

## Research Article / Araştırma Makalesi

### İnsülinin Sinaptik Plastisitedeki Rolü: Uzun Dönemli Baskılanma Role of Insulin in Synaptic Plasticity; Long Term Depression

Ercan Babur, Özlem Barutçu, Esra Tufan, Hatice Saray, Cem Süer

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

**Özet:** İnsülin, pankreatik beta hücrelerinden salgılanan ve glukoz homeostazisinin sürdürülmesinde gerekli bir hormondur. Uzun yıllar boyunca yapılan kapsamlı çalışmalar, insülinin periferik dokulardaki etki mekanizmalarını ayrıntılı olarak aydınlatmış olsa da, insülinin bilişsel işlevler üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar sınırlıdır. İnsülin reseptörleri özellikle hipocampus, olfaktor bulbus ve hipotalamusta yaygın bir dağılım göstermektedir. Bu çalışmada insülinin hipokampal plastisite formlarından biri olan uzun dönemli baskılanma üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada ağırlıkları 200-300 gr arasında değişen 24 adet Wistar erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar; Serum fizyolojik infüze edilen grup (SF, n=6), insülin infüze edilen grup (İnsülin, n=6), NT157 infüze edilen grup (NT157, n=6) ve insülin ile birlikte NT157 infüze edilen grup (İnsülin+NT157, n=6) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Uzun dönemli baskılanma, perforant yola uygulanan 1 Hz 900 adet düşük frekanslı uyarı (DFU) ile indüklendi. Dentat girus granül hücrelerinden elde edilen alan potansiyellerinden eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) eğimi ve popülasyon spike (PS) genlikleri kaydedilmiştir. Deney bitiminde çıkarılan uyarılmış hipokampuslarda PI3K, AKT, GSK3-b, IRS ve MAPT gen ekspresyonu düzeyleri PCR yöntemi ile ölçülmüştür. Perforan yolun 1 Hz ile uyarımı sonrası PS değerleri insülin infüze edilen grupta SF infüze edilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir ( $p<0,05$ ). NT157 infüze edilen grupta bu baskılanma ortadan kalkmıştır. İnsülin+NT157 verilen grupta AKT mRNA seviyeleri azalma göstermiş, NT157 infüze edilen grupta IRS mRNA seviyeleri artmıştır ( $p<0,001$ ). Yalnızca insülin infüze edilen grupta GSK3-b mRNA seviyeleri yüksek bulunmuştur. Sonuç: Hipokampal granül hücrelerinden kaydedilen alan potansiyelleri değerleri, insülinin hipokampüste UDB'yi kolaylaştırdığını göstermiştir. İnsülinin sinaptik plastisite üzerine etkisinin anlaşılması, metabolik ve dejeneratif hastalıklar arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** İnsülin, Hipokampus, NT157, Sinaptik plastisite

**Abstract:** Insulin is a hormone secreted by pancreatic beta cells that is essential for maintaining glucose homeostasis. While extensive studies over many years have elucidated the mechanisms of insulin's effects in peripheral tissues in detail, research investigating the impact of insulin on cognitive functions is limited. Insulin receptors are widely distributed in the hippocampus, olfactory bulb, and hypothalamus. In this study, the effect of insulin on long-term depression, one of the forms of hippocampal plasticity, was investigated. In this study, 24 male Wistar rats weighing between 200-300 g were used. Rats were divided into four groups as saline-infused group (SF, n=6), insulin infused group (Insulin, n=6), the NT157-infused group (NT157, n=6), and insulin+NT157-infused group (Insulin+NT157, n=6). Long-term depression (LTD) was induced by 900 low-frequency stimuli (LFS) at 1 Hz applied to the perforant pathway. Excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope and population spike (PS) amplitudes were recorded from field potentials obtained from dentate gyrus granule cells. At the end of the experiment, PI3K, AKT, GSK3-b, IRS, and MAPT gene expression levels were measured by PCR in the stimulated hippocampi. After stimulation of the perforant path with 1 Hz, PS values showed a statistically significant decrease in the insulin-infused group compared to the SF-infused group ( $p<0.05$ ). This depression disappeared in the NT157-infused group. AKT mRNA levels decreased in the insulin+NT157 group, whereas IRS mRNA levels increased in the NT157-infused group ( $p<0.001$ ). GSK3-b mRNA levels were found to be increased in the insulin-infused group. Field potentials recorded from hippocampal granule cells indicated that insulin facilitates LTD in the hippocampus. Understanding the effect of insulin on synaptic plasticity may contribute to the elucidation of the relationship between metabolic and degenerative diseases.

