipokampus dokusunun CA3 bölgesindeki NeuN pozitif reaksiyonlarını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalttığı (* $p<0,05$) belirlendi (Şekil 4.11). Diyabetik sıçanlara uygulanan krokin uygulamasının hipokampus dokusunun CA3 bölgesindeki NeuN anlatımı üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı belirlendi (Şekil 4.11).

Hipokampusün CA3 bölgesindeki kesitleri mikroskopta incelediğimizde en yoğun NeuN

anlatımının kontrol grubunda olduğu görüldü. Krokin grubunda NeuN anlatımlarının yoğunluğunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü. Diyabet ve tedavi gruplarında ise hipokampüsün CA3 bölgesindeki NeuN anlatımlarının yoğunluğunun değişmediği belirlendi.



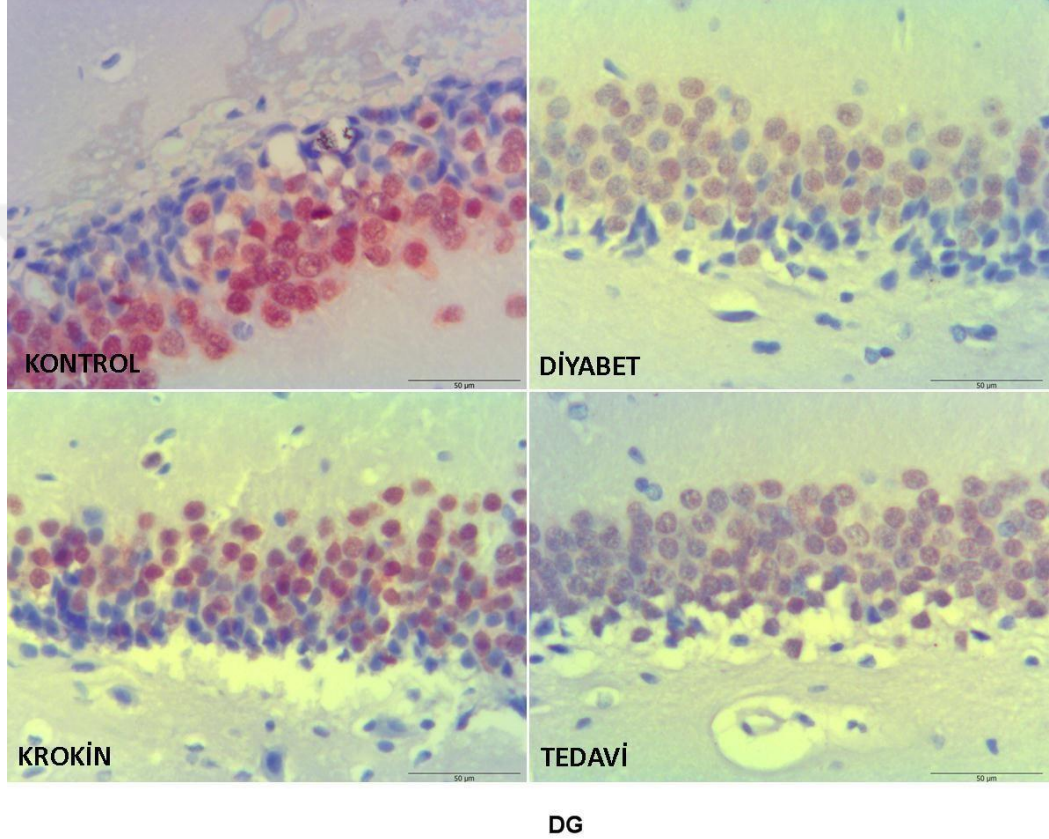
Şekil 4.11: Hipokampüs dokusunun CA3 bölgesinde NeuN anlatımı (Bar:50 µm) ve H-Skor değerleri.* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (* $p<0,05$).

4.5.3 Hipokampüs Dokusunun DG Bölgesinde NeuN Anlatımı

Krokin ve diyabet gruplarının hipokampüs dokularının DG bölgesindeki NeuN pozitif reaksiyonların kontrol grubuna kıyasla azalma eğiliminde olduğu ancak bu eğilimin anlamlı

olmadığı belirlendi (Şekil 4.12). Diyabetik sıçanlara krokin uygulamasının ise hipokampus dokusunun DG bölgesindeki NeuN anlatımlarını diyabet grubuna göre arttırma eğiliminde olduğu ancak bu eğilimin anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı belirlendi (Şekil 4.12).

Hipokampusun DG bölgesindeki kesitleri mikroskopta incelediğimizde gruplar arasında NeuN anlatımlarının yoğunlukları arasında bir farklılık görülmedi.



Şekil 4.12: Hipokampus dokusunun DG bölgesinde NeuN anlatımı (Bar:50 µm) ve H-Skor değerleri.

4.6 HİSTOLOJİK BULGULAR

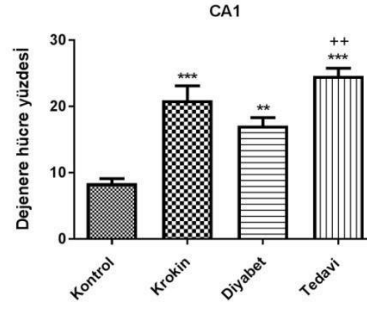
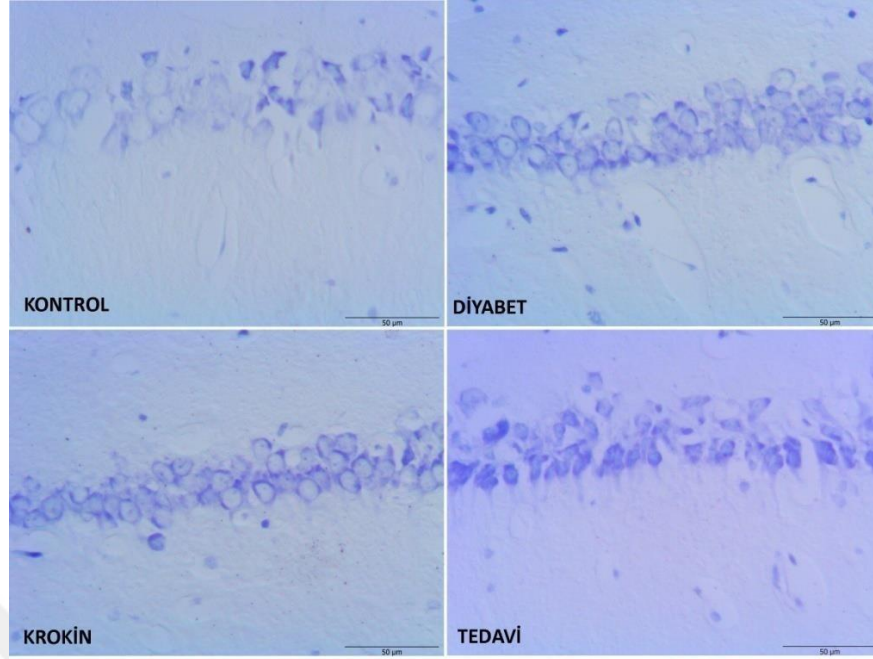
Kontrol ve deney hayvanlarının hipokampus dokularına Nissl boyama uygulandı ve tüm

gruplardaki hayvanların hipokampus kesitlerinde açık renk boyanan normal görünümlü hücrelerin olduğu tespit edildi. Diğer taraftan diyabetik hayvanların hipokampus kesitlerinde koyu renkli boyanan, koyu boyanmış ve büzülmüş hücrelerin bulunduğu gözlemlendi. Bu hücreler dejenere hücreler olarak kabul edildi.

4.6.1 Hipokampus Dokusunun CA1 Bölgesinde Nissl Boyama

Hipokampus dokusunun CA1 bölgesinde bulunan hücreleri incelediğimizde diyabet, krokin ve tedavi gruplarındaki dejenere hücre yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı ($p<0,001$) belirlendi (Şekil 4.13). Tedavi grubu ile diyabet grubu karşılaştırıldığında tedavi grubunun hipokampusunun CA1 bölümündeki dejenere hücre yüzdesinde diyabet grubuna göre anlamlı bir artış ($p<0,01$) tespit edildi (Şekil 4.13).

Hipokampus dokusunun CA1 bölgesinde bulunan hücreleri mikroskopta incelediğimizde kontrol grubundaki hücreler açık renkli ve oval şekilde olduğu görüldü. Diyabet, krokin ve tedavi grubundaki hücrelerde koyu renkli boyanan koyu boyanmış hücrelerin kontrol grubuna göre arttığı görüldü. Diyabetik gruba uygulanan krokinin hipokampusun CA1 bölgesindeki dejenere nöronların sayısını diyabet grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı görüldü (Şekil 4.13). Hem krokin grubundaki dejenere nöronların kontrole göre artmış olması hem de tedavi grubundaki dejenere nöronların diyabet grubuna göre artmış olması krokinin hipokampusun CA1 bölgesindeki dejenere nöron sayısını arttırdığını bize göstermektedir.

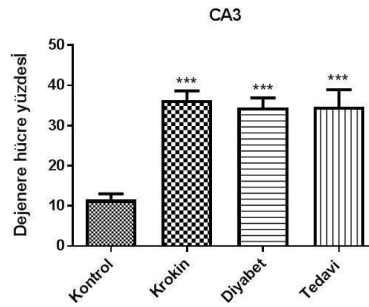
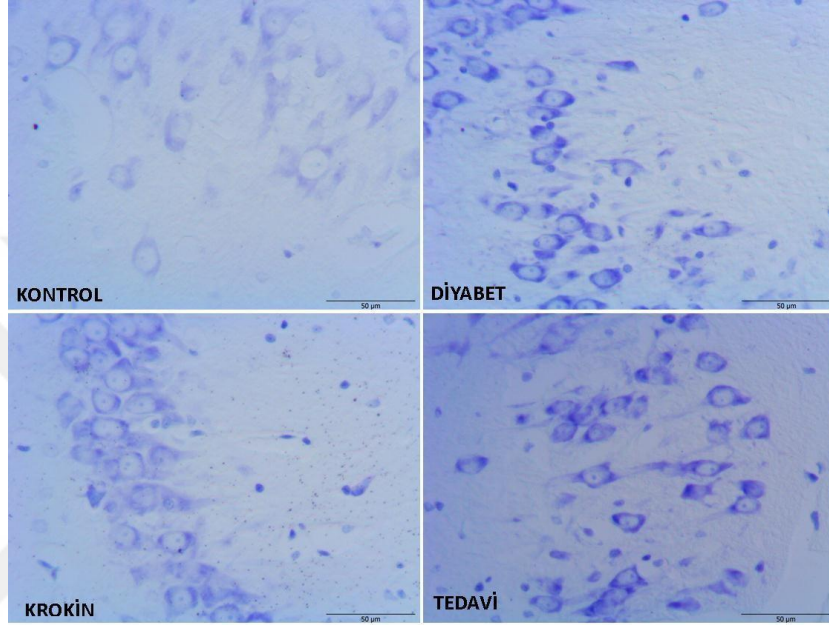


Şekil 4.13: Hipokampus dokusunun CA1 bölgesinde nissl boyama (Bar:50 µm) ve dejenere hücre yüzdesi, * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (** $p<0,01$, *** $p<0,001$), + Diyabet grubuna göre istatistiksel anlamlılık (** $p<0,01$).

4.6.2 Hipokampus Dokusunun CA3 Bölgesinde Nissl Boyama

Hipokampus dokusunun CA3 bölgesinde bulunan hücreleri incelediğimizde diyabet, krokin ve tedavi gruplarındaki dejenere hücre yüzdelерinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p<0.001$) arttığı belirlendi (Şekil 4.14). Diyabetik hayvanlara uygulanan krokinin, hipokampusün CA3 bölgesindeki dejenere hücre yüzdesi üzerine diyabetik hayvanlarla karşılaştırıldığında olumlu bir etki yapmadığı belirlendi (Şekil 4.14).

Hipokampus dokusunun CA3 bölgesinde bulunan hücreleri mikroskopta incelediğimizde kontrol grubundaki hücreler açık renkli ve oval şekilde olduğu görüldü. Diyabet, krokin ve tedavi grubundaki hücrelerde koyu renkli boyanan koyu boyanmış hücrelerin kontrol grubuna göre arttığı görüldü. Sadece krokin uygulanan hayvanların hipokampuslerinin CA3 bölgesinde dejenere nöronların kontrol grubuna göre ilginç bir şekilde arttığı belirlendi. (Resim 4.14).



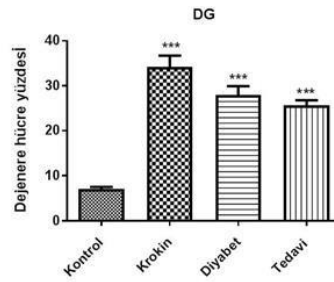
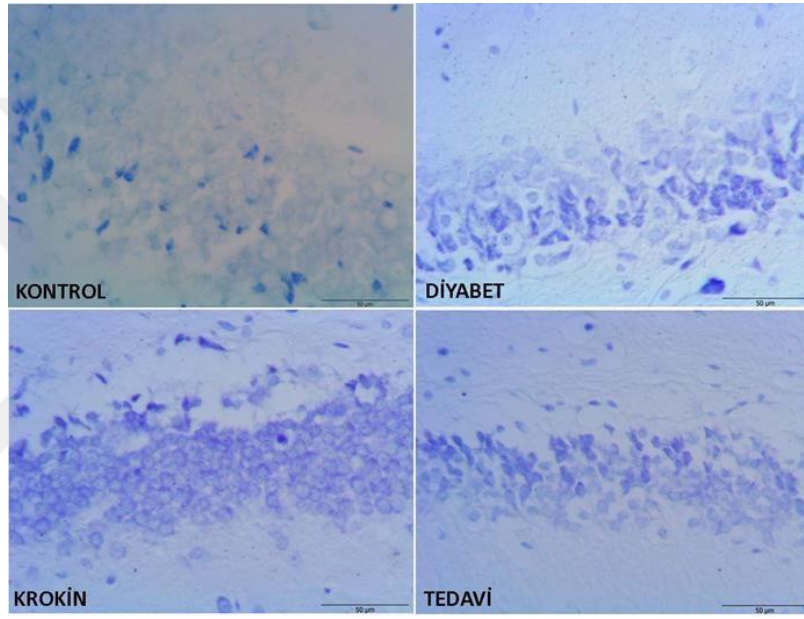
Şekil 4.14: Hipokampus dokusunun CA3 bölgesinde nissl boyama (Bar:50 µm) ve dejenere hücre yüzdesi, * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (***) $p<0,001$).

