T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ALZHEIMER HASTALIĞI İLE KORTİKOSTEROİD YOLAKLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN GLUKOZ METABOLİZMASI AÇISINDAN BEYİN ORGANOTİPİK KESİT KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ

MERVE ALAYLIOĞLU

DANIŞMAN
DOÇ. DR. DUYGU GEZEN-AK

II. DANIŞMAN
PROF. DR. SELMA YILMAZER

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2021

Bu çalışma 08.07.2021 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Doç. Dr. Duygu Gezen-Ak
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Erdinç Dursun
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Nörolojik Bilimler Ensitüsü
Sinirbilim Anabilim Dalı

Prof. Dr. Başar Bilgiç
İstanbulÜniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ali Nur Turgut Ulutin
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Dr.Öğr.Üyesi Bedia Samacı
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve Alaylıoğlu

İTHAF

Annem Leman Yıldız ERCİYAŞ ve Alzheimer hastalığından kaybettiğim anneannem Gülistan ERCİYAŞ'e ithafen.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimlerim ile bu çalışma dahil yer aldığım tüm çalışmalar ve hayatım ile ilgili her türlü konuda yardımını ve desteğini esirgemeyen, bugünlere gelmemi sağlayan bilgileri bana öğreten ve her zaman yol gösteren, kişiliği, iş sorumluluğu, disiplini ve başarılarıyla kendime örnek aldığım, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyacağım danışmanım Doç. Dr. Duygu GEZEN-AK'a, yüksek lisans ve doktora eğitimlerim ile bu çalışma sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan, akademik kişiliği ve çalışma prensipleriyle bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman onur duyacağım ikinci danışmanım Prof. Dr. Selma YILMAZER'e, yüksek lisans ve doktora eğitimlerim sırasında ve yer aldığım tüm çalışmalarda yardım ve katkılarını eksik etmeyen, iş sorumluluğu ve başarılarıyla bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman memnuniyet duyacağım Doç. Dr. Erdinç Dursun'a, çalışmam sırasındaki bilimsel katkıları için birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk ve memnuniyet duyacağım Prof. Dr. Başar BİLGİÇ'e, lisans dönemimde bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, akademik kariyer yapmamda etkili olan ve anabilim dalı olanaklarını kullanmama olanak sağlayan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e, destekleri için Temel Tıp Bilimleri bölüm başkanı Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR'e ve çalışmam sırasındaki yardımları ve motivasyonları için Gökhan ORUÇ'a teşekkür ederim.

Çalışmamda kullandığım beyin organotipik kesit kültürü tekniğinin temellerini öğrenmemi sağlayan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Ayşegül DİLSİZOĞLU, Prof. Dr. Catherine LUBETZKİ, Dr. Marc DAVENNE ve Dr. Laurent JACOB'a, her zaman yanımda olan, sevgilerini, desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım M.Sc. Büşra ŞENGÜL, M.Sc. Ebru KESKİN, B.Sc. Pelin SORDU, M.Sc. Zuhal YURTTAŞ, M.Sc. Tugay ÇAMOĞLU ve B.Sc. İdil YÜKSEKEL'e teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, beni bugünlere getiren, maddi manevi her konuda desteğini asla esirgemeyen, aldığım her kararda arkamda olan, her türlü zorluğa karşı beni koruyup kollayan, varlığıyla bana güç veren, sevgisini ve inancını tüm kalbimle hissettiğim sevgili annem, ışığım Leman Yıldız ERCİYAŞ'e, yardımları, destekleri, moral ve motivasyonları ile her zaman yanımda olan sevgili abim Ceyhun ALAYLIOĞLU ve eşi Mehtap ALAYLIOĞLU ile sevgili abim Tayfun ALAYLIOĞLU ve eşi Ecem GÜLER ALAYLIOĞLU'na, destekleri, motivasyonları ve bana olan inançları için dedem Mehmet Zeki ERCİYAŞ, teyzelerim Nur ALHAS ve Kamer ERCİYAŞ, ablalarım Deniz YÜRÜR ve Meryem DEMİR'e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduğu, moral, motivasyon, destek ve yardımını hiçbir zaman ve hiçbir konuda esirgemediği, her zaman yüzümü güldürmeye çalıştığı, hayatımda olduğu her an ve paylaştığımız her bir anı için Hasan Ufran COŞKUN'a, zor anlarımdaki yardımları ve desteği, varlığı, arkadaşlığı ve gülümsettiği her bir dakika için Ferhat ÖNK'e, moral, motivasyon, desteği ve sevgisiyle her zaman yanımda olduğu ve bana kucak açtığı için Hamdiye Uhud COŞKUN'a ve bana olan inançlarıyla her zaman destek oldukları ve aile sıcaklığını hissettirdikleri için COŞKUN ailesine ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25555

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XVİİ
ÖZET XX
ABSTRACT ..... XXİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Alzheimer Hastalığı 4
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Patolojisi 5
2.1.1.1. Amiloid Beta Peptidi ve Amiloid Plaklar 5
2.1.1.2. Tau Proteini ve Nörofibril Yumaklar 7
2.1.2. Alzheimer Hastalığında Etkilenen Beyin Bölgeleri ve Histolojik Yapıları 8
2.2. Kortikosteroid Metabolizması 11
2.2.1. Glukokortikosteroidler 14
2.2.2. Kortikosteroid Reseptörleri 16
2.2.2.1. Glukokortikosteroid Reseptörü (GR) 18
2.2.2.2. Mineralokortikosteroid Reseptörü (MR) 21
2.3. Stres ve Alzheimer Hastalığı 21
2.4. Enerji Metabolizması 25
2.4.1. Glukoz Taşıyıcı Proteinler 26
2.4.1.1. Glukoz Taşıyıcı Protein 1 (GLUT1) 27
2.4.1.2. Glukoz Taşıyıcı Protein 3 (GLUT3) 28
2.5. Enerji Metabolizması ve Glukokortikosteroidler 28
2.6. Beyin Organotipik Kesit Kültürü 30
2.6.1. Döner-tüp Tekniği 32
2.6.2. Membran Arayüz Tekniği 33

3. GEREÇ VE YÖNTEM 35
3.1. Beyin Organotipik Kesit Kültürü Deneyleri 35
3.1.1. Disseksiyon Medyumunun Hazırlanması 35
3.1.2. Kültür Medyumunun Hazırlanması 35
3.1.3. Agarozun Hazırlanması 36
3.1.4. Kültür Petrilerinin Hazırlanması 36
3.1.5. Beyin Disseksiyonu 36
3.1.6. Vibratom ile Kesitlerin Alınması 39
3.1.7. Beyin Organotipik Kesit Kültürlerinin Hazırlanması 43
3.1.8. Beyin Organotipik Kesit Kültürlerine Gerçekleştirilen Uygulamalar 44
3.1.8.1. Sirkadiyen Ritim Modeli 44
3.1.8.2. Stres Modeli 44
3.1.8.3. Alzheimer Benzeri Model 44
3.1.9. Beyin Organotipik Kesit Kültürü Deney Grupları 45
3.1.9.1. Kontrol Grubu 45
3.1.9.2. Etanol Uygulanan Grup 45
3.1.9.3. Bazal Seviyede Kortikosteron Uygulanan Grup 45
3.1.9.4. Pik Seviyede Kortikosteron Uygulanan Grup 46
3.1.9.5. Stres Seviyesinde Kortikosteron Uygulanan Grup 46
3.1.9.6. Düşük Doz $A\beta_{1-42}$ Uygulanan Grup 46
3.1.9.7. Yüksek Doz $A\beta_{1-42}$ Uygulanan Grup 46
3.2. Koronal Kesitlerden Total RNA izolasyonu 46
3.3. cDNA Sentezi 47
3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 48
3.4.1. qRT-PCR Deneylerinde Kullanılan Primer ve Problar 49
3.5. Koronal Kesitlerden Protein İzolasyonu 53
3.6. Western Blot 54
3.7. Kolorimetrik Glukoz Testi 55
3.8. Sitotoksisite Testi 56
3.9. İmmünfloresan İşaretleme 57
3.10. İstatistiksel Analizler 58
4. BULGULAR 60

4.1. Kesitlerin Morfolojik Değerlendirmesi 60
4.2. Sitotoksisite Sonuçları 64
4.3. qRT-PCR Sonuçları 66
4.3.1. Glukokortikosteroid Reseptörü (GR) mRNA Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler 66
4.3.1.1. Korteks Bölgesindeki GR mRNA Ekspresyonu 66
4.3.1.2. Hippokampus Bölgesindeki GR mRNA Ekspresyonu 67
4.3.1.3. GR mRNA Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması 69
4.3.2. Mineralokortikosteroid Reseptörü (MR) mRNA Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler 71
4.3.2.1. Korteks Bölgesindeki MR mRNA Ekspresyonu 71
4.3.2.2. Hippokampus Bölgesindeki MR mRNA Ekspresyonu 73
4.3.2.3. MR mRNA Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması 75
4.3.3. GLUT1 mRNA Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler 77
4.3.3.1. Korteks Bölgesindeki GLUT1 mRNA Ekspresyon Seviyesi 77
4.3.3.2. Hippokampus Bölgesindeki GLUT1 mRNA Ekspresyon Seviyesi 79
4.3.3.3. GLUT1 mRNA Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması 81
4.3.4. GLUT3 mRNA Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler 83
4.3.4.1. Korteks Bölgesindeki GLUT3 mRNA Ekspresyon Seviyesi 83
4.3.4.2. Hippokampus Bölgesindeki GLUT3 mRNA Ekspresyon Seviyesi 85
4.3.4.3. GLUT3 mRNA Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması 86
4.4. Western Blot Sonuçları 88
4.4.1. Glukokortikosteroid Reseptörü (GR) Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler 88
4.4.1.1. Korteks Bölgesindeki GR Protein Ekspresyon Seviyesi 88
4.4.1.2. Hippokampus Bölgesindeki GR Protein Ekspresyon Seviyesi 90
4.4.1.3. GR Protein Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması 92
4.4.2. Mineralokortikosteroid Reseptörü (MR) Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler 94

4.4.2.1. Korteks Bölgesindeki MR Protein Ekspresyon Seviyesi 94
4.4.2.2. Hippokampus Bölgesindeki MR Protein Ekspresyon Seviyesi 96
4.4.2.3. MR Protein Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması 98
4.4.3. GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler 100
4.4.3.1. Korteks Bölgesindeki GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesi 100
4.4.3.2. Hippokampus Bölgesindeki GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesi 102
4.4.3.3. GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması 104
4.4.4. GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler 106
4.4.4.1. Korteks Bölgesindeki GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesi 106
4.4.4.2. Hippokampus Bölgesindeki GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesi 108
4.4.4.3. GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması 110
4.5. Hücre İçi Glukoz Seviyesi 112
4.5.1. Korteks Bölgesindeki Glukoz Seviyesi 112
4.5.2. Hippokampus Bölgesindeki Glukoz Seviyesi 114
4.5.2.1. Hücre içi Glukoz Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması 115
4.6. İMMÜNFLORESAN İŞARETLEME SONUÇLARI 118
4.6.1. Korteks Bölgesinin İmmünfloresan Değerlendirmesi 119
4.6.2. Hippokampus Bölgesinin İmmünfloresan Değerlendirmesi 126
5. TARTIŞMA 136
KAYNAKLAR 145
ETİK KURUL KARARI 151
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 152
ÖZGEÇMİŞ 153

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: RT-PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler ve miktarları. 48
Tablo 3-2: RT-PCR reaksiyonunun sıcaklık döngüsü. 48
Tablo 3-3: HPRT primerlerinin özellikleri. 49
Tablo 3-4: GR primerlerinin özellikleri. 50
Tablo 3-5: MR primerlerinin özellikleri. 50
Tablo 3-6: GLUT1 primerlerinin özellikleri. 51
Tablo 3-7: GLUT3 primerlerinin özellikleri. 51
Tablo 3-8: qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler ve miktarları. 52
Tablo 3-9: qRT-PCR reaksiyonunun sıcaklık döngüsü. 53
Tablo 3-10: Protein izolasyonunda kullanılan maddeler ve miktarları. 53
Tablo 3-11: Western Blotta kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları. 55
Tablo 3-12: Kolorimetrik glukoz testinde kullanılan maddeler ve miktarları. 56
Tablo 3-13: Sitotoksisite testinde kullanılan maddeler ve miktarları. 57
Tablo 4-1: Tüm bulguların özetlenmesi. 117
Tablo 4-2: GR ve MR'nin hippokampus bölgesindeki lokalizasyonları. 135

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Alzheimer hastalığında görülen amiloid plaklar ve nörofibril yumakları. 4
Şekil 2-2: APP'nin kırpılması ve Aβ peptidinin oluşumu. 6
Şekil 2-3: Amiloid plakların oluşumu. 7
Şekil 2-4: Nörofibril yumaklarının oluşumu. 8
Şekil 2-5: Alzheimer hastalığında görülen beyin atrofisi. 8
Şekil 2-6: Korteksin alt tabakaları. 9
Şekil 2-7: Hippokampusun alt tabakaları. 11
Şekil 2-8: Adrenal korteks ve salınan hormonlar. 12
Şekil 2-9: Adrenal korteksten salınan steroid hormonların biyosentezi. 13
Şekil 2-10: Hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen. 14
Şekil 2-11: Sirkadiyen ritimde kortizol ve ACTH salınım seviyeleri. 15
Şekil 2-12: Glukokortikosteroidlerin etki mekanizması. 17
Şekil 2-13: Stres durumunda kortikosteroid reseptörlerinin kullanımı. 18
Şekil 2-14: GR geni ve proteininin yapısı. 19
Şekil 2-15: GRα proteininin yapısı. 20
Şekil 2-16: MR proteininin yapısı. 21
Şekil 2-17: Çevresel faktörler tarafından tetiklenen patolojik olaylar kaskadı ile AH gelişimi. 23
Şekil 2-18: Çeşitli stres kaynakları tarafından etkilenen sistemler ve AH patolojisinin gelişimi. 24
Şekil 2-19: Beyinde enerji metabolizması. 26
Şekil 2-20: Beyinde enerji moleküllerinin transportu. 27
Şekil 2-21:Glukokortikosteroidlerin enerji metabolizması üzerindeki etkisi. 29
Şekil 2-22: Kesit alma düzlemleri. 32
Şekil 2-23: Döner-tüp tekniği 33
Şekil 2-24: Membran arayüz tekniği 34
Şekil 3-1: Semiporöz özellikteki Millicell membran. 36
Şekil 3-2: Beyin disseksiyonunda kullanılan disseksiyon aletleri. 37
Şekil 3-3: 7 günlük neonatal sıçanın kafa derisinin açılması. 38
Şekil 3-4: 7 günlük neonatal sıçanın kraniyal kemiklerinin açılması. 38
Şekil 3-5: Beynin disseksiyon medyumuna aktarılması. 39

Şekil 3-6: Olfaktör bulbus ve serebellum bölgelerinin ayrılması. 40
Şekil 3-7: Beynin agaroza gömülmesi. 40
Şekil 3-8: Agaroz bloğun vibratom tablasına sabitlenmesi. 41
Şekil 3-9: Agaroz bloğun vibratom cihazına yerleştirilmesi. 41
Şekil 3-10: Vibratom cihazı ile koronal kesitlerin alınması. 42
Şekil 3-11: Koronal kesitlerin fırça yardımıyla alınması. 42
Şekil 3-12: Kesitlerin Millicell membranların üzerine yerleştirilmesi. 43
Şekil 4-1: Sağlıklı beyin koronal kesitlerinin ışık mikroskobu altında görüntüsü. 61
Şekil 4-2: Sağlıklı beyin koronal kesitlerinin canlı hücre/doku görüntüleme sistemi ile görüntülenmesi. 62
Şekil 4-3: Beyin koronal kesitin topoğrafik görünümü. 63
Şekil 4-4: Beyin organotipik kesit kültüründe $A\beta_{1-42}$ uygulamasından sonra amiloid plakların gösterilmesi. 64
Şekil 4-5: Kortikosteron ve $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda ortama salınan LDH seviyesi. 65
Şekil 4-6: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 66
Şekil 4-7: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 67
Şekil 4-8: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 68
Şekil 4-9: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 69
Şekil 4-10: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GR mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 70
Şekil 4-11: Kortikosteron uygulamaları sonucu GR mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 71
Şekil 4-12: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 72
Şekil 4-13: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 73
Şekil 4-14: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 74

Şekil 4-15: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 75
Şekil 4-16: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu MR mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 76
Şekil 4-17: Kortikosteron uygulamaları sonucu MR mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.77
Şekil 4-18: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 78
Şekil 4-19: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 79
Şekil 4-20: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 80
Şekil 4-21: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 81
Şekil 4-22: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GLUT1 mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 82
Şekil 4-23: Kortikosteron uygulamaları sonucu GLUT1 mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.83
Şekil 4-24: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 84
Şekil 4-25: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 84
Şekil 4-26: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 85
Şekil 4-27: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 86
Şekil 4-28: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GLUT3 mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 87
Şekil 4-29: Kortikosteron uygulamaları sonucu GLUT3 mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.88
Şekil 4-30: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 89

Şekil 4-31: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 90
Şekil 4-32: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 91
Şekil 4-33: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 92
Şekil 4-34: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GR protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 93
Şekil 4-35: Kortikosteron uygulamaları sonucu GR protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 94
Şekil 4-36: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 95
Şekil 4-37: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 96
Şekil 4-38: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 97
Şekil 4-39: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 98
Şekil 4-40: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu MR protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 99
Şekil 4-41: Kortikosteron uygulamaları sonucu MR protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 100
Şekil 4-42: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 101
Şekil 4-43: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 102
Şekil 4-44: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 103
Şekil 4-45: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 104
Şekil 4-46: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GLUT1 protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 105

Şekil 4-47: Kortikosteron uygulamaları sonucu GLUT1 protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 106
Şekil 4-48: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 107
Şekil 4-49: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 108
Şekil 4-50: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 109
Şekil 4-51: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 110
Şekil 4-52: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GLUT3 protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 111
Şekil 4-53: Kortikosteron uygulamaları sonucu GLUT3 protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 112
Şekil 4-54: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde görülen değişimler. 113
Şekil 4-55: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde görülen değişimler. 113
Şekil 4-56: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde görülen değişimler. 114
Şekil 4-57: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde görülen değişimler. 115
Şekil 4-58: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hücre içi glukoz seviyesinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 115
Şekil 4-59: Kortikosteron uygulamaları sonucu hücre içi glukoz seviyesinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması. 116
Şekil 4-60: GR ve MR'nin beyindeki dağılımlarının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 118
Şekil 4-61: Korteksin alt tabakaları. 119
Şekil 4-62: Herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 120

Şekil 4-63: Etanol uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 121
Şekil 4-64: 57,8 nM kortikosteron uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi..... 122
Şekil 4-65: 578 nM kortikosteron uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi..... 123
Şekil 4-66: 1300 nM kortikosteron uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi..... 124
Şekil 4-67: 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 125
Şekil 4-68: 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 126
Şekil 4-69: Hippokampusun alt tabakaları. 127
Şekil 4-70: Herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 128
Şekil 4-71: Etanol uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 129
Şekil 4-72: 57,8 nM kortikosteron uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi..... 130
Şekil 4-73: 578 nM kortikosteron uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi..... 131
Şekil 4-74: 1300 nM kortikosteron uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi..... 132
Şekil 4-75: 2 µM $A\beta_{1-42}$ $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi..... 133
Şekil 4-76: 6 µM $A\beta_{1-42}$ $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi..... 134

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACTB: Beta aktin

ACTH: Adrenokortikotropik hormone

AF1: Aktivasyon fonksiyon bölgesi 1

AF2: Aktivasyon fonksiyon bölgesi 2

AH: Alzheimer hastalığı

AICD: Amiloid öncül proteini intraselüler parçası

AP-1: Aktive edici protein 1

APP: Amiloid öncül proteini

APOE: Apolipoprotein E

Asetil-CoA: Asetil koenzim A

ATGL: Adipoz trigliserit lipaz

Aβ: Amiloid beta

BOS: Beyin-omurilik sıvısı

CBG: Kortikosteroid bağlayıcı globülin

CDK5: Siklin bağımlı kinaz 5

CLOCK: Sirkadiyen lokomotor ürün döngüleri bozukluğu

CREB: cAMP-yanıt elementi bağlayıcı protein

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole

DBD: DNA-bağlayıcı bölge

EHF: Eşleşmiş helikal filamentler

ETZ: Elektron transport zinciri

F1,6P: Fruktoz-1,6-difosfat

F6P: Fruktoz-6-fosfat

GAPDH: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz

GLUT1: Glukoz taşıyıcı protein 1

GLUT3: Glukoz taşıyıcı protein 3

GP: Glikojen fosforilaz

GR: Glukokortikosteroid reseptörü

GRE: Glukokortikosteroid yanıt elementi

GS: Glikojen sentaz

GSK3β: Glikojen sentaz kinaz 3β

G1P: Glukoz-1-fosfat

G3P: Gliserdehit-3-fosfat

G6P: Glukoz-6-fosfat

G6Pc: Glukoz-6-fosfatazın

HHA: Hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen

HK: Hekzokinaz

HPRT: Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz

HRE: Hormon yanıt elementleri

hsp: Isı-şok proteini

IgG: İmmünglobulin G

IL-1 β: İnterlökin-1β

IL-10: İnterlökin-10

IRF3: İnterferon düzenleyici transkripsiyon faktörü 3

IκB: NFκB inhibitörü

LBD: Ligand-bağlayıcı bölge

LDH: Laktat dehidrogenaz

LDH1: Laktat dehidrogenaz 1

LDH5: Laktat dehidrogenaz 5

MCT: Monokarboksilik asit taşıyıcı protein

ml: Mililitre

MR: Mineralokortikosteroid reseptörü

MSS: Merkezi sinir sistemi

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NFY: Nörofibril yumakları

NGF: Sinir büyüme faktörü

NFκB: Nüklear faktör-κB

nM: Nanomolar

NR3C1: Nüklear Reseptör Alt Ailesi 3 Grup C Üye 1

NR3C2: Nüklear Reseptör Alt Ailesi 3 Grup C Üye 2

NTD: N-terminal bölge

PDH: Pirüvat dehidrogenaz

PDK4: Pirüvat dehidrogenaz kinaz 4

PEP: Fosfoenolpürivat

PEPCK: Fosfoenolpirüvat karboksikinaz

PFK1: Fosfofruktokinaz 1

PKM1: Pirüvat kinaz M1

PP2A: Protein fosfataz 2A

PSEN1: Presenilin 1

PSEN2: Presenilin 2

RT-PCR: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

R5P: Ribuloz-5-fosfat

sAPPα: Çözünür amiloid öncül proteini α

sAPPβ: Çözünür amiloid öncül proteini β

SLC2: Çözünen madde taşıyıcı ailesi 2

STAT5: Sinyal arttırıcı ve transkripsiyon aktivatörü 5

TCA: Trikarboksilik asit döngüsü

TNFα: Tümör nekröz faktör α

qRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

6PG: 6-fosfoglukonat

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µM: Mikromolar

ÖZET

Alaylıoğlu, M. (2021). Alzheimer hastalığı ile kortikosteroid metabolizması arasındaki ilişkinin glukoz metabolizması açısından beyin organotipik kesit kültüründe incelenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AB. Doktora Tezi. İstanbul.

Stres, Alzheimer hastalığı (AH) için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Alzheimer hastalarının beyin-omurilik sıvıları (BOS), plazma ve serumlarında kortizol seviyesinin yüksek olması AH ile stres arasında bir ilişki olduğuna işaret etmektedir. Diğer taraftan AH'de, sinir hücrelerinin glukoz alımı ve kullanımında ciddi bir azalma olduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler; stres sonucu glukokortikosteroid seviyesindeki artışın, glukoz metabolizmasında değişikliklere neden olarak AH patolojisine katılabileceğini düşündürmektedir. Biz de bu çalışmamızda; doku mimarisi ve mikroçevrenin korunmasını sağlayarak *in vivo* modellere en yakın sonuçların elde edilmesine olanak sağlayan beyin organotipik kesit kültürlerinde kortikosteron uygulaması ile sirkadiyen ritim ve stres modelleri ve amiloid beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$) peptid uygulaması ile Alzheimer benzeri modeller oluşturduk. Yapmış olduğumuz bu uygulamaların; kortikosteroid reseptörleri olan glukokortikosteroid reseptörü (GR) ve mineralokortikosteroid reseptörü (MR) ekspresyonları üzerine etkilerini hem mRNA hem de protein seviyesinde araştırdık. Söz konusu proteinlerin beyindeki bölgesel lokalizasyonlarını da immünfloresan yöntemiyle inceledik. Ayrıca bu uygulamaların glukoz metabolizması üzerine etkilerini araştırmak üzere; glukoz taşıyıcı protein 1 (GLUT1) ve glukoz taşıyıcı protein 3 (GLUT3) ekspresyonlarını ve hücre içi glukoz seviyelerini belirledik. Çalışmamız sonucunda; GR, MR, GLUT1 ve GLUT3 ekspresyonlarının ve hippokampus bölgesindeki GR ve MR lokalizasyonlarının, hem kortikosteron uygulamaları sonucu oluşturulan sirkadiyen ritim ve stres modellerinde hem de $A\beta_{1-42}$ uygulaması sonucu oluşturulan AH benzeri modelde değiştiğini ve bu değişimlerin doza bağlı olarak farklılık gösterdiğini belirledik. Ayrıca hücre içi glukoz seviyesinin arttığını saptadık. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları modeller arasında değerlendirdiğimizde ise; kortikosteron ve $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GR protein seviyesi, GLUT1 mRNA seviyesi ve hücre içi glukoz seviyesi ile hippokampusun özellikle stratum piramidalis bölgesindeki GR lokalizasyonunun benzer şekilde etkilendiğini gözledik. Sonuçlarımız; stres sonucu meydana gelen kortikosteron artışının, glukoz metabolizmasında değişikliklere neden olarak AH'de görülen patolojik mekanizmaların oluşumu sürecine katılabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Stres, Glukokortikosteroid, Glukoz metabolizması, Beyin organotipik kesit kültürü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25555.

ABSTRACT

Alaylıoğlu, M. (2021). Investigation of the association between Alzheimer's disease and corticosteroid pathways in terms of glucose metabolism in organotypic brain slice culture. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. PhD Thesis. İstanbul.

Stress is accepted as an important risk factor for Alzheimer's disease (AD), the most common seen neurodegenerative disease. The high levels of the stress hormone cortisol that are found in the cerebrospinal fluid (CSF), plasma and serum of Alzheimer's patients, give rise to thought for a possible relationship between AD and stress. In AD, it has been shown that there is a serious decrease in glucose uptake and usage of nerve cells. This information give rise to thought that the increase in glucocorticosteroid level caused by stress is involved in the formation of pathological mechanisms seen in AD by causing changes in glucose metabolism. For this purpose, in circadian rhythm, stress and AD-like models that were created in organotypic brain slice cultures which allow obtaining the closest results to *in vivo* models by protecting the tissue architecture and microenvironment, we examined the effects of these applications on glucocorticosteroid receptors by determining glucocorticosteroid receptor (GR) and mineralocorticosteroid receptor (MR) expressions at both mRNA and protein levels and examining the regional localization of these proteins in the brain, and the effects of these applications on glucose metabolism by determining glucose transporter protein 1 (GLUT1) and glucose transporter protein 3 (GLUT3) expressions at both mRNA and protein levels and examining the intracellular glucose level in our study. As a result of our study, we found that GR, MR, GLUT1 and GLUT3 expression levels and GR and MR localizations in the hippocampus region changed both in circadian rhythm and stress models created by corticosterone applications and in AD-like models created by amyloid beta 1-42 application, and we determined that these changes differ depending on the dose. In addition, we found that the intracellular glucose level increased. When we evaluate the findings of corticosterone and Aβ1-42 applications we obtained in our study together, we observed that GR protein level, GLUT1 mRNA level and intracellular glucose level and GR localization of the hippocampus, especially in the stratum pyramidalis region, were similarly affected. Our findings point out that the increase in corticosterone caused by stress may be involved in the formation of pathological mechanisms seen in AD by causing changes in glucose metabolism.

Key Words: Alzheimer's disease, Stress, Glucocorticosteroid, Glucose metabolism, Organotypic brain slice culture

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 25555.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer Hastalığı (AH); nörodejeneratif hastalıklar arasında en sık görüleni olup, beynin özellikle hafıza ile ilişkili bölgeleri olan hippokampus, amigdala ve temporal neokortekste belirgin nöron dejenerasyonu ve sinaptik kayıp ile tanımlanır (Weintraub ve ark. 2012, Alzheimer's 2016). AH'nın en belirgin patolojik özelliği, amiloid beta (Aβ) peptidinin ekstraselüler alanda birikmesi sonucu oluşan amiliod plakların ve mikrotübül ilişkili tau proteinin hiperfosforilasyonu sonucu hücre içinde birikmesiyle oluşan nörofibril yumaklarının varlığıdır (Hardy 1997).

AH; hastalığın başladığı yaşa göre erken başlangıçlı AH (başlangıç yaşı < 65) ve geç başlangıçlı AH (başlangıç yaşı ≥ 65) veya genetik kökenli olup olmamasına göre ailesel AH ve sporadik AH olarak sınıflandırılabilmektedir. AH vakalarının %90'ı sporadik ve geç başlangıçlıdır (Tilley ve ark. 1998, Piaceri ve ark. 2013). Hastalığın sporadik formu, çok sayıda çevresel ve genetik faktörün bir arada etkileşmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Piaceri ve ark. 2013).

Tehdit edici fiziksel ya da çevresel değişikliklere verilen fizyolojik bir yanıt olan stres, sporadik AH için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (de Kloet 2000, Aznar ve Knudsen 2011). Majör depresif bozukluğu olan hastalarda demans benzeri bilişsel fonksiyon bozukluklarının görülmesi ve demans hastalarında anksiyete, apati, asabiyet ve depresyon gibi semptomların görülmesi, kronik stres ve AH arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (Aznar ve Knudsen 2011).

Stres sonucu adrenal bezlerden glukokortikosteroid salınmasını sağlayan sistemler aktive edilir ve böylece glukokortikosteroid seviyelerinde ciddi bir artış meydana gelir. İnsanlarda kortizol, kemirgenlerde ise kortikosteron adrenal korteks tarafından salınan bir glukokortikosteroidtir. Bu glukokortikosteroidler, etkilerini hem mineralokortikosteroid reseptörleri (MR) hem de glukokortikosteroid reseptörleri (GR) üzerinden gösterirler (Spiga ve ark. 2014, Boron ve Boulpaep 2016). Nöronlarda glukokortikosteroid reseptörlerinin aktivasyonu sonucunda hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, sinaptik plastisite, enerji metabolizması, sinyal iletimi ve immün yanıt gibi çok çeşitli hücresel yanıtlar meydana gelebilir. Ayrıca yapılan çalışmalarla glukokortikosteroidlerin nöronların ölümü ve sağkalımında, dendritik dallanmada, sinaps oluşumunda, glia hücrelerinde çeşitli yapısal proteinlerin üretiminde ve çeşitli ikincil mesajcıların iletilmesinde rol aldığı gösterilmiştir.

MR ve GR; hippokampus, amigdala ve prefrontal korteks gibi bilişsel fonksiyon ve hafıza ile ilişkili beyin bölgelerinde bol miktarda bulunmaktadır (De Kloet ve ark. 1998, de Kloet 2000, de Kloet ve ark. 2000, Swaab ve ark. 2005).

Glukokortikosteroidler, stres yanıtının dışında sirkadiyen ritmi, enerji metabolizmasını ve immün yanıtı da düzenlerler. Glukokortikosteroidlerin; çeşitli periferal doku ve hücrelerde glukoneogenezi uyardığı, glukoz taşıyıcı proteinlerin translokasyonlarını inhibe ederek hücre içi glukoz alınımını ve kullanımını azalttığı ve enerji kaynağı olarak glukoz yerine yağ asitlerinin kullanılmasını sağlayarak kan glukoz seviyesinde artışa neden olduğu bilinmektedir (Haber ve Weinstein 1992, Ruzzin ve ark. 2005, Magomedova ve Cummins 2016).

Vücuttaki organlar arasında en çok enerjiye ihtiyaç duyan organ olan beyinde yer alan hücreler; tıpkı diğer hücreler gibi, çok sayıda hücre içi olayı gerçekleştirmek ve yaşamlarını devam ettirmek için gerekli olan enerjiyi glukozdan sağlamaktadır (Yin ve ark. 2016, Camandola ve Mattson 2017). İnsan beyninde glukoz transportunun büyük bir çoğunluğu, insülinden bağımsız olarak fonksiyon gösteren glukoz taşıyıcı protein 1 (GLUT1) ve glukoz taşıyıcı protein 3 (GLUT3) tarafından gerçekleştirilir (Camandola ve Mattson 2017). GLUT1 sinir sisteminde baskın olarak astrositlerde ve kan-beyin bariyerini oluşturan endoteliyal hücrelerde bulunurken, nöronlar spesifik olarak GLUT3 eksprese ederler (Shah ve ark. 2012, Mueckler ve Thorens 2013, Camandola ve Mattson 2017).

Alzheimer hastalarının beyin-omurilik sıvıları (BOS), plazma ve serumlarında stres hormonu olan kortizolün seviyesinin yüksek olması ve majör depresyon bozukluğu olan hastalar ile kronik kortikosteroid tedavisi gören hastalarda hippokampus hacminde azalma ve dekleratif hafıza bozukluklarının tespit edilmesi, AH ile stres arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (Tsigos ve Chrousos 2002, Aznar ve Knudsen 2011, Huang 2014). Hayvanlarda yapılan deneylerle kronik stres sonucu özellikle hippokampusdaki piramidal nöronlarda dejeneratif kayıp meydana geldiği gösterilmiş ve bu hippokampal nöron hasarının altında yatan mekanizmanın; hippokampal nöronlar ve glia hücrelerindeki glukoz transportunun inhibisyonu olduğu ileri sürülmüştür (Tsigos ve Chrousos 2002).

AH'da, merkezi sinir sistemi (MSS) hücrelerinin glukoz alımı ve kullanımında ciddi bir azalma olduğu ve bu azalışın hastalık sürecinin ilerleyişiyle birlikte arttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu durum, normal yaşlanmayla birlikte görülen demans ve Alzheimer tipi demansla, hücre içi glukoz alımı ve enerji metabolizmasındaki bozulmalar

arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir (Yin ve ark. 2016). Ancak bu azalışın glukoz taşıyıcı proteinlerdeki değişikliklerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı hususu halen belirsizliğini korumaktadır.