**Keywords:** Insulin, Hippocampus, NT157, Synaptic plasticity

**ORCID ID of the authors:** EB. [0000-0003-1445-6423](https://orcid.org/0000-0003-1445-6423) ÖB. [0000-0002-6107-2599](https://orcid.org/0000-0002-6107-2599) ET. [0000-0003-3782-9085](https://orcid.org/0000-0003-3782-9085)  
HS. [0000-0002-8361-0618](https://orcid.org/0000-0002-8361-0618), CS. [0000-0002-6455-6644](https://orcid.org/0000-0002-6455-6644)

Received 05.12.2023

Accepted 14.05.2024

Online published 16.05.2024

**Correspondence:** Ercan BABUR - Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayseri Türkiye  
e-mail: [ercanbabur@erciyes.edu.tr](mailto:ercanbabur@erciyes.edu.tr)

## 1. Giriş

İnsülin, besin alımını takiben pankreatik beta hücrelerinden salgılanan polipeptit yapıda bir hormondur. 1921 yılında Banting ve Best tarafından insülinin keşfedilmesinin ardından yapılan çalışmalar, glukoz homeostazının düzenlenmesinde aldığı rol ve periferik dokulardaki etkileri üzerine odaklanmıştır [1]. Nöronlarda glukoz kullanımının insülinden bağımsız oluşu, insülin ve merkezi sinir sistemi arasındaki ilişkinin öneminin uzun yıllar geri planda kalmasına sebep olmuştur. 1978 yılında beyinde insülin reseptörlerinin varlığının gösterilmesi ile insülinin beyindeki rolü yeniden ilgi odağı haline gelmiştir [2]. Özellikle hipotalamusta beslenmenin düzenlenmesi ve enerji tüketiminde insülinin rolünün ortaya çıkarılması [3, 4], insülin reseptörlerinin geniş dağılım gösterdiği olfaktör bulbus, serebral korteks ve hipokampüsteki rolüne dikkat çekmiştir [5].

İnsülin reseptörü (IR), tek bir gen tarafından kodlanan, iki protein alt birimi içeren bir glikoprotein olup tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Tirozin kinaz aktivasyonu fosforile olan insülin reseptör substrat (IRS) proteinleri aşağı yönlü bir hücrel sinyal yanıtını başlatır. İnsülin reseptörlerinin hipokampal sinaptik terminalde yoğunluğu göz önüne alındığında [6, 7] insülinin epizodik ve uzamsal hafızada rol alan hipokampus üzerine etkisi dikkat çekicidir. Beyindeki insülin sinyal yolağının öğrenme ve bellek ile ilişkisini araştıran araştırmacılar eksojen insülin uygulamasının kognitif performansta doz bağımlı değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir [8]. Uzamsal hafıza ile ilgili davranış testlerinde, düşük dozlarda uygulanan insülinin öğrenme performansını azalttığı, yüksek doz insülinin ise öğrenme performansını arttırdığı gösterilmiştir. Diğer taraftan meta-analiz çalışmaları Tip I diyabetli hastalarda bilişsel işlevlerde bozulma ve kognitif performansta azalma ilişkisini ortaya koymuş, [9] insülin direncinin Alzheimer hastalığında kognitif ve affektif disfonksiyonda artışa neden olduğu bildirilmiştir [10].