4.6.3 Hipokampus Dokusunun DG Bölgesinde Nissl Boyama

Hipokampus dokusunun DG bölgesinde bulunan hücreleri incelediğimizde diyabet, krokin ve tedavi gruplarındaki dejenere hücre yüzdelерinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı

($p<0,001$) belirlendi (Şekil 4.15). Diyabetik sıçanlara krokin uygulamasının, hipokampüsün DG bölgesindeki dejenere hücre yüzdesini etkilemediği tespit edildi (Şekil 4.15).

Hipokampüs dokusunun DG bölgesinde bulunan hücreleri mikroskopta incelediğimizde kontrol grubundaki hücreler açık renkli ve oval şekilde olduğu görüldü. Diyabet, krokin ve tedavi grubundaki hücrelerde koyu renkli boyanan koyu boyanmış hücrelerin kontrol grubuna göre arttığı görüldü. Sadece krokin uygulanan hayvanların hipokampüslerinin DG bölgesinde dejenere nöronların kontrol grubuna göre ilginç bir şekilde arttığı belirlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Hipokampüs dokusunun DG bölgesinde nissl boyama (Bar:50 µm) ve dejenere hücre yüzdesi. * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık (*** $p<0,001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturan sıçanlarda meydana gelen nöropatolojik değişiklikler üzerine krokinin etkisi araştırıldı. Tüm gruplardaki sıçanların glikoz seviyeleri ve ağırlıkları ölçüldü. Tüm gruplara kısa ve uzun süreli hafızayı değerlendirmek amacıyla pasif sakınma testi uygulandı. Hayvanların hipokampus homojenatları ve plazma örneklerinde SOD, insülin düzeyi, öğrenme ve hafıza için BDNF, NeuN, inflamatuvar süreçlerde önemli olan TNF- α , apoptotik yolakla ilgili olarak sitokrom-c düzeyi biyokimyasal yöntemle ölçüldü. Hipokampus dokusu Nissl boyası ile boyandı ve histolojik olarak incelendi. İmmunohistokimyasal olarak hipokampusun alt zonlarındaki NeuN anlatımı incelendi ve H-Skor yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirildi.

Dünya genelinde diyabetik hasta sayısının son 20 yılda iki katından fazla arttığı bildirilmektedir. Ayrıca son yıllardaki artışın istatistiksel olarak beklenilenden daha hızlı olarak arttığı görülmektedir ve diyabetik hasta sayısındaki artışın beklenenden daha da hızlı olacağı tahmin edilmektedir (Zimmet ve Alberti, 2016; Satman ve diğ., 2016). 1921 yılında, Frederick Grant Banting ve ekibinin insülini keşfetmeleri, diyabet hastalığının mekanizmasını ve tedavisini ortaya koyan önemli bir gelişme olmuştur (Gundoğan, 2001; Sanjeevi, 2001). Pankreastaki β hücrelerinden insülin sentezi ve salınımı kan glikoz düzeyindeki artış ile uyarılır. İntestinal hormonlar, lösin, arjinin gibi bazı aminoasitler ve sülfonilüre grubu bazı ajanlar da insülin sekresyonunu başlatabilir ama insülin sentezi üzerine etkileri olmadığı bilinmektedir (Sanjeevi, 2001).

İnsüline bağımlı diyabet oluşturmak için genellikle sıçanlarda 40-60 mg/kg i.v. STZ dozu kullanılmaktadır. Ayrıca çalışmalarda daha yüksek dozlar da tercih edilebilmektedir (Katsumata ve diğ., 1992). Başka bir çalışmada 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH: 4.5) içerisinde taze olarak hazırlanmış STZ çözeltisi (buzlu ortamda saklanmak koşuluyla) 65 mg/kg olacak şekilde (tek doz) periton içi yolla sıçanlara enjekte edilerek diyabet oluşturulmuştur (Tamer ve diğ., 1997; Benwahhoud ve diğ., 2001). Tip I diyabet oluşturmak için yetişkin sıçanlarda i.p. yoldan 40-60 mg/kg arasındaki bir değer tek doz kullanımının yeterli olduğu bildirilmektedir (Green ve diğ., 1996). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak deneysel Tip I diyabet modeli oluşturmak üzere daha önce de kullanmış olduğumuz 65 mg/kg tek doz i.p. STZ uygulandı ve başarılı bir şekilde diyabet oluşturuldu. Hiperglisemi, bilişsel işlev

bozukluğu da dahil olmak üzere diyabetik komplikasyonlara yol açar (Gocmez ve diğ., 2019). Çalışmamızda diyabet grubunda tek bir STZ enjeksiyonu sonrası kan glikoz seviyesinde önemli bir artış ortaya çıkmıştır. Bunun yanı sıra diyabet oluşturduğumuz hayvanların 4. gün, 15. gün ve 25. günde ölçülen kan glikoz değerlerinin kontrol grubundaki hayvanların aynı gün ölçülen kan glikoz değerlerine göre anlamlı olarak yüksek olması daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu ve beklediğimiz bir sonuçtu.

Yapılan çalışmalarda safran ve aktif bileşenlerinin hipoglisemik ve antidiyabetik etkilerinin olduğu belirtilmektedir. Örneğin, safran'ın hidroetanolük ekstratının (50 mg/kg) sağlıklı erkek sıçanlara 1 haftalık uygulanmasıyla serum glikoz düzeyini önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiş ve safran ekstraktının sağlıklı erkek sıçanlarda hipoglisemik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Arasteh ve diğ., 2010). STZ ile uyarılan diyabetik sıçanlara 6 hafta krokin (50 ve 100 mg/kg/ip) uygulanması ile plazma glikoz ve ileri glikasyon son ürünlerinin düzeyini önemli ölçüde azalttığı (Shirali ve diğ., 2013); başka bir çalışmada ise STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlara 6 haftalık krokin (60 mg/kg/ip) uygulamasının kan glikoz düzeyini önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir (Rajaei ve diğ., 2013). Bizim çalışmamızda da diyabetik sıçanlara dördüncü günden itibaren yirmi bir gün süresince krokin (50 mg/kg/ip) uygulaması sonucunda 15. gün ve 25. günde ölçülen glikoz değerlerinin, diyabetik hayvanların glikoz değerlerine göre anlamlı olarak azalmış olması krokinin hipoglisemik etkilerini desteklemektedir ve sonuçlarımız diğer literatürlerle de uyumludur (Arasteh ve diğ., 2010 Shirali ve diğ., 2013; Rajaei ve diğ., 2013).

STZ ile oluşturulan diyabetik hayvanlarda kilo kaybı, hiperglisemi ve nöroendokrin işlev bozukluğu gibi diyabetik belirtilerin ortaya çıktığı bildirilmektedir (Kuhad ve Chopra, 2008; Papovic ve diğ., 2001). Deneyin son günü yapılan ağırlık ölçümleri gözönüne alınarak hayvanların ağırlıkları deney süresinin sonunda kontrol (% 4,3±3,3) ve krokin (% 2,8±3,3) gruplarında artarken; diyabet (%13,8±5,9) ve tedavi (%13,0±12,0) gruplarında diyabete bağlı olarak azalmıştı. Diyabet grubunda görülen ağırlık kaybı diyabetin komplikasyonlarıyla ilişkili olarak daha önce yapılmış olan çalışmalarla uyumlu ve beklenen bir sonuçtur. Diğer taraftan krokin uygulanan diyabetik sıçanların ağırlık kayıplarının diyabet grubuna göre anlamlı olarak daha az olması, 21 gün süren krokin uygulamasının vücut ağırlığı üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermektedir. Samarghandian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 28 gün süren 40 ve 80 mg/kg krokin uygulamasının vücut ağırlığını arttırdığı bildirilmektedir (Samarghandian

ve diğ., 2014). Yapılan başka bir çalışmada da diyabetik hayvanlara uygulanan safranin kilo kaybını önlediği gösterilmiştir (Ashrafi ve diğ., 2018). Bizim krokin grubumuzdaki kilo artışı ve tedavi grubundaki kilo kaybının daha az olması bu çalışmalarla uyumludur.

İnsülin hormonu eksikliği veya insüline yeterince cevap verilememesi diyabet semptomlarının gelişmesine yol açabilmektedir. Glikoz metabolizması ve insülin düzeyi normal beyin fonksiyonları için önemlidir. Bu nedenle, glikoz metabolizmasındaki bozukluklar bilişsel fonksiyonları da etkiler (Small, 2007). İnsülin eksikliği tip-1 diyabetle ilişkilidir ve hastalarda bilişsel hasarlar gözlemlenebilmektedir (Brandsve diğ., 2007). STZ ile uyarılan diyabetik sıçanlardaki hafıza bozulmalarını sistemik insülin tedavisinin önlediği gösterilmiştir (Jolivalt ve diğ., 2008, Biessels ve diğ., 1998). Yapılan bir çalışmada STZ ile uyarılan diyabetik sıçanlara oral yolla dört hafta 60 mg/ kg krokin uygulamasının kan glikoz seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü ve pankreatik insülin ekspresyonunu ve salgılanmasını artırdığı bildirilmektedir (Samaha ve diğ., 2019). Çalışmamızda 50 mg/kg krokin 21 gün uygulandığında plazma ve hipokampus dokusundaki insülin düzeyi üzerine etkide bulunmamıştır. Ayrıca diyabet ve tedavi gruplarında plazma insülin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını belirledik. Bu bulgularımız STZ ile tip 1 diyabet modeli oluşturduğumuzu doğrulamaktadır. Hipokampus homojenat örneklerimizdeki insülin düzeyleri arasında gruplar arası farklılık görülmedi. Literatürde yapılan çalışmalarda, insülin eksikliğinin beyin insülin sinyalizasyonunda azalmaya neden olarak bilişsel eksikliklere katkıda bulunduğunu göstermektedir (Jolivalt ve diğ., 2008).

Farmakokinetik çalışmalar, krokinin kan dolaşımında oral uygulamadan sonra mevcut olmadığını göstermiştir. Krokinin bağırsakta krosetine dönüştürüldüğü ancak i.v. enjeksiyondan sonra plazmadaki krosetin seviyesinin düşük olduğu bildirilmektedir (Hosseini ve diğ., 2018). Ayrıca krokinin kan-beyin bariyerini aşabildiği ve pasif transselüler difüzyon yoluyla merkezi sinir sistemine ulaşabildiği, bu nedenle nörodejeneratif bozukluklarda etkili olabildiği yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (Hosseini ve diğ., 2018).

Diyabet süresince öğrenme ve hafıza eksikliklerinin patolojik süreçlerin yoğunlaşmasıyla birlikte arttığı bildirilmektedir (Wieniewski ve diğ., 2003). Yaşlanma ve diyabetik bozukluklar arasında bir etkileşim vardır. Kemirgenlerin yaşı ile birlikte hafıza eksikliklerinin ve LTP'de değişikliklerin arttığı yapılan çalışmalarda bildirilmektedir. LTP'nin, 11-12 haftalık STZ ile uyarılmış diyabetik sıçanlarda bozulduğu bilinmekte olup, bu değişikliklerin hücresel öğrenme

ve hafıza mekanizmaları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Biessels ve diğ., 2005; Kamal ve diğ., 2000). STZ ile uyarılmış diyabetik sıçanların beyinde N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör alt birimlerinin ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir (Riedel ve diğ., 2003). Genetik çalışmalar, 3 ay süreli diyabetik sıçanlarda NMDA reseptörünün NR2B alt birimlerinin immünoreaktivitesinin yaklaşık % 40 azaldığını göstermektedir (Di Luca ve diğ., 1999). 2002 yılında Gardoni ve arkadaşları ise bir ay süren STZ ile uyarılan diyabetin, NMDA reseptör kompleksini etkilemediğini göstermiştir (Gardoni ve diğ., 2002) Aksine, sıçanlarda diyabetin uyarılmasından 3-4 ay sonra, NMDA reseptörünün NR2A/B alt-birimlerinin kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz-2 (CaMKII) ve tirozin-bağımlı fosforilasyonun azaldığı bildirilmektedir (Wieniewski ve diğ., 2003). Öğrenme ve NMDA reseptör ilişkisine bağlı olarak, 1 ay süren diyabetin reseptör komplekslerini etkilemediği; 3-4 ay süren diyabetin reseptör komplekslerini etkileyerek öğrenme ve hafıza eksikliklerine yol açtığı ileri sürülmektedir (Gardoni ve diğ., 2002; Wieniewski ve diğ., 2003). Flood ve arkadaşları, 11 hafta süren diyabetik farelerin hafızalarında önemli derecede azalma olduğunu bildirmektedir (Flood ve diğ., 1990). Bizim çalışmamızda deneyin 24. ve 25. gününde tüm gruplardaki hayvanlar pasif sakınma testine alınmıştır ve çalışmamızda diyabetik hayvanların retansiyon latans sürelerinde anlamlı bir değişiklik olmaması, 25 gün süren diyabetin sıçanların hafızaları üzerine olumsuz yönde bir değişiklik yapmadığını göstermektedir. Literatürdeki benzer çalışmalarda, 4 haftalık ve 11 haftalık diyabetin farklı hafıza eksiklikleri yaptığı bildirilmektedir (Flood ve diğ., 1990) ve aynı zamanda hafızayı etkileyen moleküller olan BDNF ve NeuN gibi moleküllerin translasyonunun kalıcı olarak etkilenmesi daha uzun süre gerektirebilir (Bathina ve diğ., 2017; Razavi ve diğ., 2017). Yaptığımız literatür taramalarında diyabet sürecinde bilişsel eksikliklerin olduğunu ve bu bilişsel eksikliklerin görülmesinde ise diyabetik olarak geçen sürenin (4 hafta-11 hafta) önemli olduğunu gördük. Ayrıca hipokampus dokusunda gruplar arasında insülin düzeyleri arasında bir farklılık görülmedi. Hipokampus dokusundaki insülin sinyalizasyonunun bozulmasının bilişsel eksikliklere katkı yaptığını düşündüğümüzde çalışmamızın pasif kaçınma testinin bulgularında latans sürelerinde bir farklılık oluşmamasını bu durumla açıklayabilmekteyiz. Bunun yanı sıra biyokimyasal bulgularımızda BDNF ve NeuN düzeyleri plazma ve hipokampus dokusunda bir farklılık göstermedi. Öğrenmede etkili olan bu moleküllerin translasyonunun etkilenmesi için daha uzun süre gerekmektedir. Bizim çalışmamızda diyabetin 25 gün sürmesinden dolayı hipokampus

insülin, BDNF ve NeuN düzeyleri üzerine bir etki göstermedi. Bu yüzden öğrenme ve hafıza eksiklikleri oluşturmada yeterli bir süre olmadığını düşünmekteyiz.