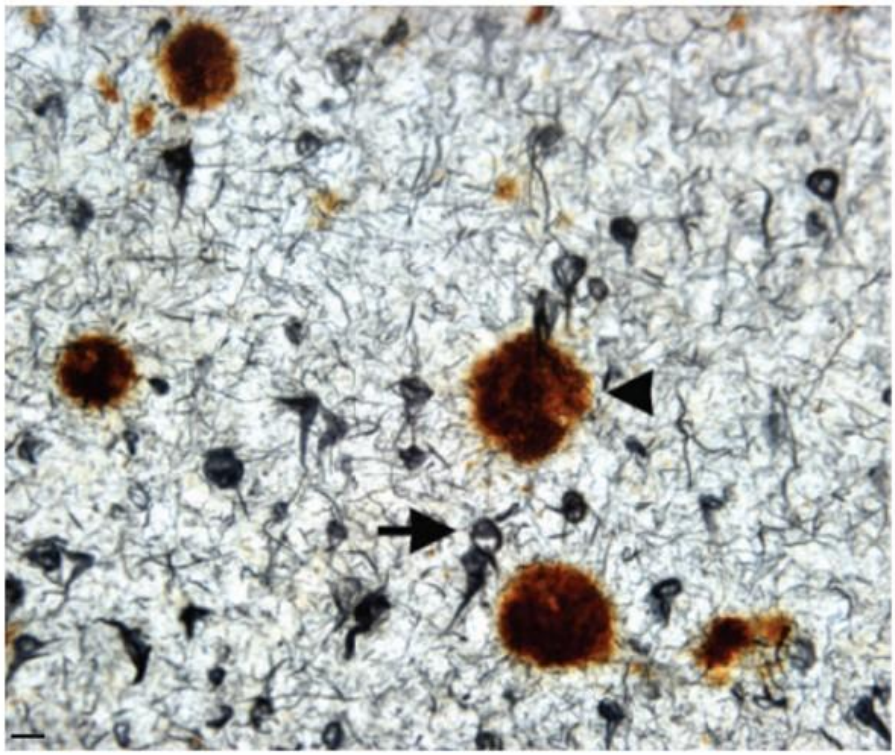
Bu bilgiler; stres sonucu meydana gelen glukokortikosteroid seviyesindeki artışın, glukoz metabolizmasında değişikliklere neden olarak AH'de görülen patolojik mekanizmaların oluşumu sürecine katıldığını düşündürmekte ve stresin nörodejenerasyona neden olan yolakları tetikleyip tetiklemediği sorusunu ortaya çıkarmaktadır. Bu sebeple bu çalışmamızda; doku mimarisi ve mikroçevrenin korunmasını sağlayarak *in vivo* modellere en yakın sonuçların elde edilmesine olanak sağlayan beyin organotipik kesit kültürlerine kortikosteron uygulaması ile oluşturulan sirkadiyen ritim ve stres modelleri ile amiloid beta 1-42 peptid uygulaması sonucu oluşturulan AH benzeri modelde; (1) kortikosteroid reseptörleri olan GR ve MR ekspresyonlarını hem mRNA hem de protein seviyesinde belirleyerek ve söz konusu proteinlerin beyindeki bölgesel lokalizasyonlarını inceleyerek bu uygulamaların kortikosteroid reseptörleri üzerine etkilerini, (2) beyindeki glukoz transportunu sağlayan GLUT1 ve GLUT3 ekspresyonlarını hem mRNA hem de protein seviyesinde belirleyerek ve hücre içi glukoz seviyesini inceleyerek bu uygulamaların glukoz metabolizması üzerine etkilerini, (3) kültür sıvısındaki LDH seviyesini ölçerek sitotoksisite testi ile bu uygulamaların nöron hasarı üzerindeki etkisini araştırarak, yıllardır çeşitli fizyolojik çalışmalar ve davranış testleri ile stres ve AH arasında var olduğu düşünülen ancak henüz tam olarak anlaşılmamış olan olası ilişkiye katılan moleküler yolakları aydınlatmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

İlerleyici ve geri dönüşümsüz bir nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer hastalığı (AH); günlük yaşamı etkileyen hafıza kaybı, yeni bilgileri hatırlamada güçlük, konuşma ve problem çözme gibi bilişsel fonksiyonların ilerleyici kaybı ile tanımlanan demansın en yaygın görülen formudur (Price ve ark. 2009, Alzheimer's 2016).

AH nöropatolojik olarak; amiloid öncül proteininin (APP) kırpılmasıyla açığa çıkan amiloid beta (Aβ) peptidinin ekstraselüler alanda birikmesi sonucu oluşan amiliod (senil) plaklar ve mikrotübül ilişkili tau proteinin hiperfosforilasyonu sonucu intraselüler alanda birikmesiyle oluşan nörofibril yumakları ile tanımlanmaktadır. (Hardy 1997) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Alzheimer hastalığında görülen amiloid plaklar ve nörofibril yumakları.

Anti-amiloid beta antikoru ile işaretlenmiş amiloid plaklar (kahverengi, ok başı) ve eşleşmiş helikal fibrillere bağlanan anti-PHF1 antikoru ile işaretlenmiş nörofibril yumakları (siyah, ok) görülmekte. Rohn 2013'ten alınmıştır.

AH; hastalığın başladığı yaşa göre erken başlangıçlı AH (başlangıç yaşı < 65) ve geç başlangıçlı AH (başlangıç yaşı ≥ 65) olarak sınıflandırılmaktadır. Erken başlangıçlı AH tüm vakaların yaklaşık olarak %1 ile %6'sını oluşturur. Genetik olarak ise AH; aile geçmişinin olup olmamasına göre ailesel AH ve sporadik AH olarak olarak sınıflandırılmaktadır.

Ailesel AH vakalarının büyük çoğunluğu erken başlangıçlı olsa da geç başlangıçlı Alzheimer hastalarının bazılarında aile geçmişi görülmektedir. AH vakalarının %90'ı sporadik ve geç başlangıçlıdır (Tilley ve ark. 1998, Piaceri ve ark. 2013).

Ailesel AH vakalarının yaklaşık %13'ü; APP, Presenilin-1 (PSEN1) ve Presenilin-2 (PSEN2) genlerinde nadir görülen mutasyonların otozomal dominant olarak kalıtılması sonucu görülmektedir. Sporadik AH ise daha karmaşık temellere sahiptir ve çok sayıda genetik ve çevresel etkenin bir araya gelmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Sporadik AH için şimdiye kadar bilinen tek genetik risk faktörü Apolipoprotein E (APOE) geni ε4 allelidir (Piaceri ve ark. 2013). Yapılan çalışmalar AH gelişme riskinin, bir ε4 alleli taşıyan bireylerde yaklaşık 3 kat, iki ε4 alleli taşıyan bireylerde ise yaklaşık 15 kat daha fazla olduğunu göstermiştir (Guerreiro ve ark. 2012).

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Patolojisi

AH'nın en belirgin patolojik özelliği amiloid plaklar ve nörofibril yumaklarının varlığıdır. Bunların yanı sıra; distrofik nöritler, astrogliozis ve mikroglial aktivasyon görülmektedir. Bu süreçlerin sonucunda, sinaptik ve nöronal kaybın yol açtığı makroskopik atrofi meydana gelmektedir (Lane ve ark. 2018).

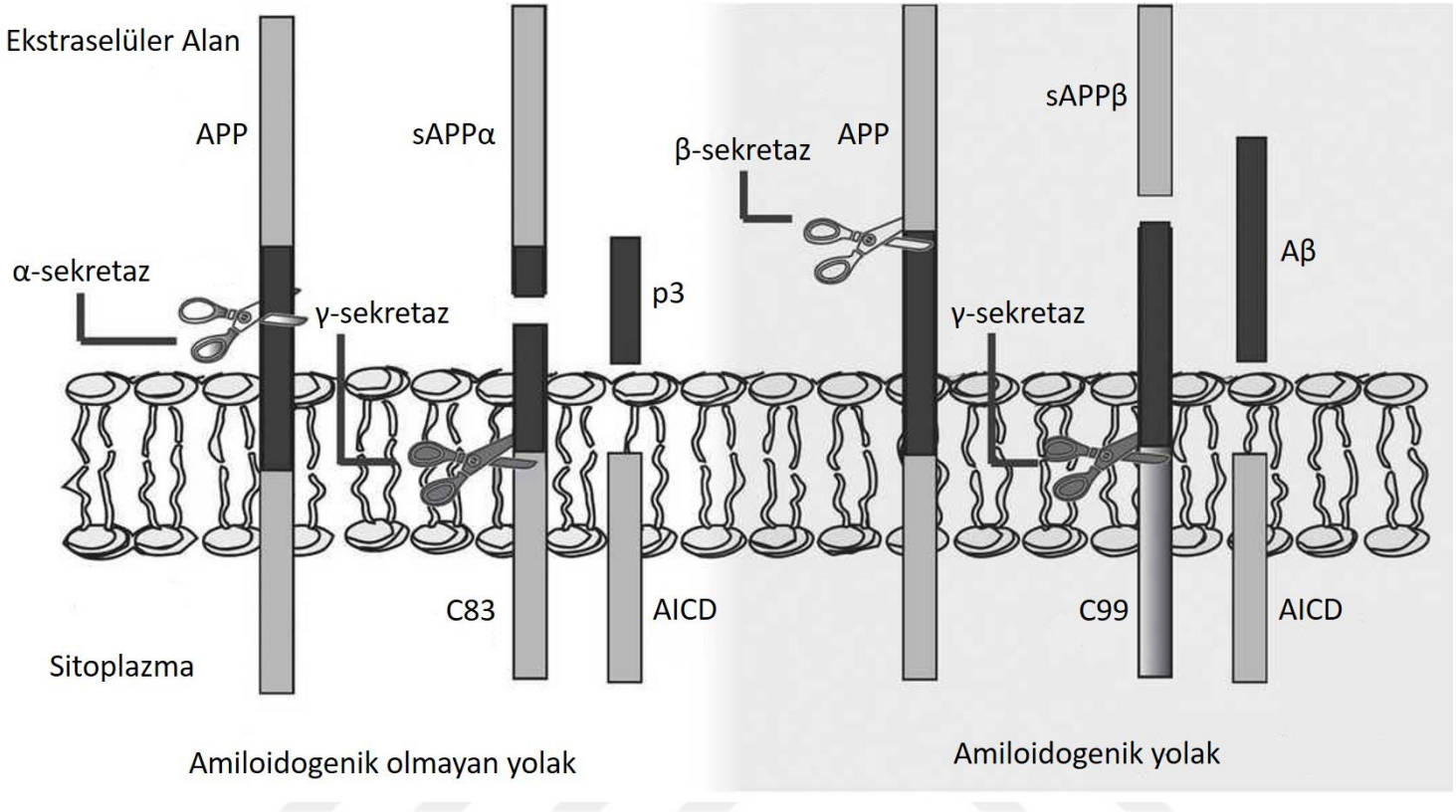
2.1.1.1. Amiloid Beta Peptidi ve Amiloid Plaklar

Amiloid plaklar; büyük bir ekstraselüler bölgesi bulunan tek geçişli transmembran bir protein olan APP'nin, sekretazlar adı verilen enzim kompleksleri tarafından kırpılmasıyla açığa çıkan Aβ peptidinin ekstraselüler alanda anormal olarak katlanması ve birikmesi sonucu meydana gelir (O'Brien ve Wong 2011, Lane ve ark. 2018). Hücrelerde APP'nin kırpılması iki yolak aracılığıyla gerçekleşmektedir.

Amiloidogenik olmayan yolakta; 770 amino asit uzunluğunda olan APP'nin, α-sekretaz enzimi tarafından 687. amino asitten kesilmesi sonucu ekstraselüler alana salınan çözünür APPα (sAPPα) ve plazma membranında gömülü kalan C83 parçaları oluşur. Daha sonra C83 parçasının γ-sekretaz enzimi tarafından kırpılmasıyla ekstraselüler alana salınan p3 parçası ve sitoplazmaya salınan APP intraselüler parçası (AICD) meydana gelir.

Amiloidogenik yolakta ise; β-sekretaz enzimi APP'ni 671. amino asitten keserek ekstraselüler alana salınan çözünür APPβ (sAPPβ) ve plazma membranında gömülü kalan C99 parçalarını oluşturur. C99 parçasının γ-sekretaz enzimi tarafından kırpılmasıyla ise

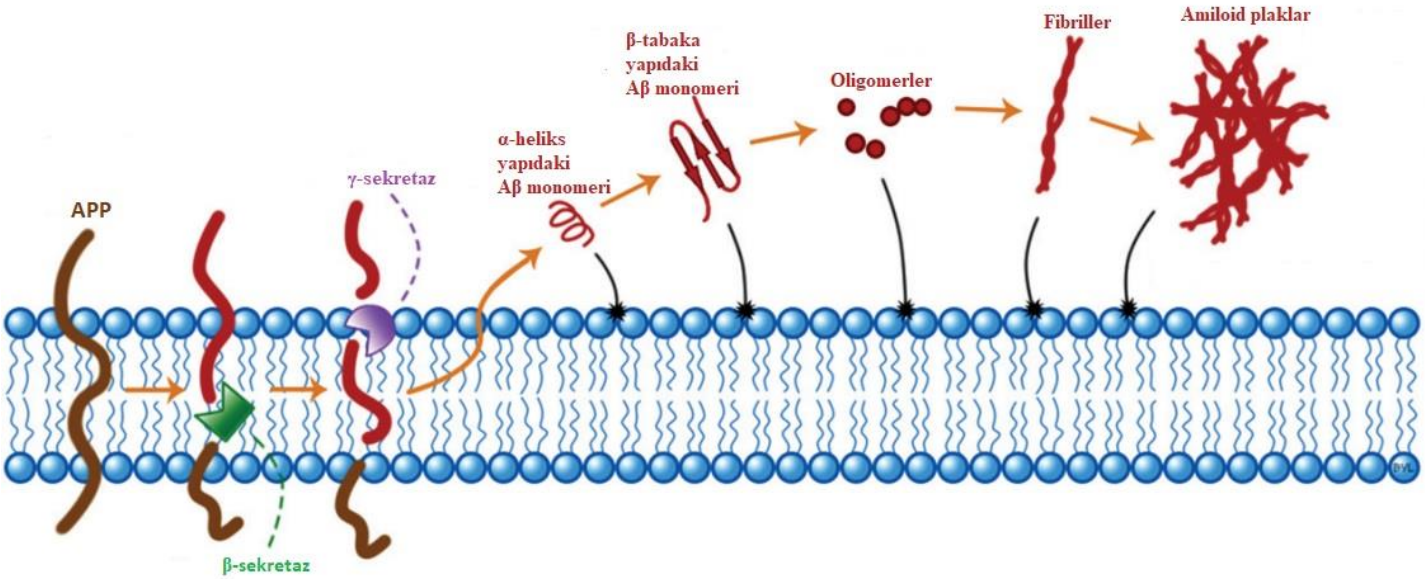
sitoplazmaya salınan AICD ile ekstraselüler alana salınan Aβ peptidi açığa çıkar (Wilkins ve Swerdlow 2017) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: APP'nin kırpılması ve Aβ peptidinin oluşumu.

Rius-Pérez 2018'den uyarlanmıştır.

β-sekretaz ve γ-sekretaz enzimlerinin kesimi gerçekleştirdiği bölgeye bağlı olarak uzunluğu 38 ile 43 amino asit arasında değişen Aβ peptidleri ortaya çıkmaktadır. Ancak fizyolojik koşullarda baskın olarak bulunan $A\beta_{1-40}$ peptidir. $A\beta_{1-42}$ ve $A\beta_{3-40}$ gibi bazı formları plak oluşturmaya daha yatkındır. Amiloid plakların oluşumu, α-heliks yapısındaki Aβ monomerlerinin yanlış katlanarak β-tabaka yapısına dönüşmesiyle başlar. Bu yapıya geçen Aβ monomerleri polimerize olarak önce Aβ oligomerlerini, daha sonra Aβ fibrillerini ve en son olarak çözünmez yapıda olan amiloid plaklarını oluştururlar (Drolle ve ark. 2014, Reiss ve ark. 2018) (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: Amiloid plakların oluşumu.

Drolle ve ark. 2014'ten uyarlanmıştır.

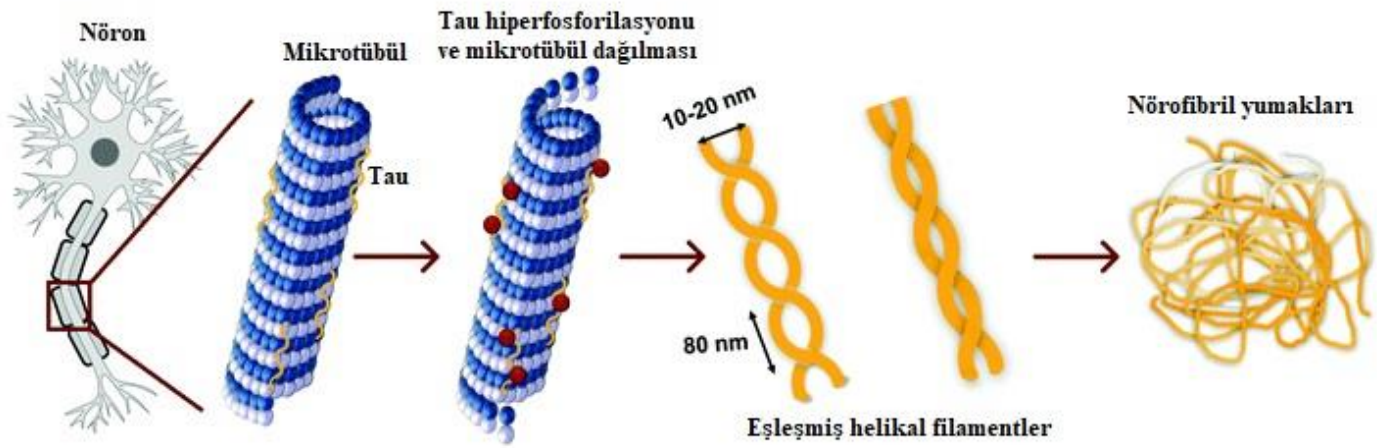
2.1.1.2. Tau Proteini ve Nörofibril Yumaklar

Tau proteini, tubulin proteinlerinin bir araya gelmesine aracılık ederek mikrotübül oluşumunda yer alan ve mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlayan mikrotübül ilişkili bir proteindir. Merkezi sinir sisteminde baskın olarak nöronlarda bulunur. Nöronlarda; mikrotübül organizasyonunun yanı sıra aksonal transport, nörit gelişimi ve sinaps oluşumunda da rol almaktadır (Wang ve Mandelkow 2016, Chong ve ark. 2018).

Tau proteininin mikrotübüllere bağlanması ve mikrotübülden ayrılması, spesifik kinaz ve fosfatazlar tarafından düzenlenen fosforilasyon/defosforilasyon mekanizması ile sağlanmaktadır. Defosforile formdaki tau mikrotübüle bağlanırken, tau proteininin fosforillenmesi mikrotübülden ayrılmasına neden olur. Tau proteininin fosforilasyonu glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3β) ve siklin bağımlı kinaz 5 (CDK5) aracılığıyla düzenlenirken, defosforilasyonu ise protein fosfataz 2A (PP2A) tarafından sağlanmaktadır.

Fizyolojik koşullarda, kinazlar ve fosfatazlar kontrollü ve dengeli bir şekilde fonksiyon göstermektedir. Ancak ekspresyon, aktivasyon veya inhibisyon süreçlerinde meydana gelen değişimler, kinaz/fosfataz dengesinin bozulmasına ve tau proteinin hiperfosforilasyonuna yol açar. Hiperfosforilasyon, tau proteininin mikrotübüllerden ayrılmasına ve mikrotübüllerin dağılmasına neden olur. Hiperfosforile olan tau proteinleri bir araya gelerek, eşleşmiş helikal filamentler (EHF) olarak adlandırılan hücre içi tau

agregatlarını oluşturur. EHF'lerin bir araya gelmesiyle ise, sitotoksisiteye ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açan nörofibril yumakları oluşur (Jouanne ve ark. 2017, Gao ve ark. 2018) (Şekil 2-4).

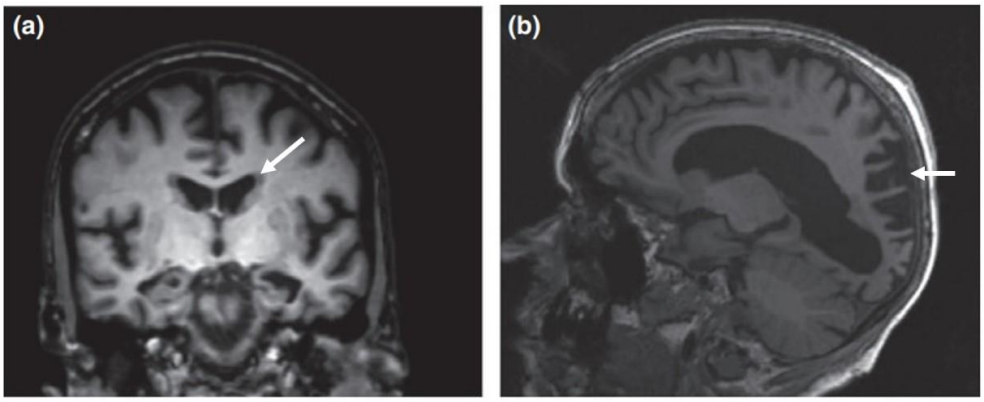


Şekil 2-4: Nörofibril yumaklarının oluşumu.

Verwilst ve ark. 2018'den alınmıştır.

2.1.2. Alzheimer Hastalığında Etkilenen Beyin Bölgeleri ve Histolojik Yapıları

Amiloid plaklar ve nörofibril yumakları dışında Alzheimer hastalarının beyinlerinde görülen en belirgin patolojik değişimlerden bir diğeri ise; nöron ölümü ve sinaptik dejenerasyon sonucu özellikle serebral korteks ile hippokampus, amigdala ve temporal korteks gibi subkortikal alanlarda meydana gelen atrofidir (Weintraub ve ark. 2012) (Şekil 2-5).

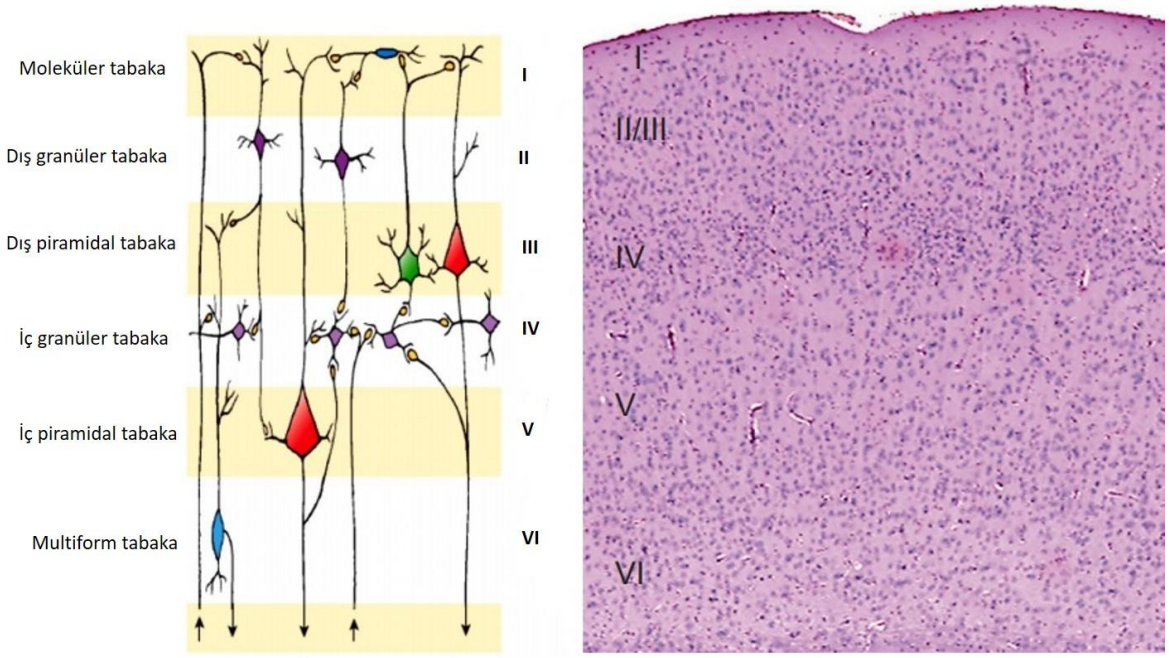


Şekil 2-5: Alzheimer hastalığında görülen beyin atrofisi.

(a) Hippokampal atrofi. (b) Parieto-oksipital atrofi. Lane ve ark. 2017'den uyarlanmıştır.

AH'de en çok etkilenen beyin bölgelerinin başında gelen ve motor hareketler, bilişsel fonksiyonlar, davranış ve hafızadan sorumlu beyin bölgesi olan korteksin; moleküler tabaka (Tabaka I), dış granüler tabaka (Tabaka II), dış piramidal tabaka (Tabaka III), iç granüler tabaka (Tabaka IV), iç piramidal tabaka (Tabaka V) ve multiform tabaka (Tabaka VI) olmak üzere 6 tabakası bulunmaktadır.

Moleküler tabakada Cajal-Retzius hücreleri ve korteksin diğer tabakalarında yer alan nöronların akson ve dendritleri yer alır. Dış granüler tabakada, bu tabakanın granüler bir yapıda görünmesine neden olan küçük stellat ve piramidal nöronlar yer almaktadır. Dış piramidal tabakada, baskın olarak piramidal nöronlar bulunmaktadır. Korteksin ana sinyal girdi merkezi olarak kabul edilen ve talamus gibi diğer beyin bölgelerinden gelen sinyalleri alan iç granüler tabakada baskın olarak stellat nöronlar ve az miktarda piramidal nöron yer almaktadır. Korteksin ana sinyal çıktı merkezi olarak kabul edilen ve beynin diğer bölgelerine sinyal gönderen iç granüler tabakada ise baskın olarak geniş piramidal nöronlar bulunmaktadır. Korteksin en iç tabakası olan ve subkortikal beyaz maddenin tam üzerinde yer alan multiform tabakada ise baskın olarak fusiform nöronlar ve az miktarda piramidal nöronlar ve internöronlar bulunmaktadır (Hagan ve ark. 2012, Kandel 2013, Bear ve ark. 2016) (Şekil 2-6).

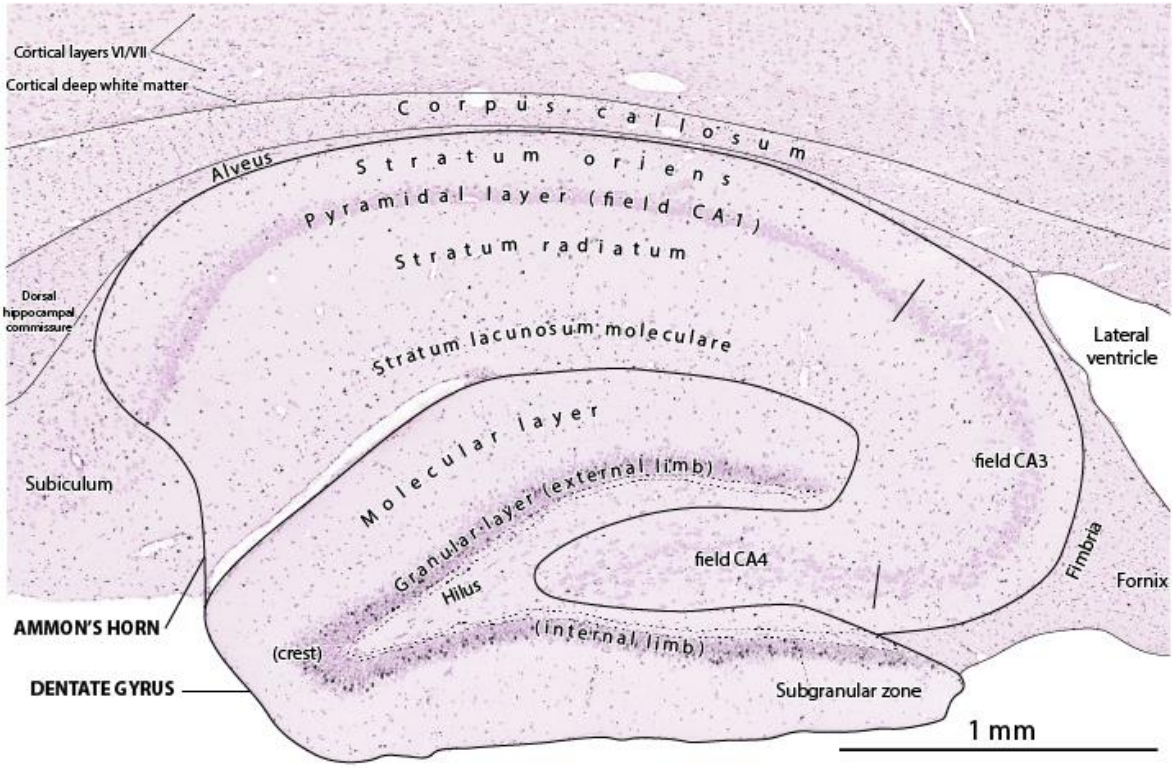


Şekil 2-6: Korteksin alt tabakaları.

Hagan ve ark. 2012'den uyarlanmıştır.

AH'de en çok etkilenen beyin bölgelerinden bir diğeri olan ve, öğrenme ve hafıza oluşumunda rolü olan hippokampus bölgesi ise; alveus, stratum oriens (oriens tabakası), stratum piramidalis (piramidal tabaka), stratum radiatum (radiatum tabakası), stratum lacunosum moleculare (lacunosum moleküler tabakası), dentat girus moleküler tabakası, dentat girus granüler tabakası ve hilus olmak üzere 8 alt tabakaya sahiptir.

Alveus tabakasında; az sayıda internöronla birlikte, başta stratum piramidalis olmak üzere hippokampusun diğer bölgelerindeki nöronların aksonları ve entorhinal korteksten gelen fiberler yer almaktadır. Stratum orienste, inhibitör basket hücreleri ve stratum piramidalisteki piramidal nöronların bazal dendritleri bulunmaktadır. Stratum piramidaliste, hippokampusun uyarıcı nöronları olan ve tabakaya adını veren piramidal nöronlar ile birlikte çok sayıda internöron yer almaktadır. Stratum radiatumda; internöronlar ve stratum piramidalisteki piramidal nöronların apikal dendritleri ile Schaffer kollateral fiberler olarak adlandırılan ve hippokampusun CA3 alanından CA1 alanına uzanan fiberler bulunmaktadır. Stratum lacunosum moleculerede; az sayıda internöron ile birlikte Schaffer kollateral fiberler ve entorhinal korteksten gelen fiberler yer almaktadır. Dentat girus moleküler tabakasında; internöronlar ile birlikte dentat girus granüler tabakada yer alan nöronların dendirtleri bulunmaktadır. Dentat girus granüler tabakasında, tabakaya adını veren granüler hücreler ve basket hücreleri bulunmaktadır. Hilus tabakasında ise internöronlar ve fusiform hücreler yer almaktadır (Cappaert ve ark. 2015, Hammond 2015) (Şekil 2-7).

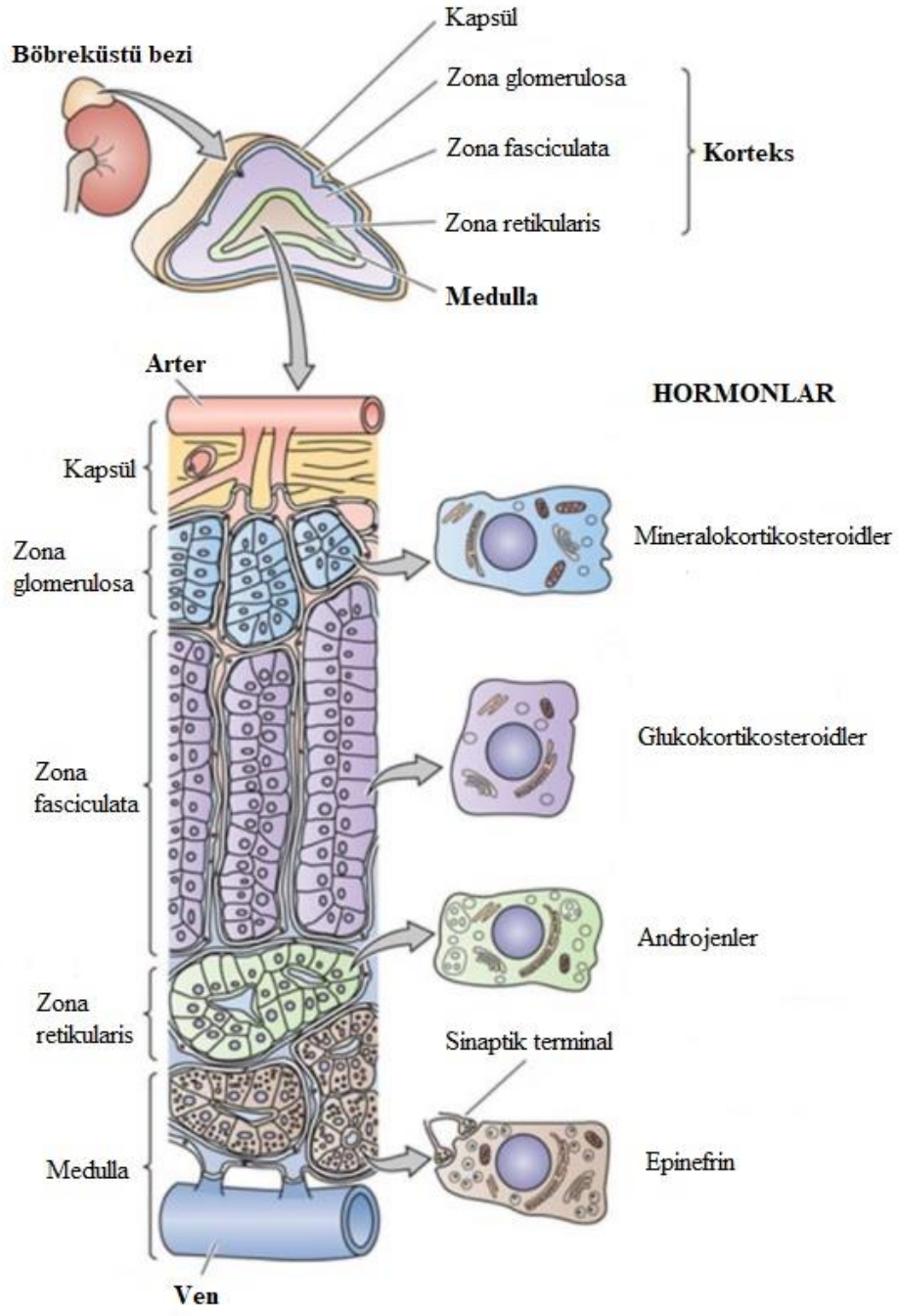


Şekil 2-7: Hippokampusun alt tabakaları.

https://braindevelopmentmaps.org/home/brain-map-sets/postnatal-neurogenesis-in-the-developing-hippocampus/ adresinden alınmıştır.