Uzun dönemli baskılanma (UDB), sinaptik plastisitenin sık çalışılan formlarından

biridir. N-metil-D-aspartat (NMDAR) ve metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGLUR) sinaptik veya farmakolojik olarak aktivasyonu UDB'yi indükleyebilir. Aynı zamanda UDB, hipokampal perforan yola uygulanan düşük frekanslı uyarı protokolü ile elektriksel olarak oluşturulabilir. UDB'nin altında yatan mekanizmalar, hücre içine kalsiyum akımının protein fosfatazları aktive ettiği yönündedir. Fosfataz aktivasyonu  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit reseptörlerinin (AMPA) hücre membranında internalizasyonuna ve duyarsızlaşmaya neden olarak sinaptik baskılanma oluşturmaktadır [11]. Ek olarak nöro-anatomik çalışmalar, UDB indüksiyonunun presinaptik dentritik dikenlerde silinme ve diken hacminde azalma ile sonuçlandığını göstermektedir [12].

Bu çalışmada, insülin ve selektif IRS1/2 inhibitörü olan NT157, hipokampal perforan yola tek başına veya birlikte infüze edilmiş ve tekrarlayan düşük frekanslı uyarı protokolü ile uzun dönemli baskılanma indüklenmiştir. Çalışmanın amacı; insülinin hipokampal dentat girus granül hücrelerinde uzun dönemli baskılanma ve hücre içi sinyal kaskatında yer alan proteinlerin gen ifadesi üzerine etkisini araştırmaktır.

## 2. Gereç ve Yöntem

### 2.1. Deneysel hayvanları ve gruplandırma

Wistar albino cinsi, ağırlıkları 200-300 gram olan 24 sıçan, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden temin edildi. İnsancıl hayvan bakımı ve kullanımına yönelik Ulusal Sağlık Enstitüleri kılavuzuna uygun bir şekilde su ve yem kısıtlaması yapılmaksızın 14 saat aydınlık 10 saat karanlık döngüsüne tabi tutularak barındırıldı. Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 07.04.2021 tarih ve 21/87 sayılı kararı ile Etik kurul onayı alındı. Sıçanlar; Serum fizyolojik infüze edilen grup (SF, n=6), insülin infüze edilen grup (İnsülin, n=6), NT157 infüze edilen grup (NT157, n=6) ve insülin ile birlikte NT157 infüze edilen grup

(İnsülin+NT157, n=6) olmak üzere dört gruba ayrıldı.

### **1.2. Kullanılan kimyasallar**

NT157: Çalışmada kullanılan insülin reseptör antagonisti olan NT157 (CAS: 1384426-12-39, Selleckhem marka) maddesi ticari olarak satın alınmıştır. 10 mMlık NT157, 1 ml DMSO da çözülürülerek ara stok hazırlanmıştır. Daha sonra infüzyon dozu 6 µM hazırlanmış ve infüzyon sırasında kullanılmak üzere ependorf tüplerin içerisinde -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

İnsülin: İnsülin ticari olarak satın alınmıştır (CAS: 11061-68-0, Sigma Aldrich marka). 5.8 mg insülin 2 mililitre SF' de çözülürülmüştür. Hazırlanan 500 nmol insülin, infüzyon sırasında kullanılmak üzere ependorf tüplerin içerisinde -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