Ayrıca, Tip I ve Tip II diyabetin öğrenme ve hafıza işlevleri üzerine olan etkileri konusunda bazı çelişkiler de rapor edilmiştir. Özellikle dikkat ve kısa süreli hafızanın diyabetten etkilenmediği bildirilmektedir (Tanbek, 2015). Sıçanlarda diyabetin bilişsel fonksiyonlara etkisini araştıran Papovic ve arkadaşları, STZ enjeksiyonundan 2 ve 10 hafta sonra Morris'in su labirenti testini uygulamışlar ve diyabetin 10 hafta sonra öğrenme performansını azalttığı yönünde sonuçlar elde etmişlerdir. Öğrenme performansındaki bu azalmanın zamana bağlı olarak hipokampüsteki nöronal ve sinaptik bozulmaya paralel geliştiğini tespit etmişlerdir (Papovic ve diğ., 2001).

Diyabetik sıçanların Morris su labirentinde, uzamsal öğrenme ve hafıza eksiklikleri gösterdiği ve bozulan bellek işlevlerine serebral kortekste artan lipid peroksidasyon seviyelerinin eşlik ettiği bildirilmektedir. Aynı çalışmada 6 hafta boyunca 15, 30 ve 60 mg/kg/ip krokin uygulanan diyabetik hayvanların Morris su labirentinde platformun yerini daha kolay hatırladıkları ve oksidatif stres belirteçlerinin iyileştiği bildirilmektedir (Ahmadi ve diğ., 2017). Ahmadi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre 60 mg/kg krokin uygulamasının STZ kaynaklı bellek disfonksiyonu üzerindeki yararlı etkileri olduğu ve diyabette meydana gelen bilişsel disfonksiyonun tedavisinde antidiyabetik ve antioksidan olarak kullanılabileceği önerilmektedir. Ancak çalışmada uygulanan 15 ve 30 mg/kg krokinin hipoglisemik etki göstermediği bildirilmiş ve ilginç olarak bu dozların lipid peroksidasyon seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Ahmadi ve diğ., 2017). Kasmaire ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada STZ ile diyabet oluşturulduktan 45 gün sonra sıçanlara Morris Su Labirenti testi uygulanmış ve hipokampal nöron kaybı ile öğrenme ve hafıza bozukluklarının ortaya çıktığı bildirilmiştir. Ayrıca, diyabetik sıçanlarda hipokampal TNF- α ve SOD aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Bu çalışmada 37 gün boyunca uygulanan *Crocus sativus*'un ana bileşeni olan safranalin (0,025, 0,1 ve 0,4 mg/kg) davranışsal, histopatolojik ve biyokimyasal değişiklikleri iyileştirdiği bildirilmektedir. Bu çalışmada kullanılan safranalin ve metforminin kombinasyonu, STZ'ye bağlı diyabetik sıçanlarda öğrenme ve hafıza bozukluklarını iyileştirdiği gösterilmiştir. Safranalin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik mekanizmalar ile iyileştirici etkide bulunduğu bildirilmektedir (Kasmaire ve diğ., 2018). Diyabetik sıçanlara 15- 30 mg/kg krokinin 30 gün uygulanmasının hipokampal nöronların sayısındaki azalmayı önlediği gösterilmiştir

(Tamaddonfard ve diğ., 2012). Çalışmamızda 21 gün süreyle 50 mg/kg uygulanan krokin latans sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa yol açmıştır ancak bizim kullandığımız dozun kısa ve uzun süreli hafıza üzerine anlamlı etkisi olmadığını düşündürmektedir.

Diyabet hastalığında görülen bilişsel bozukluklar sadece diyabetin metabolik bozukluklarından değil, aynı zamanda merkezi sinir sisteminde meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişikliklerden de kaynaklanmaktadır (Cukierman ve diğ., 2005; Kodl ve Seaquist, 2008). Yapılan bir çalışmada Nissl boyama sonucunda tip 2 diyabet grubundaki hayvanların hipokampal nöronlarının düzensiz şekilli görüldüğü ve hipokampal nöronların sayısının önemli ölçüde azaldığı, CA3 alanındaki hipokampal nöronların ise kontrol grubuna kıyasla çoğunlukla belirsiz bir hücre gövdesine sahip olduğu bildirilmektedir (Cai ve diğ., 2018). Yapılan bir çalışmada pentilenetetrazol (PTZ) ile epilepsi oluşturulan sıçanların hipokampüsün piramidal hücre tabakasının nöronal hasar gösterdiği ve Nissl boyama ile koyu renkli olan nöronların hasarlı olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Mazumder ve diğ., 2017).

Vasilev ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Nissl boyama sonuçlarında koyu olarak kuvvetli boyanan nöronları genellikle küçülmüş hücreler olarak tanımlamıştır (Vasilev ve diğ., 2018). Ayrıca koyu nöronların sıklıkla hücre ölümünü takip etme riski olduğu düşünülmektedir (Csordas ve diğ., 2003; Auer ve diğ., 1985). Biz de çalışmamızda koyu renkli ve koyu boyanmış hücreleri dejenere nöron olarak kabul ederek değerlendirmemizi yaptık. Yapılan bir başka çalışmada kontrol gruplarının hipokampüsünde belirgin bir nöron kaybı olmadığı; ancak, Alzheimer grubunda büyük miktarda nöronal hasar meydana geldiği Nissl boyama sonuçlarında bildirilmiştir. Nöronal hasarın meydana geldiğini bu çalışmada da koyu boyanmış hücreleri değerlendirerek tespit etmişlerdir (Csordas ve diğ., 2003). Aynı şekilde Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yuvarlak ve soluk lekeli nukleuslarla ortaya çıkan hücrelerin normal nöronlar olduğu gösterilirken, ölü hücrelerde normal morfolojik yapının kaybolduğu gösterilmiştir (Zhou ve diğ., 2015). Diyabet grubunun hipokampüs, frontal korteks ve amigdala bulunan nöronlarında önemli bir hasar ortaya çıktığı gösterilmiştir (Afshar ve diğ., 2018).

Biz de çalışmamızda Nissl boyama sonuçlarımızı değerlendirirken literatürdeki çalışmaları örnek alarak koyu renkli olan nöronları hasarlı olarak değerlendirdik. Çalışmamızda beynin hipokampüs bölgesinin histolojik incelemelerinde kontrol grubuna ait CA1, CA3 ve DG

bölgelerindeki kesitlerde, incelenen nöronların büyük çoğunluğunun normal histolojik özelliklere sahip olduğu görüldü. Yuvarlak, açık renkli büyük nukleuslu olan bu nöronların sitoplazmalarında perinükleer yerleşimli belirgin Nissl granülleri tespit edildi. Diyabet grubuna ait hipokampusün CA1, CA3 ve DG bölgelerindeki kesitlerde nöron kaybı ve nöronal değişiklikler gözlemlendi. Dejenere nöronlar, koyu boyanan ve büzülen sitoplazmaları ile ayırt edildi. Diyabet grubundaki hipokampusün CA1, CA3 ve DG bölgelerindeki dejenere nöron yüzdesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edildi. Bu histolojik bulgularımız diyabetle birlikte gelişen yapısal bozukluğu desteklemektedir.

Çalışmamızda ilginç olarak krokin grubuna ait hipokampusün CA1, CA3 ve DG bölgelerindeki dejenere nöron yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını gördük. Krokinin hipokampus bölümlerindeki hücrelerin bütünlüğünü bozarak hücrelerin büzülmesine ve dejenere olmasına yol açtığını tespit ettik.

Yapılan bir çalışmanın histopatolojik bulgularında, krokin uygulanan sıçanlarda koyu boyanan hücrelerin azaldığını ve krokinin değişen dozlarının (50 mg/kg-150 mg/kg) ölü hücreleri azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (Krishnaswamy ve diğ., 2020). Güncel literatür çalışmalarında diyabetik sıçanların hipokampuslerinde oluşan hasarı göstermek amacıyla Nissl boyamanın yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Afshar ve diğ., 2018). Ancak hipokampus dokusunda oluşan değişikliklere krokinin etkisini nissl boyama yöntemiyle gösteren bir çalışma bulunmamaktadır

Çalışmamızda tedavi grubundaki sıçanlara uygulanan 50 mg/kg krokinin hipokampusün sadece CA1 bölgesinde dejenere nöronların yüzdesini diyabet grubuna göre arttırdığını tespit ettik. Hipokampusün CA3 ve DG bölümlerinde krokin grubunda dejenere hücre yüzdesinin arttığını belirledik ancak tedavi gruplarına uygulandığında bir etkisi olmadığını gördük. Bu bulgularımız krokinin hipokampus dokusunda hücre bütünlüğünü bozucu bir etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Başka bir şekilde ifade edersek diyabetle beraber gelişen nöron hasarını azaltmaya yardımcı krokin uygulaması etki etmemiştir. Diğer taraftan diyabetik sürenin uzamasıyla beraber bu hasarın artabileceği ve diğer hipokampus bölümlerinde de görülme ihtimali bulunmaktadır.

Literatürdeki diğer birçok araştırma da diyabete bağlı olarak öğrenme ve bellekte oluşan zayıflamanın, beynin öğrenmede önemli bir bölgesi olan hipokampüsteki zamana bağlı olarak oluşan nörokimyasal değişikliklerle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Woods ve diğ., 2001; Aragno ve diğ., 1999). Ayrıca, yapılan çalışmalarda periferik glikoz düzeylerinin bilgi depolanması işlemleri üzerinde önemli bir rolü olduğunu, beyin hücrelerinin insülinle bağımsız olarak glikoz alımı yapmaları nedeniyle kan glikoz düzeyindeki artışın öğrenme performansında da artışa neden olduğu bildirilmiştir (Altan ve diğ., 1997). Beyinde üretilen ve daha sonra vücuttaki birçok dokuda bulunan BDNF, sinaptik plastisiteyi artırarak nöronlar arasında optimum iletişimi teşvik eder (Maisonpierre ve diğ., 1991; Yamada ve diğ., 2002; Siresha ve diğ., 2015; Blurton-Jones ve diğ., 2009). BDNF, MSS' de esas olarak nöronların gelişmelerine ve kendilerini yenilemelerine yardımcı olurken, nörotransmitterlerin görev yaptıkları önemli sinir yollarının yapısal olarak sağlıklı olmalarına ve görevlerini sürdürmelerine katkıda bulunur. BDNF'nin mRNA ekspresyonu fizyolojik ve patolojik durumlarda değişmektedir (Castrén ve diğ., 1995; Chen ve diğ., 2001). Beyin esas olarak glikoza bağlı bir organ olduğundan, hiperglisemide nöronal glukoz metabolizmasının bozulmasının serbest radikal üretiminin artmasına bağlı olabileceği bildirilmektedir (Gonzalez ve diğ., 2016; Ono ve diğ., 1997). Bizim çalışmamızdaki diyabetik hayvanların hipokampus homojenatlarında ve plazmalarında BDNF düzeyinin azalma eğiliminde olduğunu belirledik. Ancak diyabet olarak geçen sürenin 25 gün olmasından dolayı bu azalmanın anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını tespit ettik.

Hipokampüse bağlı öğrenme ve hafıza eksikliklerinin nörogenezdeki azalmalarla ilişkilendirilebileceği ve BDNF'nin bir hafıza belirteci olarak kullanılabileceği yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (Wang ve diğ., 2004). Hipokampüsteki BDNF ekspresyonunun STZ ile uyarılan diyabet hayvan modellerinde azaldığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Utkan ve diğ., 2015; Tian ve diğ., 2016). Son zamanlarda, diyabetin beyinde BDNF seviyesinde bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir ki bu diyabetteki bilişsel eksikliklerin altında yatan nedenlerden biri olabilir (Gocmez ve diğ., 2019). BDNF'nin kan glikoz ve lipid düzeylerini etkilediği, tip-2 diyabette BDNF düzeylerinin azalmış olduğu saptanmıştır (Krabbe ve diğ., 2007; Bramham ve diğ., 1996). Başlıca fonksiyonu hipokampal ve kortikal nöronlar ile periferik duyu nöronlarının yaşamasını sağlamak olan BDNF, dendritlerin büyümesinde, piramidal nöronların dendritik dallanmasında ve sinaptik plastisitede rol almaktadır (Alderson ve diğ., 1990; Leihteinen ve diğ., 2004). Yapılan çalışmalarda düşük BDNF

konsantrasyonlarının, diyabetteki azalmış hafızaya ve bilişsel bozulmaya katkıda bulunabildiği bildirilmektedir (Bathina ve diğ., 2017). Önceki yapılan çalışmalarda, Alzheimer hastalarının spesifik beyin bölgelerinde, özellikle de hipokampüste, azalmış bir BDNF ekspresyonunu gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2008).

Siresha ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, STZ ile uyarılan tip 1 diyabet hayvanların BDNF plazma seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı, IL-6 ve TNF- α 'nın ise anlamlı olarak yükseldiği gösterilmiştir (Bathina ve diğ., 2017). Ayrıca, bu çalışmada STZ'nin neden olduğu tip 1 diyabetik hayvanların hipokampüslerinde düşük BDNF seviyelerinin insülin sinyal iletiminde bir azalmaya yol açabileceğini ve hiperglisemiye katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir. Uzun süreli diyabetin deneklerde öğrenme ve hafızada kusurlar yaratabildiği bilinmektedir. STZ'nin neden olduğu tip 1 diyabetin, bu çalışmada görüldüğü gibi önemli bir hipokampal nöron kaybına sahip olduğunun gösterilmesi de bu görüşü desteklemektedir (Bathina ve diğ., 2017). Çalışmamızın plazma örneklerindeki BDNF düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Yaptığımız literatür araştırmalarında uzun süren tip 1 diyabette BDNF'nin azaldığını ve öğrenmede kusurlar olduğunu gördük. 25 gün süreli diyabetin BDNF düzeylerini azaltmada yeterli olmadığını düşünmekteyiz.

Yapılan bir çalışmada, sıçan serebellumunda 21 gün boyunca uygulanan 50 mg/kg krokinin cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) ve BDNF protein seviyelerinde anlamlı artışlar yapmadığı bildirilmektedir (Razavi ve diğ., 2017). Başka bir çalışmada ise krokinin sıçanların hipokampüs dokusunda CREB, p-CREB ve BDNF protein ifadelerini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Vahdati ve diğ., 2014). Yani krokin uygulamasının BDNF üzerine etkileriyle ilgili yapılan çalışmalarda çelişkiler bulunmaktadır (Razavi ve diğ., 2017; Vahdati ve diğ., 2017). Safran'ın aktif bir bileşeni olan krokinin subakut antidepresan etkilerini ve CREB, BDNF ve sinir büyüme faktörü (VGF) proteinleri üzerine etkilerini araştırmayı amaçlayan bir çalışmada sıçanlara 12,5, 25 ve 50 mg/kg krokin 21 gün süreyle uygulanmıştır. Sadece 12,5 mg/kg krokin uygulamasının BDNF düzeylerinde anlamlı bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. 25 ve 50 mg/kg krokin uygulamasının hipokampüsteki BDNF düzeyleri üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bildirilmektedir (Vahdati ve diğ., 2014). Krokinin doz ve uygulama süresine göre BDNF düzeyleri üzerindeki etkileri farklı olmasına bağlı olarak bizim çalışmamızın BDNF sonuçlarında anlamlı bir değişiklik görmemiş olabiliriz.