2.2. Kortikosteroid Metabolizması

Kortikostreodiler; adrenal korteksten salınan steroid hormonlardır. Mineralokortikosteroidler ve glukokortikosteroidler olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar. Mineralokortikosteroidler; adrenal korteksin zona glomerulosa bölgesinde üretilirken, glukokortikosteroidler ise zona fasciculata bölgesinde üretilir (Barrett 2009) (Şekil 2-8).

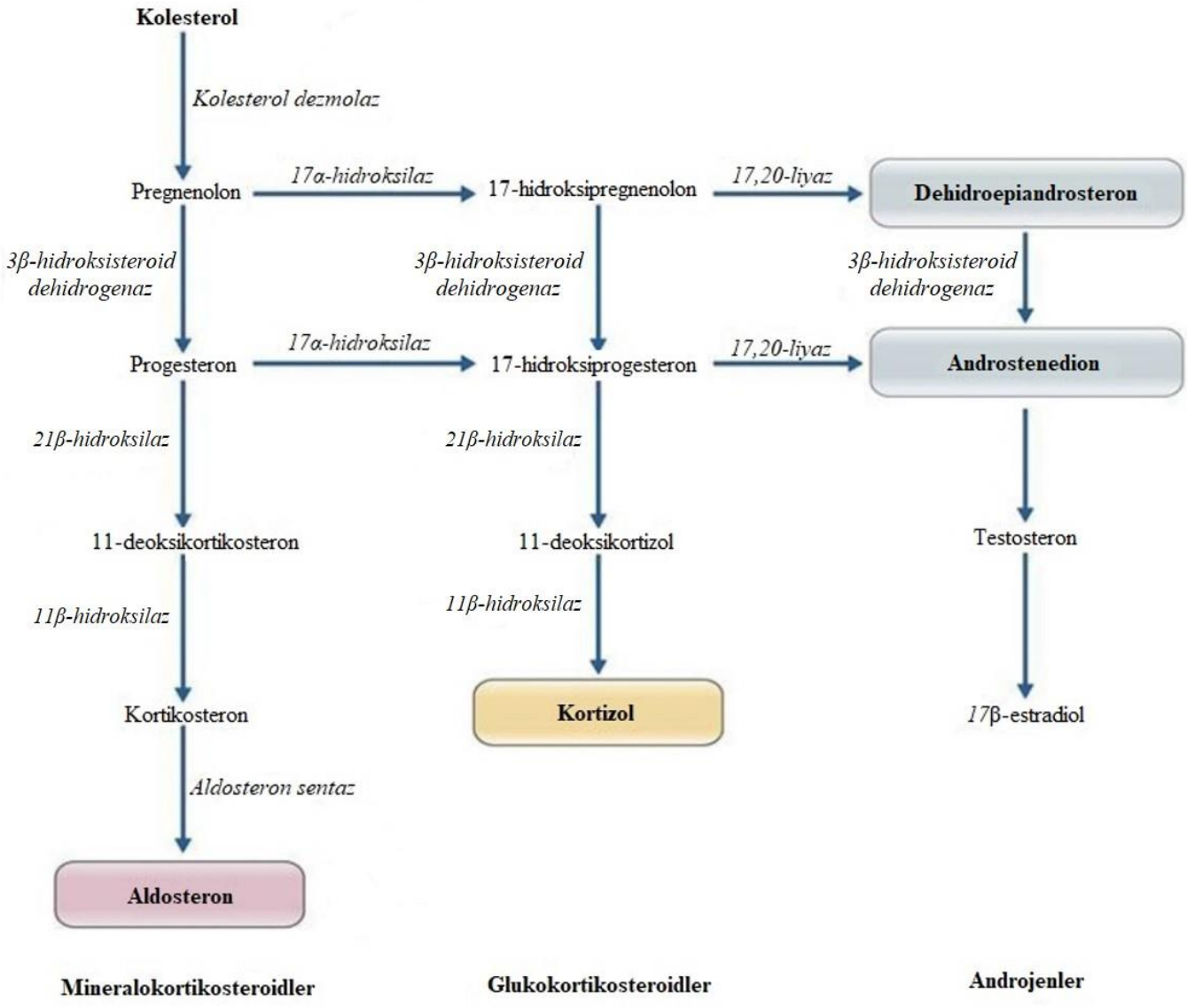


Şekil 2-8: Adrenal korteks ve salınan hormonlar.

Barrett 2009'den uyarlanmıştır.

Kortikosteroidler, diğer steroid hormonlar gibi kolesterol kökenlidir. Mineralokortikosteroid ve glukokortikosteroid sentezi pregnenolona kadar ortaktır. Zona glomerulosa ve zona fasciculata bölgesinde bulunan hücrelerin mitokondri iç membranında eksprese edilen enzimler farklılık göstermesi nedeniyle zona glomerulosada pregnenolondan

mineralokortikosteroid sentezi gerçekleşirken zona fasciculatada pregnenolondan glukokortikosteroid sentezi gerçekleşir (Costanzo 2013) (Şekil 2-9).



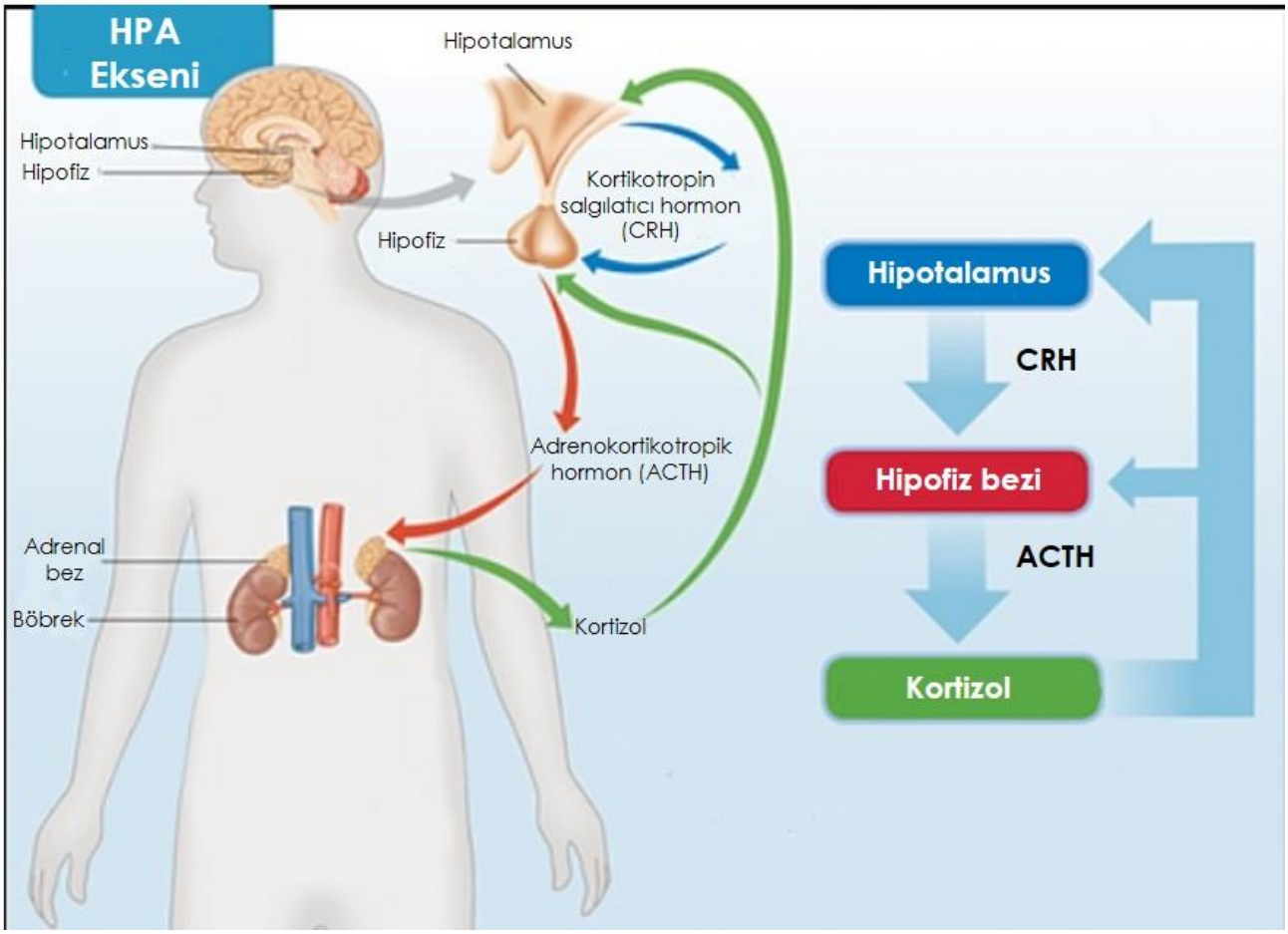
Şekil 2-9: Adrenal korteksten salınan steroid hormonların biyosentezi.

Costanzo 2013'ten uyarlanmıştır.

Aldosteron gibi mineralokortikosteroidler iyon homeostazını düzenlerken, glukokortikosteroidler enerji metabolizmasını, inflamasyonu ve stres yanıtlarını düzenler (Barrett 2009).

2.2.1. Glukokortikosteroidler

İnsanlarda kortizol, kemirgenlerde ise kortikosteron adrenal korteks tarafından salınan bir glukokortikosteroidtir. Glukokortiosteroidlerin salınımı, hipotalamik-hipofiz-adrenal (HHA) eksen tarafından gerçekleştirilir. Hipotalamusun paraventriküler nükleus bölgesinden salınan bir nöropeptid olan kortikotropin-salgılatıcı hormon (CRH), hipofiz bezinden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımını uyarır. ACTH kan dolaşımına salınarak adrenal korteksin zona fasciculata bölgesinden kortizol salınımını uyarır (Spiga ve ark. 2014) (Şekil 2-10).

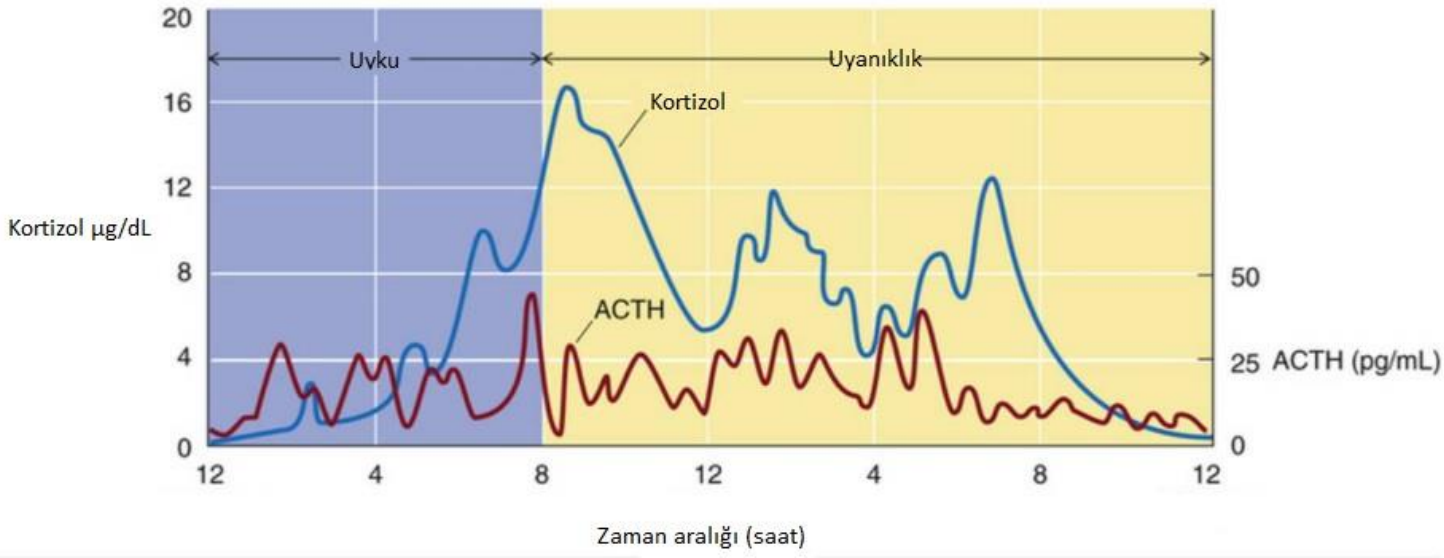


Şekil 2-10: Hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen.

https://msdiagnosed.wixsite.com/whatyoudontknow/hpa-axis-stress sayfasından uyarlanmıştır.

Glukokortikosteroidler; sirkadiyen ritmi, enerji metabolizmasını, immün yanıtı ve stres yanıtını düzenler. Sirkadiyen ritim ile birlikte kortizol seviyesi de değişiklik gösterir. 23:00-00:00 saatleri arasında en düşük seviyesindeyken 02:00-03:00 saatleri arasında yükselmeye başlayarak 09:00-10:00 saatleri arasında en yüksek seviyesine ulaşır ve gün

içerisinde seviyesi giderek azalır. Sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde glukokortikosteroidlerin, biyolojik saatten sorumlu genler olan *sirkadiyen lokomotor ürün döngüleri bozukluğu* (*CLOCK*) genleri ile işbirliği yaptığı düşünülmektedir (Spiga ve ark. 2014, Boron ve Boulpaep 2016) (Şekil 2-11).



Şekil 2-11: Sirkadiyen ritimde kortizol ve ACTH salınım seviyeleri.

Boron ve Boulpaep 2016'dan uyarlanmıştır.

Stres, tehdit edici fiziksel ya da çevresel değişikliklerin algılanması sonucu verilen fizyolojik bir yanıttır. Strese karşı verilen en belirgin yanıt adrenal medulladan katekolaminlerin, adrenal korteksten ise glukokortikosteroidlerin salınmasını sağlayan sistemlerin aktive edilmesidir. Bir tehdit varlığında meydana gelen akut stres sonucunda hipotamalus, sempatik sinir sistemi aracılığıyla doğrudan adrenal bezleri uyararak epinefrin ve norepinefrin salınımını uyararak kalp atışı ve soluk alıp verişin hızlanması, kan basıncının yükselmesi gibi hızlı bir yanıt oluşturur. Bu hormonlar kısa süreli etkiye sahiptir. Akut stres sırasında salınan glukokortikoidler ise oluşan bu adaptif yanıt sürecinde vücudun ihtiyaç duyduğu fazla enerjiyi sağlamak üzere katabolik olayları indükler ve daha sonra geri bildirim mekanizması aracılığıyla fizyolojik olarak normal seviyesine geri döner. Ancak stress uyaranının kronik olarak tekrarlanmasıyla, glukokortikosteroid seviyelerinde ciddi bir artış meydana gelir. Kronik olarak artan glukokortikosteroidler sonucu geri bildirim mekanizması zamanla inhibe olur ve stres uyaranı ortadan kalksa bile uzun bir süre glukokortikosteroid

seviyesi fizyolojik seviyesine dönemez (de Kloet 2000, Swaab ve ark. 2005, Lee ve ark. 2015).

MSS'de glukokortikosteroidler, nörotransmitter sistemlerini ve pek çok beyin bölgesinde nöronal plastisiteyi düzenler. Ayrıca yapılan çalışmalarla glukokortikosteroidlerin nöronların ölümü ve sağkalımında, dendritik dallanmada, sinaps oluşumunda, glia hücrelerinde çeşitli yapısal proteinlerin üretiminde ve çeşitli ikinci mesajcı sistemlerin iletilmesinde rol aldığı gösterilmiştir (de Kloet 2000, Swaab ve ark. 2005).

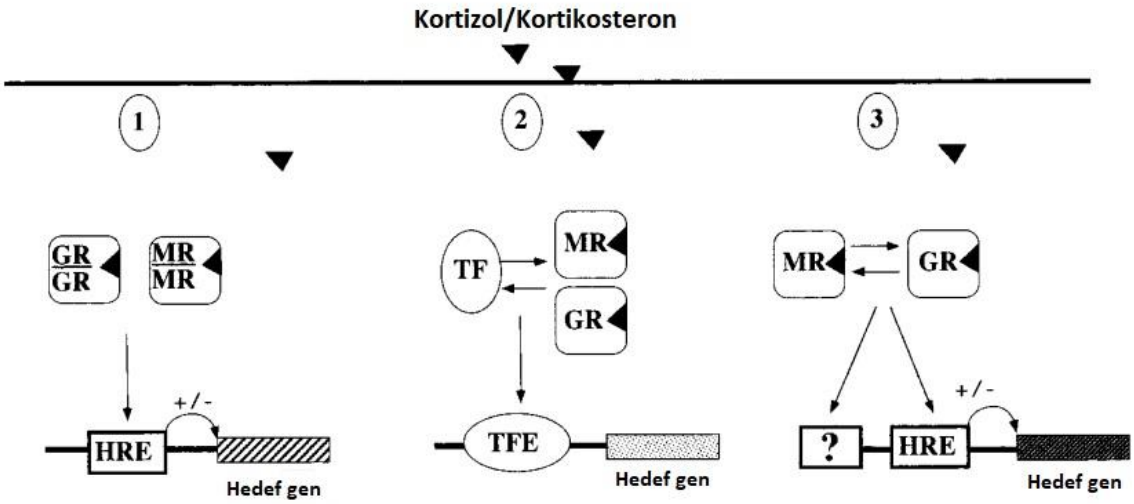
2.2.2. Kortikosteroid Reseptörleri

Lipofilik özellikte olan kortizol/kortikosteron, kortikosteroid bağlayıcı globüline (CBG) bağlanarak kan-beyin bariyerinden (KBB) ve hücre membranından kolaylıkla geçerek hücre içerisindeki reseptörlerine bağlanır. Kortizol ve kortikosteron, etkilerini hem mineralokortikosteroid reseptörleri (MR) hem de glukokortikosteroid reseptörleri (GR) üzerinden gösterirler. Kortizol ve kortikosteron, her iki kortikosteroid reseptörlerine de bağlanabilirler ancak MR reseptörlerine GR reseptörlerine göre yaklaşık 6-10 kat daha fazla afiniteyle bağlanırlar (De Kloet ve ark. 1998, de Kloet ve ark. 2000).

Kortikosteroid reseptörleri diğer steroid reseptörleri gibi intraselüler reseptörlerdendir. Her bir kortikosteroid reseptörü, birkaç ısı-şoku proteini (örneğin; iki hsp90, bir hsp70) ve bir immünofilin ile birlikte sitoplazmik bir multiprotein kompleksi oluşturmuş durumdadır. Ligandın bağlanmasıyla ısı-şoku proteinlerinden ayrılarak nükleusa transloke olur, homo- ya da heterodimerizasyonun ardından hedef genlerin promoter bölgesindeki hormon yanıt elementlerine (HRE) bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu düzenler (Stahn ve ark. 2007).

İntraselüler kortikosteroid reseptörlerinin aktivasyonu sonucunda hücresel yapı, enerji metabolizması ve sinyal iletimi gibi çok çeşitli hücresel yanıt meydana gelebilir. Hücresel yapı üzerindeki etkileri birkaç günde görülürken, enerji metabolizması ya da sinyal iletimi süreçlerindeki etkileri saatler içerisinde görülmektedir. Kortizol/kortikosteron tarafından aktive edilen GR ve MR en az üç farklı yol ile gen transkripsiyonu düzenler. İlk yolda steroid reseptörlerinin, pek çok genin promoter bölgesinde bulunan bir ya da birden fazla HRE'ye bağlanması sonucu o genin ekspresyonu ya aktive olur ya da baskılanır. İkinci yolda aktive edici protein 1 (AP-1), nüklear faktör-κB (NFκB) ve cAMP-yanıt elementi bağlayıcı protein (CREB) gibi diğer transkripsiyon faktörleri tarafından aktive edilen gen transkripsiyonu GR tarafından baskılanır. Bu durum protein-protein etkileşimlerini

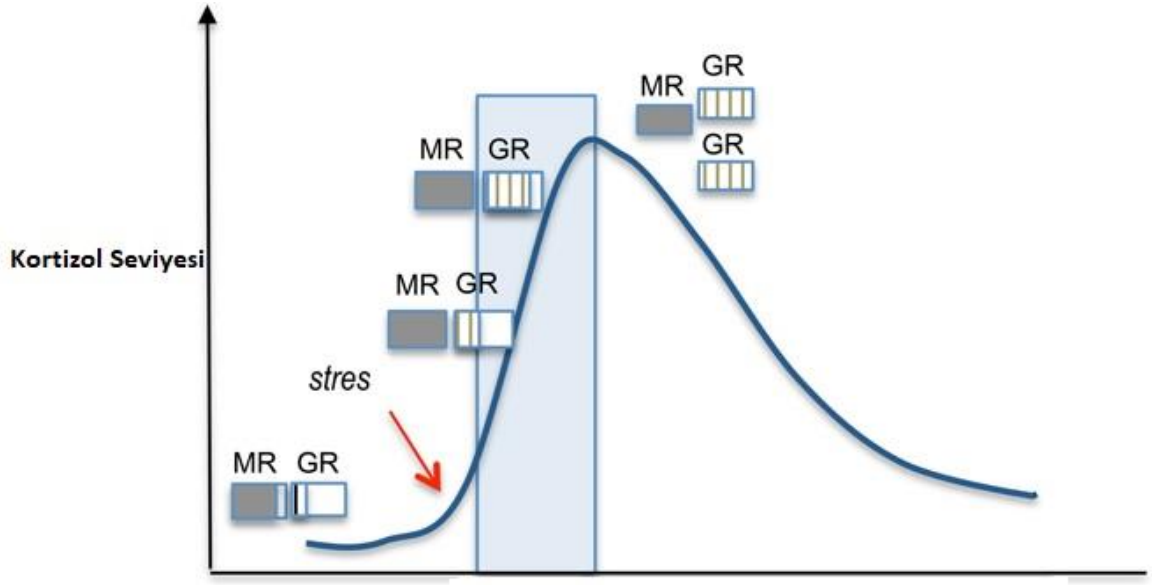
gerektirmektedir. Hedef genlerde HRE bulunmamaktadır. Üçüncü yolda ise farklı nükler reseptörler ile heterodimerlerin oluşması sonucu gen transkripsiyonu düzenlenir (De Kloet ve ark. 1998) (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: Glukokortikosteroidlerin etki mekanizması.

De Kloet ve ark. 1998'den uyarlanmıştır. **HRE:** Hormon yanıt elementi, **TF:** Transkripsiyon faktörü, **TFE:** Transkripsiyon faktörü yanıt elementi

Glukokortikosteroid seviyesi sirkadiyen saat ile birlikte ve stres koşullarında değişiklik gösterdiği için kortizol ve kortikosteronun gün içerisinde ve stres durumunda kullandıkları reseptörler de farklılık göstermektedir. Sabah saatlerinde glukokortikosteroid seviyesi maksimum seviyesine ulaşırken geç saatlere doğru yavaşça düşmektedir. Akşam saatlerinde glukokortikosteriodler %90 oranında MR reseptörünü kullanırken %10 oranında GR reseptörünü kullanır. Ancak sabah saatlerinde ve stres durumunda MR reseptörleri doygunluğa ulaştığı için GR reseptörü kullanımı yaklaşık %67-74 oranında artar (De Kloet ve ark. 1998, de Kloet 2000, de Kloet ve ark. 2000, Yau ve Seckl 2012) (Şekil 2-13).



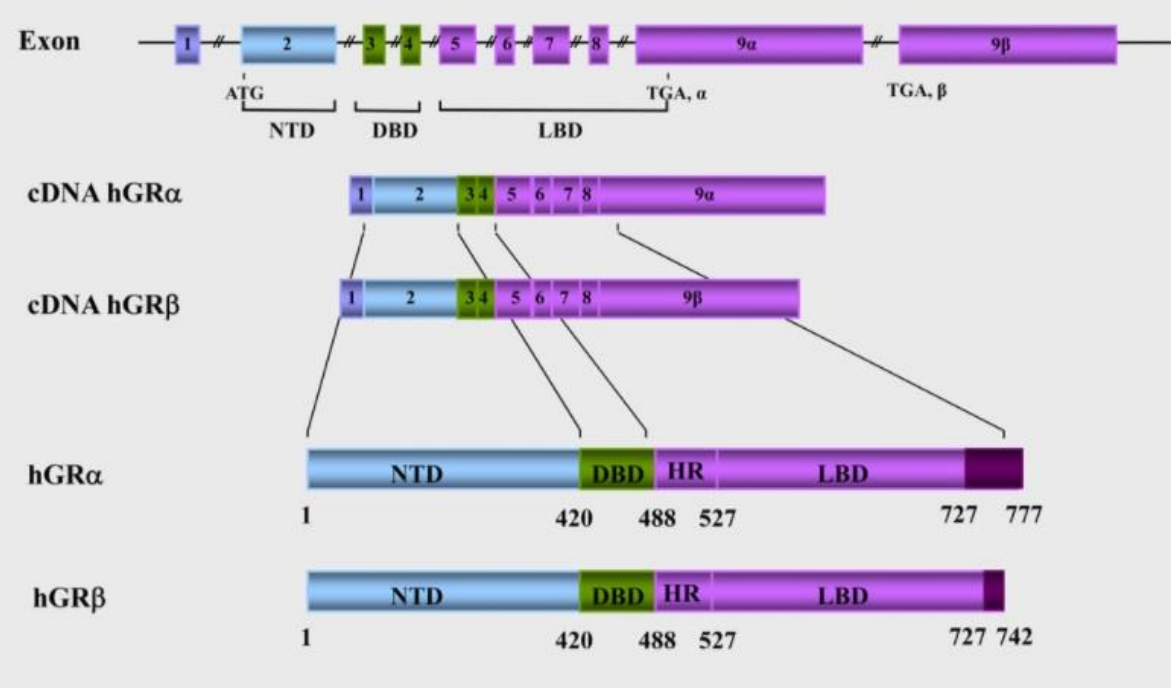
Şekil 2-13: Stres durumunda kortikosteroid reseptörlerinin kullanımı.

Yau ve Seckl 2012'den uyarlanmıştır.

MR ve GR; hippokampus, amigdala ve serebral korteks gibi bilişsel fonksiyon ile ilişkili beyin bölgelerinde bol miktarda bulunmaktadır ancak beyindeki dağılımları farklılık göstermektedir. MR reseptörleri; limbik sistemde, hippokampusta, parahippokampal girusta, entorinal ve insular kortekste, GR reseptörü ise; subkortikal yapılar (paraventriküler nukleus ve diğer hipotalamik nukleuslarda, hippokampusta ve parahippokampal girusta) ve prefrontal korteks başta olmak üzere kortikal yapılarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır (De Kloet ve ark. 1998, de Kloet 2000, de Kloet ve ark. 2000, Swaab ve ark. 2005).

2.2.2.1. Glukokortikosteroid Reseptörü (GR)

GR; 5. kromozom üzerinde yer alan, 10 ekzondan oluşan ve nüklear reseptör süperailesinin bir üyesi olan *Nüklear Reseptör Alt Ailesi 3 Grup C Üye 2* (*NR3C1)* geni tarafından kodlanmaktadır. İnsanda GR'nin alternatif kırpılma sonucu oluşan, 777 amino asit uzunluğunda olan GRα ve 727 amino asit uzunluğunda olan GRβ olmak üzere iki izoformu vardır. Bu izoformların translasyonları sonucu ilk 727 amino asidi identik olan ancak C-terminalleri farklı olan 2 protein ortaya çıkar (Şekil 2-14). GR'nin %99'u GRα olarak bulunurken %1'i ise GRβ olarak bulunur. GRβ, ligand bağlama ve hedef genlere bağlanma yeteneğine sahip değildir. GRβ'nın fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalar GRβ'nın GRα'ya ve MR'a bağlanarak aktivitelerini inhibe ettiğini ileri sürmektedir (Nicolaides ve ark. 2010, Kadmiel ve Cidlowski 2013).



Şekil 2-14: GR geni ve proteininin yapısı.

Nicolaides ve ark. 2010'dan alınmıştır. **NTD:** N-terminal bölge; **DBD:** DNA bağlayıcı bölge; **HR:** Menteşe bölgesi; **LBD:** Ligand bağlayıcı bölge

GR proteini, bir N-terminal bölge (NTD), merkezi bir DNA-bağlayıcı bölge (DBD), bir C-terminal ligand-bağlayıcı bölge (LBD) ve DBD ile LBD'yi ayıran esnek bir menteşe bölgesi bulunan bir proteindir. NTD bölgesinde, koregülatörler ve transkripsiyon makinesinin bir araya gelmesini sağlayan güçlü bir transkripsiyonal aktivasyon fonksiyon bölgesi (AF1) vardır. Nüklear reseptör süperailesinin 48 üyesi arasında en korunmuş DBD bölgesine sahip olan GR proteinidir. DBD'ye bulunan iki çinko parmak motifi, glukokortikosteroid yanıt elementi (GRE) olarak adlandırılan hedef genlerin spesifik DNA dizilerini tanıyıp bağlanmayı sağlar. Ligand bağlanmasıyla birlikte, LBD üzerinde yer alan ikinci aktivasyon fonksiyon bölgesi (AF2) koregülatörlerle etkileşime girer. DBD/menteşe bölgesi ve LBD, importin-bağımlı bir mekanizma aracılığıyla nükleusa transloklasyonu sağlayan bir nüklear lokalizasyon sinyaline sahiptir (Ortsäter ve ark. 2012, Kadmiel ve Cidlowski 2013) (Şekil 2-15).



Şekil 2-15: GRα proteininin yapısı.

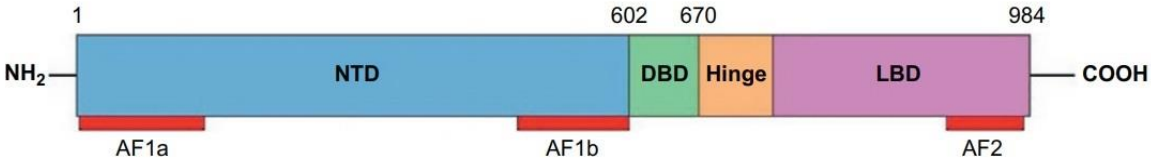
Ortsäter ve ark. 2012'den uyarlanmıştır.

GR'nin genomik ve genomik olmayan etkileri vardır. Ligand bağlandıktan sonra hsp kompleksinden ayrılarak nukleusa transloke olan GR, hedef genler üzerindeki etkisini transaktivasyon veya transrepresyon şeklinde gösterir. İnterlökin-1β (IL-1 β) ve tümör nekröz faktör α (TNFα) gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını baskılayarak, interlökin-10 (IL-10) gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin ve NFκB inhibitörü olan IκB ekspresyonunu arttırarak veya inflamatuvar genlerin ekspresyonunu düzenleyen AP1, NFκB, CREB, interferon düzenleyici transkripsiyon faktörü 3 (IRF3), sinyal arttırıcı ve transkripsiyon aktivatörü 5 (STAT5) gibi transkripsiyon faktörlerine doğrudan bağlanıp inhibe ederek inflamatuvar yanıtı düzenler (Brattsand ve Linden 1996, Hubner ve ark. 2015).

GR'nin, dakikalar-saatler içerisinde gerçekleşen transkripsiyonel etkilerininin haricinde saniyeler-dakikalar içerisinde meydana gelen ve genomik mekanizmalar aracılığıyla olmayan hızlı hücresel etkileri de bulunmaktadır. Bu etkilerini, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), AKT/protein kinaz B ve mitojenle-aktive olan protein kinazlar (MAPK) gibi çeşitli kinazların yer aldığı sinyal mekanizmaları aracılığıyla göstermektedir. Örneğin, sitoplazmada şaperon kompleksiyle birlikte GR'ye bağlı olarak bulunan aksesuar proteinlerden olan hücresel tirozin-protein kinaz c-Src, ligandın GR'ye bağlanmasıyla birlikte kompleksten ayrılarak anneksin 1'in fosforilasyonu, sitozolik fosfolipaz A2 aktivitesinin inhibisyonu ve araşidonik asit salınımı gibi olayları başlatan çok sayıda kinaz kaskatını aktive eder (Oakley ve Cidlowski 2013).

2.2.2.2. Mineralokortikosteroid Reseptörü (MR)

984 amino asit uzunluğunda olan MR; 4. kromozom üzerinde yer alan ve 10 ekzondan oluşan *Nüklear Reseptör Alt Ailesi 3 Grup C Üye 2 (NR3C2)* geni tarafından kodlanır. Diğer nüklear reseptör süperailesinin üyeleri gibi MR proteini; bir NTD, merkezi bir DBD, C-terminalde yer alan bir LBD ve DBD ile LBD'yi ayıran esnek bir menteşe bölgesi olmak üzere 4 bölgeye sahiptir (Şekil 2-16). MR'nin DBD bölgesi, GR proteini ile yaklaşık %94 identiktir (Fuller ve ark. 2019).



Şekil 2-16: MR proteininin yapısı.

Fuller ve ark. 2019'dan uyarlanmıştır. **AF1a ve AF1b**: Aktivasyon fonksiyon bölgesi 1; **AF2:** Aktivasyon fonksiyon bölgesi 2.

MR'nin aldosteron ve kortizol/kortikosteron olmak üzere iki fizyolojik ligandı vardır. Ancak kortizol/kortikosteron, aldosterona kıyasla yaklaşık 3 kat daha fazla afinite ile MR'ye bağlanmaktadır. MR, ligand bağlanana kadar sitoplazmik şaperonlarla kompleks oluşturarak inaktif halde tutulur. Ligandın bağlanmasıyla nüklear translokasyonuna, dimerizasyonuna ve DNA'ya bağlanmasına izin veren konformasyonel bir değişim geçirirerek gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon gösterir. (Viengchareun ve ark. 2007, Fuller ve ark. 2019).