### **1.3. Elektrofizyolojik kayıt alınması**

Sıçanlar periton içine 1,2 g/kg dozunda üretan ile anestezi edilmiştir. Anestezi sonrası stereotaksik çatiya (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) ağız ve kulak çubukları ile sabitlenmiştir. Bregma ve lambda noktalarının aynı düzlemde olup olmadığı düzlem ayarlamaya çubuğu ile kontrol edilmiştir. Sonrasında saçlı deri tıraş edilmiş, orta hat kesisi ile kafatasına ulaşılmıştır. Kraniumda bregma noktası keçeli kalemle işaretlenmiş ve sağ hemisfere uyan kranium bölgesi drill kullanılarak (FM3545) oval bir pencere şeklinde kemik parçası çıkarılmıştır. Dura zarı ince bir pens yardımı ile uzaklaştırılmış, sıçan beyin atlasında perforan yol ve dentat girus için belirlenen koordinatlara elektrotlar yerleştirilmiştir (Bregma referans noktası alınarak uyarıcı elektrot ön-arka: 6,5 mm; medio-lateral: 3,8 mm (SS-NE-100); kayıt elektrodu ön-arka: 3,0 mm, medio-lateral: 2,13 mm). Her iki elektrot hemisfer yüzeyinden 2.0 mm derine indirilmiştir. Bu işlem stereotaksik çatının her üç ekseninde harekete izin veren 0.01mm hassasiyete sahip manipülatörler aracılığı ile sağlanmıştır (Kopf Instruments, 9082B). Kayıt elektrodu mikropipet çekiciyle (Sutter

Ins. Coop. P-30) iki kanallı borosilikat kapiller camdan üretilmiştir. Bir kanal 3M NaCl, diğer kanal ise infüzyon maddesi (insülin veya NT157) ile doldurulmuştur. Infüzyon maddesi doldurulan kanal bir P50 tüp ile Hamilton pompasındaki 25µL hacimli Hamilton şiringasına bağlanmıştır. NaCl ile doldurulan kanala ise klorlanmış gümüş tel yerleştirilerek kayıt elektrodu oluşturulmuştur. Kayıt işlemi voltaj-akım kısaç yükselteci (Physiologic Ins. VCC60C) ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Ag/AgCl disk elektrot boyun derisi altına yerleştirilmiş ve referans elektrot olarak kullanılmıştır. Uyarıcı elektrodun yerleştirilmesini takiben elektrik puls uyarım için bir uyarı-izolasyon ünitesi (World Precision Ins. A385) kullanılmış ve üretilen puls akımlar, düşük dirençli kablolar ile uyarıcı elektrota iletilmiştir. Uyarımın tetiklenmesi ve biyolojik yanıt bir A/D çevirici içeren bilgisayar sistemi ile sayısal verilere dönüştürülerek 1024 ms süre ve 40 Hz' de örneklenmiştir. Bütün sistem bir faraday kafesi kullanılarak topraklanmıştır.

### **1.4. Tipik bir elektriksel yanıtın elde edilmesi**

Uyarı ve kayıt elektrodu eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) olarak tanımlanan pozitif sapmayı takip eden popülasyon spike (PS) olarak tanımlanan maksimum negatif yönlü sapma elde edilene kadar derin yapılar inilmiştir. Dentat girus granül hücre tabakasından kayıtlanan alan potansiyeli görüldükten sonra, maksimum cevap elde edilene kadar kayıt elektrotu 0,1 mm aralıklarla inilmiştir.

### **1.5. Uzun Dönemli Baskılanmanın İndüklenmesi**

Giderek arta şiddette uyarı verilmesi ile girdi ve çıktı eğrileri elde edilmiştir. En yüksek değere sahip PS genliğinin yarısı test uyarın şiddeti olarak belirlenmiştir. 15 dakika boyunca her 30 saniyede bir belirlenen şiddette uyarı verilmiştir. Bu dönem bazal kayıt dönemi olarak adlandırılmıştır. Bazal kayıt sonrası 15 dakika boyunca 1 Hz frekanslı 900 düşük frekanslı uyarı (DFU) verilerek UDB indüklenmiştir. Bu dönem

indüksiyon dönemi olarak adlandırılmıştır. İndüksiyon dönemi sonrası tekrar başlangıçtaki test uyarı şiddetine dönülmüş 60 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla uyarıya devam edilmiştir (İdame dönemi). İnfüze edilen maddeler bazal kaydın hemen ardından DFU protokolü ile birlikte başlamış, 60 dakika boyunca infüzyona devam edilmiştir.