Diyabet ile proinflatuar sitokinlerin artmış üretimi arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (Pratchayasakul ve diğ., 2008; Ola ve diğ., 2014). Artmış sitokinlerin diyabetik sıçanlarda merkezi ve periferik inflamasyona yol açtığı bilinmektedir. STZ'ye bağlı diyabette plazmada TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin arttığı bildirilmektedir (Cai ve diğ., 2011). Diyabet hastalığında serbest radikallerin; non-enzimatik glikasyon, enerji metabolizması değişikliklerinden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolağının aktivitesinin, hipoksi ve iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarı sonucu arttığı ve antioksidan savunma duvarının aşıldığı ve bu tablonun diyabetik komplikasyonlara yol açtığı vurgulanmaktadır (Altan ve diğ., 2006). Kronik hiperglisemi oksijen tüketiminin artmasına ve serbest radikallerin üretimine neden olur. Serbest radikallerin aşırı birikmesi sonucunda prooksidanlar üretilir ve proinflatuar bir çevre oluşur (Suge ve diğ., 2012).

Oksidatif stresin, diyabet komplikasyonlarında rol oynayan mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir (Lipscombe ve Hux, 2007). Diyabetin tedavisine yönelik yapılan araştırmaların diğer bir kısmı da hastalıkta bozulan oksidan/antioksidan dengenin düzeltilmesine yönelik çalışmalardır. Bu çalışmalar ya antioksidan savunma sistemini güçlendirmeye ya da oksidatif strese bağlı hasarı azaltmaya yöneliktir (Gardoni ve diğ., 2002). Diyabette serbest radikallerin fazlaca yükselişi ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin zayıflaması, yalnızca hücrel organellerin ve enzimlerin hasarına değil, lipid peroksidasyonunun artmasına ve insülin reseptörlerinin insüline karşı duyarlılıklarının azalmasına da neden olmaktadır (McEven ve diğ., 2002). İnsülin reseptörünün, mekansal öğrenme, hafıza ve bilişten sorumlu bir anahtar beyin alanı olan hipokampus dahil, diğer beyin bölgelerinde de eksprese edildiği bildirilmektedir. İnsülin reseptörünün otofosforilasyonu, PI3K-Akt yolağının aktivasyonuna yol açar ve bu da GLUT-4'ün translokasyonuna aracılık eder (Biessels ve Reagan, 2015). Hipokampüste insülin reseptörlerinin aktivasyonu, sağlıklı insanlarda ve deney hayvanlarında, metabolik, büyüme, sinaptik ve nöronal fonksiyonların korunmasında önemli bir rol oynar (Grillo ve diğ., 2015; Pratchayasakul ve diğ., 2011). Uzun süreli hipergliseminin, hipokampüste bozulmuş bir insülin sinyal yolağınave değişmiş bir glikoz homeostazisine yol açabileceği bildirilmiştir (Sadeghi ve diğ., 2016). Ayrıca, uzun süreli bir hipergliseminin, serbest radikallerin veya ROT üretiminin artmasına neden olabileceği gösterilmiştir (Jabbarpour ve diğ., 2014). Son çalışmalarda, diyabet ile proinflatuar sitokinlerin artmış üretimi arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (Pratchayasakul ve diğ., 2008; Ola ve diğ., 2014). Artmış sitokinlerin diyabetik sıçanlarda merkezi ve periferik inflamasyona yol açtığı bilinmektedir.

STZ'ye bağıli diyabette plazmada TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin arttığı bildirilmektedir (Cai ve diğ., 2011).

Safran ve aktif bileşenlerinin antioksidan özellikleriyle hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda diyabetik komplikasyonlarda yararlı etkileri olduğu bildirilmektedir. STZ ile uyarılan diyabetik sıçanlarda *Crocus sativus*'un etanolik ekstratının (40 mg/kg/ip/8 hafta) hepatoprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu etkisini lipid peroksidasyonunu, serum aspartat amino transferaz (AST), Alanin amino transferaz (ALT) ve bilirubin düzeylerini azaltarak, aynı zamanda karaciğerdeki SOD, CAT, GSH ve GSH-PX düzeyini arttırarak gösterdiği ileri sürülmektedir (Rahbani ve diğ., 2012). Hücreyi serbest radikallerin toksik etkilerine karşı koruyan SOD enzim aktivitesinin diyabette değişmediği, azaldığı ya da arttığı konusunda çalışmalarda farklı sonuçlar mevcuttur (Huang ve diğ., 2011; Volpato ve diğ., 2011).

Çalışmamızda hipokampüs doku homojenatı örneklerinde sadece krokin grubunda SOD düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. Diyabette SOD düzeylerinin arttığı, değişmediği veya azaldığı şeklinde birbiriyle çelişen çalışmalar olduğu bilinmektedir (Abou-Seif ve Youssef, 2004, Aydın ve diğ., 2001,). Gocmez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 4 hafta süren diyabetin SOD düzeyini arttırdığı bildirilmektedir (Gocmez ve diğ., 2019). Diyabetik hayvanlarda SOD enzim aktivitelerinde saptanan bu artışın, diyabette artmış olan lipid peroksidasyonuna karşı gelişen bir yanıt olduğu düşünülebilir (Gocmez ve diğ., 2019). Çalışmamızda diyabetik her iki grupta da SOD düzeyleri kontrole yakındı ve diyabetik olarak geçirilen süreye de bağıli olarak SOD düzeyinde farklılık görülmemiş olabilir.

Krokinin diyabetle beraber azalan antioksidan savunmayı arttırdığı ve oksidatif yükü azaltmasıyla birlikte, belirgin antienflamatuvar etkilerle glukagon salgılanmasını bastırdığı bildirilmiştir (Samaha ve diğ., 2019). Diyabetik sıçanlara 50 mg/kg krokin uygulamasının hipokampüs homojenatı ve plazma örneklerimizde krokin grubundaki SOD düzeylerinin arttığını belirledik. Krokin grubunun plazma ve homojenat örneklerinde SOD düzeyinin artması, krokinin antioksidan özelliğiyle gerçekleşmiş olabilir. Krokinin aynı konsantrasyondaki α -tokoferole göre daha güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu da bildirilmektedir (Ochiai ve diğ., 2004). Yaptığımız literatür taramalarında da safran ve bileşenlerinin plazma SOD düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (Tamaddonfard ve diğ., 2013). Ancak diyabetik sıçanlara 50 mg/kg krokin uygulaması plazma ve hipokampüs homojenatlarındaki SOD düzeylerini etkilememiştir.

TNF- α gibi sitokinlerin proinflamatuvar yanıtlarda rol oynadığı ve patojenlerin hızlı eliminasyonuna yardım ederek immun cevabın arttırılmasında görev aldığı (Kim ve diğ., 2015) ve insülin direncine neden olarak insülinin kan glikozu üzerindeki etkinliğini azalttığı bilinmektedir (Liu ve diğ., 2008). Ayrıca yağ dokusu hücrelerine glikozun alınmasını ve depolanmasını arttırdığı ifade edilmektedir (Brindley ve diğ., 1999). Tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalarda serum TNF- α düzeyinin yükseldiği, bu sitokinin diyabetin kontrolünde ve diyabette gelişen pro-inflamatuvar immun yanıtların değerlendirilmesinde kullanılabileceği öne sürülmüştür (Foss-Freitas ve diğ., 2006). Deneysel diyabet ve obezite modellerinde yağ dokusunda TNF- α ekspresyonunun artmış olduğu yapılan bir çalışma ile ortaya konulmuştur (Hube ve ark., 1999).

Yapılan çalışmalarda TNF- α 'nın, mikrovasküler diyabetik komplikasyonların ilerlemesinde belirleyici bir rol oynadığı gösterilmiştir (Samarghandian ve diğ., 2014). Ayrıca safran gibi şifalı bitkilerin antiinflamatuvar etki ile inflamasyonu azaltarak hiperglisemik koşullardan etkilenen çeşitli organların işleyişi üzerine olumlu etkide bulunduğu bildirilmiştir. Diyabetik sıçanların böbrek, karaciğer ve lens dokularında artan TNF- α düzeylerinin sulu safran ekstresi uygulamasıyla azaldığı bildirilmektedir (Ashrafi ve diğ., 2018). Yapılan diğer bir çalışmada krokinin serum TNF- α düzeyini önemli ölçüde azalttığı bildirilmektedir (Samarghandian ve diğ., 2014).

Diyabetik hayvanlara krokin (40 ve 80 mg/kg/ip/28 gün) uygulamasından sonra kan glikoz düzeyi, glikozillenmiş serum proteinleri ve ileri glikasyon son ürünleri düzeyleri, total kolesterol, total gliserid ve LDL düzeylerinin azaldığı; vücut ağırlığı ile plazma HDL düzeyinin ise arttığı bildirilmektedir (Samarghandian ve diğ., 2014). Aynı çalışmada krokin, plazmadaki GSH, SOD ve CAT enzimlerinin düzeylerini artırırken hipokampus dokusunda uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesi ve bilişsel eksiklikleri önemli ölçüde azaltmıştır (Samarghandian ve diğ., 2014).

Bizim çalışmamızda diyabetik sıçanların plazmasındaki TNF- α düzeyinin artma eğilimde olduğu ancak anlamlı bir sonuç vermediğini gördük. Sitokin cevabının oluşması için yaptığımız deneysel diyabet süresinin az olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızda hipokampus doku homojenatı örneklerinde diyabet oluşturulduktan sonra 21 gün süreyle 50 mg/kg krokin uygulanan tedavi grubunun TNF- α düzeylerinin diyabet grubuna göre azaldığı belirlendi. Tedavi grubunda hipokampus homojenatında tespit edilen bu azalma krokinin TNF- α düzeyini

azalttığını gösterirken ilginç olarak plazma örneklerinde krokinin TNF- α düzeyini arttırdığını belirledik. Sonuç olarak krokinin farklı koşullarda farklı etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Diyabetin neden olduğu bilişsel bozukluğun beyinde insülin direnci ve glikozun neden olduğu nöron apoptozisi ile ilişkili olduğu söylenmektedir (Hao ve diğ., 2019). Apoptozun düzenlenmesinde Bcl2 aile proteinleri anahtar rol oynamaktadır. Bcl2 antiapoptotik bir düzenleyicidir, Bax ise proapoptotik düzenleyicidir (Adams ve Cory, 1998). Bcl2 ve Bax arasındaki denge hücrenin prosurvival veya proapoptotik koşullar altında olup olmadığını belirlemeye yardımcı olur. İntrinsik yolda; Bax ve Bak proteinlerinin içeri girmesiyle sitokrom-c mitokondriden salınır. Sitokrom-c, prokaspaz-9 ile kompleks yapmak için apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1)'e bağlanır ve kaspaz-9 aktive olduğunda kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açar. Bcl-2 gibi bazı Bcl ailesi üyeleri bu yolu engelleyebilir (Los ve diğ., 1999). Ekstrinsik yolda, kaspaz-8 ve kaspaz-10 aktivasyonu kaspaz-3 aktivasyonuna yol açar (Fuchs ve Steller, 2011). Bax ve Bcl-2 seviyelerinin ölçümünün sırasıyla intrinsik yolağın aktivasyonu ve inhibisyonunu ortaya koyduğu bildirilmektedir. Kaspaz-3 seviyesinin ölçümünün ise apoptoz sinyal yollarının tamamlanmasına ilişkin bilgi sağladığı yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Asadi ve diğ., 2015).

Ye ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, diyabetin sıçanların mekansal öğrenmesini ve hafızasını bozduğu Morrisin su labirenti testinde gösterilmiştir. Diyabetin nöronların apoptozunu ve Bax'ın sitoplazmadan mitokondriye translokasyonunu uyardığı, ayrıca mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salınımını indüklediği bildirilmektedir (Ye ve diğ., 2011). Sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması, hipokampusün CA1 bölgesindeki piramidal nöronlarının apoptozunda rol oynayabileceği ve bu durumun da hipokampüsteki nöron sayısının azalmasına ve performans fonksiyonunun bozulmasına neden olabileceği söylenmektedir (Ye ve diğ., 2011). Mitokondriyal fonksiyonu korumanın diyabetin hipokampal fonksiyon üzerindeki bozulmalarını önlemek için olası bir aday olabileceğini düşündürmektedir. Biz de çalışmamızda diyabetin nöronların apoptozu üzerinde etkisini araştırmak amacıyla sitokrom-c düzeylerini biyokimyasal olarak ölçtük ancak gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlemedik. Diyabet grubunun sitokrom-c düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir artış mevcuttu. Çalışmamızda diyabet olarak geçirilen sürenin daha fazla olması halinde bu değişikliklerin olabileceğini düşünmekteyiz. Diyabet olarak geçirilen süre arttığında mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salınımının arttığını bildiren çalışmalar

bulunmaktadır (Ye ve diğ., 2011). Diyabetin yarattığı bozukluklarının önlenmesi için nöronların apoptozisinin nasıl azaltılacağını ve mitokondriyal fonksiyonun nasıl korunacağını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Krokinin TNF- α ve kaspaz-8 aktivasyonunu, dolayısıyla mitokondriden sitokrom-c salınımını sağlayan proapoptotik mRNA'nın uyarılmasını baskılayarak hem iç hem de dış apoptotik uyarılara bağlı nöronal hücre ölümünü inhibe ettiği bildirilmektedir (Soeda ve diğ., 2001). Ayrıca krokinin diyabetik sıçanlarda sitokrom-c salınımını uyardığı da belirtilmektedir (Ochiai ve diğ., 2004). Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak krokin grubundaki plazma sitokrom-c düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını ancak, krokin uygulanan diyabetik sıçanların sitokrom-c düzeylerinde bir değişiklik belirlemedik.

Mevcut nöronal popülasyonlardaki patolojik değişiklikleri belirlemek amacıyla anti-NeuN antikoru kullanılmaktadır (Kirik ve diğ., 2009). Nöronlarda NeuN immünoreaktivitesinin zayıflaması veya ortadan kalkmasıyla çeşitli patolojik süreçlerin başladığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Kirik ve diğ., 2009). Yapılan bir çalışmada sıçan beyninin striatum kısmında oluşan iskemik hasar nöronun nukleus ve sitoplazmasındaki NeuN immünreaktivitesini tamamen ortadan kaldırmıştır (Kirik ve diğ., 2009). Hipokampüste hasar görmüş veya ölmekte olan piramidal nöronlarda NeuN aktivitesinin kaybolduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Korzhevskii ve diğ., 2006).