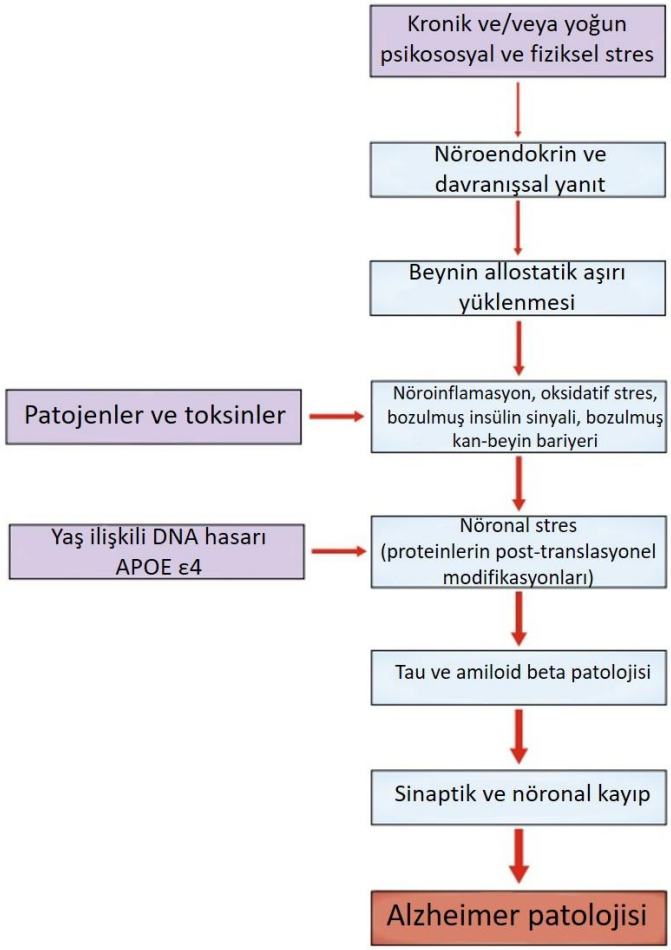
MR'ye ligand bağlanması sonucu tuz dengesi ve su homestazı düzenlenir. Ligandın bağlanmasıyla amiloride duyarlı epiteliyal Na^+ kanalı (ENaC) alt üniteleri, Na^+/K^+-ATPaz pompası alt üniteleri ve sodyum homeostazında rol alan bir serin/treonin kinaz olan serum-glukokortikosteroid tarafından düzenlenen kinaz 1 (SGK1) ekspresyonları uyarılır (Viengchareun ve ark. 2007). Ayrıca anti-inflamatuvar yanıtı düzenleyen GR'nin aksine, MR pro-inflamatuvar yanıtta rol alan genlerin ekspresyonlarını uyarır (Fuller ve ark. 2019).

2.3. Stres ve Alzheimer Hastalığı

Stres, çok sayıda genetik ve çevresel etkenin bir araya gelmesi sonucu ortaya çıkan sporadik AH için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Majör depresif bozukluğu olan hastalarda demans benzeri bilişsel fonksiyon bozukluklarının görülmesi ve

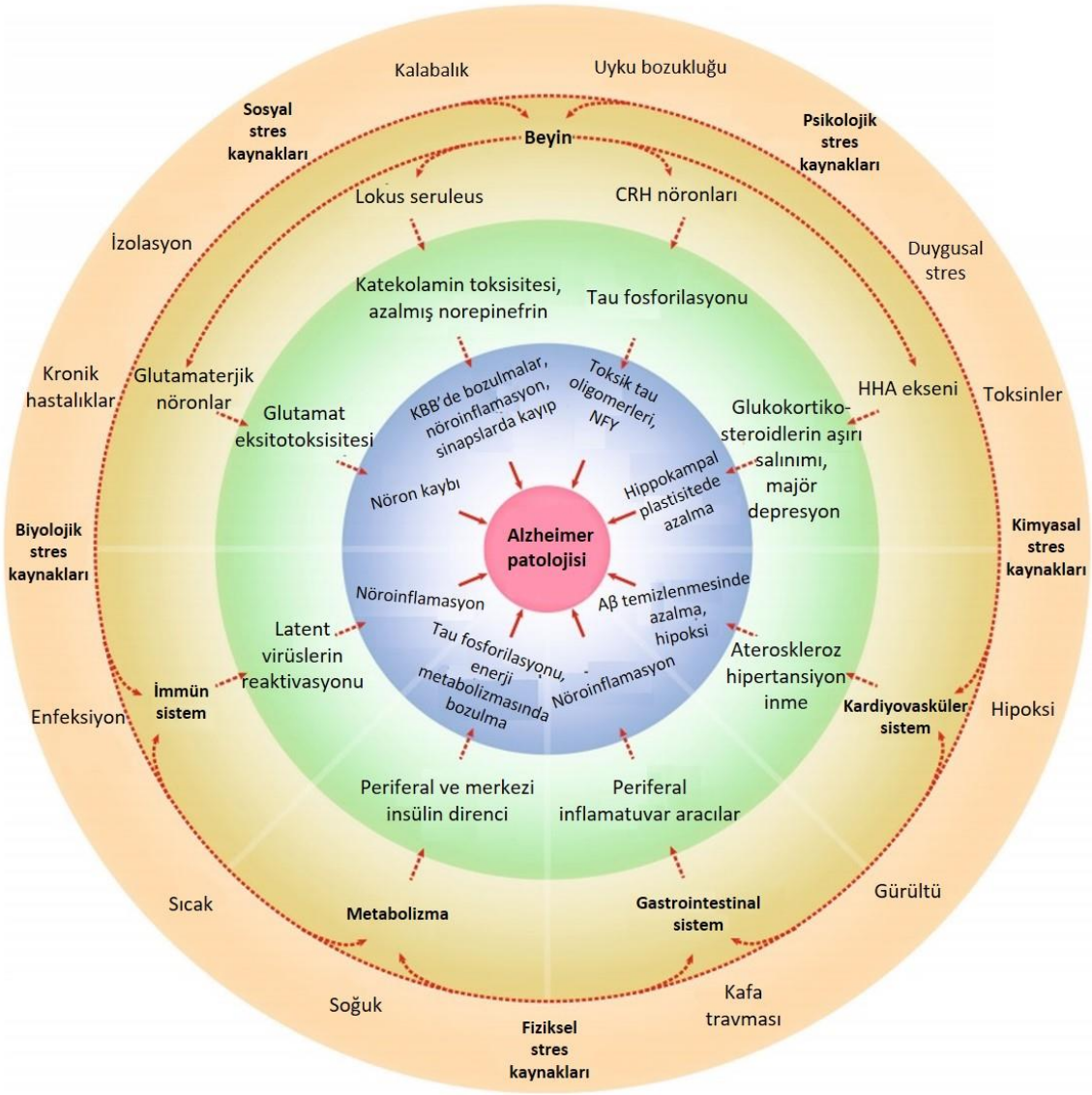
demans hastalarında anksiyete, apati, asabiyet ve depresyon gibi semptomların görülmesi, kronik stres ve AH arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Bu durum; kronik stres ve sonrasında görülen depresyonun demans benzeri nöropatolojik değişimlere yol açtığına dair bir hipotezin ileriye sürülmesine neden olmuştur (Aznar ve Knudsen 2011).

Bu hipotezde; stres yanıtının şiddetinin ve süresinin fazla olmasının, beyin de dahil olmak üzere herhangi bir organda allostatik olarak aşırı yüklenmeyle ve fonksiyonlarında görülen bozulmalarla sonuçlanabileceği ileri sürülmektedir. Bu hipoteze göre; kronik stres, beyinde direkt veya indirekt olarak nöropatolojik değişimleri başlatabilir veya yoğunluğunu arttırabilir. Tekrarlayan stres ilişkili allostatik aşırı yüklenme, beyin fonksiyonlarını üç şekilde etkileyerek AH ilişkili nöropatolojinin gelişimine dahil olabilir: (1) Hücresel seviyede; tau proteini gibi proteinlerin proteostazını ve organellerin homeostazını bozarak ve nöronal DNA'da epigenetik değişiklikleri indükleyerek, (2) Doku seviyesinde; sinaptik bağlantılar gibi hücreler arası iletişimi, nöron gibi hücrelerin sayısını, amiloid plakların birikimi gibi ekstraselüler matriks yapısını etkileyerek, (3) Sistemik seviyede; bilişsel fonksiyonlarda gerileme gibi davranışın düzenlenmesini bozarak (Mravec ve ark. 2018) (Şekil 2-17 ve Şekil 2-18).



Şekil 2-17: Çevresel faktörler tarafından tetiklenen patolojik olaylar kaskadı ile AH gelişimi.

Mravec ve ark. 2018'den uyarlanmıştır.



Şekil 2-18: Çeşitli stres kaynakları tarafından etkilenen sistemler ve AH patolojisinin gelişimi.

Mravec ve ark. 2018'den uyarlanmıştır. CRH: Kortikotropin-salgılatıcı hormon; HHA: Hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen; KBB: Kan-beyin bariyeri; NFY: Nörofibril yumakları.

Alzheimer hastalarının beyin-omurilik sıvıları (BOS), plazma ve serumlarında stres hormonu olan kortizolün seviyesinin yüksek olması ve majör depresyon bozukluğu olan hastalar ile kronik kortikosteroid tedavisi gören hastalarda hippokampus hacminde azalma ve dekleratif hafıza bozukluklarının tespit edilmesi bu hipotezi destekler niteliktedir (Tsigos ve Chrousos 2002, Aznar ve Knudsen 2011, Huang 2014).

2.4. Enerji Metabolizması

Vücuttaki organlar arasında en çok enerjiye ihtiyaç duyan organ beyindir. Total vücut ağırlığının yalnızca %2'si olmasına rağmen, beyin vücutta üretilen enerjinin yaklaşık %20'sini kullanmaktadır. Beyindeki hücreler arasında ise bu enerjinin yaklaşık %70-80'i nöronlar tarafından kullanılmaktadır (Camandola ve Mattson 2017).

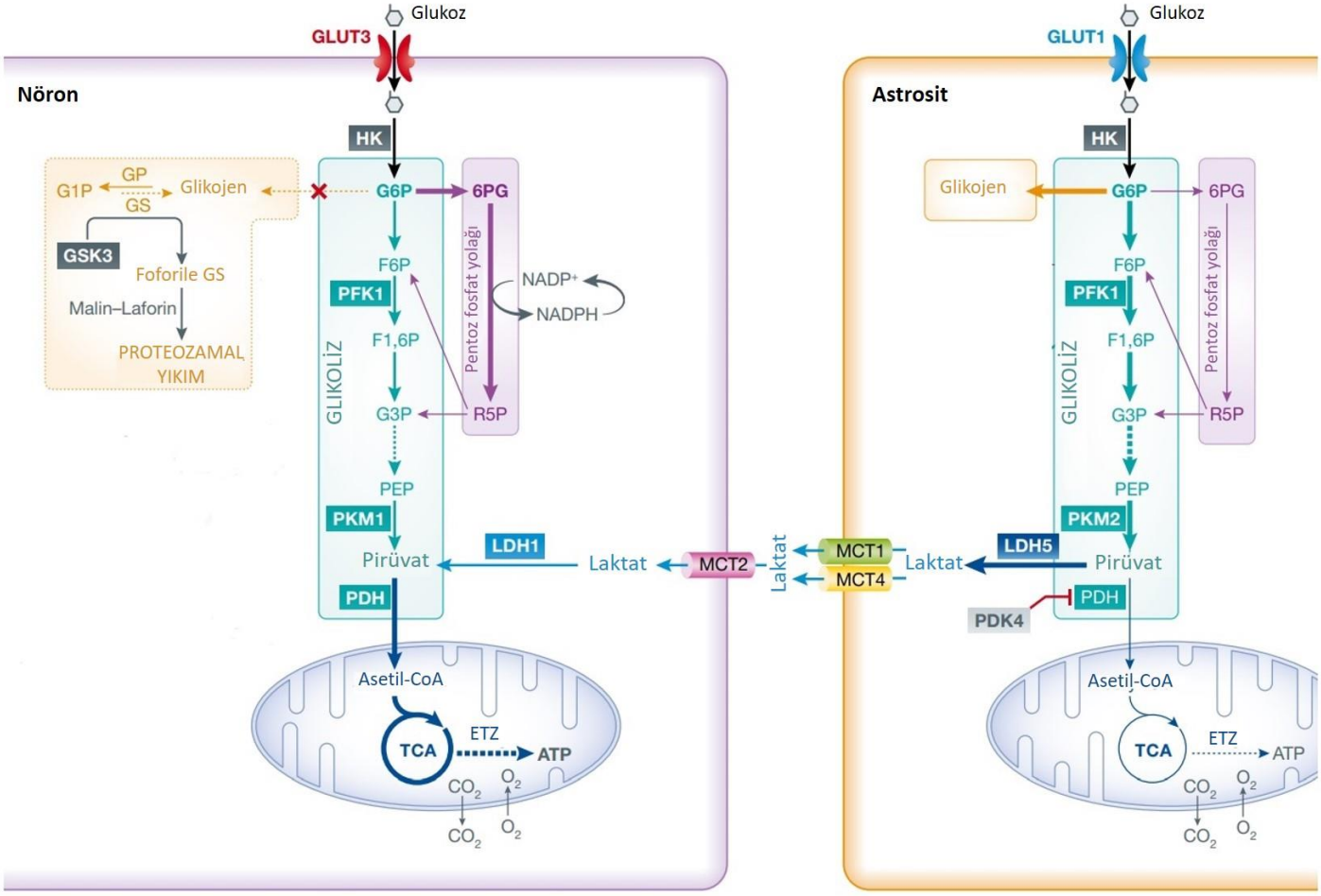
Sinir sisteminde yer alan hücreler ana enerji kaynağı olarak glukozu kullanmaktadır. Tıpkı diğer hücreler gibi sinir hücreleri de, çok sayıda hücre içi olayı gerçekleştirmek ve yaşamlarını devam ettirmek için gerekli olan enerjiyi glikoliz ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ile sağlar (Yin ve ark. 2016).

Hücrelerde her bir glukoz molekülü; glikoliz, pentoz fosfat yolağı, trikarboksilik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon aracılığıyla okside edilerek karbondioksit, su ve ATP'ye dönüştürülür. Glukoz taşıyıcı proteinler ile hücre içerisine alınan glukoz, hekzokinaz tarafından fosforillenerek glukoz-6-fosfata (G6P) dönüştürülür. G6P daha sonra, glikolitik yolağa veya pentoz fosfat yolağına girer. Glikolitik süreçte, glukoz pirüvata metabolize edilir. Pirüvat ayrıca, laktat dehidrogenaz 1 (LDH1) aracılığıyla laktattan da üretilebilir. Pirüvat daha sonra mitokondriye geçerek asetil koenzim A'ya (Asetil-CoA) dönüştürülür. Asetil-CoA, trikarboksilik asit döngüsü ve elektron transport zinciri aracılığıyla metabolize edilerek ATP üretilir. Pentoz fosfat yolağında ise G6P, 6-fosfoglukonata (6PG) ve daha sonra ribuloz-5-fosfata (R5P) çevrilerek yağ asitlerinin sentezinde bir kofaktör olan ve redoks hemostazını sağlayan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) üretilir (Magistretti ve Allaman 2015, Camandola ve Mattson 2017) (Şekil 2-19).

Nöronlar ana enerji kaynağı olarak glukozu kullansa da bazı durumlarda glukoz dışında başka substratları tercih edebilir. Örneğin; beyin gelişimi sırasında ve uzun süren açlık süreçlerinde enerji kaynağı olarak keton gövdelerini kullanırken, yoğun fiziksel aktivite sırasında laktat kullanımı artar. Nöronların laktat ihtiyacı astrositler tarafından sağlanmaktadır. Astrositler, hücre içerisine aldıkları glukozu glikolitik yolakla pirüvata çevirdikten sonra laktat dehidrogenaz 5 (LDH5) aracılığıyla laktata çevirir. Bu esnada pirüvat dehidrogenaz kinaz 4 enzimi pirüvat dehidrogenazı inhibe ederek pirüvatın asetil-CoA'ya çevrilmesini engeller. Üretilen laktat monokarboksilik asit taşıyıcı proteinler aracılığıyla astrositten nörona transfer edilir (Camandola ve Mattson 2017) (Şekil 2-19).

Astrositler glukozu glikojen olarak depolayabilirken; nöronlar glikojen sentaz enziminin, glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) tarafından fosforillenmesi ve malin-laforin

kompleksi tarafından ubikuitin bağımlı proteazomal yıkımı sonucu sürekli olarak degrade olması nedeniyle glikojen depolayamazlar (Camandola ve Mattson 2017) (Şekil 2-19).



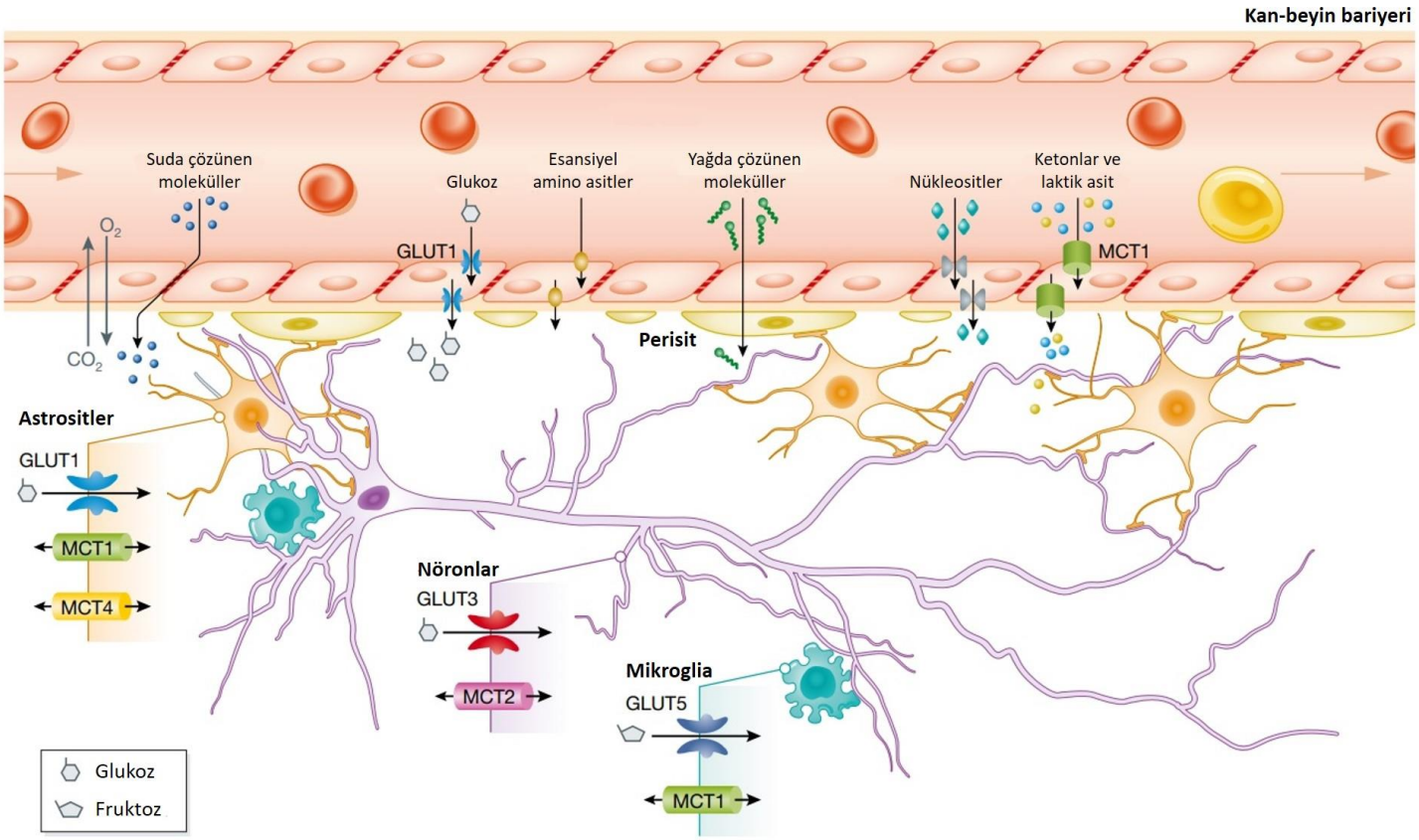
Şekil 2-19: Beyinde enerji metabolizması.

Camandola ve Mattson 2017'den uyarlanmıştır. GLUT: Glukoz taşıyıcı protein; HK: Hekzokinaz; G6P: Glukoz-6-fosfat; F6P: Fruktoz-6-fosfat; PFK1: Fosfofruktokinaz 1; F1,6P: Fruktoz-1,6-difosfat; G3P: Gliserdehit-3-fosfat; PEP: Fosfoenolpürivat; PKM1: Pirüvat kinaz M1; PDH: Pirüvat dehidrogenaz; TCA: Trikarboksilik asit döngüsü; ETZ: Elektron transport zinciri; 6PG: 6-fosfoglukonat; R5P: ribuloz-5-fosfat; GS: Glikojen sentaz; GP: Glikojen fosforilaz; G1P: Glukoz-1-fosfat; GSK3: Glikojen sentaz kinaz 3; LDH: Laktat dehidrogenaz; PDK4: Pirüvat dehidrogenaz kinaz 4; MCT: Monokarboksilik asit taşıyıcı protein.

2.4.1. Glukoz Taşıyıcı Proteinler

Glukozun KBB'den ve hücre membranından geçişi, çözünen madde taşıyıcı ailesi 2 (*SLC2*) genleri tarafından kodlanan ve glukoz taşıyıcı proteinler (GLUT) olarak adlandırılan bir protein ailesi tarafından sağlanır. Bugüne kadar insanlarda 14 tane GLUT üyesi (GLUT1-14) olduğu bildirilmiştir. Tüm GLUT üyeleri, 12 geçişli transmembran proteinlerdir ve yaklaşık %60-81 oranında homolojiye sahiptir (Mueckler ve Thorens 2013, Patching 2017).

İnsan beyninde glukoz transportu büyük bir çoğunlukla, insülinden bağımsız olarak fonksiyon gösteren glukoz taşıyıcı protein 1 (GLUT1) ve glukoz taşıyıcı protein 3 (GLUT3) tarafından gerçekleştirilir (Camandola ve Mattson 2017) (Şekil 2-20).



Şekil 2-20: Beyinde enerji moleküllerinin transportu.

Camandola ve Mattson 2017'den uyarlanmıştır.GLUT: Glukoz taşıyıcı protein; MCT: Monokarboksilik asit taşıyıcı protein.

2.4.1.1. Glukoz Taşıyıcı Protein 1 (GLUT1)

GLUT1, *SLC2A1* geni tarafından kodlanan ve 492 amino asit uzunluğunda olan bir proteindir. GLUT1'in, N-bağlı glikolizasyonu bakımından 45 kDa ve 55 kDa olmak üzere farklı moleküler ağırlıklara sahip iki izoformu vardır (Mueckler ve Thorens 2013, Pragallapati ve Manyam 2019).

GLUT1 sinir sisteminde baskın olarak astrositlerde ve KBB'ni oluşturan endoteliyal hücrelerde eksprese edilir. GLUT1'in 55 kDa ağırlığında olan izoformu, KBB'de yer alan endoteliyal hücrelerde bulunur ve glukozun beyne girişini sağlar. 45 kDa ağırlığında olan izoformu ise astrositlerde, ependimal hücrelerde ve BOS üretiminden sorumlu koroid pleksus hücrelerinde bulunur (Camandola ve Mattson 2017).

2.4.1.2. Glukoz Taşıyıcı Protein 3 (GLUT3)

GLUT3, *SLC2A3* geni tarafından kodlanan ve 496 amino asit uzunluğunda olan bir proteindir. GLUT1 ile %64 oranında homoloji göstermektedir. Nöronlar, spesifik olarak GLUT3 eksprese ederler. GLUT3, GLUT1'e göre glukoza daha yüksek afiniteyle bağlanabilmektedir. Normal fizyolojik koşullarda akson ve dendritlerde yüksek oranda GLUT3 lokalizasyonu görülmektedir (Shah ve ark. 2012, Mueckler ve Thorens 2013).

2.5. Enerji Metabolizması ve Glukokortikosteroidler

Glukokortikosteroidler ismini, plazma glukoz seviyesi üzerindeki etkisi sebebiyle almıştır. Glukokortikosteroidler; karaciğerde glukoneogenezi uyarır, glikojen depolanmasını arttırır, iskelet kası glukoz alınımını ve kullanımını azaltır, protein degredasyonunu arttırarak glukoneogenezde kullanılacak amino asitleri sağlar, beyaz adipoz dokuda glukoz alınımını ve kullanımını azaltır, lipolizisi arttırarak glukoneogenezde kullanılacak gliserolü sağlar, pankreasta β hücrelerinin insülin salgısını inhibe eder, α hücrelerinin glukagon salgısını arttırır, enerji kaynağı olarak glukoz yerine yağ asitlerinin kullanılmasını sağlar ve kan glukoz seviyesinde artışa neden olur (Magomedova ve Cummins 2016).

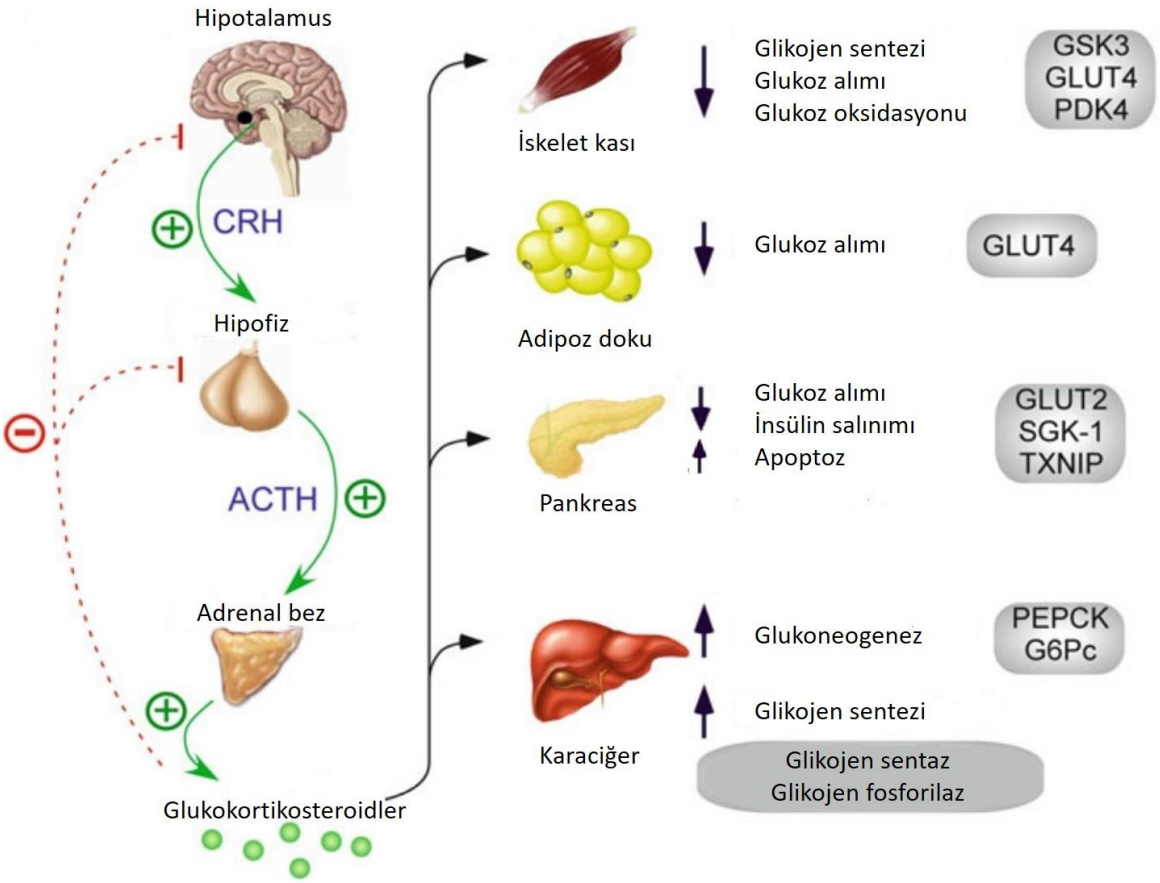
Ligand bağlı GR, karaciğerde glukoneogenezde yer alan iki anahtar enzim olan fosfoenolpirüvat karboksikinaz (PEPCK) ve glukoz-6-fosfatazın (G6Pc) transkripsiyonunu aktive ederek glukoneogenezi ve glukozun kana salınımını uyarır. Ancak glukokortikosteroidler, glukononeogenezi uyarırken ilginç bir şekilde diğer taraftan da glikojen fosforilaz enzimini inhibe, glikojen sentaz enzimini ise aktive ederek glikojen sentezini arttırır (Chakravarty ve ark. 2005, Magomedova ve Cummins 2016).

Glukokortikosteroidler iskelet kasında insülinin etkilerini antagonize ederek çalışır. Glukoz taşıyıcı protein 4'ün (GLUT4) plazma membranına translokasyonunu inhibe ederek hücre içine glukoz alımını azaltır, GSK3'ün fosforilasyonunu azaltarak glikojen sentazı baskılar ve böylelikle glikojen sentezini azaltır. Ayrıca, pirüvat dehidrogenaz kompleksinin aktivitesini inhibe eden pirüvat dehidrogenaz 4'ün (PDK4) ekspresyonunu arttırarak glukoz oksidasyonunu baskılar ve iskelet kasında glukoz kullanımını azaltır (Haber ve Weinstein 1992, Sugden ve Holness 2003, Ruzzin ve ark. 2005).

Uzun süreli açlık durumunda, adipoz trigliserit lipaz (ATGL) aracılığıyla adipoz dokunun lipolizini uyararak yağ asitleri ve gliserolün üretimini arttırır. Böylelikle hücrelerin enerji kaynağı olarak glukoz yerine yağ asitlerinin kullanımını teşvik eder. Ayrıca iskelet

kasında olduğu gibi, adipoz dokuda da GLUT4'ün plazma membranına translokasyonunu engelleyerek hücre içine glukoz alımını baskılar (Xu ve ark. 2009, Magomedova ve Cummins 2016).

Glukokortikosteroidler, insülin salınımından sorumlu pankreatik β hücrelerinin SGK1 ekspresyonunu arttırarak insülin salınımını azaltır Ayrıca glukoz taşıyıcı protein 2'nin (GLUT2) protein seviyesini azaltarak hücre içine glukoz transporunu baskılar (Magomedova ve Cummins 2016) (Şekil 2-21).



Şekil 2-21:Glukokortikosteroidlerin enerji metabolizması üzerindeki etkisi.

Magomedova ve Cummins 2016'dan uyarlanmıştır. CRH: Kortikotropin-salgılatıcı hormon; ACTH: Adrenokortikotropik hormon; GSK3: Glikojen sentaz kinaz 3; GLUT: Glukoz taşıyıcı protein; PDK4: Pirüvat dehidrogenaz kinaz 4; SGK-1: Serin/treonin kinaz 1; TXNIP: Tioredoksin etkileşim proteini; PEPCK: Fosfoenolpirüvat karboksikinaz; G6Pc: Glukoz-6-fosfataz.

2.6. Beyin Organotipik Kesit Kültürü

In vitro hücre kültürleri, hücresel ve moleküler biyolojide en çok kullanılan model sistemlerdir. Ancak bu tarz hücresel sistemler, izole hücrelerin diğer hücre tipleriyle ve ekstraselüler matriks bileşenleriyle bağlantılarının olmaması sebebiyle *in vivo* çevrenin doğasını tam olarak yansıtamamaktadır (Segeritz ve Vallier 2017). *In vitro* hücre kültürleri, hücrelerin herhangi bir koşula karşı bireysel olarak verdiği cevabı anlamamızı sağlamakla birlikte bu kültürlerden elde edilen bulgular, hücrelerin kendi doğal mikroçevrelerinde farklı davranabilmeleri nedeniyle *in vivo* modellerle teyit edilmelidir (Alaylıoğlu ve ark. 2020). *İn vivo* hayvan modelleri araştırmalarda kullanılabilinecek en iyi sistem olmasına rağmen, fiziksel ve kimyasal komplikasyonların kontrolünün zayıf olması nedeniyle önemli kısıtlamaları bulunmaktadır. *In vitro* hücre kültürlerinin ve *in vivo* hayvan modellerinin bu eksikliğini gidermek üzere organotipik kültürler geliştirilmiştir (Humpel 2015). Organotipik kültürler, dokunun üç-boyutlu hücre mimarisini ve mikroçevresini koruduğu için tek bir sistemde çok sayıda hücre tipini çalışmayı sağlayan ve *in vivo* koşullara en yakın cevabı veren sistemlerdir. Bu nedenle organotipik kültürler, *in vitro* ve *in vivo* arasındaki boşluğu dolduran bir köprü olarak kabul edilmektedir (Alaylıoğlu ve ark. 2020).

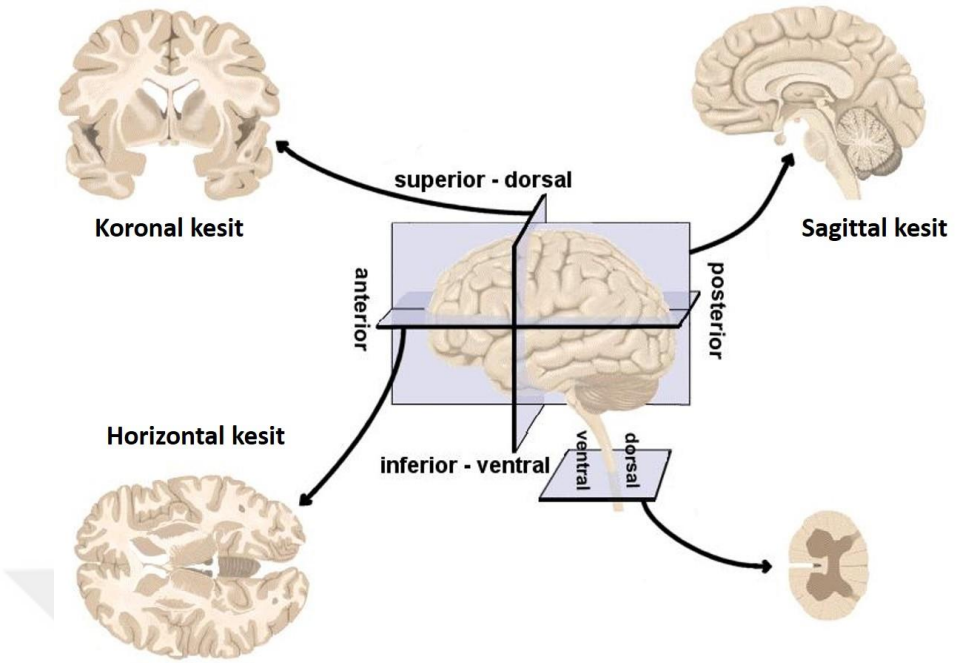
Organotipik kesit kültürlerinin temelleri eksplant doku kültürü çalışmalarına dayanmaktadır. "Organotipik" terimi, daha organize bir şeklinde büyüyen ve farklılaşan kültüre dokuları tanımlamak üzere Maximov tarafından ilk kez 1925 yılında kullanılmıştır. Daha sonra 1951 yılında Fell organotipik terimini "karakteristik mimarisini büyük oranda koruyan, fonksiyonel olarak hayatta kalmaya devam eden ve farklılaşmamış bir materyalden elde edilse bile şaşırtıcı bir şekilde gelişebilen doku" olarak tanımlamıştır (Crain 1966). Organotipik kültür olarak tarif edilen ilk deneyler civciv embriyosunun göz (Reinbold 1954), tiroid bezi (Gaillard 1954), akciğer (Loffredo Sampaolo ve Sampaolo 1956) ve bağırsak (Monesi 1960) gibi çeşitli organlarının gelişimi farklılaşması üzerine yapılan çalışmalarda görüşmüştür.