### 1.6. Gerçek zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elektrofizyolojik kayıtların alınmasının ardından anestezi altındaki sıçanlara ait uyarılmış hemisfere ait hipokampus dokusu çıkarılmış, RT-qPCR analizi için purezol solüsyonuna konularak -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Çalışmada SsO Advanced Universal IT SYBR Green Supermix (BioRad) kit kullanılmıştır. Kit içerisindeki SYBR Green Supermix (10 µl), Nuclease Free Water (8 µl) ve primer/probe (1 µl)' den bir reaksiyon karışımı hazırlanmış, 96'lık well plate üzerindeki kuyucuklara bölünmüş, bir kuyucuğa cDNA (1 µl) eklenmiştir. Hazırlanan plaka CFX Connect Real-Time PCR detection System PCR cihazına yerleştirilmiş, PCR pre-inkübasyon, çoğaltma ve soğutma koşulları için sırasıyla 95 °C' da 3 dk, 95 °C 5 sn ve 60 °C' de 15 sn (45 döngü) ve 40 °C' da 30 sn tutulmuştur. Manipülasyondan doğabilecek hataları önleyebilmek için her örnek çift çalışılmıştır. House-keeping gen olarak  $\beta$ -Actin geni kullanılmıştır.

### 1.7. İstatistiksel analiz

Elektrofizyolojik kayıta elde edilen veriler (her bir alan potansiyeli için EPSP eğimi ve PS genliği) SCOPE yazılımı ile analiz edilmiştir. EPSP eğimi için EPSP dalgasının başlangıcının %20 yukarısı, bitişinin %20 altı seçilmiştir. PS genliği için minimum ve maksimum değerler arasındaki fark alınmıştır. Protokolün son beş dakikasında elde edilen EPSP ve PS değerleri, bazal kayıt sırasında alınan yanıtların ortalama değerlerine bölünerek kendi ortalama değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma ikili kıyaslamalar için bağımsız örneklem t-testi ile analiz

edilmiş, İnsülin+NT157 etkisini göstermek için 2x2 ANOVA testi uygulanmıştır.

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testiyle, varyans homojenliği ise Levene testi ile değerlendirilmiştir. Gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu ile elde edilen veriler  $2^{-\Delta Ct}$  metodu kullanılarak normalize edildikten sonra, gruplar arası kıyaslama Kruskal Wallis testi sonrası Mann Whitney U testi yapılmıştır.

İstatistiksel anlamlılık için olasılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde ifade edilmiştir.