Diyabetik ketoasidozun beyin histolojisinde kalıcı değişikliklere yol açıp açmadığını ve bu değişikliklerin bir sıçan modelinde bilişsel eksikliklerle ilişkili olup olmadığını belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada 4 haftalık genç sıçanlar STZ ile diyabetik hale getirilmiştir. Diyabet oluşturulduktan 7 hafta sonra bilişsel testler uygulanmış ve 15. haftada beyin dokularında NeuN anlatımları incelenmiştir. Diyabetik sıçanların korteksinde NeuN pozitif hücre sayılarının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiş ve bu sonucun nöron kaybını düşündürdüğü ifade edilmiştir. Hipokampus bölgesinde ise NeuN pozitif hücre sayımlarında önemli bir farklılık gözlenmediği bildirilmektedir (Glaser ve diğ., 2017).

Çalışmamızda diyabetik sıçanların hipokampuslerinin CA1 bölümündeki NeuN anlatımının azaldığını ve diyabetik sıçanlara 21 gün 50 mg/kg krokin uygulamasıyla NeuN anlatımının arttığını belirledik. Yapılan bir çalışmada diyabetin 15. haftasında olan sıçanların kortekslerinde NeuN anlatımının azaldığı bildirilmektedir (Glaser ve diğ., 2017). Diyabetik

sıçanların hipokampuslerinin CA1 bölgesinde NeuN anlatımının azalmış olması literatür ile uyumludur. Diyabetik sıçanlara uygulanan krokinin hipokampusün CA1 bölgesinde NeuN anlatımını arttırdığını tespit ettik. Bu bulgumuzun literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Hipokampusün DG bölgesinde ise NeuN anlatımı arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Yi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hipokampusün sadece DG bölgesinde farklılık görürken biz hipokampusün CA1 bölgesinde farklılık gördük (Yi ve diğ., 2011). Sadece hipokampusün belirli bölümlerinde görülen bu farklılığa diyabetin süresinin yol açtığını düşünmekteyiz. Hipokampusün CA3 bölgesinde ise krokin grubundaki NeuN anlatımının kontrol grubuna göre azaldığını ($p<0,05$) gördük. Hipokampusün tüm bölümlerinde değişikliğin meydana gelmesi için diyabetin daha uzun süreli olması gerekebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca krokin uygulaması hipokampusün CA1, CA3 ve DG bölümlerinde farklı etki göstermiştir.

Uzun süreli diyabetin hipokampal bozukluğa neden olduğu bilinmektedir ve yapılan bir çalışmada NeuN anlatımının diyabet gelişiminin erken evresinde azaldığı bulunmuştur (Lebed ve diğ., 2008). Yi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, NeuN anlatımı diyabetik hayvanların dentat girus bölgesi dışında hiçbir alanda önemli ölçüde azalmamıştır. NeuN anlatımının azalmaması 4 haftalık STZ kaynaklı diyabet süresinin nispeten kısa bir süre olmasıyla ilgili olabileceği bildirilmiştir (Yi ve diğ., 2011). Bununla birlikte bu çalışmada hipokampüsteki nöronal olgunlaşmanın diyabetten etkileniyor gibi görüldüğü bildirilmektedir (Yi ve diğ., 2011). Ayrıca Biessels ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi, STZ uygulanan hayvanlar yaşlıysa, STZ'nin neden olduğu oksidatif stres ile yaşlanmanın etkileri arasında ayırım yapmanın mümkün olmayacağı düşünülmektedir (Biessels ve diğ., 1999).

Çalışmamızda plazma örnekleri incelendiğinde; tedavi grubunun NeuN düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken, bu azalmanın diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığını belirledik. Literatürde krokinin NeuN üzerine etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Diyabet olarak geçirilen süre arttığında NeuN gibi moleküllerin translasyonunun değiştiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Diyabet grubunda NeuN düzeyinin değişmemesinin bu duruma bağlı olduğunu düşünmekteyiz. İlginç olarak diyabetik sıçanlara verilen krokin plazma NeuN düzeyini kontrol grubuna göre azaltmıştır. İmmunohistokimyasal bulgularımızda da buna benzer şekilde hipokampusün CA1 bölgesinde krokin uygulaması tedavi grubunun NeuN anlatımını artırırken; hipokampusün CA3 bölgesindeki NeuN anlatımının da sadece krokin uygulanan grupta azaldığını görmüştük.

Plazma örneklerinde sadece tedavi grubunda NeuN anlatımının azalmasını yine krokinin farklı koşullar altında değişik etkiler ortaya çıkarması sonucunda olduğunu düşünebiliriz.

Hipokampus doku homojenatı örneklerimizde NeuN düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark görmedik. Diyabet olarak geçirilen süre daha uzun olduğunda bilişsel eksiklerin ortaya çıktığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Flood ve diğ., 1990; Razavi ve diğ., 2017). 4 haftalık diyabetin kısa olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Yi ve diğ., 2011). Biz de hipokampus homojenat örneklerimizdeki NeuN düzeyleri arasında bir farklılık olmamasının 25 günlük diyabete bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

İmmunohistokimyasal bulgularımızda hipokampusun CA1 bölgesinde diyabet ve krokin grubunun NeuN anlatımının kontrol grubuna göre azaldığını belirledik. Krokin uygulanması ile tedavi grubunun NeuN anlatımının diyabete göre arttığını gördük. 25 gün süren diyabetin dış etkilere karşı en hassas zon olan hipokampusun CA1 bölgesindeki NeuN anlatımını azalttığını ve 50 mg/kg krokin uygulamasının NeuN anlatımı üzerine arttırıcı etkide bulunduğunu belirledik. Ancak hipokampusun CA3 bölgesinde sadece krokin uygulanan grupta NeuN anlatımının azaldığını görürken hipokampusun DG bölgesinde anlamlı bir farklılık göremedik. Bu bulgularımıza göre krokinin tek başına uygulandığında ve diyabetik hayvanlara uygulandığında daha farklı sonuçlar ortaya çıkardığını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak;

Tek doz 65 mg/kg STZ uygulaması ile Tip 1 Diyabet modeli oluşmuştur ve ortalama kan glikoz düzeyi 180 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir. 21 gün 50 mg/kg krokin uygulaması sonucunda tedavi grubunun kan glikoz değerlerinin diyabetik gruba göre azaldığı belirlenmiştir. Krokin, kan glikoz değerleri üzerine azaltıcı etki göstermiştir. 50 mg/kg krokin 21 gün uygulandığında diyabetin komplikasyonları ile ilişkili olan ağırlık kayıplarında azaltıcı etkide bulunmuştur. Pasif kaçınma testinde latans sürelerinin değişmemesi hipokampus homojenat örneklerimizde insülin düzeylerinin farklılık göstermemesini desteklemektedir. Ayrıca 3-4 ay süren diyabetin reseptör kompleksleri ve BDNF gibi moleküllerin düzeylerini değiştirdiği bildirilmektedir. Çalışmamızın hipokampus homojenatlarında BDNF ve NeuN düzeylerinin değişmemesi de pasif kaçınma testi sonuçları ile uyumludur.

Diyabet grubunun SOD düzeylerinin değişmemesini diyabetik olarak geçirilen süre ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz. Diyabet olarak geçirilen süre arttığında kronik olarak kanda glikozun

yüksek olmasıyla glikoz oto-oksidasyonları artarak AGE oluşumları artacaktır. Bu koşullar oluştuğunda antioksidan enzimlerin miktarının değişebileceğini öngörmekteyiz. Ayrıca inflamasyon koşullarında artması gereken TNF- α 'nın diyabet grubunda düzeyinin değişmediğini gördük. Sitokin cevabı oluşması için diyabet olarak geçirilen sürenin az olduğunu düşünmekteyiz. Diyabetin sitokrom-c salınımını arttırarak hipokampüsün CA1 bölümündeki nöronlarda apoptozu uyardığını bildiren çalışmalar vardır. Ancak çalışmamızda diyabetin 25 gün sürmesine bağlı olarak plazma ve hipokampüs homojenat örneklerinde sitokrom-c düzeyini arttırma eğiliminde olduğunu ama bu artışın anlamlı olmadığını belirledik.

Histolojik olarak incelediğimiz nissl boyamalarında diyabetik hayvanların hipokampüslerinin tüm bölümlerinde dejenere hücre yüzdelерinin arttığını belirledik. İmmunohistokimyasal olarak incelediğimiz NeuN anlatımının diyabetik hayvanların sadece hipokampüsün CA1 bölgesinde azaldığını belirledik. Diyabet olarak geçirilen süre arttığında NeuN anlatımı hipokampüsün diğer bölümlerinde de değişebilme olasılığını düşünebiliriz.

Çalışmamızda nöroprotektif etkilerini göstermesini beklediğimiz krokinin 50 mg/kg dozunda 21 gün boyunca uygulanması ile kan glikoz düzeyini azaltıcı ve kilo kaybı üzerine arttırıcı etkilerini gösterdi. Ancak bilişsel etkilerini görebilmek için farklı doz ve sürelerin uygulandığı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz. Plazma ve hipokampüs homojenat örneklerimizde krokin uygulamasının insülin düzeylerini etkilemediğini belirledik.

Hem plazma hem de hipokampüs homojenat örneklerinde krokin grubunda SOD düzeylerinin arttığını belirledik. Krokinin bu artışı antioksidan özelliğiyle yapmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Krokin uygulamasının BDNF'yi arttırdığı veya etkilemediğini bildiren çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda krokinin farklı dozlarının uygulanmasının farklı etkiler yaptığını gördük. Bizim çalışmamızda 21 gün 50 mg/kg krokin uygulaması BDNF düzeyini etkilememiştir. Bu bulgumuz doz ve süre anlamında literatüre katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda krokin tek başına uygulandığında TNF- α düzeyini arttırıcı etki gösterirken; diyabetik hayvanların hipokampüslerindeki koşullarda TNF- α düzeyini azaltıcı etki göstermiştir. Bu durum krokinin aynı doz ve aynı süre uygulansa bile farklı koşullarda farklı etki gösterdiğini ortaya çıkarmaktadır. Benzer şekilde krokin tek başına uygulandığında plazma

sitokrom-c düzeyini arttırıcı etkide bulunurken diyabetik hayvanların sitokrom-c düzeylerinde herhangi bir değışikliğe neden olmadı.

İmmunohistokimyasal olarak incelediğimiz hipokampus dokusunda diyabetik sıçanların sadece hipokampusün CA1 bölgesinde azalan NeuN anlatımını krokin uygulamasının arttırdığını belirledik. Krokinin bu etkisini sadece hipokampusün CA1 bölümünde görebildik. İlginç olarak krokin grubunun hipokampusünün CA3 bölgesinde NeuN anlatımını azalttığını belirledik. Bu bulgularımızda da krokinin etkisinin koşullara göre değışebildiği görölmektedir.

Son olarak nissl boyama incelemelerimizde tedavi grubunun hipokampusünün CA1 bölgesinde dejenere nöronların diyabete göre arttığını belirledik. Ayrıca hipokampusün tüm bölümlerinde krokin uygulaması ile dejenere hücre yüzdelerinin arttığını gördük. 50 mg/kg krokin verildiğinde koruyucu olmasını beklerken dejenere hücreleri arttırdığını tespit ettik. Bu bulgularımız krokinin 50 mg/kg doz ve 21 gün uygulama süresinin etkileri ile ilgili literatüre katkı sağlayacaktır

KAYNAKLAR

- Abe, K., Saito, H., 2000, Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long- term potentiation, *Phytotherapy Research*, 14, 149–152.
- Abou-Seif, M. A., Youssef, A., 2004, Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients, *Chimica Acta*, 346, 161-170.
- Adams, J. M., Cory, S., 1998, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science*, 281:1322-1326.
- Afshar, S., Shahidi, S., Rohani, A. H., Komaki, A., Asl, S. S., 2018, The effect of NAD-299 and TCB-2 on learning and memory, hippocampal BDNF levels and amyloid plaques in Streptozotocin-induced memory deficits in male rats, *Psychopharmacology*, 235:2809–2822.
- Agrawal, R., Tyagi, E., Shukla, R., Nath, C., 2011, Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model, *European Neuropsychopharmacology*, 21, 261–273.
- Ahmadi, M., Rajaei, Z., Hadjzadeh, M. A., Nemati, H., Hosseini, M., 2017, Crocin improves spatial learning and memory deficits in the Morris water maze via attenuating cortical oxidative damage in diabetic rats, *Neuroscience Letters*, 642: 1-6.
- Akkuş, I., Kalak, S., Vural, H., Çağlayan, O., Menekşe, E., Can, G., Durmuş, B., 1996, Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin c levels of patients with type II diabetes mellitus, *Clinical&Chimical Acta*, 244, 221-227.
- Alavizadeh, S. H., Hosseinzadeh, H., 2014, Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review, *Food and Chemical Toxicology*, 64:65-80.
- Alderson, R. F., Alterman, A. L., Barde, Y. A., Lindsay, R. M., 1990, Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture, *Neuron*, 5, 297-306.
- Altan, N., Dinçel, A. S., Koca, C., 2006, Diabetes mellitus and oksidatif stress, *Turkish Journal of Biochemistry*, 31(2), 51-6.
- Altan, N., Yiğit, Ş., Elmalı, E., Malhatun, E., Rota, S., Kılıç, N., 1997, Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase in Streptozotocine-Induced Diabetic Rat Muscle, *General Pharmacology*, 28, 795-96.
- Amaral, D. G., Insausti, R., 1990, Hippocampal formation, Editör: Paxinos G, The Human Nervous System, İkinci baskı, *California: Academic Press*.
- Aragno, M., Tamagno, E., Gatto, V., Brignardello, E., Parola, S., Danni, O., 1999, Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 26:1467-74.