MSS'de yer alan bir dokuya ait ilk kültür çalışması, 1907 yılında Harrison tarafından kurbağa embriyo omurgasının kültüre edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Harrison 1907). Daha sonra 1913 yılında Ingebrigtsen; civciv embriyosu, tavşan, kedi ve köpeğe ait beyin dokularını kısa süreli de olsa kültüre etmiştir (Ingebrigtsen 1913). Yıllar boyu, pek çok bilim insanı beyin dokusunu canlı ve bir bütün halinde uzun süre *in vitro* koşullarda yaşatmanın

yollarını aramış ve çeşitli teknikler geliştirmiştir. Günümüzde bu teknikler arasında en çok kullanılanları, döner-tüp ve membran arayüz teknikleridir (Alaylıoğlu ve ark. 2020).

Beyin organotipik kesit kültürleri hippokampus (De Simoni ve Yu 2006), serebellum (Doussau ve ark. 2017), korteks (Plenz ve Kitai 1996), talamus (Sieg ve ark. 1998), hipotalamus (Ito ve ark. 2012), striatum (Ostergaard ve ark. 1995) ve substantia nigra (Holmes ve ark. 1995) gibi neredeyse tüm beyin bölgelerinden başarılı bir şekilde hazırlanabilir ancak hippokampus ve serebellum en yaygın kültüre edilen beyin bölgeleridir.

Literatürde yer alan çalışmaların büyük bir çoğunluğu spesifik bir beyin bölgesiyle ya da bir yolakta yer alan birden fazla beyin bölgesinin ko-kültüre edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan beyin organotipik kesit kültürlerinde; tam koronal, sagittal ya da horizontal beyin kesitleri de kullanılabilmektedir (Şekil 2-22). Bu tarz bir kültür ile daha *in vivo*-benzeri bir çevre elde edilebilmektedir (Alaylıoğlu ve ark. 2020). Tam beyin kesitleriyle yapılan kültürlerin, nöronların daha az aksotomize olması nedeniyle daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Foidl ve ark. 2018). Ancak tam beyin kesitlerini hasar vermeden elde etmek ve kesitleri kültürde uzun süreli canlı tutmak daha zor olmakla birlikte nöronal sağkalımı desteklemek amacıyla kültür medyumuna ekzogenik büyüme faktörlerinin eklenmesi gibi bazı modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Tam beyin kesitini uzun süre in vitro ortamda canlı tutabilmek için kültür koşulları, her bir beyin bölgesinin farklı tipte nörona sahip olması ve bu özel nöron tiplerinin sağkalım için farklı bileşenlere ihtiyaç duyması sebebiyle kültüre edilen beyin kesitinde yer alan beyin bölgeleri göz önünde bulundurularak belirlenmelidir (Alaylıoğlu ve ark. 2020).

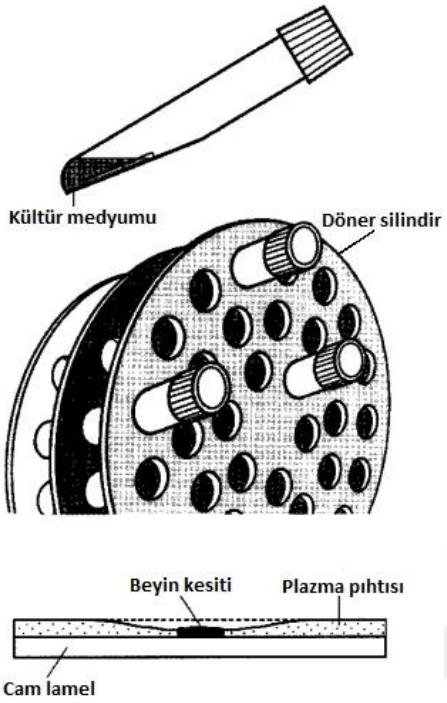


Şekil 2-22: Kesit alma düzlemleri.

http://neurones.co.uk/Neurosciences/Chapters/Chapter%201/A.1%20Anatomical%20Terms.html sayfasından uyarlanmıştır.

2.6.1. Döner-tüp Tekniği

Beyin dokusu kullanılarak gerçekleştirilen döner-tüp tekniği ilk kez Hogue tarafından geliştirilmiştir (Hogue 1947) ve daha sonra yıllar boyunca pek çok bilim insanı taraından modifiye edilmiştir. Bu teknikte görülen en büyük gelişme; Gähwiler'ın fizyolojik ve farmakolojik çalışmalar için daha uygun yapıda olan daha ince (300-400 µm kalınlığında) beyin kesitleri kullanmasıyla yaşanmıştır (Gahwiler 1981). Bu teknikte her bir kesit, bir plazma pıhtısı veya bir kollajen matriks yardımıyla cam bir lamele tutundurulmaktadır. Her bir lamel, kültür medyumu içeren bir tüpe konur ve daha sonra tüpler 37ºC'lik bir etüvde bulunan döner silindire yerleştirilir. Döner silindir, kesitlerin sağkalımını sağlayacak şekilde düzenli olarak oksijen almasını sağlayan yavaş bir rotasyon sağlar (Şekil 2-23). Döner-tüp tekniğiyle kültüre edilen kesitler, *in vitro* koşullarda bir kaç hafta içerisinde yaklaşık 50 µm'lik bir kalınlığa incelir (Gahwiler ve ark. 1997). Ancak bu tekniğin; kültür sırasında kesitlerin düşmesi veya dokunun bir pıhtı içerisinde gömülmesi nedeniyle sinaptik organizasyonun yeniden düzenlenmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Alaylıoğlu ve ark. 2020).

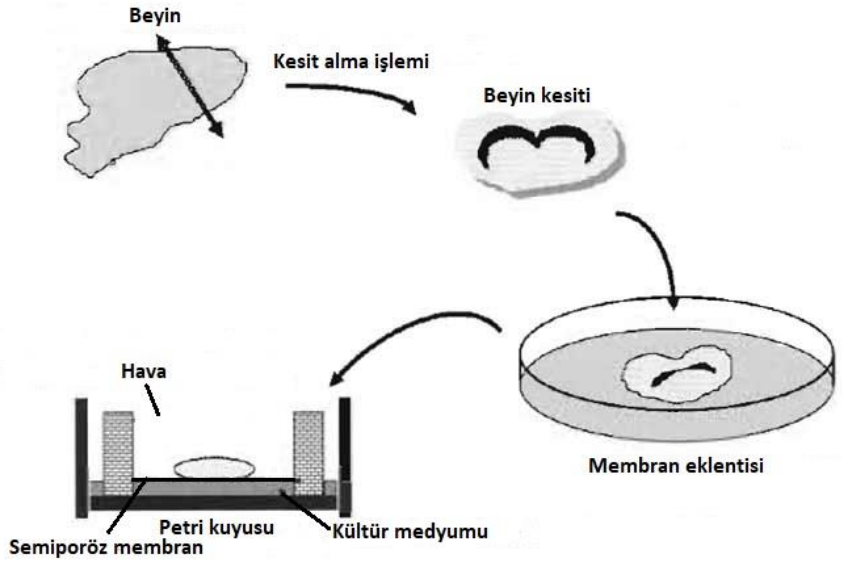


Şekil 2-23: Döner-tüp tekniği

Gähwiler ve ark. 1997'den uyarlanmıştır.

2.6.2. Membran Arayüz Tekniği

Döner-tüp tekniğinde görülen dezavantajlar nedeniyle, 1991 yılında Stoppini ve ark. organotipik kesit kültürleri için dokuların, hava ve kültür medyumu arasında bir arayüz oluşturan semiporöz bir membran üzerine yerleştirildiği daha farklı ve daha kolay bir metod geliştirdi (Stoppini ve ark. 1991). Bu teknikte, çok az bir miktarda kültür medyumu bulunan petirlere membran eklentisi yerleştirilir ve dokular membran üzerine konur. Böylelikle doku yeterli oksijeni alabilmek üzere doğrudan hava ile temas halindedir (Şekil 2-24). Semiporöz membran, kesitin sağkalımı için gerekli olan ve kültür medyumunda bulunan bileşenlerin difüzyonuna olanak sağlayan bir yapıdadır. Döner-tüp tekniğine kıyasla, *in vitro* koşullarda bir kaç hafta içerisinde yaklaşık 100-150 μm'lik bir kalınlığa incelir. Bu kalınlık, elektrofizyolojik ve analitik tekniklerde kullanılmaya daha uygundur. Ayrıca bu teknik, dokuların herhangi bir materyal ile kaplı olmaması nedeniyle kimyasal veya ilaç uygulaması, gen susturması veya gen aşırı ekspresyonu gibi uygulamalar için kullanıma daha müsaittir (Alaylıoğlu ve ark. 2020).



Şekil 2-24: Membran arayüz tekniği

https://biocyclopedia.com/index/cell_biology_methods/analysis_of_tumor_cell_invasion.php sayfasından uyarlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, 7 günlük Spraque-Dawley sıçan beyinleri kullanılanılarak hazırlanan beyin organotipik kesit kültürlerinde gerçekleştirildi. Hazırlanan beyin organotipik kesit kültürlerinde, Alzheimer hastalığında (AH) en çok etkilenen ve hafıza ile ilişkili beyin bölgeleri olan hippokampus ve serebral korteksi içeren koronal kesitler kullanıldı. Bu kesitlere sirkadiyen ritim ve stres modeli oluşturmak üzere kortikosteron ve AH benzeri bir in vitro model oluşturmak üzere amiloid beta 1-42 peptidi ($A\beta_{1-42}$) uygulandı. Oluşturulan bu modellerde; glukokortikosteroid reseptörü (GR), mineralokortikosteroid reseptörü (MR), glukoz taşıyıcı protein 1 (GLUT1) ve glukoz taşıyıcı protein 3 (GLUT3) mRNA ekspresyon seviyeleri RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR yöntemleriyle; GR, MR, GLUT1 ve GLUT3 protein seviyeleri protein izolasyonu ve Western blot yöntemleriyle; GR ve MR'nin beyindeki bölgesel dağılımları immünfloresans işaretleme ile; hücreiçi glukoz seviyesi protein izolasyonu ve kolorimetrik glukoz testi ile belirlendi. Yapılan uygulamaların muhtemel toksik etkileri ise sitotoksisite testi ile saptandı. Bahsi geçen tüm yöntemler İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Beyin Organotipik Kesit Kültürü Deneyleri

3.1.1. Disseksiyon Medyumunun Hazırlanması

Disseksiyon medyumu, kültür gününden bir gün önce aşağıdaki şekilde hazırlandı.

1. 10X HBSS (Gibco, 14065-049), final konsantrasyonu 1X olacak şekilde 0,20 µm filtreden (Sartorius, 16534) geçirilmiş MiliQ dH_2O ile karıştırılarak hazırlandı.
2. Hazırlanan 1X HBSS'nin içerisine, final konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde D-(+)-glukoz (Sigma, G7021) eklenip çözündürüldü.
3. Daha sonra %2 oranında PenStrep (Sigma, P-4333) eklendi.
4. Hazırlanan disseksiyon medyumu kullanılana kadar $+4^oC$'de saklandı.

3.1.2. Kültür Medyumunun Hazırlanması

Kültür medyumu, kültür gününden bir gün önce aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı. DMEM/F12 (Gibco, 31331-028) içerisine %25 1X HBSS (Gibco, 14025-092), %25 at serumu (daha önceden $56\ ^oC$'de 30 dakika bekletilerek ısı inaktivasyonu gerçekleştirilmiş)

(Gibco, 16050-122), %1 N-2 (Gibco, 17502-048), %2 B-27 (Gibco, 17504-044), %1 PenStrep (Sigma, P-4333), final konsantrasyonu 3,349 mg/ml olacak şekilde D-(+)-glukoz (Sigma, G7021), final konsatrasyonu 20 ng/ml olacak şekilde insulin (Gibco, 12585-014), final konsantrasyonu 10 ng/ml olacak şekilde sinir büyüme faktörü (NGF) (Sigma, N6009) eklenerek hazırlandı. Kültür medyumu hazırlandıktan sonra 0,22 µ'luk filtreden geçirildi ve kullanılana kadar +4 ^{o}C'de saklandı.

3.1.3. Agarozun Hazırlanması

Vibratom ile kesit alma sırasında beyni desteklemek amacıyla kullanılan agaroz, disseksiyon öncesi belirtildiği şekilde hazırlandı. Düşük erime sıcaklığına sahip Low Melting Point Agarose (Sigma, A9414) %4 (ağırlık/hacim) olacak şekilde 1X HBSS (Gibco, 14025-092) içerisinde ısıtılarak ve karıştırılarak çözündürüldü. Erimiş halde olan agaroz katılaşmaması için kullanılana kadar 37^{o}C'lik etüvde bekletildi.

3.1.4. Kültür Petrilerinin Hazırlanması

Disseksiyon öncesi 6 kuyulu petrilerin (Corning, 3506) her bir kuyusuna 1 ml kültür medyumu kondu. Kültür medyumu üzerine steril bir pens yardımıyla 0,4 µm por çapına sahip semiporöz Millicell membranlar (Millipore, PICMORG50) yerleştirildi. Hazırlanan 6 kuyulu petriler kullanılana kadar 37^{o}C %5 CO_2 içeren etüvde bırakıldı.



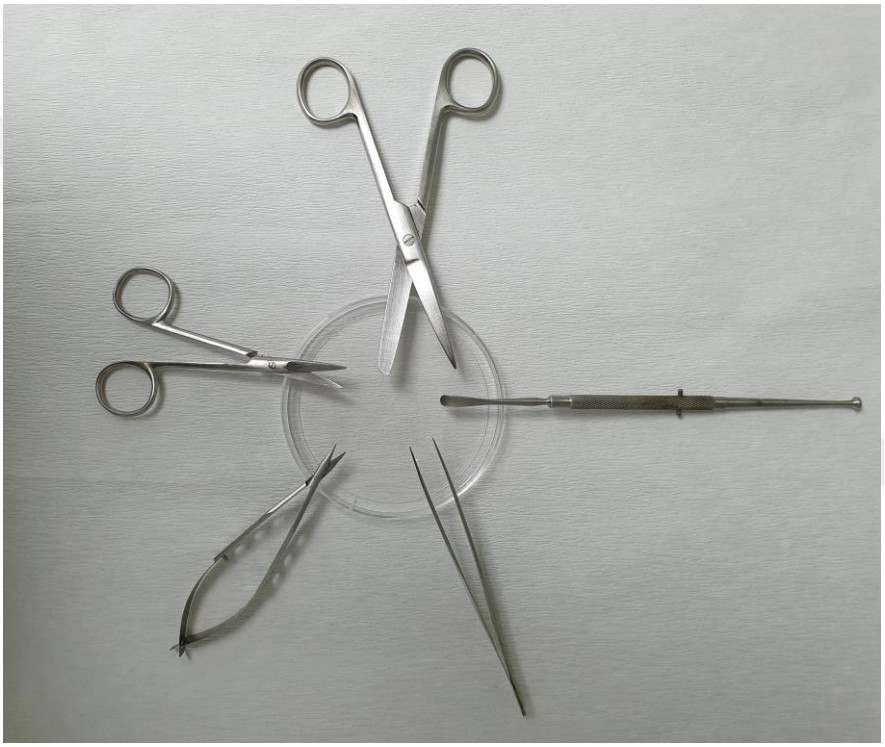
Şekil 3-1: Semiporöz özellikteki Millicell membran.

http://static.fishersci.com/cmsassets/downloads/segment/Scientific/pdf/Millipore/millicell_cellcult_sol.pdf sayfasından alınmıştır.

3.1.5. Beyin Disseksiyonu

Beyin disseksiyonu sırasında kullanılan disseksiyon aletleri Şekil 3-2'de gösterilmiştir. Doğumu takiben 7. günde alınan neonatal sıçanlar hızlı bir şekilde tek darbe

ile dekapite edilerek sakrifiye edildi. Kafa derisinin üzerine %70'lik etanol sürülerek temizlendikten sonra neonatal sıçanların beyinleri, ince uçlu makas yardımıyla serebellum tarafından başlayacak şekilde kafa derisi (Şekil 3-3) ve daha sonra ince uçlu kemik makası yardımıyla yine serebellum tarafından başlayacak şekilde kranial kemikler açılarak dikkatlice açığa çıkartıldı (Şekil 3-4). Beyinler, olfaktör bulbus tarafından bir spatula yardımıyla kaldırılarak nazikçe kafatasından ayrıldı ve daha önceden hazırlanan ve disseksiyon öncesi buz üzerine yerleştirilen soğuk disseksiyon medyumunun içerisine alındı (Şekil 3-5).



Şekil 3-2: Beyin disseksiyonunda kullanılan disseksiyon aletleri.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.



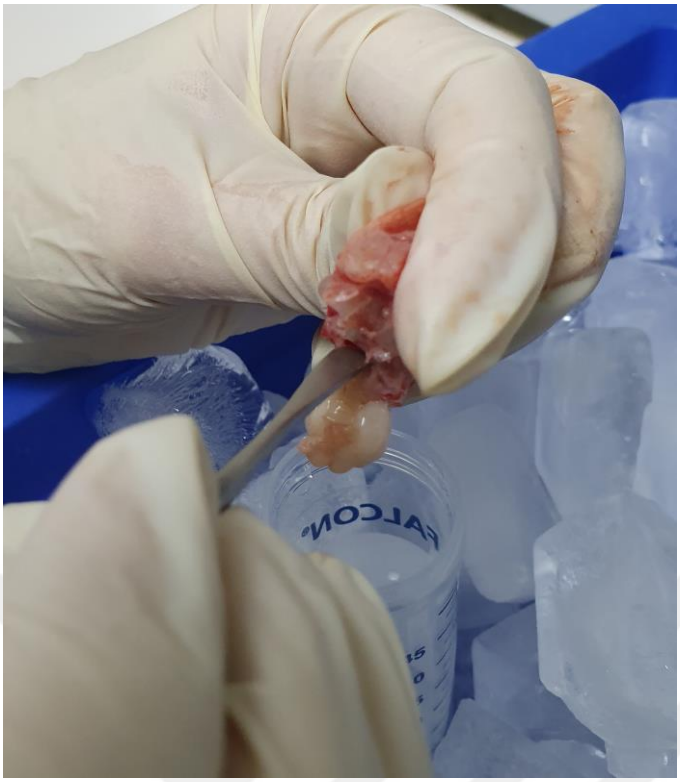
Şekil 3-3: 7 günlük neonatal sıçanın kafa derisinin açılması.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.



Şekil 3-4: 7 günlük neonatal sıçanın kraniyal kemiklerinin açılması.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.



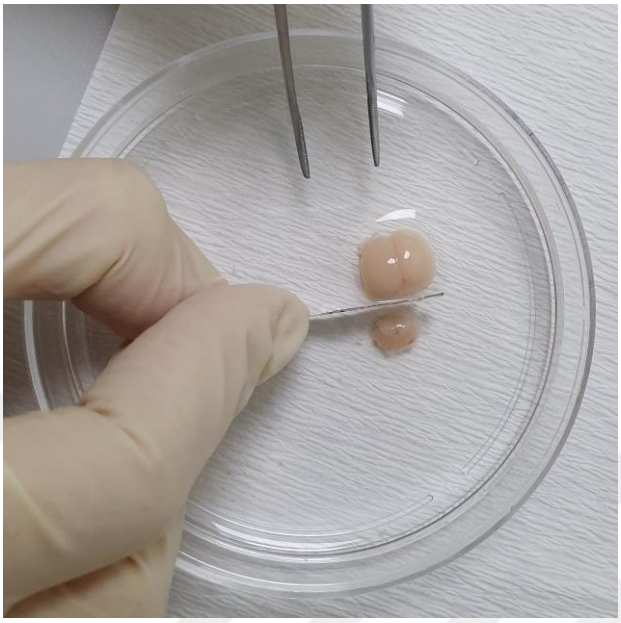
Şekil 3-5: Beynin disseksiyon medyumuna aktarılması.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.

3.1.6. Vibratom ile Kesitlerin Alınması

Kesit almaya başlamadan önce Leica VT1000S vibratom cihazının kesit alma haznesi soğuk disseksiyon medyumu ile doldurulduğu. Kesit alma haznesinin etrafı, kesit alma sırasında beyni soğuk tutmak amacıyla buz ile çevrelendi. Disseksiyon medyumu içerisindeki beyin bir petriye aktarıldıktan sonra, bir bistüri ve pens yardımıyla serebellum ve olfaktör bulbus bölgeleri koronal disseksiyonla beyinden ayrıldı (Şekil 3-6). Daha önceden hazırlanan ve 37^{o}C'lik etüvde bekletilen agaroz, gömme kalıbına döküldü ve ılıklaşması beklendi. Agaroz ılıklaştıktan sonra, beyin pens yardımıyla tutuldu, etrafındaki disseksiyon medyumu uzaklaştırıldı ve agarozun içine yerleştirildi (Şekil 3-7). Agaroz donduktan sonra beyni içeren agaroz blok gömme kabından çıkartıldı. Beyne yaklaşmayacak şekilde agarozun fazlası bistüri yardımıyla kesilerek uzaklaştırıldı. Agaroz blok, arka beyin kısmı vibrotom tablasına bakacak şekilde koronal pozisyonda yapıştırıcı ile sabitlendi (Şekil 3-8). Vibratom tablası kesit alma haznesine yerleştirildi (Şekil 3-9). Vibratomun bıçağı takıldıktan sonra 300 μm kalınlığında koronal kesitler alındı (Şekil 3-10). Beynin hippokampus bölgesine kadar alınan kesitler fırça yardımıyla kenara alınarak uzaklaştırıldı.

Hippokampus ve serebral korteksi içeren koronal kesitler fırça yardımıyla agarozdan ayrıldıktan sonra daha önceden buz üzerine yerleştirilmiş ve içerisinde soğuk disseksiyon medyumu bulunan 35 mm'lik petrilere (Corning, 430165) aktarıldı (Şekil 3-11).



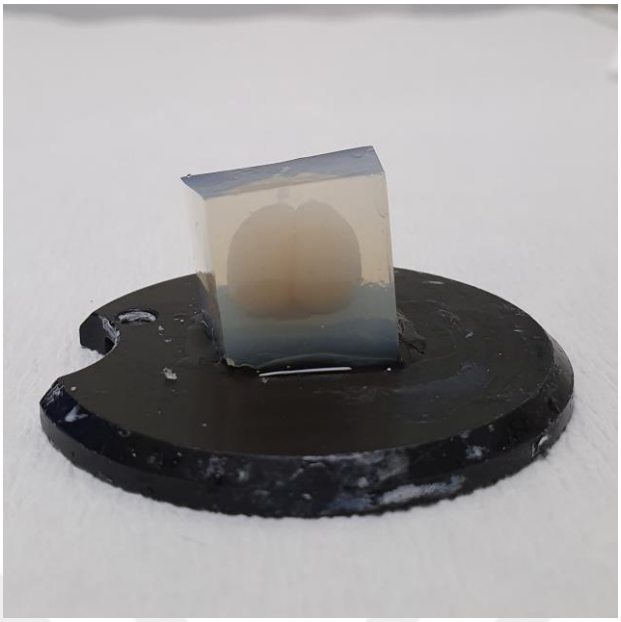
Şekil 3-6: Olfaktör bulbus ve serebellum bölgelerinin ayrılması.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.



Şekil 3-7: Beynin agaroza gömülmesi.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.



Şekil 3-8: Agaroz bloğun vibratom tablasına sabitlenmesi.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.



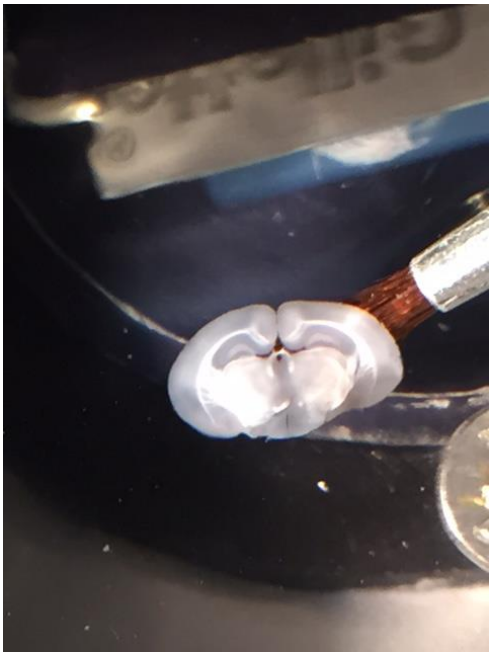
Şekil 3-9: Agaroz bloğun vibratom cihazına yerleştirilmesi.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.



Şekil 3-10: Vibratom cihazı ile koronal kesitlerin alınması.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.

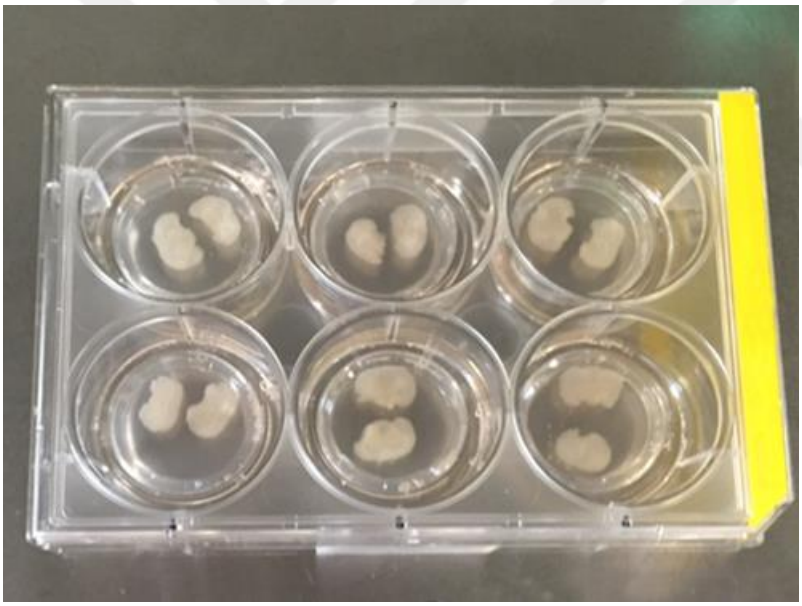


Şekil 3-11: Koronal kesitlerin fırça yardımıyla alınması.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.

3.1.7. Beyin Organotipik Kesit Kültürlerinin Hazırlanması

Kesit alma işlemi tamamlandıktan sonra kesitleri içeren petriler buz üzerinde Sınıf 100 steril oda içinde bulunan Sınıf II biyolojik güvenlik kabinine alındı ve sonraki tüm işlemler bu güvenlik kabini içinde gerçekleştirildi. Kesitler stereo mikroskop altında incelendi ve hasarlı kesitler çalışma dışında bırakıldı. Uygun olan kesitler ucu kesilmiş plastik pastör pipeti yardımıyla bir miktar disseksiyon medyumu ile birlikte dikkatlice çekildi ve daha önce hazırlanmış olan 6 kuyulu petrinin kuyularına yerleştirilmiş her bir Millicell membran üzerine 2 tane kesit olacak şekilde dikkatlice bırakıldı. Kesitlerle birlikte alınan disseksiyon medyumu pipet yardımıyla dokuyu hareket ettirmeden yavaşça çekilerek uzaklaştırıldı (Şekil 3-12). 6 kuyulu petriler 37^{o}C'de %5 CO2 içeren etüve kaldırıldı. Her 2 günde bir kuyulardaki medyum taze kültür medyumu ile değiştirildi.



Şekil 3-12: Kesitlerin Millicell membranların üzerine yerleştirilmesi.

Alaylıoğlu ve ark. (2020)'den alınmıştır.

Kültüre edilen kesitlere, kesit alma sırasında salınan endojenik enzim ve iyonlara cevaben oluşan gliozis ve mikroglial aktivasyonun en aza indirgenmesi, dokunun ortama uyum sağlaması ve fizyolojik koşullarına dönmesi için 7 gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. Bu süre içerisinde kesitlerin sağkalımı, invert ışık mikroskobu ve canlı hücre/doku görüntüleme sistemi ile takip edildi.

3.1.8. Beyin Organotipik Kesit Kültürlerine Gerçekleştirilen Uygulamalar

Kültüre edilen kesitlere sirkadiyen ritim ve stres modelleri oluşturmak üzere kortikosteron ve AH benzeri bir model oluşturmak üzere $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapıldı. Herhangi bir madde uygulaması yapılmayan kesitler kontrol grubu olarak kullanıldı. Buna ek olarak, kesitlere kortikosteronun çözündürüldüğü etanol uygulanarak, çözücü maddenin etkisinin kontrol edildiği ikinci bir kontrol grubu oluşturuldu. Tüm uygulamalar kültürün 7. gününde ve 96 saat süreyle gerçekleştirildi. Uygulamaların 96. saatinde kesitlerden RNA izolasyonu ve protein izolasyonu yapıldı. Aynı saat aralığında immünfloresan işaretlemeler için ayrılan kesitlerin fiksasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca, yine uygulamaların 96. saatinde tüm grupların kültür medyumları toplanarak sitotoksisite testinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

Tüm uygulamalar 2 farklı deney düzeneğinde tekrarlandı.

3.1.8.1. Sirkadiyen Ritim Modeli

Kesitlere, sıçanların plazmalarında sirkadiyen ritimde saptanan en düşük (bazal seviye, 2 µg/100 ml) ve en yüksek (pik seviye, 20 µg/100 ml) kortikosteron konsantrasyonlarını taklit edecek şekilde kortikosteron uygulanarak sirkadiyen ritim modeli oluşturuldu (Spencer ve Deak 2017). Etanol içerisinde çözündürülerek hazırlanan 72,5 mM kortikosteron (Sigma, 27840) 1 ml kültür medyumu içerisinde final konsantrasyonu 57,8 nM (2 µg/100 ml) veya 578 nM (20 µg/100 ml) olacak şekilde uygulandı. Uygulamalar sonrasında 96 saat boyunca medyum değişimi gerçekleştirilmedi.

3.1.8.2. Stres Modeli

Kesitlere, sıçanların akut stres sırasında plazmalarında saptanan ortalama kortikosteron konsantrasyonunda (30-60 µg/100 ml, ortalama: 45 µg/100 ml) kortikosteron uygulanarak stres modeli oluşturuldu (Spencer ve Deak 2017). Etanol içerisinde çözündürülerek hazırlanan 72,5 mM kortikosteron (Sigma, 27840) 1 ml kültür medyumu içerisinde final konsantrasyonu 1300 nM (45 µg/100 ml) olacak şekilde uygulandı. Uygulamalar sonrasında 96 saat boyunca medyum değişimi gerçekleştirilmedi.

3.1.8.3. Alzheimer Benzeri Model

Kesitlere düşük (2 µM) ve yüksek (6 µM) olmak üzere 2 farklı dozda $A\beta_{1-42}$ peptidi uygulanarak AH benzeri model oluşturuldu. PBS içerisinde çözündürülerek hazırlanan 220 µM $A\beta_{1-42}$ peptidi (Millipore, AG912) final konsantrasyonu 2 µM ve 6 µM olacak şekilde

kesitlerin üzerine uygulandı. Uygulamalar sonrasında 96 saat boyunca medyum değişimi gerçekleştirilmedi.

$A\beta_{1-42}$ uygulaması ile oluşturulan AH benzeri modelin başarılı bir şekilde gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğini ve amiloid plakların oluşup oluşmadığını kontrol etmek üzere kesitler, bir amiloid boyası olan Kongo kırmızısı ile boyandı.

Kesitlerin Kongo kırmızısı ile boyanması aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. Kesitler %3,7 paraformaldehit (Sigma, 158127) ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edildi.

2. Fikse olan kesitler 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkandı.

3. Kesitlerin üzerine dH_2O ile %0,1 oranında çözündürülen Kongo kırmızısı konulup 10 saniye bekletildi.

4. Kesitler 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine %1 sodyum hidroksit ve %50 etanolden oluşan alkalin alkol solüsyonu konulup 10 saniye bekletildi.

5. İnkübasyon sonunda kesitler 3 kez PBS ile yıkandı ve 1:15000 oranında dH2O ile sulandırılarak hazırlanan DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) solüsyonu içinde 15 saniye bekletildi.

11. Kesitler 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra kapama medyumu (ThermoFisher, P36970) ile kapatıldı ve invert floresan mikroskopta görüntülendi.

3.1.9. Beyin Organotipik Kesit Kültürü Deney Grupları

3.1.9.1. Kontrol Grubu

Kültürün 7. günü, diğer gruplarla birlikte aynı anda medyum değişimi gerçekleştirilen ve herhangi bir madde uygulaması yapılmayan kesitlerden oluşan grup.

3.1.9.2. Etanol Uygulanan Grup

Kültürün 7. günü, en yüksek doz kortikosteronun içerisinde çözündürüldüğü hacimde etanol uygulaması yapılan kontrol grubu.

3.1.9.3. Bazal Seviyede Kortikosteron Uygulanan Grup

Kültürün 7. günü, sirkadiyen ritimde sıçanların plazmalarında saptanan en düşük kortikosteron seviyesi olan 57,8 nM kortikosteron uygulaması yapılan grup.

3.1.9.4. Pik Seviyede Kortikosteron Uygulanan Grup

Kültürün 7. günü, sirkadiyen ritimde sıçanların plazmalarında saptanan en yüksek kortikosteron seviyesi olan 578 nM kortikosteron uygulaması yapılan grup.

3.1.9.5. Stres Seviyesinde Kortikosteron Uygulanan Grup

Kültürün 7. günü, sıçanların akut stes durumunda plazmalarında saptanan ortalama kortikosteron seviyesi olan 1300 nM kortikosteron uygulaması yapılan grup.

3.1.9.6. Düşük Doz $A\beta_{1-42}$ Uygulanan Grup

Kültürün 7. günü, 2 μM $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapılan grup.

3.1.9.7. Yüksek Doz $A\beta_{1-42}$ Uygulanan Grup

Kültürün 7. günü, 6 μM $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapılan grup.