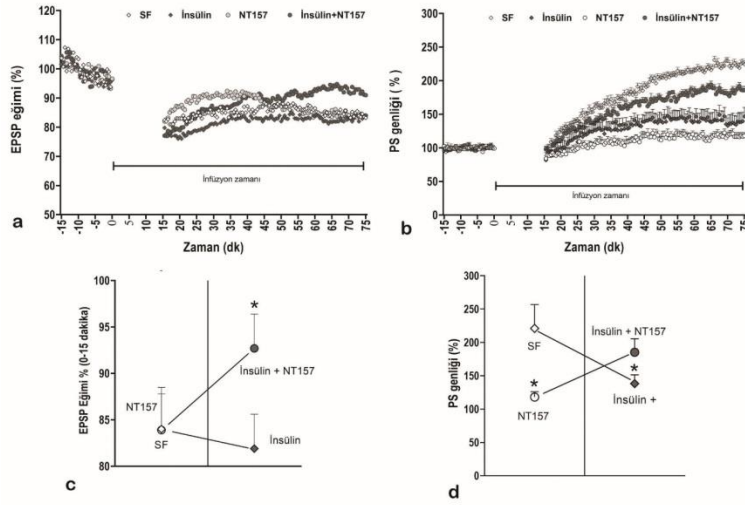
## 2. Bulgular

Perforan yolun 1 Hz ile uyarımının sonrası, protokolün 70-75. dakikaları arasındaki EPSP eğiminde SF infüze edilen grupta protokolün bazal kayıttaki değerlerin %  $84,0 \pm 4,5$ ' üne ulaşan bir oranda azalma görülmüştür (Şekil 1a, 1c)). Bağımsız örneklem t-testi bu ortalama değerlerin %100' den farklı olduğunu göstermiştir ( $t_{18} = 3,533$ ,  $p = 0,006$ ). Bu bulgu uzun dönemli baskılanma protokolünün, dentat girus granül hücrelerinde sinaptik bir baskılanmaya neden olduğunu göstermektedir. Aynı uyarım protokolü, insülin ( $81,9 \pm 3,7\%$ ;  $t_{18} = 4,958$ ;  $p = 0,001$ ) ve NT157 ( $83,9 \pm 3,9$ ;  $t_{18} = 4,115$ ,  $p = 0,003$ ) varlığında sinaptik güçte benzer bir baskılanma oluştururken; bu iki maddenin birlikte verildiği deneylerde istatistiksel olarak anlamlı bir baskılanma gözlenmemiştir ( $92,7 \pm 3,7\%$ ;  $t_{18} = 2,010$ ;  $p = 0,075$ , Şekil 1a, 1c). Gruplar arası farklılık tek yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları EPSP eğimindeki değişikliklerin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadığını göstermiştir.

Nöronal çıktının göstergesi olan PS genliği analiz sonuçları Şekil 1b' de görüldüğü üzere 1 Hz frekanslı uyarımların, protokolün 70-75. dakikasındaki değerlerin bazal kayıttaki değerlere oranla dentat girus granül hücre çıktılarında artışa neden olduğunu göstermiştir (SF infüze edilen grup

%221,8±35,8, İnsülin infüze edilen grup %138,3±13,1, NT157 infüze edilen grup %118,1±5,1, İnsülin+NT157 infüze edilen grup %185,2±20,4). Uygulanan t-testi bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir (sırasıyla  $t_{18}=-4,425$ ,  $p=0,001$ ,  $t_{18}=-3,440$ ,  $p=0,003$ ,  $t_{18}=-3,056$ ,  $p=0,007$ ,  $t_{18}=-3,597$ ,  $p=0,002$ ). Gruplar arası kıyaslama, insülinin etkisini kıyaslamak amacıyla bağımsız örneklem t-testi ile yapılmıştır. İnsülinin etkisi SF ile

karşılaştırıldığında, insülinin SF' nin neden olduğu artıştan daha az artışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 1d). Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $t_{18}=2,191$ ,  $p=0,042$ ). Ancak insülin ve NR157 birlikte verildiğinde bu farklılık ortadan kalkmıştır ( $t_{18}=0,888$ ,  $p=0,386$ ). Bu sonuçlar, insülinin uzun dönemli baskılanmayı indüklediğini, insülin reseptör blokörü infüzyonunun bu etkiyi geri çevirdiğini göstermektedir.



**Şekil 1.** Kontrol ve deney gruplarının elektrofizyolojik bulguları, (a) Eksitator post-sinaptik potansiyel eğiminin tüm deney protokolü boyunca değişimi, (b) Populasyon spike genişliğinin tüm deney protokolü boyunca değişimi, (c) Protokolün son beş dakikasında grupların EPSP eğimi ortalama değerleri, (d) Protokolün son beş dakikasında grupların PS genişliği ortalama değerleri, \* SF infüze edilen gruba göre  $p < 0,05$ , değerler ortalama + standart hata olarak verilmiştir (n=6)

İnsülin reseptör sinyal yolağını içeren proteinlerin gen ekspresyonu seviyesindeki değişiklikler şekil 2' de sunulmuştur. İnsülin infüzyonu, PI3K (Şekil 2a,  $t_{10}=-0,135$ ,  $p=0,89$ , AKT (Şekil 2b,  $t_{10}=0,337$ ,  $p=0,74$ , IRS1 (Şekil 2d,  $t_{10}=-0,324$ ,  $p=0,75$ ) ve MAPT (şekil 2e,  $t_{10}=0,234$ ,  $p=0,82$ ) ekspresyonu üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Bağımsız örneklem t-testi sonuçları insülinin GSK3-b gen ekspresyonu seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğunu göstermiştir (Şekil 2c,  $t_{10}=-2,567$ ,  $p=0,02$ ). Selektif IRS1/2 inhibitörü olan