- Arasteh, A., Aliyev, A., Khamnei, S., Delazar, A., Mesgari, M., Mehmannaavaz, Y., 2010, Effects of hydromethanolic extract on saffron (*Crocus sativus*) on serum glucose, insulin and cholesterol levels in healthy male rats, *Planta Medica*, 4: 397-402.
- Arisi, G. M., 2014, Nervous and immune systems signals and connections: cytokines in hippocampus physiology and pathology, *Epilepsy&Behavior*, 38, 43-47.
- Asadi, F., Abdollahi, M., Ghahremani, M. H., Jamshidi, A. H., Khodagholi, F., Yans, A., Azimi, L., Faizi, M., Vali, L., Sharifzadeh, M., 2015, Reversal effects of crocin on amyloid β -induced memory deficit: modification of autophagy or apoptosis markers, *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 139:47-5.
- Asai, A., Nakano, T., Takahashi, M., Nagao, A., 2005, Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 7302-7306.
- Ashrafi, M., Afsar, Z., Erjae, H., Nazifi, S., 2018, The Effects of Saffron (*Crocus sativus*) Aqueous Extract on TNF- α Levels in Liver, Kidney, and Lens Tissues of Diabetic Rats, *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 22:217-224.
- Auer, R. N., Kalimo, H., Olsson, Y., Siesjo, B. K., 1985, The temporal evolution of hypoglycemic brain damage Light and electron microscopic findings in the rat cerebral cortex, *Acta Neuropathology*, 67, (1): 13-24.
- Aydin, A., Orhan, H., Sayal, A., Ozata, M., Sahin, G., Isimer, A., 2001, Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control, *Clinical Biochemistry*, 34, 65-70.
- Bartsch, T., Wulff, P., 2015, The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability, *Neuroscience*, 309: 1-16.
- Bathina, S., Srinivas, N., Das, U. N., 2017, Streptozotocin produces oxidative stress, inflammation and decreases BDNF concentrations to induce apoptosis of RIN5F cells and type 2 diabetes mellitus in Wistar rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486:406-413.
- Benwahhoud, M., Jouad, H., Eddouks, M., Lyoussi, B., 2001, Hypoglycemic effect of *Suaeda fruticosa* in streptozotocin induced diabetic rats, *Journal of Rethnopharmacology*, 76: 35-38.
- Bertam, O., 2014, Memory function and the hippocampus, *Neuroscience*, 34: 51-9
- Biessels, G. J., Cristino, N. A., Rutten, G. J., Hamers, F. P., Erkelens, D.W., Gispen, W. H., 1999, Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats, Course of development and effects of insulin treatment, *Brain*, 122: 757-768
- Biessels, G. J., Gispen, W. H., 2005, The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models, *Neurobiology Aging*, 26: 36-41.

- Biessels, G. J., Kamal, A., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D.W., Gispen, W. H., 1998, Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin diabetic rats: effects of insulin treatment, *Brain Research*, 800:125-135.
- Biessels, G. J., Kerssen, A., de Haan, E. H., Kappelle, L. J., 2007, Cognitive dysfunction and diabetes: implications for primary care, *Primary Care Diabetes*, 1, 187–193.
- Biessels, G. J., Reagan, L. P., 2015, Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction, *Nature Reviews Neuroscience*, 16, 660–671.
- Bliss, T., Schoepfer, R., 2004, Neuroscience: Controlling the ups and downs of synaptic strength, *Science*, 304:973–974.
- Blurton-Jones, M., Kitazawa, M., Martinez-Coria, H., Castello, N. A., Müller, F. J., Loring, J. F., Yamasaki, T. R., Poon, W. W., Green, K. N., LaFerla, F. M., 2009, Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 13594-13599.
- Bolzan, A. D., Bianchi, M. S., 2002, Genotoxicity of streptozotocin, *Mutation Research*, 512, 121-134.
- Bonnefont-Rousselot, D., 2002, Glucose and reactive oxygen species, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5, 561-568.
- Bramham, C. R., Southard, T., Sarvey, J. M., Herkenhem, M., Brady, L. S., 1996, Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication, *Journal of Comparative Neurology*, 368, 371-382.
- Brands, A. M., Biessels, G. J., Kappelle, L. J., de Haan, E. H., de Valk, H.W., Algra, A., Kessels, R. P., 2007, Cognitive functioning and brain MR1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: a comparative study, *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 23, 343–350.
- Brindley, D. N., Wang, C. N., Mei, J., Xu, J., Hanna, A. N., 1999, Tumor necrosis factor- α and ceramides in insulin resistance, *Lipids*, 34:85-88.
- Brownlee, M., 2001, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, 414, 813-820.
- Cai, X. J., Wang, L., Hu, C. M., 2018, Effects of GABAB receptor activation on spatial cognitive function and hippocampal neurons in rat models of type 2 diabetes mellitus, *Bioscience Research*, 38, (1): 171-184.
- Cai, Y., 2011, Activated microglia are less vulnerable to hemin toxicity due to nitric oxide-dependent inhibition of JNK and p38 MAPK activation, *Immunology*, 187, 1314–1321.
- Cai, Z., Zhao, Y., Yao, S., 2011, Increase in β -amyloid protein in the hippocampus caused by diabetic metabolic disorder are blocked by minocycline through inhibition of NK- κ B pathway activation, *Pharmacology Research*, 63: 381–391.

- Cannon, J. R., Greenamyre, J. T., 2009, NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra, *Neuroscience Letters*, 464, 14–17.
- Castrén, E., Thoenen, H., Lindholm, D., 1995, Brain derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus, *Neuroscience*, 64, 71-80.
- Ceretta, L. B., 2012, Imipramine treatment reverses depressive-like behavior in alloxan-diabetic rats, *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 28, 139–144.
- Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. C., 2011, Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone, *Life Sciences*, 88:619-627.
- Chen, B., Dowlathshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., Young, L. T., 2001, Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication, *Biological Psychiatry*, 50, 260-265.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., Mecocci, C., 2005, Potential markers of oxidative stress in stroke, *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 841-852.
- Cramer, S. C., Sur, M., Dobkin, B. H., O'Brien, C., Sanger, T. D., Trojanowski, J. Q., Rumsey, J. M., Hicks, R., Cameron, J., Chen, D., Chen, W. G., Cohen, L. G., deCharms, C., Duffy, C. J., Eden, G. F., Fetz, E. E., Filart, R., Freund, M., Grant, S. J., Haber, S., Kalivas, P. W., Kolb, B., Kramer, A. F., Lynch, M., Mayberg, H. S., McQuillen, P. S., Nitkin, R., Pascual-Leone, A., Reuter, L. P., Schiff, N., Sharma, A., Shekim, L., Stryker, M., Sullivan, E. V., Vinogradov, S., 2011, Harnessing neuroplasticity for clinical applications, *Brain*, 134:1591-1609.
- Csordas, A., Mazlo, M., Gallyas, F., 2003, Recovery versus death of “dark” (compact) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations, *Acta Neuropathology*, 106, (1):37-49.
- Cukierman, T., Gerstein, H. C., Williamson, J. D., 2005, Cognitive decline and dementia in diabetes systematic overview of prospective observational studies, *Diabetologia*, 48, 2460-2469.
- de la Monte, S. M., 2014, Relationships between diabetes and cognitive impairment, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 43, 245–267.
- Di Luca, M., Ruts, L., Gardoni, F., Cattabeni, F., Biessels, G. J., Gispen, W. H., 1999, NMDA receptor subunits are modified transcriptionally and post-translationally in the brain of streptozotocin-diabetic rats, *Diabetologia*, 42: 693–701.
- Domingueti, C. P., Dusse, L. M. S., Carvalho, M. G., de Sousa, P., Gomes, K. B., Fernandes, A. P., 2016, Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications, *Journal of Diabetes and its Complications*, 30, 738–745.

- Dudai, Y., 2004, The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?, *Annual Review of Psychology*, 55, 51–86.
- Dünya Sağlık Örgütü, 2006, Prevention of blindness from diabetes mellitus: report of WHO consultation in Geneva, Switzerland.
- El- Alfy, A. T., 2017, The development of novel antidepressants: Focus on plant- based drugs, *Frontiers in Drug Discovery*, 2, 357–390.
- Esmaeal, T., Amir Abbas, F., Siamak, A. R., Shahram, J., Voria, K., Bentolhoda, R., Zahra, M., 2013, Crocin Improved Learning and Memory Impairments in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Iranian Journal of Basic Medical Science*, 16, 91-100.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M., 2003, Are oxidative stress activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction, *Diabetes*, 52, 1-8.
- Fazeli, S.A., 2009, Neuroprotection in diabetic encephalopathy, *Neurodegeneration Disorders*, 6, 213–218.
- Finley, J. W., and Gao, S., 2017, A Perspective on *Crocus sativus* L. (Saffron) Constituent Crocin: A Potent Water-Soluble Antioxidant and Potential Therapy for Alzheimer's Disease, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 1005–1020.
- Flood, J. F., Mooradian, A. D., Morley, J. E., 1990, Characteristics of learning and memory in streptozotocin-induced diabetic mice, *Diabetes*, 39, 1392-1398.
- Foss-Freitas, M. C., Foss, N. T., Donadi, E. A., Foss, M. C., 2006, In vitro TNF- α and IL-6 production by adherent peripheral blood mononuclear cells obtained from type 1 and type 2 diabetic patients evaluated according to the metabolic control, *Annals of New York Academy of Sciences*, 1079, 177-180.
- Frier, B.M., 2011, Cognitive functioning in type 1 diabetes: the diabetes control and complications trial (DCCT) revisited, *Diabetologia*, 54, 233–236.
- Fuchs, Y., Steller, H., 2011, Programmed cell death in animal development and disease, *Cell*, 147,742-758.
- Fukui, K., Onodera, K., Shinkai, T., Suzuki, S., Urano, S., 2001, Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems, *Annals of the New York Academy Sciences*, 928, 168–175.
- Gardoni, F., Kamal, A., Bellone, C., Biessels, G. J., Ramakers, G. M., Cattabeni, F., Gispen, W. H., Di Luca, M., 2002, Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats, *Journal of Neurochemistry*, 80, 438–447.
- Ghadroost, B., Vafaei, A. A., Rashidy-Pour, A., Hajisoltani, R., Bandegi, A. R., Motamedi, F., 2011, Protective effect of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory in rats, *European Journal of Pharmacology*, 667, 222-229.

- Giaccio, M., 2004, Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice Review, *Food Science&Nutrition*, 44:(3), 155-72.
- Gillery, P., Monboisse, J. C., Maquart, F. X., Borel, J. P., 1988, Glycation of proteins as a source of superoxide, *Diabetes*, 14, 1114- 1120.
- Glaser, N., Russell, J. S., Cohen, M., Little, C., O'Donnell, M., Sall, J., 2017, Histological and cognitive alterations in adult diabetic rats following an episode of juvenile diabetic ketoacidosis: Evidence of permanent cerebral injury, *Neuroscience Letters*, 650, 161-167.
- Gocmez, S. S., Şahin, T. D., Yazır, Y., Duruksu, G., Eraldemir, F. C., Polat, S., Utkan, T., 2019, Resveratrol prevents cognitive deficits by attenuating oxidative damage and inflammation in rat model of streptozotocin diabetes induced vascular dementia, *Physiology & Behavior*, 201, 198-207.
- Gonzalez, R. E., Aliev, G., Rodrigues, M. A., Barreto, G. E., 2016, Alterations in glucose metabolism on cognition: a possible link between diabetes and dementia, *Current Pharmaceutical Design*, 22, 812-818.
- Grazyna, L., Thomas, N., Claes, G. Ö., Vladimer, D., Cesare, P., 2015, Type 2 diabetes-induced neuronal pathology in the piriform cortex of the rat is reversed by the GLP-1 receptor agonist exendin-4, *Oncotarget*, 7:5.
- Green, A., Sjølie, A. K., Eshøj, O., 1996, Trends in the epidemiology of IDDM during 1970 in Fyn County, Denmark, *Diabetes Care*, 19:(8), 801-806.
- Green, K., Brand, M. D., Murphy, M. P., 2004, Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes, *Diabetes*, 53, 110-118.
- Grillo, C. A., Piroli, G. G., Lawrence, R. C., Wrihten, S. A., Green, A. J., Wilson, S. P., 2015, Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity, *Diabetes*, 64, 3927–3936.
- Gundogan, N. U., 2001, The Story of A Nobel Prize, The 80th Anniversary of the Discovery of Insulin, *Baskent University Publication*, Ankara, 5-55.
- Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., 2014, Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 4405-4409.
- Guselnikova, V. V., Korzhevskiy, D. E., 2015, NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker, *Acta Naturae*, 25, 7-2.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2007, *Tıbbi Fizyoloji*, Nobel, Ankara, ISBN: 978-975-420-558-9.
- Habif, S., Turgan, N., Mutaf, I., 1997, Plasma catalase, glutathione peroxidase and selenium levels in adult diabetic patients, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 27, 139-141.
- Hall, J.E., 2011, Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 12th edition, Philadelphia: Elseiver.

- Hao, L., Li, Q., Zhao, X., Li, Y., Zhang, C., 2019, A long noncoding RNA LOC103690121 promotes hippocampus neuronal apoptosis in streptozotocin-induced type 1 diabetes, *Neuroscience Letters*, 703, 11-18.
- Hatziagapiou, K., Lambrou, G. I., 2018, The protective role of *Crocus sativus* L. (Saffron) against ischemia- reperfusion injury, hyperlipidemia and atherosclerosis: Nature opposing cardiovascular diseases, *Current Cardiology Reviews*, 14, 272–289.
- Hazman, Ö., Aksoy, L., Büyükben, A., 2016, Effects of crocin on experimental obesity and type- 2 diabetes, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46, 1593–1602.
- Hirsh, R., 1974, The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: A theory 1, *Behavioral Biology*, 12, 421-444.
- Hoshyar, R., Mollaei, H., 2017, A comprehensive review on anticancer mechanisms of the main carotenoid of saffron, crocin, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69, 1419–1427.
- Hosseini, A., Razavi, B. M., 2018, Pharmacokinetic Properties of Saffron and its Active Components, *Pharmacokinetics*, 43:(4), 383-390.
- Hosseinzadeh, H., Nassiri- Asl, M., 2013, Avicenna's (Ibn Sina) the Canon of Medicine and saffron (*Crocus sativus*): A review, *Phytotherapy Research*, 27, 475–483.
- <https://diabetesatlas.org/en/sections/worldwide-toll-of-diabetes.html>, [Erişim Tarihi: 08 Kasım 2020].
- <https://evrimagaci.org/amigdala-hipokampus-ve-bellek-uzerine-160>, [Erişim tarihi: 08 Kasım 2020].
- <https://psikologterapi.wordpress.com/2010/11/01/bellek-cesitleri-ve-islevleri>, [Erişim tarihi: 08 Kasım 2020].
- Huang, C., Yin, M., Chiu, L., 2011, Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Psidium guajava* fruit in streptozotocin-induced diabetic rats, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2189-95.
- Hube, F., Birgel, M., Lee, Y. M., Hauner, H., 1999, Expression pattern of tumour necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus, *European Journal of Clinical Investigation*, 29:(8), 672-678.
- Isaacson, R.L., 2002, Unsolved mysteries: The hippocampus, *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 2, 87-107.
- Iwai, T., Suzuki, M., Kobayashi, K., Mori, K., Mogi, Y., Oka, J., 2009, The influences of juvenile diabetes on memory and hippocampal plasticity in rats: improving effects of glucagon-like peptide-1, *Neuroscience Research*, 64, 67–74.
- İzci, Y., Erbaş, Y. C., 2015, Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları, *Türk Nöroşürji Dergisi*, 25, 287-295.