3.2. Koronal Kesitlerden Total RNA izolasyonu

Koronal kesitler, stereo mikroskop altında pens yardımıyla serebral korteks ve hippokampus bölgelerine ayrıldıktan ve ayrı ayrı 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konduktan sonra total RNA izolasyonu PureLink RNA izolasyon kiti (Ambion, 12183018A) kullanılarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. Kit içerisinde yer alan Lizis Tamponu içerisine %1 oranında beta-merkaptoetanol eklendi.
2. Her bir tüpe 600 μl Lizis Tamponu kondu ve 30 saniye boyunca pipetaj yapılarak dokular homojenize edildi.
3. Tüpler oda sıcaklığında 5 dakika 2600 g'de santrifüjlendi.
4. Üst sıvılar temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak pellet uzaklaştırıldı.
5. Her bir homojenatın üzerine 600 μl %70 etanol eklendi ve tüpler 20 saniye boyunca vortekslendi.
6. Homojenat-etanol karışımı en fazla 700 μl olacak şekilde, kit ile birlikte gelen ve toplama tüpü içerisinde yer alan filtre tüpüne pipetlendi.
7. Tüpler 12000 g'de 15 saniye santrifüjlendikten sonra toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve filtre tüpü tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
8. Kalan homojenat-etanol karışımları için 6. ve 7. basamaklar tekrarlandı.

9. Filtre tüpü içerisine 700 µl Yıkama Tamponu I kondu.
10. Tüpler 12000 g'de 15 saniye santrifüjlendikten sonra toplama tüpü biriken sıvı ile birlikte atıldı ve filtre tüpü temiz bir toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
11. Filtre tüpü içerisine 500 µl Yıkama Tamponu II kondu.
12. Tüpler 12000 g'de 15 saniye santrifüjlendikten sonra toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve filtre tüpü tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
13. 11. ve 12. basamaklar bir kez daha tekrarlandı.
14. Filtrede kalan tüm sıvıyı uzaklaştırmak üzere filtre tüplerinin içerisine hiçbir şey konmadan 12000 g'de 2 dakika santrifüjlendi.
15. Toplama tüpü biriken sıvı ile birlikte atıldı ve filtre tüpü temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirildi.
16. Filtre tüpü içerisine 40 µl RNaz bulunmayan steril su kondu ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
17. Tüpler 12000 g'de 2 dakika santrifüjlendikten sonra filtre tüpü atıldı.
18. Total RNA'ları içeren mikrosantrifüj tüpleri cDNA sentezi yapılana kadar -80°C'de saklandı.

3.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezine başlanmadan önce, izole edilen total RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop One cihazı ile belirlendi. 1. normalizasyon işlemi için, belirlenen RNA konsantrasyonları doğrultusunda her bir gruba ait total RNA'lardan eşit miktarda kullanılacak şekilde cDNA sentezi gerçekleştirildi. 1. normalizasyon işlemi, her deney düzeneği için ayrı ayrı gerçekleştirildi. cDNA sentezi, iScript cDNA sentez kiti (BioRad, 1708891) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği şekilde 0,2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde hazırlandı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: RT-PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler ve miktarları.

	Hacim
5X iScript Reaksiyon Karışımı	4 µl
iScript Ters Transkriptaz	1 µl
dH_2O	Değişken
RNA	Değişken
Toplam Hacim	20 µl

2. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) işlemi aşağıda belirtilen sıcaklık döngüleri kullanılarak Techne TC-3000G cihazında gerçekleştirildi (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: RT-PCR reaksiyonunun sıcaklık döngüsü.

Sıcaklık	**Süre**
25ºC	5 dakika
46ºC	20 dakika
95ºC	1 dakika
4ºC	∞

3. Reaksiyon sonrası tüpler kullanılana kadar -20C'de saklandı.

3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

GR, MR, GLUT1 ve GLUT3 mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler, Universal Probe Library (UPL) probları ve LightCycler 480 Probe Master Mix kiti (Roche, 04707494001) kullanılarak LightCycler 480 (Roche Applied Biosystems™, California,

USA) cihazında saptandı. Hedef genlerin göreceli ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere beta aktin (ACTB), gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HPRT) genleri referans genler olarak kullanılarak 2. normalizasyon işlemi gerçekleştirildi. Tüm deneylere ait her bir cDNA örneği için qRT-PCR deneyleri 3 kez tekrarlandı.

3.4.1. qRT-PCR Deneylerinde Kullanılan Primer ve Problar

Primerler final konsantrasyonları 10 pmol olacak şekilde dH_2O ile sulandırıldı.

1. UPL sıçan, fare ACTB Gene Assay (Roche, 05046190001)
2. UPL sıçan GAPDH Gene Assay (Roche, 05046203001)
3. Sıçan HPRT, NM_012583.2, Probe #95 (Roche, 04692128001) (Tablo 3-3)
4. Sıçan GR, NM_012576.2, Probe #25 (Roche, 04686993001) (Tablo 3-4)
5. Sıçan MR, NM_013131.1, Probe #66 (Roche, 046088651001) (Tablo 3-5)
6. Sıçan GLUT1, NM_138827.1, Probe #66 (Roche, 046088651001) (Tablo 3-6)
7. Sıçan GLUT3, NM_017102.2, Probe #66 (Roche, 046088651001) (Tablo 3-7)

Tablo 3-3: HPRT primerlerinin özellikleri.

Primer	Uzunluk	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	19	54-72	60	58	gaccggttctgtcatgtcg
Geri Primer	24	91-114	59	42	acctggttcatcatcactaatcac
Ürün (61 nt)					
gaccggttctgtcatgtcgaccctcagtcccagcgtcgtgattagtgatgatgaaccaggt					

Tablo 3-4: GR primerlerinin özellikleri.

Primer	Uzunluk	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	20	1223-1242	60	50	ggccggtcagtgttttctaa
Geri Primer	18	1315-1332	59	61	aggcagagcttgggaggt

Ürün (110 nt)

ggccggtcagtgttttctaatgggtactcaagccctggaatgagaccagatgtaagctctcctccatccagctcgtcagcagccac gggaccacctcccaagctctgcct

Tablo 3-5: MR primerlerinin özellikleri.

Primer	Uzunluk	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	20	2469-2489	60	48	caagctggcatgaacttagga
Geri Primer	21	2574-2593	59	55	tatgtggtcccctcttctgg

Ürün (125 nt)

caagctggcatgaacttaggagctcgaaagtcaaagaagctggggaagttaaaaggcctccacgaggagcaaccacagcagc ccccaccaccgccaccccagagtccagaagaggggaccacata

Tablo 3-6: GLUT1 primerlerinin özellikleri.

Primer	Uzunluk	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	18	1055-1072	60	56	cagctgtcgggcatcaat
Geri Primer	18	1129-1146	60	61	gagccgatggtggcatac

Ürün (92 nt)

cagctgtcgggcatcaatgctgtgttctactactcaacgagcatcttcgagaaggcaggtgtgcagcagcctgtgtatgccaccatcggctc

Tablo 3-7: GLUT3 primerlerinin özellikleri.

Primer	Uzunluk	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	20	91-110	60	45	atcaatgcgcctgagacaat
Geri Primer	20	183-202	59	55	ccacacataacgaccagagc

Ürün (112 nt)

atcaatgcgcctgagacaatcattaaggactttcttaactacacgttggaagagcggttggaagacctaccaagcgaggggctgctgaccacgctctggtcgttatgtgtgg

qRT-PCR reaksiyonu aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. Buz üzerindeki 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine aşağıda belirtildiği şekilde qRT-PCR reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3-8: qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler ve miktarları.

	Hacim
LC480 Probe Master Mix	5 µl
Prob	0,1 µl
İleri Primer	0,2 µl
Geri Primer	0,2 µl
dH_2O	2 µl
Toplam Hacim	7,5 µl

2. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna hazırlanan 7,5 µl'lik reaksiyon karışımı pipet yardımıyla kondu.
3. Reaksiyon karışımının üzerine 2,5 µl cDNA örneği eklendi.
4. Plakanın üzeri şeffaf jelatin ile kaplanarak örtüldü.
5. Plaka 1000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek tüm malzemenin dibe çökmesi sağlandı.
6. Plaka LightCycler 480 cihazına yerleştirildi ve aşağıda belirtilen sıcaklık döngüsü kullanılarak qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3-9: qRT-PCR reaksiyonunun sıcaklık döngüsü.

Program İsmi	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık değişim oranı (ºC/sn)	Döngü sayısı	Analiz Tipi
Pre-inkübasyon	95ºC	10 dakika	4,4	1	-
	95ºC	10 saniye	4,4		
Amplifikasyon	60ºC	30 saniye	2,2	45	Kantitatif analiz
	72ºC	1 saniye	4,4		
Soğuma	40ºC	10 saniye	1,5	1	-

3.5. Koronal Kesitlerden Protein İzolasyonu

Koronal kesitler, stereo mikroskop altında pens yardımıyla serebral korteks ve hippokampus bölgelerine ayrıldıktan ve ayrı ayrı 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konduktan sonra protein izolasyonu aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. Aşağıda belirtildiği şekilde Lizis Tamponu hazırlandı.

Tablo 3-10: Protein izolasyonunda kullanılan maddeler ve miktarları.

	Hacim
Memeli Protein Ekstraksiyon Reaktifi (MPER) (Thermo Scientific, 78501)	200 µl
Fosfotaz inhibitörü (Roche, 4906845001)	20 µl
Halt proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific, 78430)	2 µl

2. Her bir tüpe 200 µl Lizis Tamponu kondu ve önce 1 dakika boyunca pipetaj yapılarak, sonra da 1 dakika boyunca vortekslenerek dokular homojenize edildi.
3. Tüpler 14000 g'de 10 dakika +4ºC'de santrifüjlendikten sonra üst sıvılar temiz 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

4. İzole edilen proteinler kullanılıncaya kadar -80ºC'de saklandı.

3.6. Western Blot

GR, MR, GLUT1 ve GLUT3 protein seviyelerindeki değişimler Western blot yöntemi ile saptandı. Western Blot yöntemine başlanmadan önce, izole edilen proteinlerin konsantrasyonları NanoDrop One cihazı ile belirlendi. Belirlenen protein konsantrasyonları doğrultusunda her bir gruba ait protein örneği, eşit konsantrasyonda olacak şekilde hesaplanarak 1,5 ml'lik vida kapaklı tüplere aktarıldı. Protein örneklerinin üzerine, içerisine %10 β-merkaptaetanol (AppliChem, A1108) eklenerek hazırlanan 4X Bolt LDS (lityum dodesil sülfat) Örnek Yükleme Tamponu'ndan (Invitrogen, B0007) final konsantrasyonu 1X olacak şekilde eklendi. Bolt %4-12 Bis-Tris Plus jel (Invitrogen, NW04120BOX) elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, tank final konsantrasyonu 1X olacak şekilde dH_2O ile seyreltilerek hazırlanan 20X Bolt MES SDS (sodyum dodesil sülfat) Yürütme Tamponu (Invitrogen, B0002) ile dolduruldu. GR ve MR protein seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan protein örnekleri 100ºC'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra, GLUT1 ve GLUT3 protein seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan protein örnekleri ise GLUT1 ve GLUT3 proteinlerinin aşırı hidrofobik özellikte olmaları sebebiyle kaynatılmadan jele yüklendi. Ayrıca her bir jelin ilk kuyusuna, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher, 26619) ve MagicMark XP Western Protein Standard (ThermoFisher, LC5602)'ın 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan protein standartı yüklendi. Proteinler, Invitrogen PowerEase500 elektroforez sisteminde 200 voltta 25 dakika yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı.

Elektroforez sonrası moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, jelden Power Blotter Select Transfer Stacks (Invitrogen, PB3310) nitroselülöz membrana aktarıldı. Proteinlerin transferi, Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

Nitroselüloz membrana aktarılan proteinler, PBS (Invitrogen, 00-3002) içerisinde hazırlanan %5 yağsız süt tozu (BioShop, SKI400) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklandı. İnkübasyon sonunda membranlar 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Daha sonra membranların üzerine %5 yağsız süt tozu solüsyonu içerisinde Tablo 3-11'de belirtilen dilüsyonlarda sulandırılarak hazırlanan primer antikorlar konarak +4ºC'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün membranlar 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandıktan sonra %5 yağsız süt tozu solüsyonu içerisinde 1:3000 oranında sulandırılarak hazırlanan anti-tavşan IgG (immünglobulin G) (Invitrogen, 65-6120) veya anti-fare IgG (Abcam, ab97040) sekonder

antikorları ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Membranlar kemilüminesan substrat (Advansta, K-12045-D50) ile 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra DR MicroCheimi 4.2 MP görüntüleme cihazında görüntülendi.

Tablo 3-11: Western Blotta kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları.

Primer Antikor	Dilüsyon	Antikorun Üretildiği Canlı
GR (ThermoFisher, MA1-510)	1:200	Fare
MR (ThermoFisher, MA1-620)	1:1000	Fare
GLUT1 (ProteinTech, 21829-1-AP)	1:750	Tavşan
GLUT3 (Abcam, ab41525)	1:100	Tavşan

Hedef proteinlerin normalizasyonu için beta aktin (ACTB) proteini referans olarak kullanıldı. ACTB proteininin işaretlenmesi için, daha önce hedef proteinler ile işaretlenen membranlar primer ve sekonder antikor kompleksini ayırmak üzere 25 mM glisin ve %1 SDS (pH 2.0)'ten oluşan soyma tamponu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar yukarda belirtildiği gibi bloklandı. Bloklama işleminden sonra membranlar, %5 yağsız süt tozu solüsyonu içerisinde 1:3000 oranında sulandırılarak hazırlanan ACTB primer antikoru (Abcam, ab8226) ile +4ºC'de gece boyu inkübe edildikten sonra yukarda belirtildiği gibi sekonder antikor ve kemilüminesan substrat muamelelerini takiben görüntülendi.

3.7. Kolorimetrik Glukoz Testi

Hücre içi glukoz seviyesi, izole edilen protein örneklerinden Glucose Colorimetric Assay Kit II (Biovision, K686-100) kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre saptandı.

1. Kit içerisinde yer alan stok standart çözeltisi (100 mM), Glukoz Assay Tamponu ile 3 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 120 µM, 160 µM ve 200 µM olacak şekilde sulandırılarak standart serileri hazırlandı.

2. Hazırlanan standart serileri ve 1:10 oranında Glukoz Assay Tamponu ile sulandırılan protein örnekleri, 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 50 µl olacak şekilde pipetlendi.
3. Üzerlerine Tablo 3-12'de gösterildiği gibi hazırlanan reaksiyon karışımından 50 µl eklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.

Tablo 3-12: Kolorimetrik glukoz testinde kullanılan maddeler ve miktarları.

	Hacim
Glukoz Assay Tamponu	46 µl
Glukoz Enzim Karışımı	2 µl
Glukoz Substrat Karışımı	2 µl

4. İnkübasyon sonunda 96 kuyulu plaka Thermo MultiSkan EX ELISA okuyucu cihazına yerleştirilerek 450 nm'lik filtre ile spektrofotometrik olarak okundu. Ölçümler, her bir örnek için 3 kez tekrarlandı.

3.8. Sitotoksisite Testi

Yapılan uygulamaların muhtemel toksik etkileri, ölü hücrelerden kültür medyumuna salınan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarının ölçülmesiyle belirlendi. Deneyler sırasında hazırlanan kültür medyumu negatif kontrol olarak, herhangi bir uygulama yapılmamış kesitlerden toplanan kültür medyumu düşük konsantrasyonlu kontrol olarak, membran hasarına yol açarak yüksek seviyede LDH salınımını sağlamak üzere 24 saat süreyle %2 Triton X-100 uygulaması yapılmış kesitlerden toplanan kültür medyumu ise yüksek konsantrasyonlu kontrol olarak kullanıldı.

Sitotoksisite seviyesi, uygulama sürelerinin sonunda tüm deney gruplarından ve kontrollerden toplanan kültür medyumundan Cytotoxicity Detection (LDH) kiti (Roche, 11644793001) ile aşağıdaki protokole göre belirlendi.

1. 96 kuyulu plaka kuyularına her bir örnekten 100 µl olacak şekilde pipetlendi.
2. Üzerlerine Tablo 3-13'de gösterildiği gibi hazırlanan reaksiyon karışımından 100 µl eklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.

Tablo 3-13: Sitotoksisite testinde kullanılan maddeler ve miktarları.

	Hacim
Katalizör	250 µl
Boya solüsyonu	11,25 ml

3. İnkübasyon sonunda 96 kuyulu plaka Thermo MultiSkan EX ELISA okuyucu cihazına yerleştirilerek 492 nm'lik filtre ile spektrofotometrik olarak okundu. Ölçümler, her bir örnek için 3 kez tekrarlandı.

3.9. İmmünfloresan İşaretleme

GR ve MR proteinlerinin beyindeki dağılımlarını belirlemek üzere koronal kesitler, GR ve MR'ye spesifik antikorlar kullanılarak immünfloresan yöntemi ile aşağıdaki protokole göre işaretlendi.

1. Kesitler %3,7 paraformaldehit (Sigma, 158127) ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edildi.
2. Fikse olan kesitler 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkandı.
3. Kesitler, PBS içerisine %0,3 triton X-100 (Sigma, X-100) ve %5 keçi serumu (Chemicon, S26) eklenerek hazırlanan TPBS ile 1 saat oda sıcaklığında bloklandı.
4. 3 kez hızlıca PBS ile yıkandıktan sonra, yukarda belirtildiği şekilde hazırlanan TPBS içerisinde 1:100 oranında sulandırılarak hazırlanan MR (ThermoFisher, MA1-620) primer antikoru ile +4ºC'de gece boyu inkübe edildi.
5. Ertesi gün kesitler 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkandı.
6. Yukarda belirtildiği şekilde hazırlanan TPBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılarak hazırlanan FITC (fluorescein isothiocyanate) işaretli anti-fare IgG (Abcam, ab150117) sekonder antikoru ile 1,5 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Bu basamaktan itibaren tüm işlemler karanlıkta gerçekleştirildi.
7. İnkübasyon sonunda kesitler 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkandı ve yukarda belirtildiği şekilde hazırlanan TPBS ile 30 dakika oda sıcaklığında bloklandı.

8. 3 kez hızlıca PBS ile yıkandıktan sonra, yukarda belirtildiği şekilde hazırlanan TPBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılan GR (ThermoFisher, MA1-510) primer antikoru ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonunda kesitler 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkandı ve yukarda belirtildiği şekilde hazırlanan TPBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılan TR (Texas Red) işaretli anti-fare IgG (Abcam, ab175473) sekonder antikoru ile 1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonunda kesitler 1:15000 oranında dH_2O ile sulandırılarak hazırlanan DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) solüsyonu içinde 15 saniye bekletildi.
11. Kesitler 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkandıktan sonra kapama medyumu (ThermoFisher, P36970) ile kapatıldı.
12. Kesitler daha sonra Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) ile görüntülendi. Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu ile elde edilen her bir kesite ait görüntüler, Gen5 (Biotek) yazılımı kullanılarak montaj ve dekonvolüsyon işlemleri sonrası birleştirilip tek bir görüntü haline getirildi.

3.10. İstatistiksel Analizler

Hedef genlerin göreceli ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere, qRT-PCR deneylerinden elde edilen her bir örneğe ait Ct değeri $\Delta CT = 2^{(\text{Referans Genlerin geometrik ortalaması - Ct hedef Gen})}$ formülüne konarak hesaplandı. Hesaplamalar ve grafikler Microsoft Office Excel 2016 programında yapıldı.

Hedef proteinlerin göreceli ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere, elde edilen görüntülerdeki bant yoğunlukları ImageJ 1.52a programı ile belirlendikten sonra istatistiksel analiz yapıldı.

Hücre içi glukoz seviyesini belirlemek üzere, her örnek için elde edilen 3 absorbans değerinin ortalaması alındı ve bu değerlerden köre ait absorbans değerinin ortalaması çıkartıldı. Elde edilen bu değerler, standartların absorbans değerleri ile oluşturulan linear standart eğrisinden elde edilen formüle kondu. Hesaplamalar ve grafikler Microsoft Office Excel 2016 programında yapıldı.

Sitotoksisite yüzdesini belirlemek üzere, her örnek için elde edilen 3 adet absorbans değerinin ortalaması alındı ve bu değerlerden negatif kontrole ait absorbans değerinin

ortalaması çıkartıldı. Elde edilen bu değerler kullanılarak, aşağıdaki formüle göre sitotoksisite yüzdeleri belirlendi. Hesaplamalar ve grafikler Microsoft Office Excel 2016 programında yapıldı.

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{\text{beklenen değer – düşük konsantrasyonlu kontrol}}{\text{yüksek konsantrasyonlu kontrol - düşük konsantrasyonlu kontrol}} \times 100$$

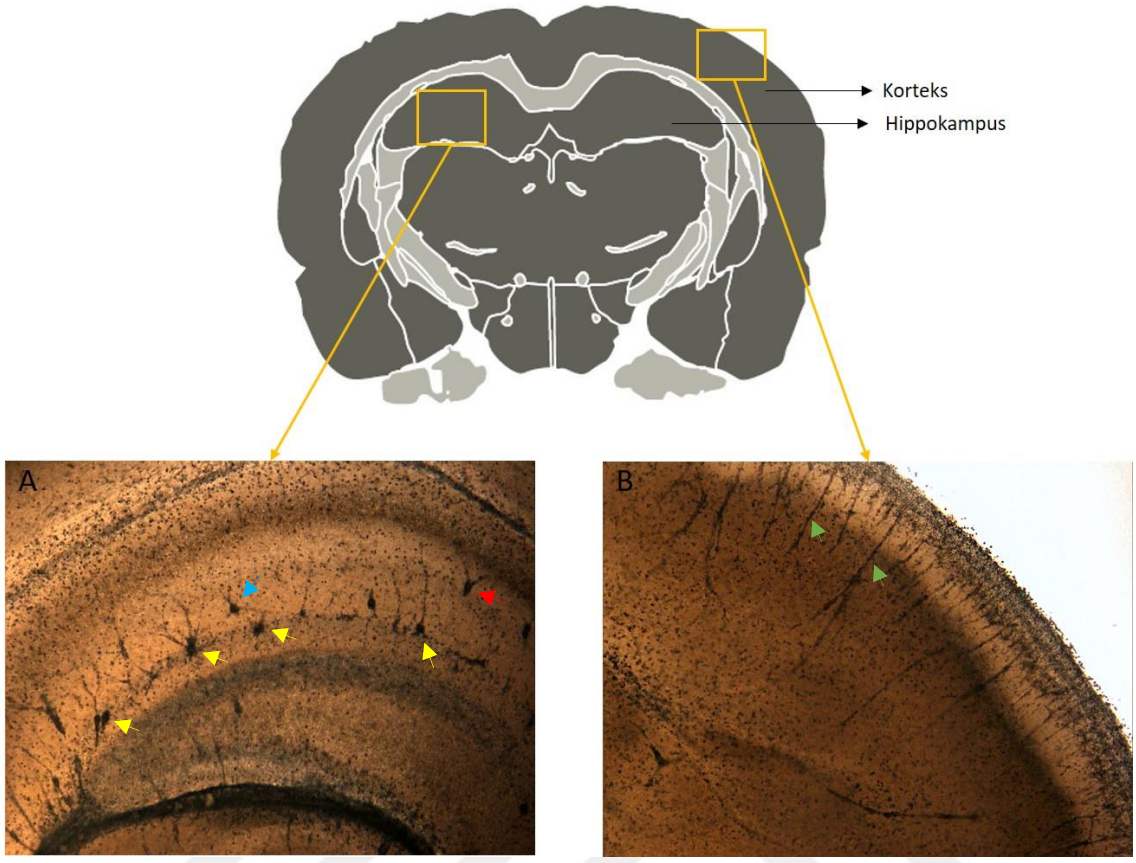
Her bir deneye ait ham veriler GraphPad InStat DTCG 3.06 (GraphPad Software, Inc. San Diego USA) yazılımında veri dağılımının normal olup olmamasına göre, önce tek yönlü ANOVA ardından Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi ile veya önce Kruskal-Wallis ardından Dunn’s çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmada, 7 günlük Spraque-Dawley sıçan beyinlerinden alınan koronal kesitler ile hazırlanan organotipik kesit kültürleri kullanıldı. Beyin organotipik kesit kültürlerine kortikosteron ve $A\beta_{1-42}$ uygulamaları yapıldıktan sonra glukokortikosteroid reseptörü (GR), mineralokortikosteroid reseptörü (MR), glukoz taşıyıcı protein 1 (GLUT1) ve glukoz taşıyıcı protein 3'ün (GLUT3) mRNA ve protein seviyelerindeki değişimler saptandı. Ayrıca yapılan uygulamaların hücre içi glukoz seviyesini etkileyip etkilemediği araştırıldı. Ek olarak, GR ve MR'nin beyindeki bölgesel dağılımları immünfloresan yöntemi ile incelendi. Yapılan uygulamaların muhtemel toksik etkileri ise sitotoksisite testi ile saptandı.

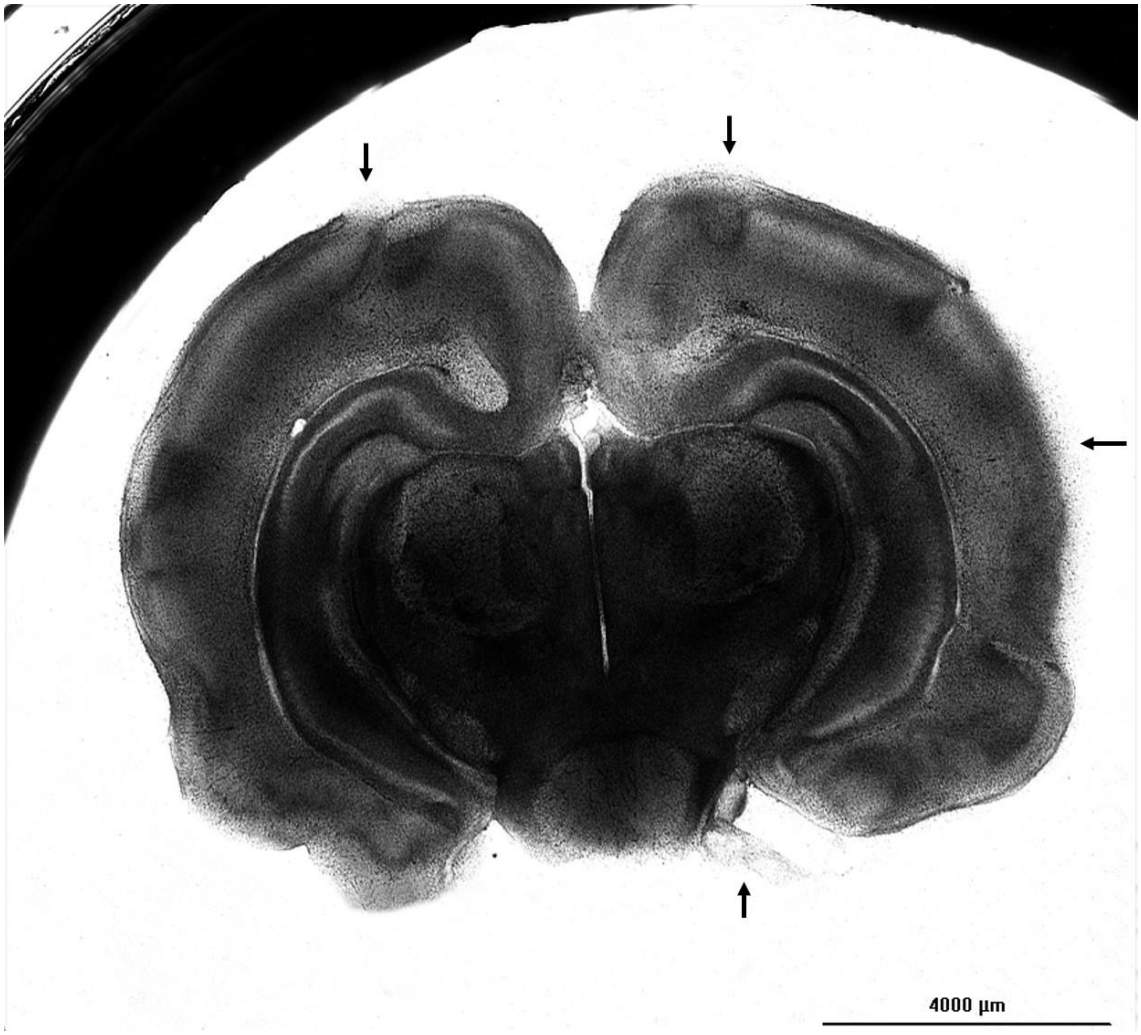
4.1. Kesitlerin Morfolojik Değerlendirmesi

Beyin organotipik kesit kültürü gerçekleştirildikten sonra, dokunun ortama uyum sağlaması ve fizyolojik koşullarına dönmesi için herhangi bir uygulama yapılmadan beklenen 7 gün boyunca kesitlerin morfolojik özellikleri takip edildi. Kültürün ilk haftasında incelip yayvanlaşan, rengi şeffaflaşan ve kenarlarından dışarıya hücre yayılımı görülen kesitler sağlıklı olarak kabul edildi. Kalınlığı değişmeyen, rengi beyazımsı-opak kalan veya herhangi bir bölgesinde atrofi tespit edilen kesitler çalışma dışı bırakıldı. İnvert ışık mikroskobu ve canlı hücre/doku görüntüleme sistemi ile incelenen sağlıklı bir beyin koronal kesitinin genel morfolojisi Şekil 4-1 ve Şekil 4-2'de gösterilmiştir.



Şekil 4-1: Sağlıklı beyin koronal kesitlerinin ışık mikroskobu altında görüntüsü.

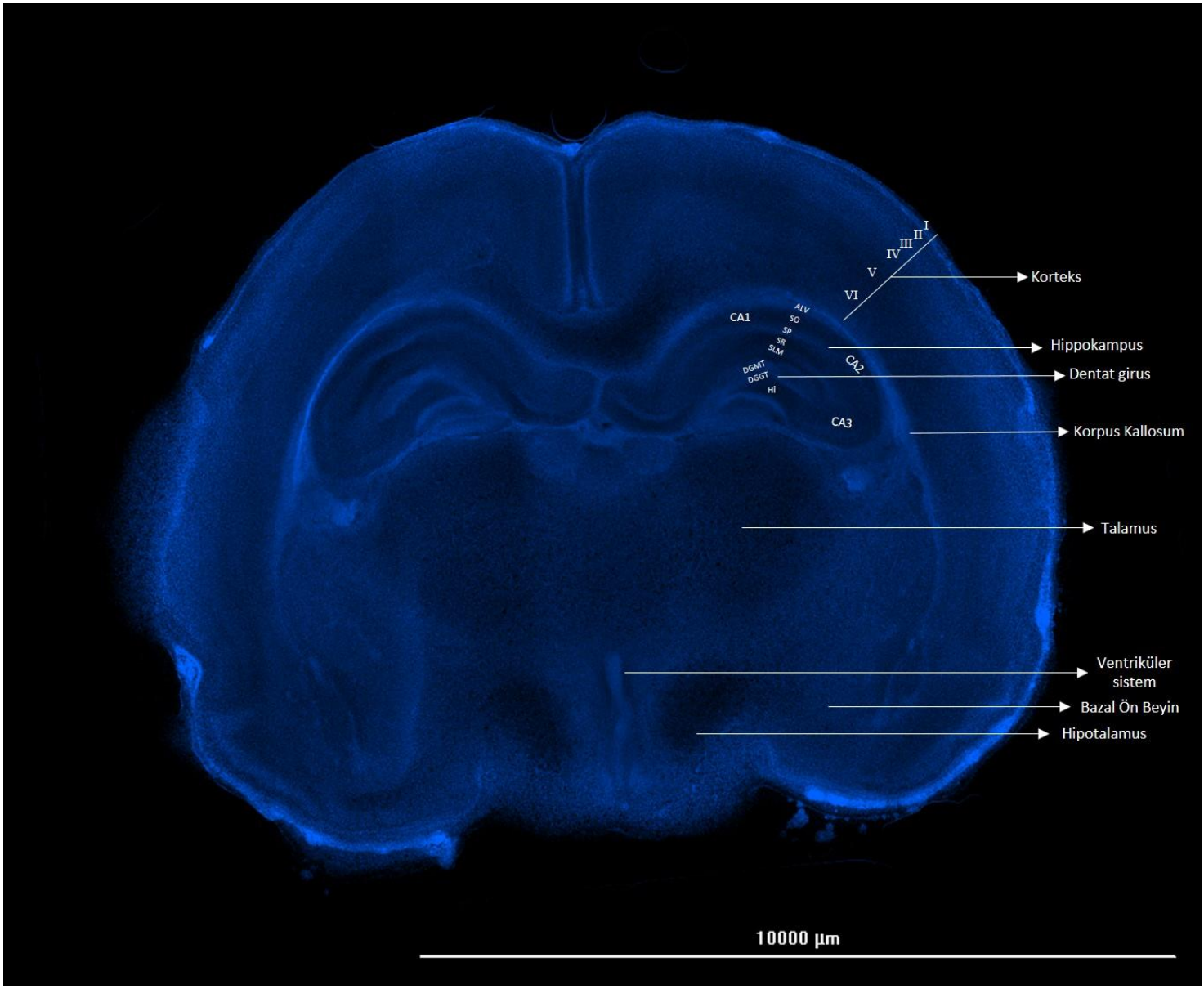
A. Hippokampus. Stratum Piramidalis (Piramidal Tabaka)'da yer alan piramidal nöron kırmızı ok ile, Stratum Radiatum (Radiatum Tabakası)'da yer alan internöron mavi ok ile, Stratum Lacunosum-moleculare (Lacunosum Moleküler Tabaka)'de yer alan internöronlar ise sarı ok ile gösterilmiştir. **B.** Korteks. Kortikal nöron aksonları yeşil ok ile gösterimiştir. **Büyütme:** 10X



Şekil 4-2: Sağlıklı beyin koronal kesitlerinin canlı hücre/doku görüntüleme sistemi ile görüntülenmesi.

Kesitler, Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobunda (Biotek) aydınlık alan filtresi kullanılarak 4X büyütmede görüntülendi. Elde edilen görüntüler, Gen5 (Biotek) yazılımı kullanılarak montaj ve dekonvolüsyon işlemleri sonrası birleştirilip tek bir görüntü haline getirildi. Doku kenarlarından dışarıya yayılan hücreler ok ile gösterilmiştir.