NT157' nin tek başına olan etkisine bakıldığında PI3K, AKT, GSK3-b ve MAPT gen ekspresyonu üzerine bir etki göstermediği ( $p>0,05$ ) ancak IRS1 ( $t_{10}=-3,129$ ,  $p=0,01$ ) gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu görülmüştür. Aynı zamanda GSK3-b' da insülinin neden olduğu artış, NT157 sonrası SF infüze edilen grupla aynı düzeye dönmüştür ( $t_{10}=0,094$ ,  $p=0,92$ ). İnsülin ve NT157' nin birlikte verildiği grupta yalnızca AKT gen ekspresyonu seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ( $t_{10}=4,748$ ,  $p=0,001$ ).



AKT' dir. Bu çalışmada insülin infüzyonu AKT mRNA seviyesinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Ancak insülin ve NT157' nin birlikte verilmesi AKT mRNA seviyelerinde dikkat çekici bir düşüşe sebep olmuştur. Hücre kültürü çalışmaları NT157' in PI3K/AKT/mTOR yolunu baskılayıcı etki göstererek otofajiyi indüklediğini ve anti-onkogenik etki gösterdiğini bildirmektedir [20]. Çalışmamızda NT157' in tek başına verildiği durumda AKT mRNA seviyelerinde değişiklik gözlenmezken insülin ve NT157' nin birlikte verildiği durumda AKT mRNA seviyelerindeki azalma bu etkinin IRS' den bağımsız diğer moleküller aracılığı ile olabileceğini düşündürmektedir.

GSK3-b, AKT' nin aşağı yönlü hedef proteinlerinden biridir ve aktivitesi AKT tarafından inhibe edilir. Çalışmamız GSK3-b mRNA seviyesinin insülin infüzyonu ile arttığını göstermiştir. Ancak burada dikkat edilmesi gereken husus UDB protokolünün indüklenmesi durumunun hipokampal granül hücre içerisindeki protein seviyelerinde değişikliğe yol açabildiğidir. Bradley ve arkadaşları UDB' nin indüklediği durumlarda GSK3-b aktivasyonunun arttığını göstermişlerdir [21]. Çalışmamızda insülinin etkisi ile görülmesi beklenen

GSK3-b mRNA düzeylerinde azalma, UDB' nin indüklenmesi nedeniyle artmış ve sonuç olarak mRNA seviyeleri değişmemiş veya hafif artmış olarak bulunmuş olabilir. Çalışmamızdaki en belirgin bulgu, IRS1 mRNA seviyesinin NT157 verilen grupta gösterdiği üç katlık artıştır. Bu bulgu IRS1 inhibisyonunun negatif geri bildirim yoluyla gen ekspresyonu seviyesinde artışa neden olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda son olarak mikrotübül ilişkili protein tau (MAPT) mRNA seviyeleri ölçülmüştür. MAPT, nöronal aksonal transportta yer alan mikrotübül stabilizasyonundan sorumlu tau proteinlerini kodlar. Çalışma sonuçları MAPT mRNA seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını göstermiştir.