- Jabbarpour, Z., Shahidi, S., Saidijam, M., Sarihi, A., Hassanzadeh, T., Esmaeili, R., 2014, Effect of tempol on the passive avoidance and novel object recognition task in diabetic rats, *Brain Research Bulletin*, 101, 51-56.
- Jam, I. N., Sahebkar, A. H., Eslami, S., Mokhber, N., Nosrati, M., Khademi, M., Abbasi, M., 2017, The effects of crocin on the symptoms of depression in subjects with metabolic syndrome, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26, 925–930.
- Javadi, B., Sahebkar, A., Emami, S. A., 2013, A survey on saffron in major Islamic traditional medicine books, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16, 1–11.
- Javadi, B., Sahebkar, A., Emami, S. A., 2017, Medicinal plants for the treatment of asthma: A traditional persian medicine perspective, *Current Pharmaceutical Design*, 23, 1623–1632.
- Jolival, C. G., Lee, C. A., Beiswenger, K. K., Smith, J. L., Orlov, M., Torrance, M. A., 2008, Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic rats: parallel with alzheimer's disease and correction by insulin, *Journal of Neuroscience Research*, 86, 3265-3274.
- Kamal, A., Biessels, G. J., Duis, S. E. T., Gispen, W. H., 2000, Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin- diabetic rats: interaction of diabetes and ageing, *Diabetologia*, 43, 500–506.
- Kang, C., Lee, H., Jung, E. S., Seyedian, R., Jo, M., Kim, J., Kim, E., 2012, Saffron (*Crocus sativus* L.) increases glucose uptake and insulin sensitivity in muscle cells via multipathway mechanisms, *Food Chemistry*, 135, 2350–2358.
- Kaptan, Z., 2018, Sıçanlarda Adolesan Dönemde Öngörülebilir Kronik Stres ve Zengin Çevre Uygulamasının Spasyal Hafıza ve Hipokampal Asimetri Üzerine Etkisi, Doktora, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Karrer, P., Benz, F., Morf, R., Raudnitz, H., Stoll, M., Takahashi, T., 1932, Pflanzenfarbstoffe XLVI. Konstitution des Crocetins und Bixins, Synthese des Perhydro- norbixins, *Helvetica Chimica Acta*, 15, 1399-1419.
- Kasmaire, F. D., Farshid, A. A., Tamaddonfard, E., Imani, M., 2018, The effects of safranal, a constitute of saffron, and metformin on spatial learning and memory impairments in type-1 diabetic rats: behavioral and hippocampal histopathological and biochemical evaluations, *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 107, 203-211.
- Katsumata, K., Katsumata, K. J., Katsumata, Y., 1992, Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan-or-streptozotocin-induced diabetes in rats, *Hormone and Metabolic Research*, 24, 508-510.
- Keleş, E., Çepni, S., 2006, Beyin ve Öğrenme, *Türk Fen Eğitimi Dergisi*, 3, 2.
- Kennedy, J. M., Zochodne, D. W., 2005, Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus, *Journal of the Peripheral Nervous System*, 10, 144–157.

- Kim, A. Y., Kim, H. S., Kang, J. H., Yang, M. P., 2015, Serum adipokine concentrations in dogs with diabetes mellitus: a pilot study, *Journal of Veterinary Science*, 16:(3), 333-340.
- Kirik, O. V., Sukhorukova, E. G., Vlasov, T. D., Korzhevskii, D. E., 2009, NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker, *Morfologia*, 135: 80-82.
- Kodl, C. T., Seaquist, E. R., 2008, Cognitive dysfunction and diabetes mellitus, *Endocrine Reviews*, 29, 494-511.
- Kolb, B., Whishaw, I. Q., 2005, Introduction to Brain and Behavior, 2nd ed. US: Worth Publishers.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, K., Olczyk, P., Winsz-Szczotka, K., 2005, Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 68, 207-216.
- Korzhevskii, D. E., Khozhai, L. I., Gilerovich, E. G., Grigoriev, I. P., Gilyarov, A.V., Otellin, V. A., 2006, Structural, functional and neurochemical regularities of the brain asymmetry and plasticity, *Proceedings of the All-Russian conference with international participation*, Moscow, In the conference abstract-book, 139–142.
- Korzhevskii, D. E., Kirik, O. V., Petrova, E. S., Karpenko, M. N., Grigor'ev, I. P., Sukhorukova, E. G., Kolos, E. A., 2014, Theoretical bases and practical application of the immunohistochemical methods, Sayfa:119.
- Krabbe, K. S., Nielsen, A. R., Krogh, M. R., Plomgaard, P., Rasmussen, P., Erikstrup, C., Fischer, C. P., Lindegard, B., Petersen, A. M., Taudorf, S., Secher, N. H., Pilegaard, H., Bruunsgaard, H., Pedersen, B. K., 2007, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes, *Diabetologia*, 50, 431-438.
- Krishnaswamy, V. K. D., Alugoju, P., Periyasmy, L., 2020, Effect of short-term oral supplementation of crocin on age-related oxidative stress, cholinergic, and mitochondrial dysfunction in rat cerebral cortex, *Life Sciences*, 263, 118-545.
- Kucukatay, V., Agar, A., Gumuslu, S., Yargicoglu, P., 2007, Effect of sulfur dioxide on active and passive avoidance in experimental diabetes mellitus: relation to oxidant stress and antioxidant enzymes, *International Journal of Neuroscience*, 117, 1091–1107.
- Kucukatay, V., Hacioglu, G., Ozkaya, G., Agar, A., Yargicoglu, P., 2009, The effect of diabetes mellitus on active avoidance learning in rats: the role of nitric oxide, *Medical Science Monitor*, 15, 88–93.
- Kuhad, A., Chopra, K., 2008, Effect of sesamol on diabetes-associated cognitive decline in rats, *Experimantel Brain Research*, 185, 411-420.
- Kumar, S. S., Buckmaster, P. S., 2007, Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata, *Brain Research*, 1142, 54–60.
- Kurçer, Z., Karaoğlu, D., 2012, Deneysel diyabet modellerinde alloksan ve streptozotosin kullanımı, *Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Dergisi*, 16, 34-40.

- Lathe, R., 2001, Hormones and the hippocampus, *Journal of Endocrinology*, 169, 205–231.
- Leal, G., Afonso, P. M., Salazar, I. L., Duarte, C. B., 2015, Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF, *Brain Research*, 1621, 82–101.
- Lebed, Y. V., Orlovsky, M. A., Tsupikov, O. M., Skibo, G. G., Pivneva, T. A., 2008, Remodelling of ammon's horn during the first 2 weeks of experimental diabetes development, *Fiziologichnyi Zhurnal*, 54, 52-56.
- Leihteinen, S., Pitkanen, A., 2004, Brain-derived neurotrophic factor signaling modifies hippocampal gene expression during epileptogenesis in transgenic mice, *European Journal of Neuroscience*, 19, 3245-3254.
- Lenzen, S., 2008, The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes, *Diabetologia*, 51:(2), 216-226.
- Li, G., Anderson, R. E., Tomita, H., Adler, R., Liu, X., Zack, D. J., Rajala, R. V., 2007, Nonredundant role of Akt2 for neuroprotection of rod photoreceptor cells from light-induced cell death, *Journal of Neuroscience*, 27, 203-211.
- Li, J., Shao, Y. H., Gong, Y. P., Lu, Y. H., Liu, Y., Li, C. L., 2014, Diabetes mellitus and dementia a systematic review and meta-analysis, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18, 1778–1789.
- Liou, J. C., Yang, S. L., Wang, P. H., Wu, J. L., Huang, Y. P., Chen, B.Y., Lee, M. C., 2018, Protective effect of crocin against the declining of high spatial frequency- based visual performance in mice, *Journal of Functional Foods*, 49, 314–323.
- Lipscombe, L., Hux, J., 2007, Trend in diabetes prevalence, incidence and mortality in Ontario, Canada (1995 -2005): A population-based study, *Lancet*, 369, 750-756.
- Liu, X., Mameza, M. G., Lee, Y. S., Eseonu, C. I., Yu, C. R., Kang Derwent, J. J., Egwuagu, C. E., 2008, Suppressors of cytokine-signaling proteins induce insulin resistance in the retina and promote survival of retinal cells, *Diabetes*, 57, 1651-1658.
- Lopresti, A. L., Drummond, P. D., 2014, Saffron (*Crocus sativus*) for depression: A systematic review of clinical studies and examination of underlying antidepressant mechanisms of action, *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 29, 517–527.
- Los, M., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., 1999, The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice, *Immunity*, 10, 629-639.
- Maisonpierre, P. C., Le Beau, M. M., Ip, N. Y., 1991, Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations, *Genomics*, 10, 558-568.
- Maksimov, M. L., Svistunov, A. A., Tarasov, V. V., Chubarev, V. N., Ávila- Rodríguez, M., Barreto, G. E., Aliev, G., 2016, Approaches for the development of drugs for treatment of obesity and metabolic syndrome, *Current Pharmaceutical Design*, 22, 895–903.

- Malviya, N., Malviya, S., Jain, S., Vyas, S., 2016, A review of the potential of medicinal plants in the management and treatment of male sexual dysfunction, *Andrologia*, 48, 880–893.
- Manschot, S. M., Biessels, G. J., Rutten, G. E., Kessels, R. P., Gispen, W. H., Kappelle, L. J., 2008, Peripheral and central neurologic complications in type 2 diabetes mellitus: no association in individual patients, *Journal of the Neurological Sciences*, 264, 157–162.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., Watkins, J. B., 2003, Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 4-38.
- Mastrocola, R., Restivo, F., Vercellinatto, I., Danni, O., Brignardello, E., Aragno, M., Boccuzzi, G., 2005, Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats, *Journal of Endocrinology*, 187, 37–44.
- Mazumder, A. G., Sharma, P., Patial, V., Singh, D., 2017, Crocin Attenuates Kindling Development and Associated Cognitive Impairments in Mice via Inhibiting Reactive Oxygen Species-Mediated NF- κ B Activation, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 120, 426-433.
- McEwen, B. S., Magariños, A. M., Reagan, L. P., 2002, Studies of hormone action in the hippocampal formation possible relevance to depression and diabetes, *Journal of Psychosomatic Research*, 53:(4), 883-890.
- Memişoğulları, R., 2003, Plazma Homosistein Düzeyleri ile Tip 2 Diyabet, Komplikasyonları, Kontrolü ve Süresi Arasındaki İlişkinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
- Memişoğulları, R., Bakan, E., 2004, Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus, *Journal of Diabetes and Its Complications*, 18, 193-197.
- Memisogullari, R., Taysi, S., Bakan, E., Capoglu, I., 2003, Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus, *Cell Biochemistry & Function*, 21, 291-296.
- Moradzadeh, M., Sadeghnia, H. R., Tabarraei, A., Sahebkar, A., 2018, Anti- tumor effects of crocetin and related molecular targets, *Journal of Cellular Physiology*, 233, 2170–2182.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., Smith, A. M., 1992, NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates, *Development*, 116, 201–211.
- Nam, K. N., Park, Y. M., Jung, H. J., Lee, J. Y., Min, B. D., Park, S.U., Lee, E. H., 2010, Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells, *European Journal of Pharmacology*, 648, 110–116.
- Nikbakht- Jam, I., Khademi, M., Nosrati, M., Eslami, S., Foroutan- Tanha, M., Sahebkar, A., Emamian, M., 2015, Effect of crocin extracted from saffron on pro- oxidant–anti-oxidant balance in subjects with metabolic syndrome: A randomized, placebo-controlled clinical trial, *European Journal of Integrative Medicine*, 8, 307–312.

- Ochiai, T., Ohno, S., Soeda, S., Tanaka, H., Shoyama, Y., Shimeno, H., 2004, Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol, *Neuroscience Letters*, 362, 61-64.
- Ola, M. S., Aleisa, A. M., Al-Rejaie, S. S., Abuohashish, H. M., Parmar, M. Y., Alhomida, A. S., 2014, Flavanoid, morin inhibits oxidative stress, inflammation and enhances neurotrophic support in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats, *Neurology Sciences*, 35: (7), 1003–1008.
- Ono, M., Ichihara, J., Nonomura, T., Itakura, Y., Taiji, M., Nakayama, C., Noguchi, H., 1997, Brain-derived neurotrophic factor reduces blood glucose level in obese diabetic mice but not in normal mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 238, 633-637.
- Oruc, S., Gönül, Y., Tunay, K., Oruc, O. A., Bozkurt, M. F., Karavelioglu, E., Bağcıoğlu, E., Coşkun, K. S., Celik, S., 2016, The antioxidant and antiapoptotic effects of crocin pretreatment on global cerebral ischemia reperfusion injury induced by four vessels occlusion in rats, *Life Sciences*, 154, 79–86.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z., 2015, Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6, 331-336.
- Özden, Y., 2003, Öğrenme ve Öğretme, 5. Baskı, Pegem A Yayıncılık, Ankara.
- Papovic, M., Biessels, G. J., Isaacson, R. L., Gispen, W. H., 2001, Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task, *Behavioural Brain Research*, 122, 201–207.
- Pascual, M., 2007, Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats, *European Journal of Neuroscience*, 25, 541–550.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A., Sacktor, T. C., 2006, Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP, *Science*, 313, 1141-1144.
- Patterson, S. L., Grover, L. M., Schwartzkroin, P. A., Bothwell, M., 1992, Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs, *Neuron*, 9, 1081-1088.
- Pham, T. Q., Cormier, F., Farnworth, E., Tong, V. H., Van Calsteren, M. R., 2000, Anti-oxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1455-1461.
- Pratchayasakul, W., Kerdphoo, S., Petsophonakul, P., Pongchaidecha, A., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. C., 2011, Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone, *Life Sciences*, 88, 619–627.

- Pratchayasakul, W., Kerdphoo, S., Petsophonsakul, P., Pongchaidecha, A., Puglisi, M. J., Fernandez, M. L., 2008, Modulation of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and adiponectine by diet, exercise, and weight loss, *Journal of Nutrition*, 138:(12), 2293–2296.
- Putta, S., Peluso, I., Yarla, N. S., Kilari, E. K., Bishayee, A., Lu, D. Y., Kamal, M. A., 2017, Diabetes mellitus and male aging: Pharmacotherapeutics and clinical implications, *Current Pharmaceutical Design*, 23, 4475–4483.
- Rahbani, M., Mohajeri, D., Rezaie, A., and Nazeri, M., 2012, Protective effect of ethanolic extract of saffron (dried stigmas of *Crocus sativus* L.) on hepatic tissue injury in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Animal Veterinary Advances*, 11: 1985–1994.
- Rahiman, N., Akaberi, M., Sahebkar, A., Emami, S. A., Tayarani- Najaran, Z., 2018, Protective effects of saffron and its active components against oxidative stress and apoptosis in endothelial cells, *Microvascular Research*, 118, 82–89.
- Rajaei, Z., Hadjzadeh, M. A., Nemati, H., Hosseini, M., Ahmadi, M., Shafiee, S., 2013, Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Medicinal Food*, 16, 206–210.
- Razavi, B. M., Hosseinzadeh, H., 2017, Saffron: a promising natural medicine in the treatment of metabolic syndrome, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 1679–1685.
- Razavi, B. M., Sadeghi, M., Abnous, K., Hasani, F. V., Hosseinzadeh, H., 2017, Study of the Role of CREB, BDNF, and VGF Neuropeptide in Long Term Antidepressant Activity of Crocin in the Rat Cerebellum, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16: (4), 1452-1462.
- Rezaee, R., Hosseinzadeh, H., 2013, Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16:(1), 12-26.
- Riazi, A., Panahi, Y., Alishiri, A. A., Hosseini, M. A., Zarchi, A. A. K., Sahebkar, A., 2017, The impact of saffron (*Crocus sativus*) supplementation on visual function in patients with dry age- related macular degeneration, *Italian Journal of Medicine*, 11, 196–201.
- Rice, J. P., Wallace, D. G., Hamilton, D. ., 2015, Lesions of the hippocampus or dorsolateral striatum disrupt distinct aspects of spatial navigation strategies based on proximal and distal information in a cued variant of the Morris water task, *Behavioural Brain Research*, 289, 105–117.
- Riedel, G., Platt, B., Micheau, J., 2003, Glutamate receptor function in learning and memory, *Behavioural Brain Research*, 140, 1-47.
- Rios, J., Recio, M., Giner, R., Manez, S., 1996, An update review of saffron and its active constituents, *Phytotherapy Researches*, 10:(3), 189-93.