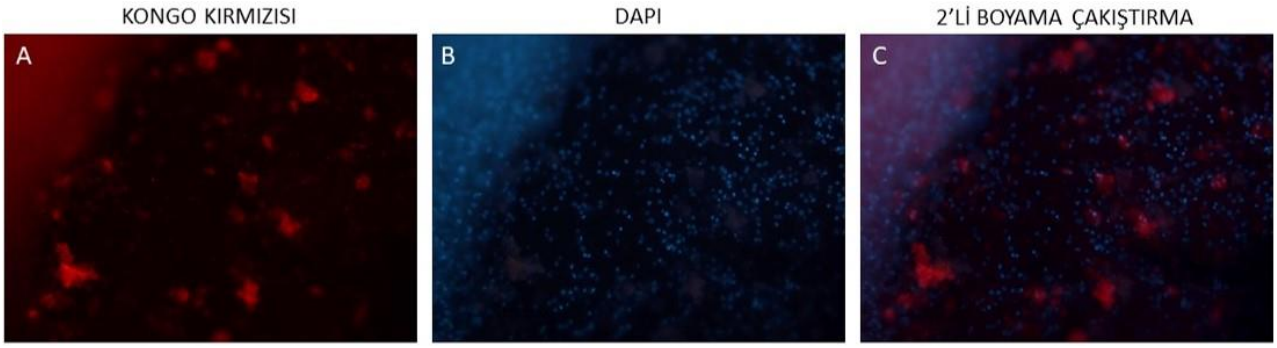
Ayrıca, invert ışık mikroskobu ve canlı hücre/doku görüntüleme sistemi ile sağlıklı olduğu belirlenen koronal kesitlerin genel morfolojik değerlendirmesi DAPI nükleus boyası ile yapıldı (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: Beyin koronal kesitin topoğrafik görünümü.

Kesitler, Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılarak görüntülendi. Elde edilen 81 adet görüntü, Gen5 (Biotek) yazılımı kullanılarak montaj ve dekonvolüsyon işlemleri sonrası birleştirilip tek bir görüntü haline getirildi. Boyama: DAPI nükleus boyası, Büyütme: 4X. **I, II, III, IV, V, VI:** Korteksin alt tabakaları. **ALV:** Alveus. SO: Stratum Oriens (Oriens Tabakası). **SP:** Stratum Piramidalis (Piramidal Tabaka). **SR:** Stratum Radiatum (Radiatum Tabakası). **SLM:** Stratum Lacunosum-moleculare (Lacunosum Moleküler Tabaka). **DGMT:** Dentat Girus Moleküler Tabaka. **DGGT:** Dentat Girus Granüler Tabaka. **Hİ:** Hilus. **CA1:** Cornu Ammonis 1. **CA2:** Cornu Ammonis 2. **CA3:** Cornu Ammonis 3.

Hazırlanan beyin organotipik kesit kültürlerine $A\beta_{1-42}$ uygulaması ile AH benzeri bir model oluşturulduğunu göstermek üzere amiloid plakların varlığı bir amiloid boyası olan Kongo kırmızısı ile boyanarak incelendi. Floresan mikroskobu ile incelenen kesitlerde modelin başarılı bir şekilde oluşturulduğu amiloid plakların varlığı ile gösterildi (Şekil 4-4).

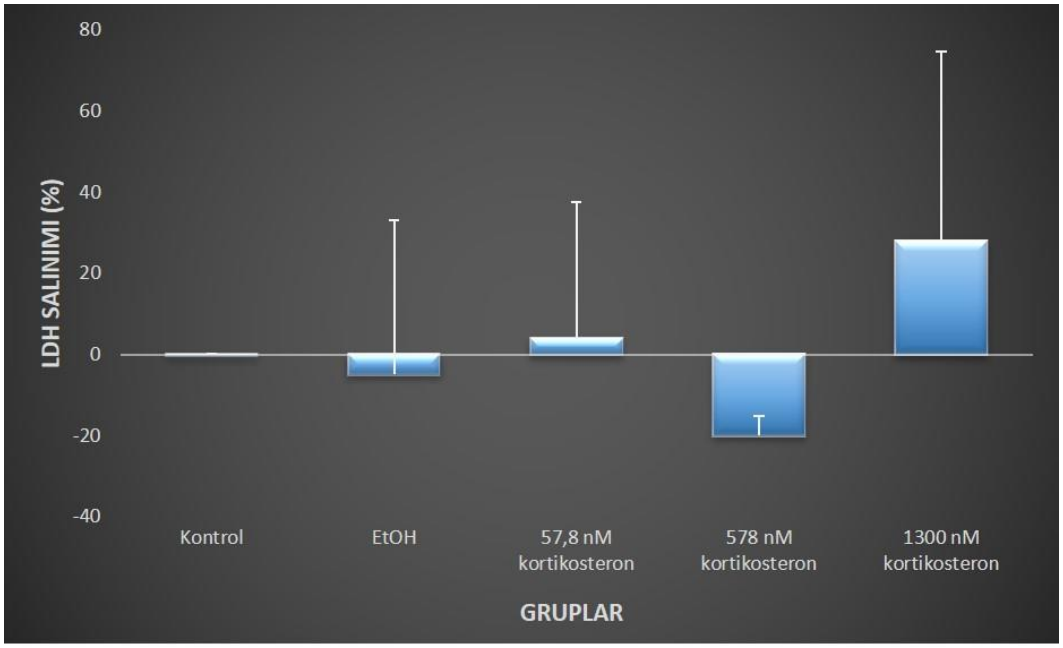


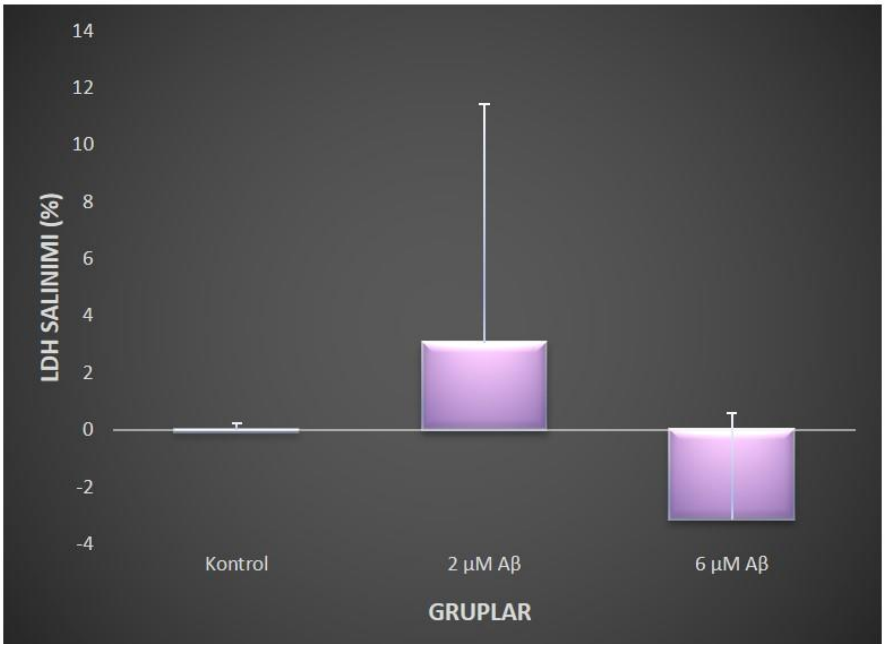
Şekil 4-4: Beyin organotipik kesit kültüründe $A\beta_{1-42}$ uygulamasından sonra amiloid plakların gösterilmesi.

A. Kongo Kırmızısı boyaması ile Amiloid plaklar görülmektedir. **B.** DAPI nükleus boyası olarak kullanılmıştır. **C.** Her iki boyamaya ait görüntülerin çakıştırılması. Boya: Kongo kırmızısı. Büyütme: 4X.

4.2. Sitotoksisite Sonuçları

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron ve $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda ortama salınan LDH seviyesi Şekil 4-5'te gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).





Şekil 4-5: Kortikosteron ve $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda ortama salınan LDH seviyesi.

İstatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

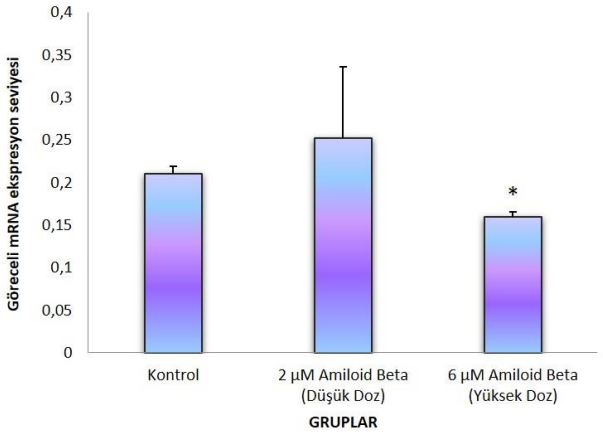
4.3. qRT-PCR Sonuçları

4.3.1. Glukokortikosteroid Reseptörü (GR) mRNA Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler

4.3.1.1. Korteks Bölgesindeki GR mRNA Ekspresyonu

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-6'da gösterilmiştir. 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun GR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubu ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba göre anlamlı seviyede azaldığı saptandı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,01$).



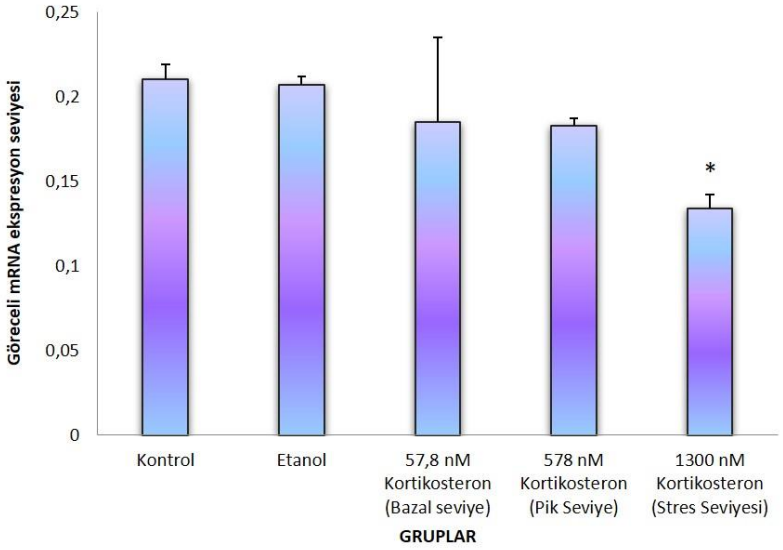
Şekil 4-6: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubu ve 2 µM Aβ uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede azaldı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,01$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-7'de gösterilmiştir. 1300 nM kortikosteron uygulanan grubun GR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubu ve çözücü madde olarak kullanılan etanol

uygulanan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü (sırasıyla p<0,001; p<0,01).



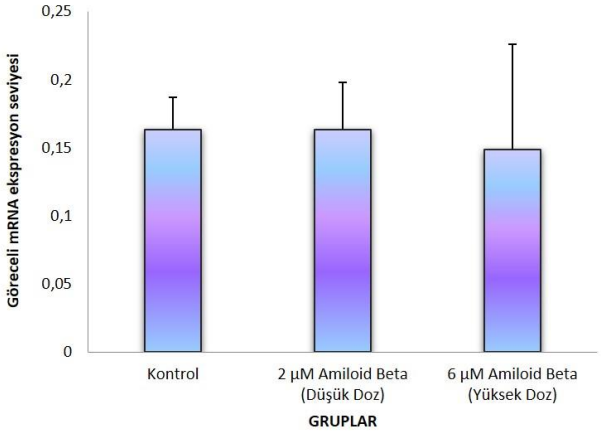
Şekil 4-7: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubu ve etanol uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede azaldı (sırasıyla p<0,001; p<0,01).

4.3.1.2. Hippokampus Bölgesindeki GR mRNA Ekspresyonu

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-8'de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı.

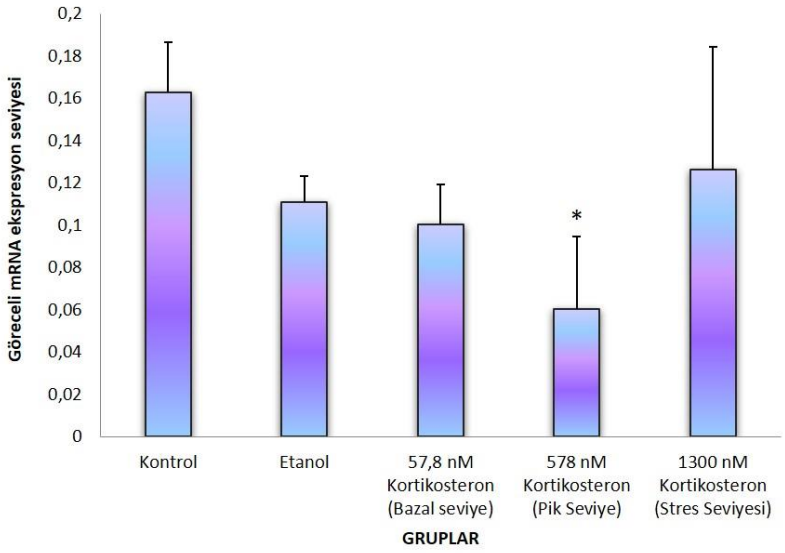


Şekil 4-8: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-9'da gösterilmiştir. 578 nM kortikosteron uygulanan grubun GR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p<0,001$).



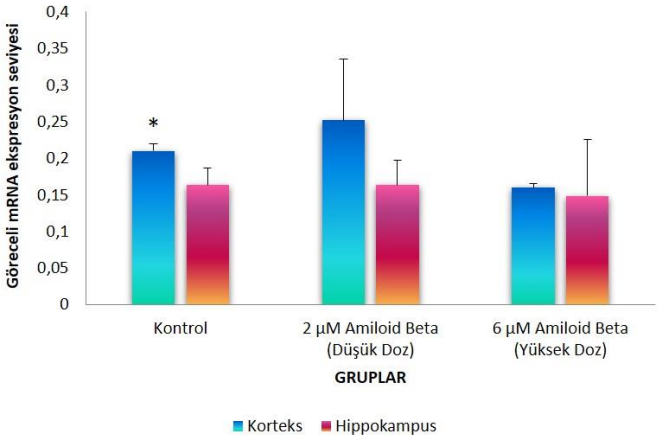
Şekil 4-9: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldı ($p<0,001$).

4.3.1.3. GR mRNA Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GR mRNA ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubunun korteks bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyesinin hippokampus bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0,0006$). $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruplarda beyin bölgeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bulgular Şekil 4-10'da gösterilmiştir.

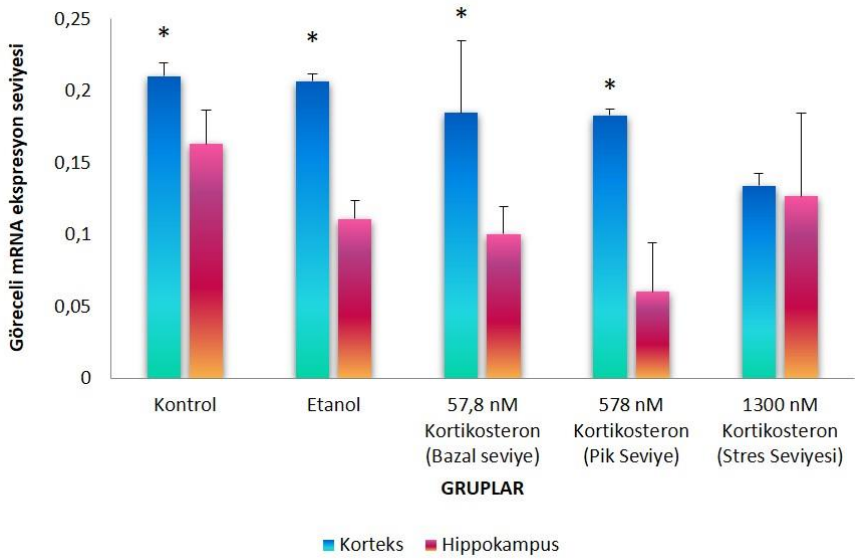


Şekil 4-10: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GR mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Hippokampus bölgesine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek (p=0,0006).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GR mRNA ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubu, çözücü madde olarak kullanılan etanol uygulanan kontrol grubu ile 57,8 nM kortikosteron ve 578 nM kortikosteron uygulanan grupların korteks bölgesindeki GR mRNA ekspresyon seviyelerinin hippokampus bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=0,0006; p=0,0006; p=0,0006; p=0,0006). Bulgular Şekil 4-11'de gösterilmiştir.



Şekil 4-11: Kortikosteron uygulamaları sonucu GR mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

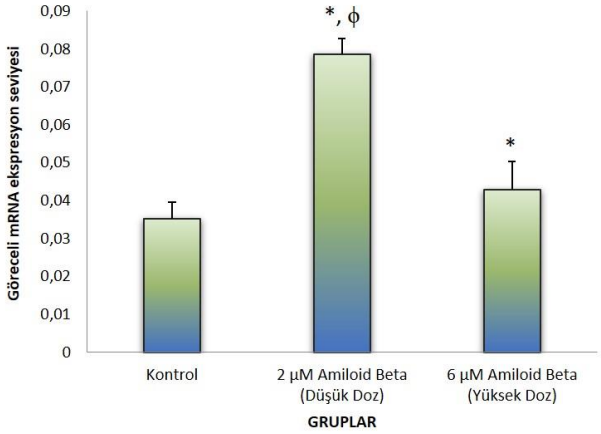
* Hippokampus bölgesine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek (sırasıyla p=0,0006; p=0,0006; p=0,0006; p=0,0006).

4.3.2. Mineralokortikosteroid Reseptörü (MR) mRNA Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler

4.3.2.1. Korteks Bölgesindeki MR mRNA Ekspresyonu

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu MR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-12'de gösterilmiştir. 2 µM $A\beta_{1-42}$ ve 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupların MR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı seviyede arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,05$). Ayrıca 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun MR mRNA ekspresyon seviyesinin 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,001$).



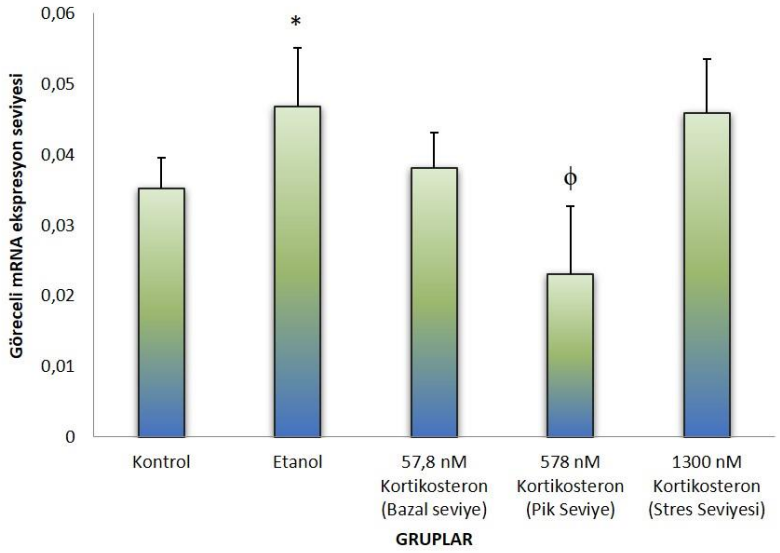
Şekil 4-12: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,05$).

ϕ 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede yüksek ($p<0,001$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu MR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-13'te gösterilmiştir. Çözücü madde olarak kullanılan etanol uygulanan grubun MR mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$). 578 nM kortikosteron uygulanan grubunun MR mRNA ekspresyon seviyesinin ise diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,001$; $p<0,01$; $p<0,001$).



Şekil 4-13: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

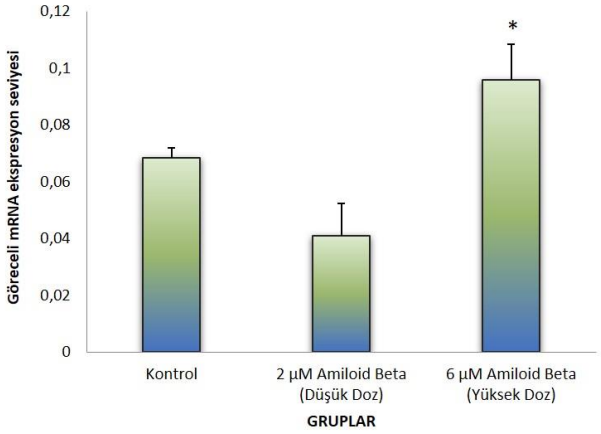
* Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p<0,05$).

ϕ Diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede azaldı (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,001$; $p<0,01$; $p<0,001$).

4.3.2.2. Hippokampus Bölgesindeki MR mRNA Ekspresyonu

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu MR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-14'te gösterilmiştir. 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun MR mRNA ekspresyon seviyesinin 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,001$).

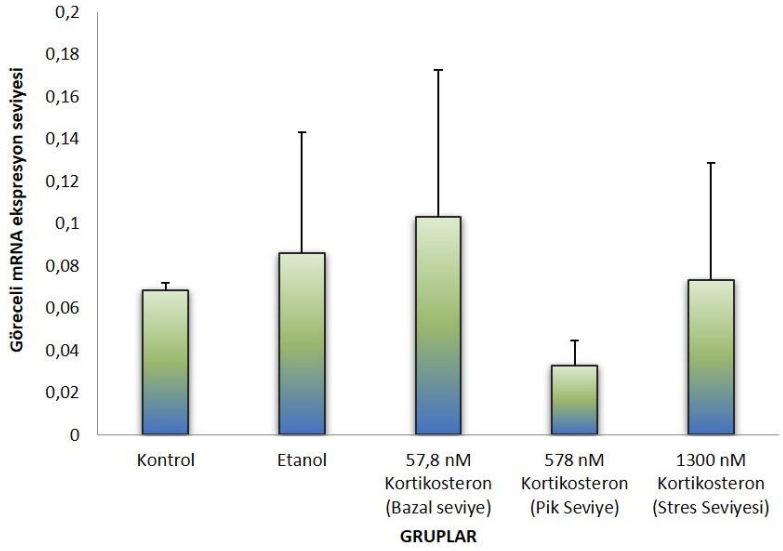


Şekil 4-14: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede yüksek ($p<0,001$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu MR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-15'te gösterilmiştir. 578 nM kortikosteron uygulanan grubun MR mRNA ekspresyon seviyesinin diğer gruplara göre azaldığı görüldü. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.



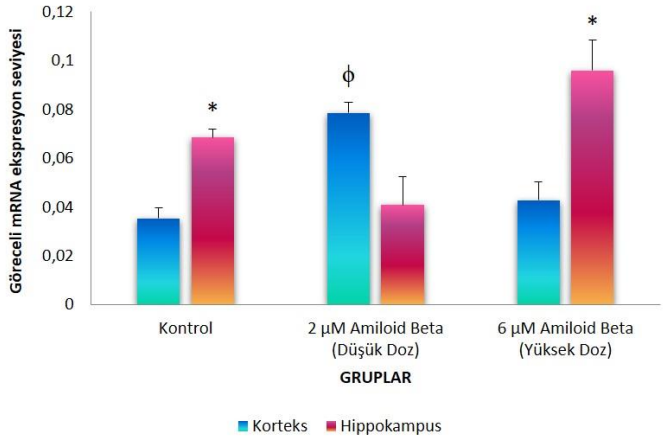
Şekil 4-15: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

4.3.2.3. MR mRNA Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu MR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

MR mRNA ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun hippokampus bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine kıyasla, 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun ise korteks bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinin hippokampus bölgesine oranla daha yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0,0001$; $p<0,0001$; $p=0,0006$). Bulgular Şekil 4-16'da gösterilmiştir.



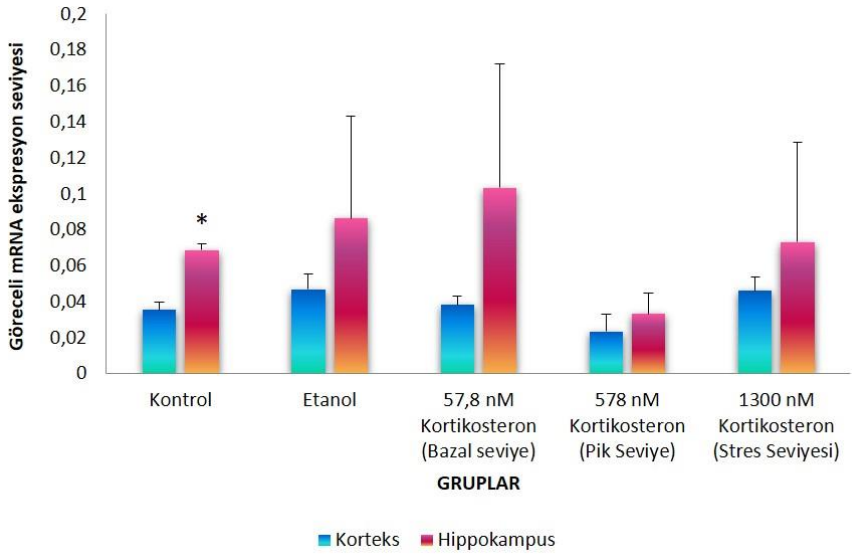
Şekil 4-16: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu MR mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Korteks bölgesine göre anlamlı derecede yüksek (sırasıyla $p<0,0001$; $p<0,0001$).

ϕ Hippokampus bölgesine göre anlamlı derecede yüksek ($p=0,0006$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu MR mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

MR mRNA ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubunun hippokampus bölgesindeki MR mRNA ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0,0001$). Kortikosteron uygulanan gruplarda beyin bölgeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bulgular Şekil 4-17'de gösterilmiştir.



Şekil 4-17: Kortikosteron uygulamaları sonucu MR mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

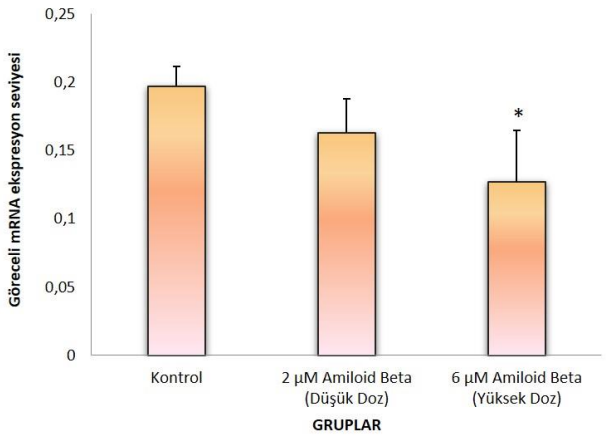
* Hippokampus bölgesine göre anlamlı derecede yüksek ($p<0,0001$).

4.3.3. GLUT1 mRNA Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler

4.3.3.1. Korteks Bölgesindeki GLUT1 mRNA Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT1 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-18'de gösterilmiştir. 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p<0,001$).

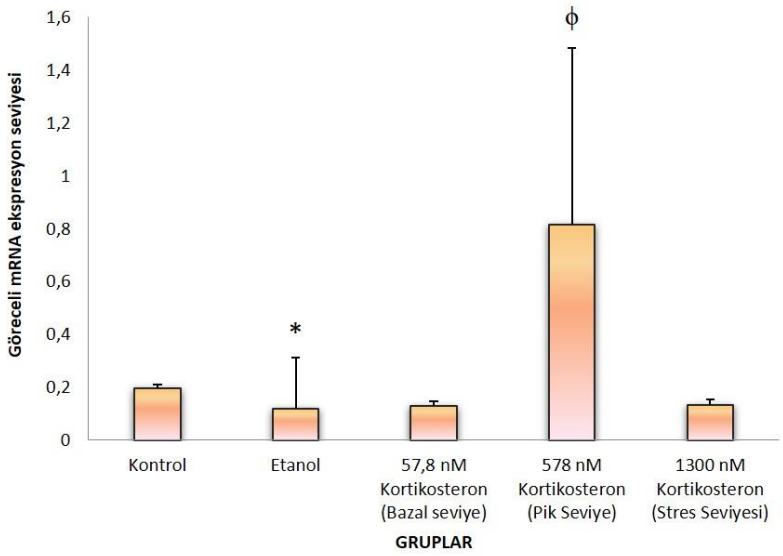


Şekil 4-18: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldı ($p<0,001$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT1 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-19'da gösterilmiştir. Çözücü madde olarak kullanılan etanol uygulanan grubun GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha düşük olduğu saptandı ($p<0,01$). 578 nM kortikosteron uygulanan grubunun GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinin ise etanol, 57,8 nM kortikosteron ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,05$; $p<0,05$).



Şekil 4-19: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

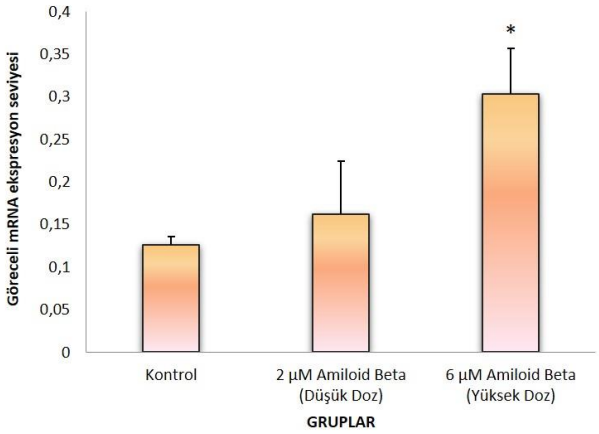
* Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ($p<0,01$).

ϕ Etanol, 57,8 nM kortikosteron ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruplara kıyasla anlamlı derecede arttı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,05$; $p<0,05$).

4.3.3.2. Hippokampus Bölgesindeki GLUT1 mRNA Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT1 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-20'de gösterilmiştir. 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,01$).

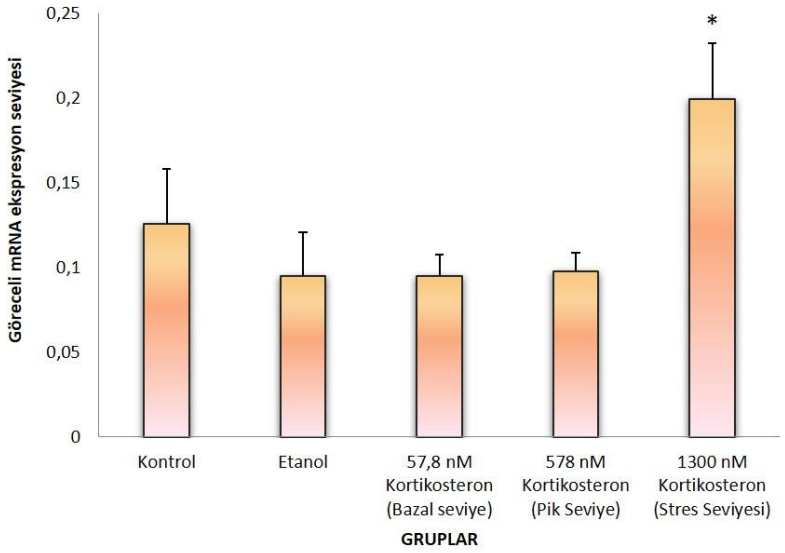


Şekil 4-20: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubuna ve 2 µM Aβ1-42 uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede arttı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,01$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT1 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-21'de gösterilmiştir. 1300 nM kortikosteron uygulanan grubun GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinin çözücü madde olarak kullanılan etanol uygulanan kontrol grubu ile 57,8 nM kortikosteron ve 578 nM kortikosteron uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,01$; $p<0,01$).



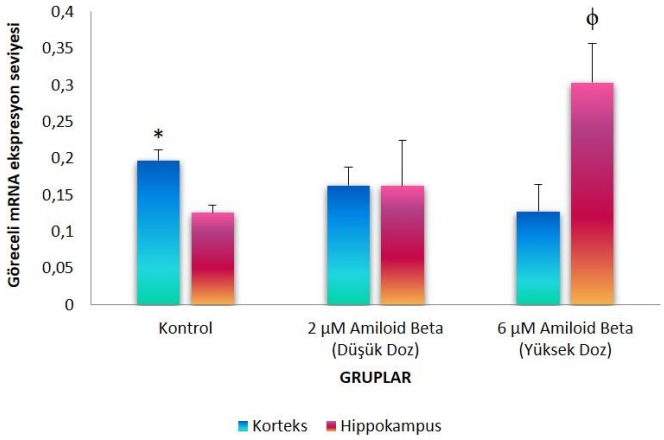
Şekil 4-21: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Etanol, 57,8 nM kortikosteron ve 578 nM kortikosteron uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,01$; $p<0,01$).

4.3.3.3. GLUT1 mRNA Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT1 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GLUT1 mRNA ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubunun korteks bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinin hippokampus bölgesine kıyasla, 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun ise hippokampus bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine oranla daha yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0,0001$; $p<0,0001$). Bulgular Şekil 4-22'de gösterilmiştir.



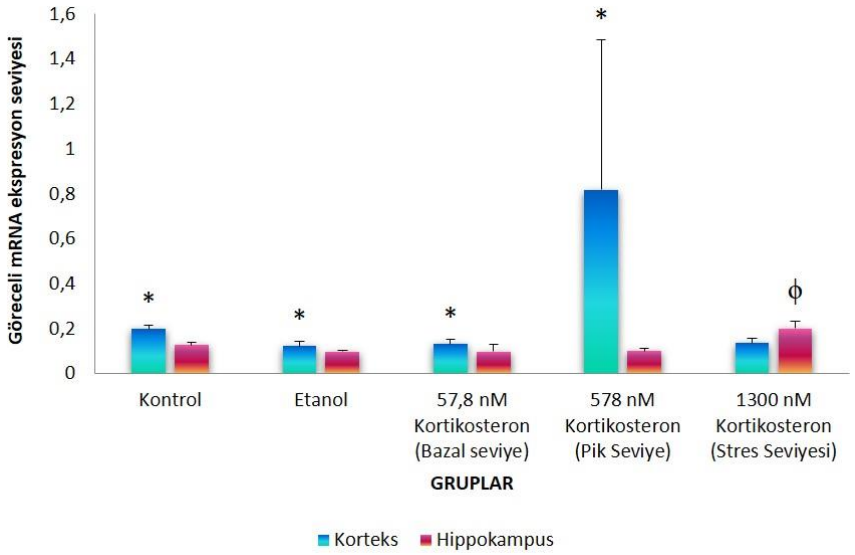
Şekil 4-22: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GLUT1 mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Hippokampus bölgesine göre anlamlı derecede yüksek ($p<0,0001$).

ϕ Korteks bölgesine göre anlamlı derecede yüksek ($p<0,0001$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT1 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GLUT1 mRNA ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubu, çözücü madde olarak kullanılan etanol uygulanan kontrol grubu ile 57,8 nM kortikosteron ve 578 nM kortikosteron uygulanan grupların korteks bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyelerinin hippokampus bölgesine kıyasla; 1300 nM kortikosteron uygulanan grubun ise hippokampus bölgesindeki GLUT1 mRNA ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p<0,0001$; $p=0,0041$; $p=0,0433$; $p=0,0047$; $p=0,0007$). Bulgular Şekil 4-23'te gösterilmiştir.