Sonuç olarak; insülin hipokampal granül hücrelerinde uzun dönemli baskılanma indüksiyonunu kolaylaştırmıştır. IRS1/2 inhibitörü ile bu etkinin ortadan kalkması insülinin dolaylı etkilerinden bağımsız doğrudan bir etkisi olduğunu göstermektedir. İnsülinin öğrenme ve hafızada rol alan hipokampus üzerine etkisinin anlaşılması, glikoz metabolizması ve nörodejeneratif hastalıklar arasındaki ilişkinin açığa çıkarılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Banting, F.G., et al., Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Canadian Medical Association Journal, 1922. 12(3): p. 141.
2. Havrankova, J., J. Roth, and M. BROWNSTEIN, Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. Nature, 1978. 272(5656): p. 827-829.
3. Porte Jr, D., D.G. Baskin, and M.W. Schwartz, Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from C. elegans to humans. Diabetes, 2005. 54(5): p. 1264-1276.
4. Lin, X., et al., Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in  $\beta$  cells and brain causes obesity and diabetes. The Journal of clinical investigation, 2004. 114(7): p. 908-916.
5. Marks, J.L., M.G. King, and D.G. Baskin, Localization of insulin and type I IGF receptors in rat brain by in vitro autoradiography and in situ hybridization. Molecular biology and physiology of insulin and insulin-like growth factors, 1991: p. 459-470.
6. Abbott, M.-A., D.G. Wells, and J.R. Fallon, The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. Journal of Neuroscience, 1999. 19(17): p. 7300-7308.
7. Zhao, W., et al., Brain insulin receptors and spatial memory: correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(49): p. 34893-34902.
8. Moosavi, M., et al., The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. Hormones and behavior, 2006. 50(5): p. 748-752.
9. Brands, A.M., et al., The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. Diabetes care, 2005. 28(3): p. 726-735.
10. Hishikawa, N., et al., Cognitive and affective functions in Alzheimer's disease patients with metabolic syndrome. European journal of neurology, 2016. 23(2): p. 339-345.
11. Malenka, R.C. and M.F. Bear, LTP and LTD: an embarrassment of riches. Neuron, 2004. 44(1): p. 5-21.
12. Bastrikova, N., et al., Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal

- neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(8): p. 3123-3127.
13. Ilabouëbe, G., et al., Insulin induces long-term depression of ventral tegmental area dopamine neurons via endocannabinoids. Nature neuroscience, 2013. 16(3): p. 300-308.
  14. Lissin, D.V., et al., Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. Journal of Neuroscience, 1999. 19(4): p. 1263-1272.
  15. Man, H.-Y., et al., Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. Neuron, 2000. 25(3): p. 649-662.
  16. Beattie, E.C., et al., Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. Nature neuroscience, 2000. 3(12): p. 1291-1300.
  17. Wang, Y.T. and D.J. Linden, Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. Neuron, 2000. 25(3): p. 635-647.
  18. Holgado-Madruga, M., et al., A Grb2-associated docking protein in EGF-and insulin-receptor signalling. Nature, 1996. 379(6565): p. 560-564.
  19. Copps, K. and M. White, Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. Diabetologia, 2012. 55: p. 2565-2582.
  20. Li, C.X., et al., Repressing IRS1/2 by NT157 inhibits the malignant behaviors of ovarian cancer through inactivating PI3K/AKT/mTOR pathway and inducing autophagy. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2023. 39(4): p. 377-389.
  21. Bradley, C.A., et al., A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. Frontiers in molecular neuroscience, 2012. 5: p. 13.

#### Etik Bilgiler

**Etik Kurul Onayı:** Çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Sayı: 21/87, Tarih:07.04.2021)

**Onam:** Yazar retrospektif bir çalışma olduğu için olgulardan imzalı onam almadıklarını beyan etmişlerdir.

**Telif Hakkı Devir Formu:** Yazar tarafından Telif Hakkı Devir Formu imzalanmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Hakem değerlendirmesinden geçmiştir.

**Yazar Katkı Oranları:** Cerrahi ve Tıbbi Uygulamalar: ÖB. Konsept: CS. Tasarım: ÖB, CS. Veri Toplama veya İşleme: ÖB, ET, HS. Analiz veya Yorum: CS, EB. Literatür Taraması: EB. Yazma: EB

**Çıkar Çatışması Bildirimi:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**Destek ve Teşekkür Beyanı:** Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2021-11215 kodlu proje ile desteklenmiştir