- Ryan, C. M., Freed M. I., Rood, J. A., Cobitz, A. R., Waterhouse, B. R., Strachan, M. W., 2006, Improving metabolic control leads to better working memory in adults with type 2 diabetes, *Diabetes Care*, 29: (2), 345–351.
- Sadeghi, A., Hami, J., Razavi, S., Esfandiary, E., Hejazi, Z., 2016, The effect of diabetes mellitus on apoptosis in Hippocampus: cellular and molecular aspects, *International Journal of Preventive Medicine*, 7, 57.
- Sadoughi, S., 2017, Effects of crocin on ovarian follicle and serum sex hormone in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in rat model, *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*, 17, 198–210.
- Samaha, M. M., Said, E., Salem, H. A., 2019, A comparative study of the role of crocin and sitagliptin in attenuation of STZ-induced diabetes mellitus and the associated inflammatory and apoptotic changes in pancreatic β -islets, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 72, 103-238.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., and Samini, F., 2014, Ameliorative effect of saffron aqueous extract on hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidative stress on diabetic encephalopathy in streptozotocin induced experimental diabetes mellitus, *BioMed Research International*, 857-920.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Farkhondeh, T., 2016, Crocin attenuate tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin- 6 (IL- 6) in streptozotocin- induced diabetic rat aorta, *Cytokine*, 88, 20–28.
- Sanjeevi, C. B., 2001, One hundred years of Nobel Prize and Diabetes, *Diabetologia* 44: (9), 37-38.
- Sarnat, H. B., Nochlin, D., Born, D. E., 1998, Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system, *Brain & Development*, 20, 88–94.
- Satman, I., Rea, R., Eriksson, M., Mosenzon, O., Pratley, R., Baeres, F., Orsted, D., Mann, J., 2016, Baseline renal function and associated factors in a high cardiovascular risk type 2 diabetes population, *Journal of Diabetes Complications*, 30:(8), 1631-1639.
- Satman, İ., Alagöl, F., Ömer, B., Kalaca, S., Çolak, N., 2013, Turdep-2 Sonuçlarının Özeti, <https://diabetesatlas.org/en/sections/worldwide-toll-of-diabetes.html>, [Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2020].
- Satman, İ., İmamoğlu, Ş., Yılmaz, C., Akalın, S., 2011, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu, http://temd.org.tr/uploads/hastalar/03_Tip_1_Diyabet.pdf, [Ziyaret tarihi: 7 Kasım 2020].
- Savaş, H. B., Gültekin, F., 2017, İnsülin direnci ve klinik önemi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 24:(3), 116-125.

- Scheen, A. J., 2003, Pathophysiology of type 2 diabetes, *Acta Clinical Research*, 58:(6), 335-341.
- Schein, P. S., Cooney, D. A., and Vernon, M. L., 1967, The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity, *Cancer Research*, 27, 2324-32.
- Schmatz, R., Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Corrêa, M., da Rosa, M. M., Rubin, M. A., 2009, Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats, *European Journal of Pharmacology*, 610, 42–48.
- Shafiee, M., Arekhi, S., Omranzadeh, A., Sahebkar, A., 2017, Saffron in the treatment of depression, anxiety and other mental disorders: Current evidence and potential mechanisms of action, *Journal of Affective Disorders*, 227, 330–337.
- Shirali, S., Zahra Bathaie, S., Nakhjavani, M., 2013, Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin- induced diabetic rats, *Phytotherapy Research*, 27, 1042–1047.
- Sima, A. A. F., Kamiya, H., Lia, Z. G., 2004, Insulin C-peptide hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes, *European Journal of Pharmacology*, 490, 187–197.
- Siresha, B., Das, U. N., 2015, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its clinical implications, *Archives of Medical Science*, 11, 1164-1178.
- Siresha, B., Nanduri, S., Undurti, D. N., 2017, Streptozotocin produces oxidative stress, inflammation and decreases BDNF concentrations to induce apoptosis of RIN5F cells and type 2 diabetes mellitus in Wistar rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486, 406-413.
- Small, G. W., 2007, Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 6037-6042.
- Sobhani, Z., Nami, S. R., Emami, S. A., Sahebkar, A., Javadi, B., 2017, Medicinal plants targeting cardiovascular diseases in view of Avicenna, *Current Pharmaceutical Design*, 23, 2428–2443.
- Soeda, S., Ochiai, T., Paopong, L., Tanaka, H., Shoyama, Y., Shimeno, H., 2001, Crocin suppresses tumor necrosis factor- α -induced cell death of neuronally differentiated PC- 12 cells, *Life Sciences*, 69, 2887-2898.
- Soylu, H., 2004, Keşif Yoluyla Öğrenme: Fen Öğretiminde Yeni Yaklaşımlar, 1. Basım, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Sözmen, E. Y., Onat, T., Emerk, K., 2002, Yaşlanma Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Stranahan, A. M., 2008, Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons, *Nature Neuroscience*, 11, 309–317.

- Suge, R., Shimazu, T., Hasegawa, H., Inoue, I., Hayashibe, H., Nagasaka, H., Araki, N., Katayama, S., Nomura, M., Watanabe, S., 2012, Cerebral antioxidant enzyme increase associated with learning deficit in type2 diabetes rats, *Brain Research*, 1481, 97-106.
- Szkudelski, T., 2001, The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of rat pancreas, *Physiological Research*, 50, 537-546.
- Tamaddonfard, E., Farshid, A. A., Ahmadian, E., Hamidhoseyni, A., 2012, Crocin enhanced functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, Accepted for Publication.
- Tamaddonfard, E., Farshid, A. F., Rezaee, S., Javadi, S., Khosravi, V., Rahman, B., Mirfakhraee, Z., 2013, Crocin Improved Learning and Memory Impairments in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16: (1), 91-100.
- Tamer, L., İspir, T., Doran, F., 1997, Deneysel diyabetik sıçan modelinde kalsiyum adenosin 5'-trifosfataz enzimi, serum malondialdehid ve alfa tokoferol düzeylerinin araştırılması, *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 22, 145-151.
- Tanbek, K., 2015, Streptozotocin ile indüklenmiş diyabetik sıçan modelinde metformin'in diyabetik nöropati ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisinin araştırılması, *Yüksek lisans tezi*, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, R.A., Bakan, E., 2002, Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis, *Rheumatology International*, 21, 200-204.
- Thomas, P.B., 2001, The Implication of Brain Research in Preparing Young Children to Enter School Ready to Learn, The Florida Agricultural and Mechanical University College of Education, *Doctor of Philosophy*, Florida, USA.
- Tian, Z., Wang, J., Xu, M., Wang, Y., Zhang, M., Zhou, Y., 2016, Resveratrol improves cognitive impairment by regulating apoptosis and synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats, *Cellular Physiology Biochemistry*, 40, 1670-1677.
- Utkan, T., Yazir, Y., Karson, A., Bayramgürler, D., 2015, Etanercept improves cognitive performance and increases eNOS and BDNF expression during experimental vascular dementia in streptozotocin-induced diabetes, *Current Neurovascular Research*, 12, 135-146.
- Uzum, G., Akgun-Dar, K., Aksu, U., 2010, The effects of atorvastatin on memory deficit and seizure susceptibility in pentylenetetrazole-kindled rats, *Epilepsy & Behavior*, 19, 284-289.
- Vahdati, H. F., Naseri, V., Razavi, B., Mehri, S., Abnous, K., Hosseinzadeh, H., 2014, Antidepressant effects of crocin and its effects on transcript and protein levels of CREB, BDNF, and VGF in rat hippocampus, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, 22-16.
- Vasilev, D. S., Tumanova, N. L., Kim, K. K., Lavrentyeva, V. V., Lukomskaya, N. Y., Zhuravin, I. A., Magazanik, L. G., Zaitsev, A. V., 2018, Transient Morphological

Alterations in the Hippocampus After Pentylentetrazole-Induced Seizures in Rats, *Neurochemical Research*, 43, 1671-1682.

- Vaynman, S., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2004, Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition, *European Journal of Neuroscience*, 20, 2580–2590.
- Volpato, G. T., Calderon, I. M., Sinzato, S., Campos, K. E., Rudge, M. V., Damasceno, D. C., 2011, Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 691-6.
- Wang, K., Zhang, L., Rao, W., Su, N., Hui, H., Wang, L., Fei, Z., 2015, Neuroprotective effects of crocin against traumatic brain injury in mice: Involvement of notch signaling pathway, *Neuroscience Letters*, 591, 53–58.
- Wang, R., Dineley, K. T., Sweatt, J. D., Zheng, H., 2004, Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis, *Neuroscience*, 126: (2), 305–312.
- Weyer, A., Schilling, K., 2003, Developmental and cell type- specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum, *Journal of Neuroscience Research*, 73, 400–409.
- Wieniewski, K., Fedosiewicz, W. M., Holy, Z. Z., Car, H., Grzêda, E., 2003, Influence of NMDA, a potent agonist of glutamate receptors, on behavioral activity in 4-week streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Pharmacology*, 55, 345-351.
- Wolf, H. K., Buslei, R., Schmidt-Kastner, R., Schmidt-Kastner, P. K., Pietsch, T., Wiestler, O. D., Blümcke, I., 1996, NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44, 1167–1171.
- Woods, J. R., Plessinger, M. A., Miller, R. K., 2001, Vitamins C and E: missing links in preventing premature rupture of membranes, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185, 5-10.
- Wortock, J., 2002, Brain Based Learning Principles Applied to the Teaching of Basic Cardiac Code to Associate Degree Nursing Students Using the Human Patient Simulator, *Doctor of Philosophy*, University of South Florida, Florida, USA.
- Xi, L., Qian, Z., Xu, G., Zheng, S., Sun, S., Wen, N., Zhang, Y., 2007, Beneficial impact of crocetin, a carotenoid from saffron, on insulin sensitivity in fructose- fed rats, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 64–72.
- Yamada, K., Mizuno, M., Nabeshima, T., 2002, Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory, *Life Sciences*, 70: 735-744.
- Yang, X., Huo, F., Liu, B., Liu, J., Chen, T., Li, J., Lv, B., 2017, Crocin inhibits oxidative stress and pro- inflammatory response of microglial cells associated with diabetic retinopathy through the activation of PI3K/Akt signaling pathway, *Journal of Molecular Neuroscience*, 61, 581–589.

- Yaribeygi, H., Atkin, S. L., Sahebkar, A., 2018, A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia- induced free radical generation leading to oxidative stress, *Journal of Cellular Physiology*, 234, 1300- 1312.
- Yaribeygi, H., Mohammadi, M. T., Rezaee, R., Sahebkar, A., 2018, Crocin improves renal function by declining Nox- 4, IL- 18, and p53 expression levels in an experimental model of diabetic nephropathy, *Journal of Cellular Biochemistry*, 119, 6080–6093.
- Yaribeygi, H., Mohammadi, M.T., Sahebkar, A., 2018, Crocin potentiates antioxidant defense system and improves oxidative damage in liver tissue in diabetic rats, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 98, 333–337.
- Yaribeygi, H., Sahraei, H., Mohammadi, A. R., Meftahi, G. H., 2014, Saffron (*Crocus sativus* L.) and morphine dependence: A systematic review article, *American Journal of Biology and Life Sciences*, 2, 41–45.
- Ye, L., Wang, F., Yang, R. H., 2011, Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons, *Brain Research*, 1411, 57–64.
- Ye, L., Wang, F., Yang, R. H., 2011, Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons, *Brain Research*, 1411, 57-64.
- Yi, S. S., Hwang, I. K., Kim, D. W., Shin, J. H., Nam, S. M., Choi, J. H., Lee, C. H., Won, M. H., Seong, J. K., Yoon, Y. S., 2011, The Chronological Characteristics of SOD1 Activity and Inflammatory Response in the Hippocampi of STZ-Induced Type 1 Diabetic Rats, *Neurochemical Research*, 36, 117-128.
- Young, I. S., Woodside, J. V., 2001, Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.
- Zeidman, P., Maguire, E. A., 2016, Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory, *National Review Neurosciences*, 17:(3), 173-182.
- Zhang, W. J., Tan, Y. F., Yue, J. T., Vranic, M., Wojtawicz, J. M., 2008, Impairment of hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats, *Acta Neurologica Scandinavica*, 117, 205-210.
- Zhao, W. Q., Chen, H., Quon, M. J., Alkon, D. L., 2004, Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory, *European Journal of Pharmacology*, 490, 71-81.
- Zhou, X., 2015, Inhibition of inflammation by astaxanthin alleviates cognition deficits in diabetic mice, *Physiology&Behavior*, 151, 412–420.
- Zimmet, P. Z., Alberti, K. G. M. M., 2016, Epidemiology of Diabetes Status of a Pandemic and Issues Around Metabolic Surgery, *Diabetes Care*, 39:(6), 878-883.

Ziylan, Y. Z., 2001, Kontrol Sistemleri Sindirim ve Boşaltım Fizyolojisi, Editör: Refik Yiğit, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakóltesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.



EKLER

EK 1. Etik Kurul Karar Metni




T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2017/41

KONU: Sn. Prof. Dr. Kadriye AKGÜN-DAR

22.06.2017

Sayın, Prof. Dr. Kadriye AKGÜN-DAR

“STZ ile Uyarılmış Diyabetik Sıçanlarda Hipokampus ve Öğrenme Üzerine Krokinin Etkileri” başlıklı projenize ait başvurunuz 22.06.2017 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve STZ kullanımı, diyabet ve hafıza bozukluğu arasındaki ilişkinin literatür eşliğinde ayrıntılı bir şekilde açıklanması şartıyla onanmasına karar verilmiştir.

- Etik kurumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Neslihan AKARSU
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☐ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	
Fakülte	
Bölümü	
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Programı	

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	