Şekil 4-23: Kortikosteron uygulamaları sonucu GLUT1 mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Hippokampus bölgesine göre anlamlı derecede yüksek (sırasıyla $p<0,0001$; $p=0,0041$; $p=0,0433$; $p=0,0047$).

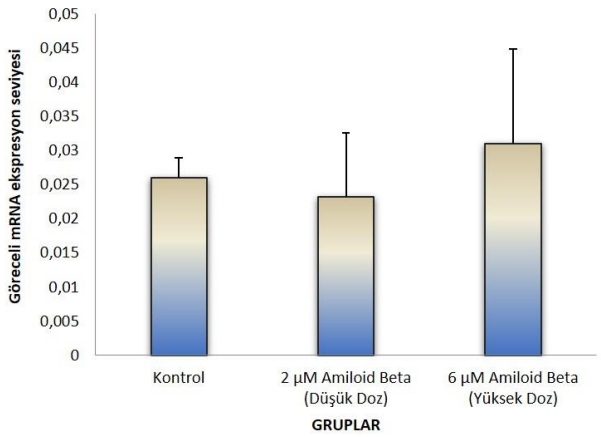
ϕ Korteks bölgesine göre anlamlı derecede yüksek ($p=0,0007$).

4.3.4. GLUT3 mRNA Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler

4.3.4.1. Korteks Bölgesindeki GLUT3 mRNA Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT3 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-24'te gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

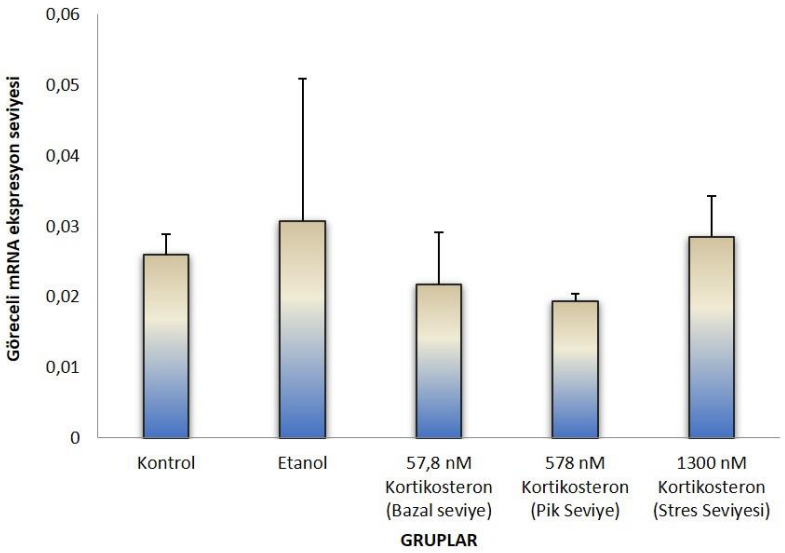


Şekil 4-24: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT3 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-25'te gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.



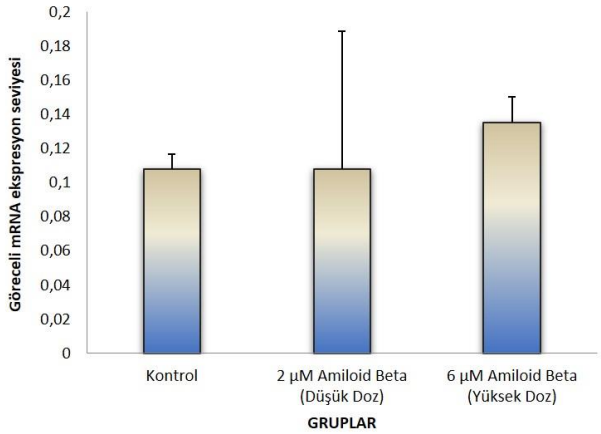
Şekil 4-25: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

4.3.4.2. Hippokampus Bölgesindeki GLUT3 mRNA Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT3 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-26'da gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

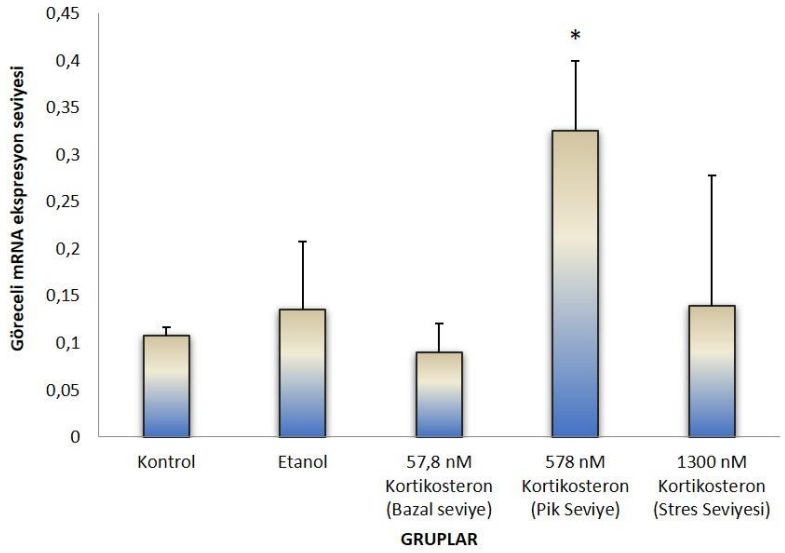


Şekil 4-26: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT3 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-27'de gösterilmiştir. 578 nM kortikosteron uygulanan grubun GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinin 57,8 nM kortikosteron ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,05$).



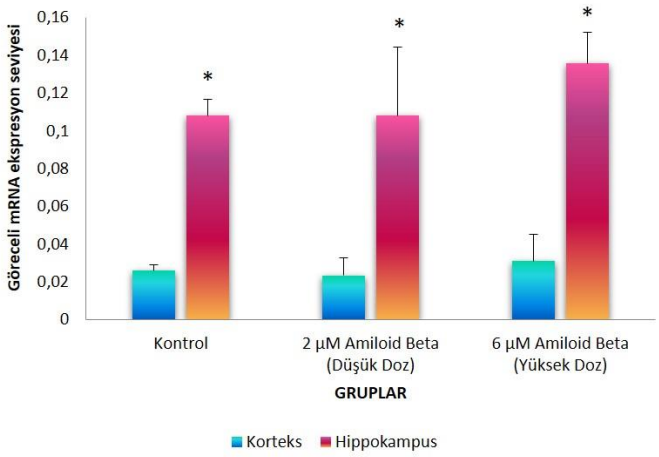
Şekil 4-27: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* 57,8 nM kortikosteron ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,05$).

4.3.4.3. GLUT3 mRNA Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT3 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GLUT3 mRNA ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; tüm grupların hippokampus bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyelerinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0006$; $p=0,0006$; $p<0,0001$). Bulgular Şekil 4-28'de gösterilmiştir.

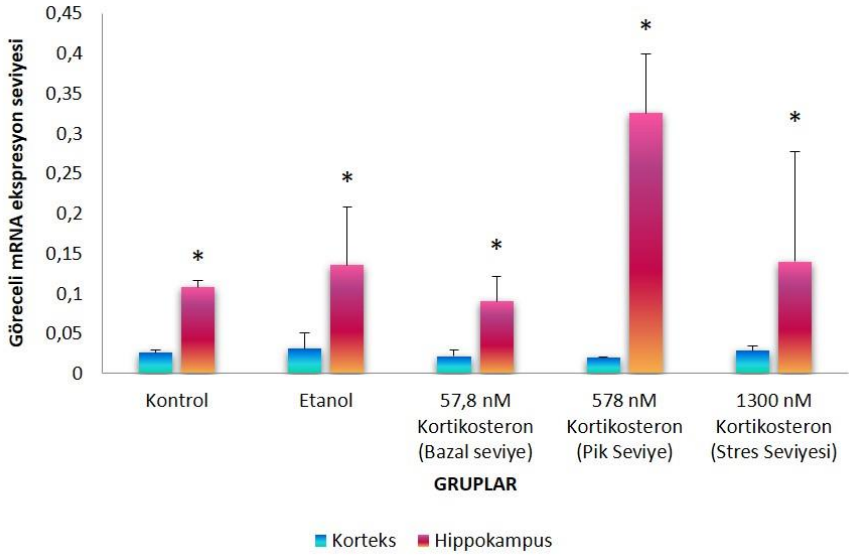


Şekil 4-28: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GLUT3 mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Korteks bölgesine kıyasla daha yüksek (sırasıyla p=0,0006; p=0,0006; p<0,0001).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT3 mRNA Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GLUT3 mRNA ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; tüm grupların hippokampus bölgesindeki GLUT3 mRNA ekspresyon seviyelerinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=0,0006; p=0,0006; p=0,0006; p=0,0012; p=0,0006). Bulgular Şekil 4-29'da gösterilmiştir.



Şekil 4-29: Kortikosteron uygulamaları sonucu GLUT3 mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Korteks bölgesine kıyasla daha yüksek (sırasıyla p=0,0006; p=0,0006; p=0,0006; p=0,0012; p=0,0006).

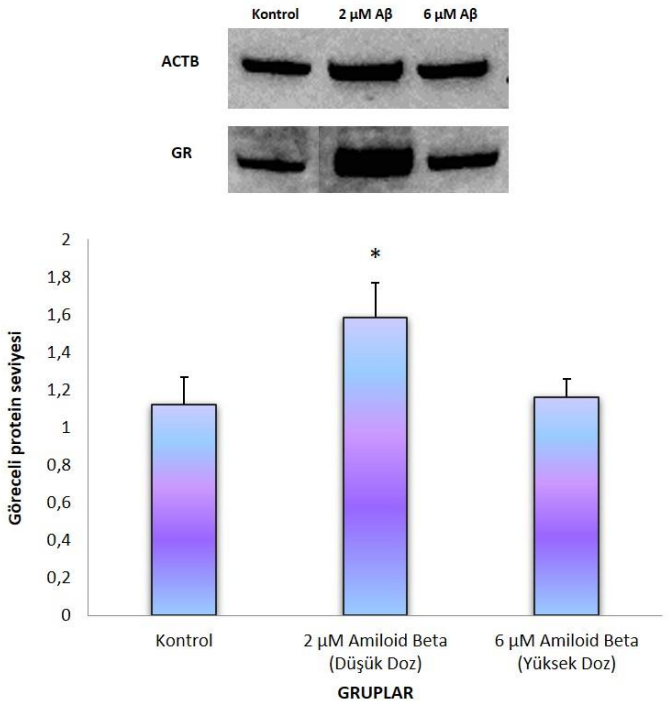
4.4. Western Blot Sonuçları

4.4.1. Glukokortikosteroid Reseptörü (GR) Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

4.4.1.1. Korteks Bölgesindeki GR Protein Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GR Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-30'da gösterilmiştir. 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun GR protein ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna ve 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,01$).

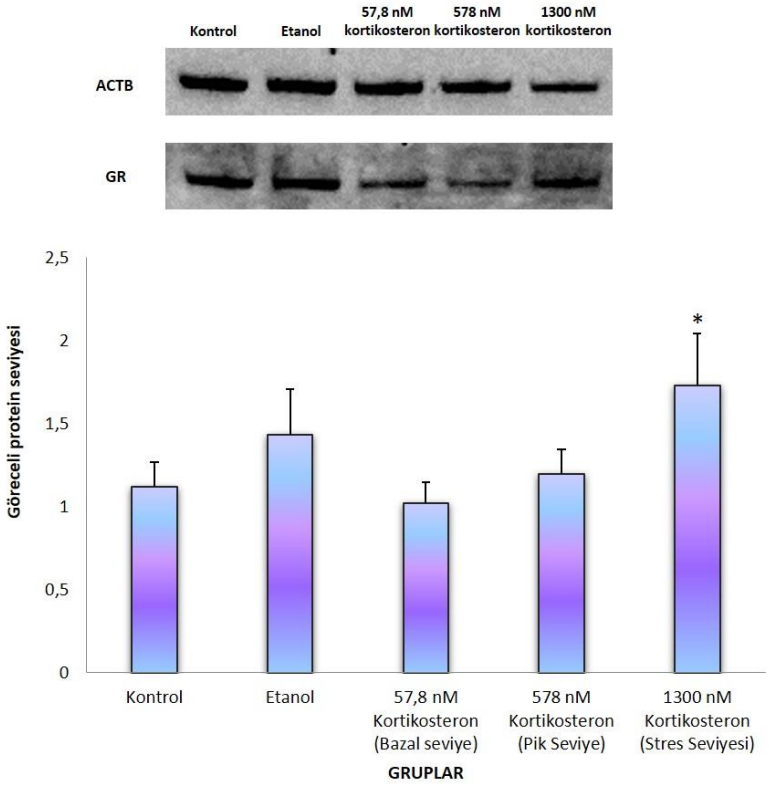


Şekil 4-30: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubuna ve 6 µM Aβ1-42 uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede arttı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,01$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GR Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-31'de gösterilmiştir. 1300 nM kortikosteron uygulanan grubun GR protein ekspresyon seviyesinin kontrol grubu ve 57,8 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,001$).



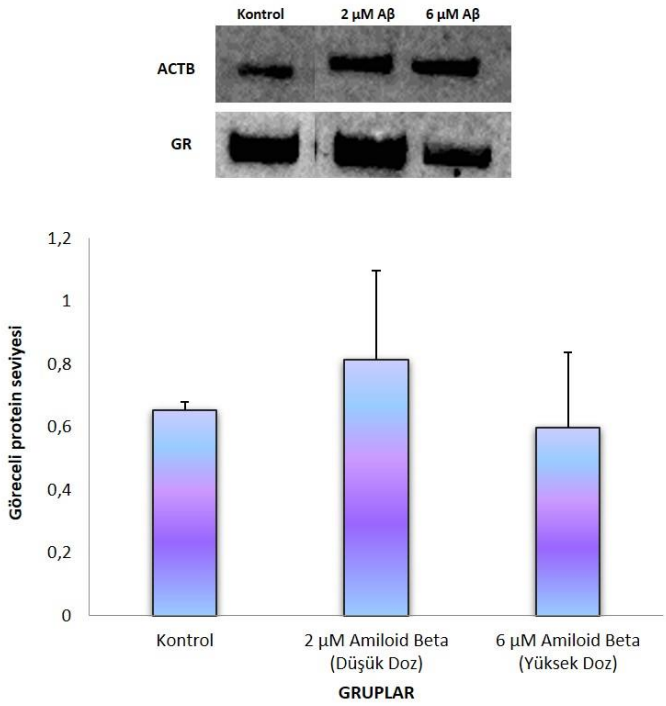
Şekil 4-31: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubuna ve 57,8 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede arttı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,001$).

4.4.1.2. Hippokampus Bölgesindeki GR Protein Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GR Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-32'de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

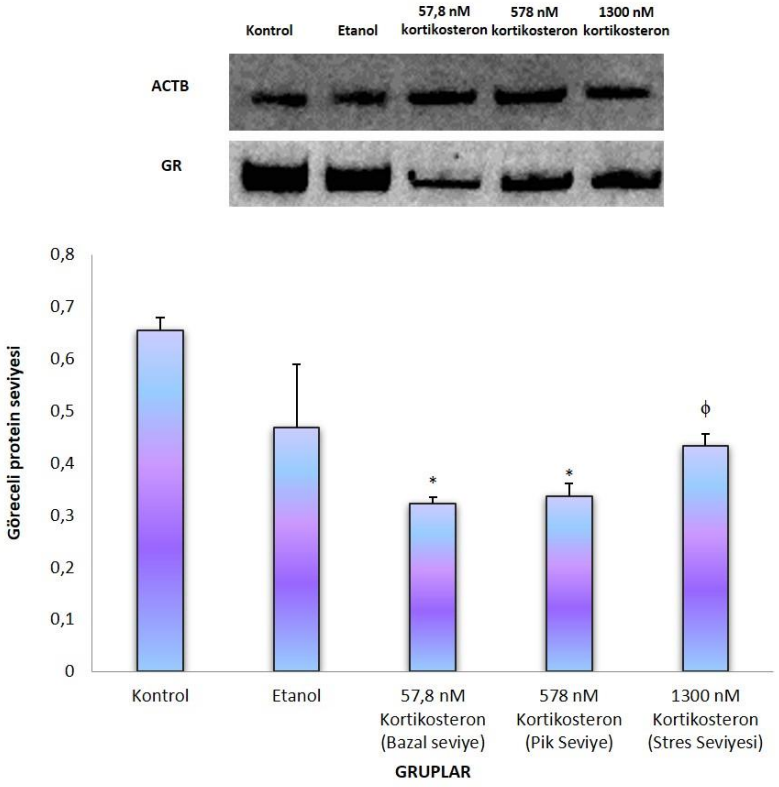


Şekil 4-32: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GR Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-33'te gösterilmiştir. 57,8 nM kortikosteron ve 578 nM kortikosteron uygulanan grupların GR protein ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$). Ayrıca 1300 nM kortikosteron uygulanan grubun GR protein ekspresyon seviyesinin 57,8 nM kortikosteron uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$).



Şekil 4-33: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

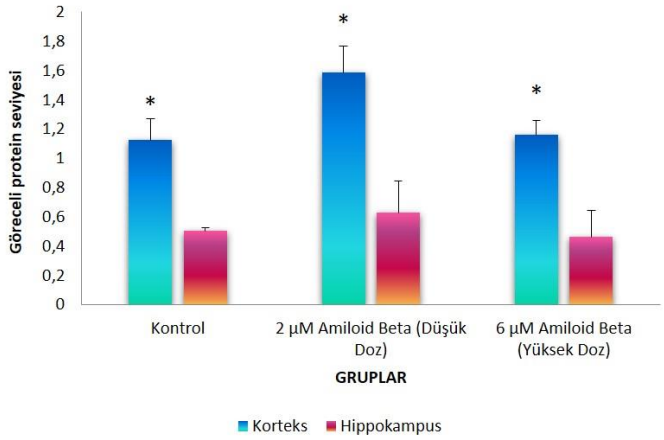
* Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$).

ϕ 578 nM kortikosteron uygulanan gruba göre daha yüksek ($p<0,05$).

4.4.1.3. GR Protein Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GR Protein Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GR protein ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; tüm grupların korteks bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinin hippokampus bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0002$; $p=0,0002$; $p=0,0002$). Bulgular Şekil 4-34'te gösterilmiştir.

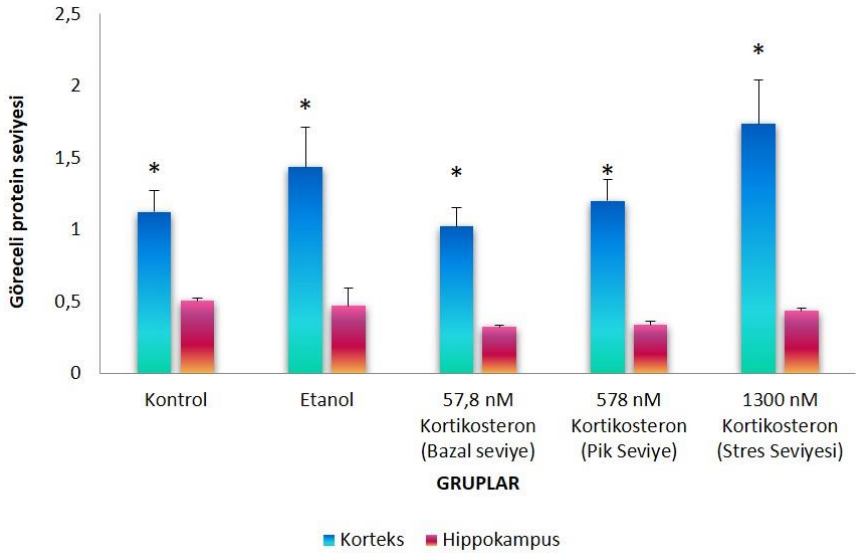


Şekil 4-34: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GR protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Hippokampus bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002; p=0,0002).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GR Protein Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GR protein ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; tüm grupların korteks bölgesindeki GR protein ekspresyon seviyesinin hippokampus bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002; p=0,0002; p=0,0002; p=0,0002). Bulgular Şekil 4-35'te gösterilmiştir.



Şekil 4-35: Kortikosteron uygulamaları sonucu GR protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

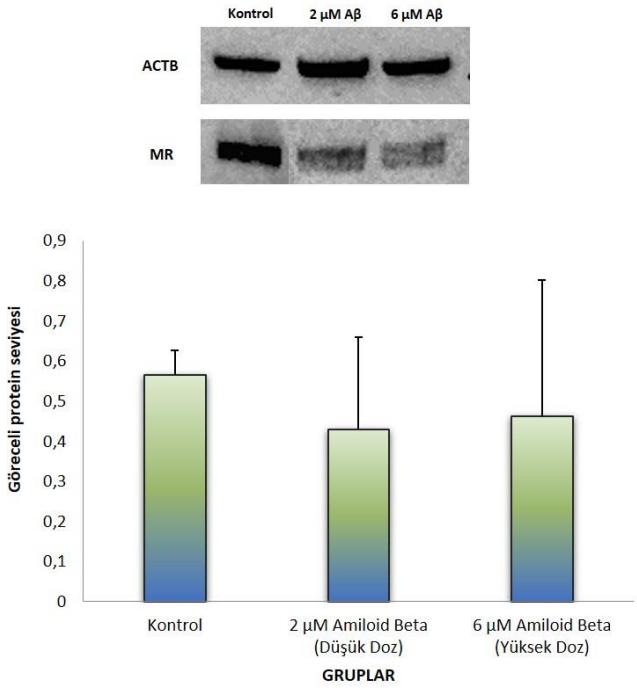
* Hippokampus bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002; p=0,0002; p=0,0002; p=0,0002).

4.4.2. Mineralokortikosteroid Reseptörü (MR) Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

4.4.2.1. Korteks Bölgesindeki MR Protein Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu MR Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-36'da gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

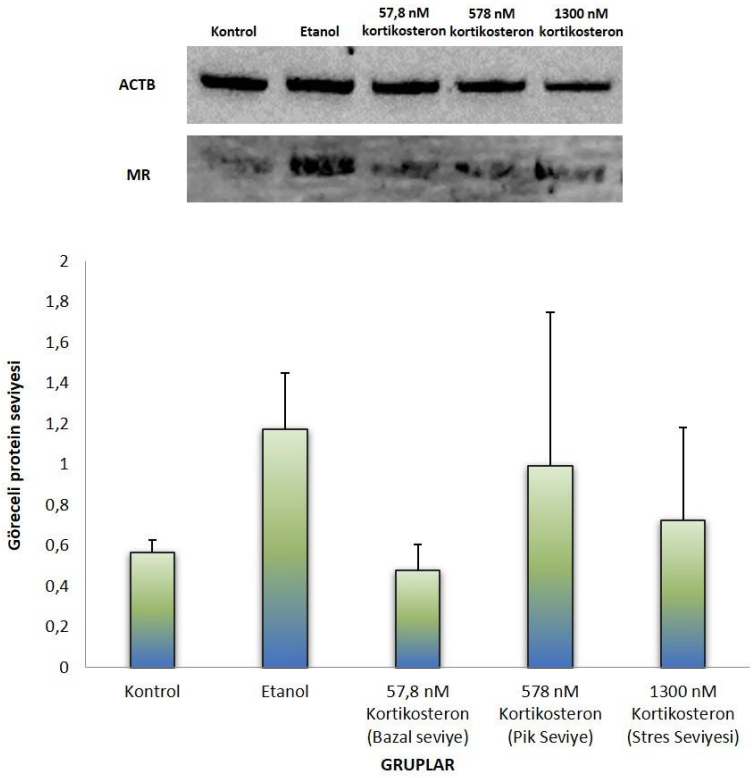


Şekil 4-36: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu MR Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-37'de gösterilmiştir. 57,8 nM kortikosteron uygulanan grubun MR protein ekspresyon seviyesinin diğer gruplara kıyasla azaldığı, ancak bu farkın istatistiksel olarak yakın anlamlı olduğu saptandı (p=0,0832).



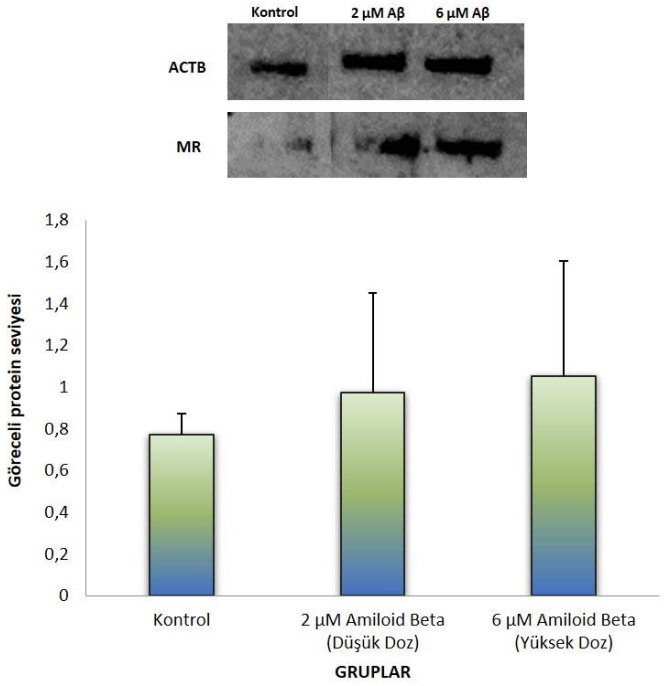
Şekil 4-37: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak yakın anlamlı fark saptandı (p=0,0832).

4.4.2.2. Hippokampus Bölgesindeki MR Protein Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu MR Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-38'de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

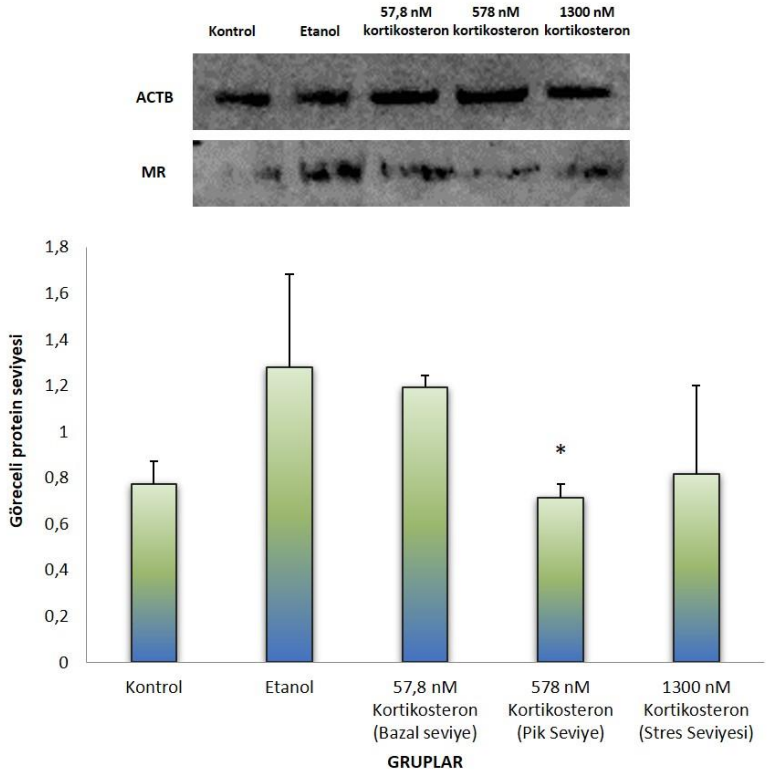


Şekil 4-38: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu MR Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-39'da gösterilmiştir. 578 nM kortikosteron uygulanan grubun MR protein ekspresyon seviyesinin kontrol grubu ve 57,8 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,01$).



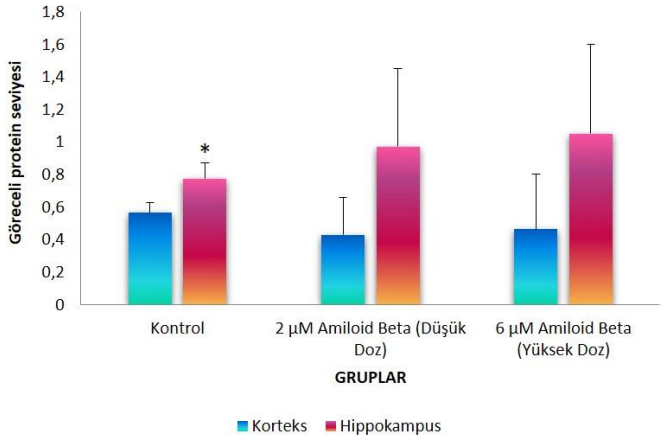
Şekil 4-39: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubu ve 57,8 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak azaldı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,01$).

4.4.2.3. MR Protein Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu MR Protein Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

MR protein ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubunun hippokampus bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı ($p=0,0002$). Bulgular Şekil 4-40'ta gösterilmiştir.

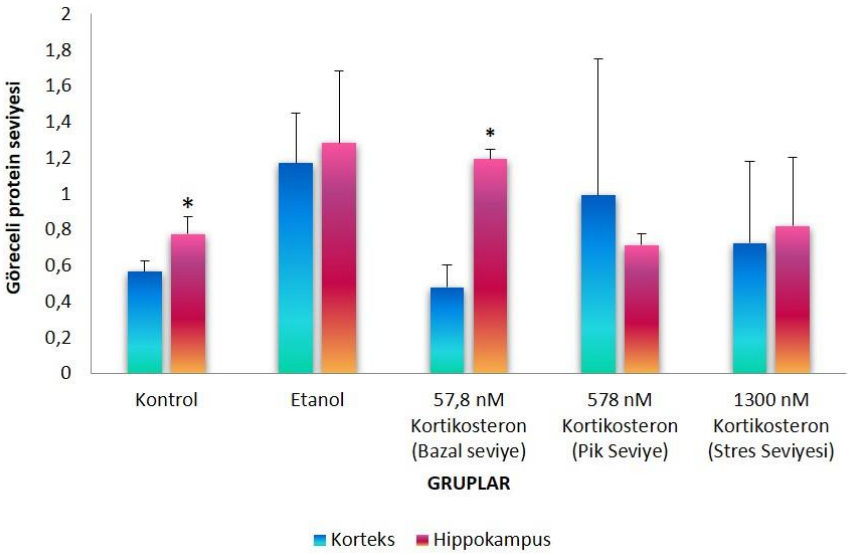


Şekil 4-40: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu MR protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (p=0,0002).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu MR Protein Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

MR protein ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubu ve 57,8 nM kortikoseron uygulanan grupların hippokampus bölgesindeki MR protein ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002). Bulgular Şekil 4-41'de gösterilmiştir.



Şekil 4-41: Kortikosteron uygulamaları sonucu MR protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

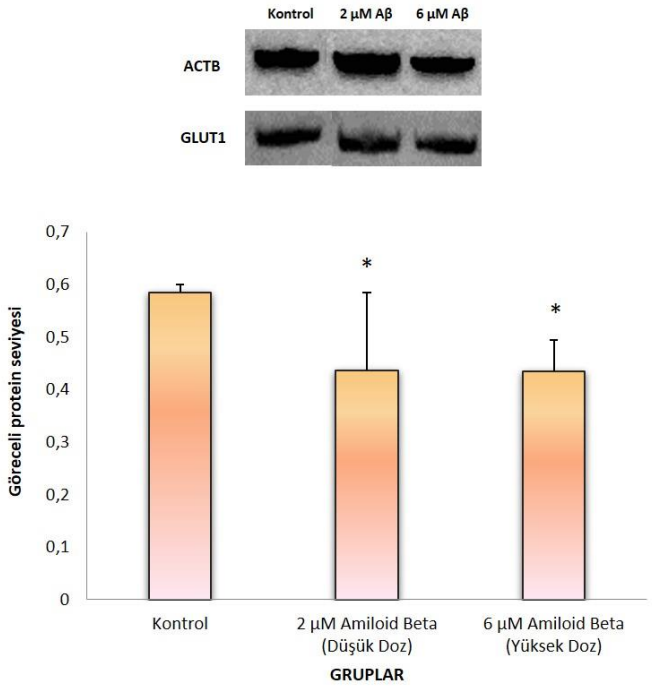
* Korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002).

4.4.3. GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

4.4.3.1. Korteks Bölgesindeki GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-42'de gösterilmiştir. 2 µM $A\beta_{1-42}$ ve 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupların GLUT1 protein ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,01$).

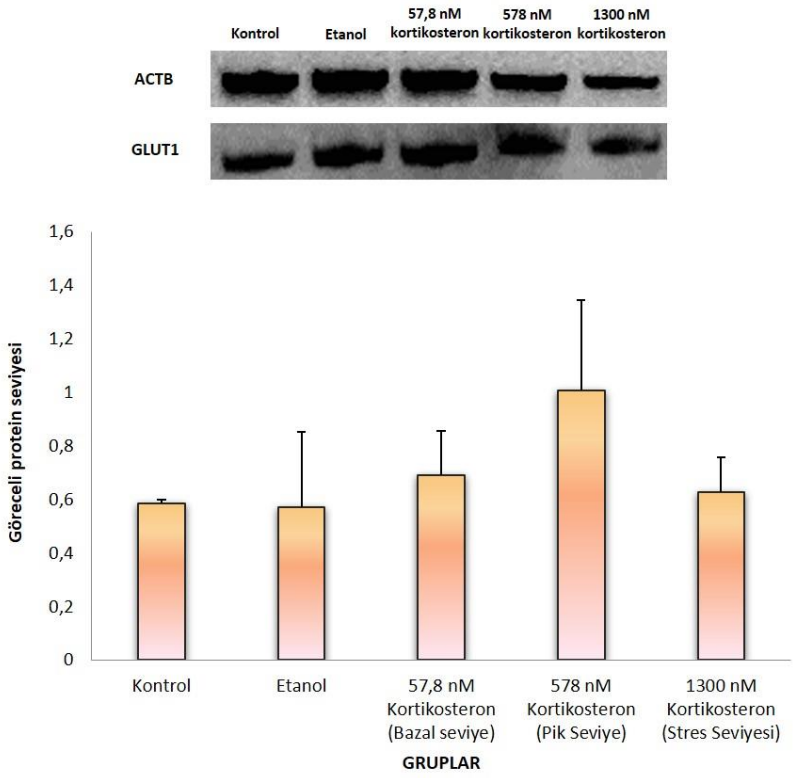


Şekil 4-42: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldı (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,01$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-43'te gösterilmiştir. 578 nM kortikosteron uygulanan grubun GLUT1 protein ekspresyon seviyesinin diğer gruplara kıyasla arttığı, ancak bu farkın istatistiksel olarak yakın anlamlı olduğu saptandı ($p=0,0722$).



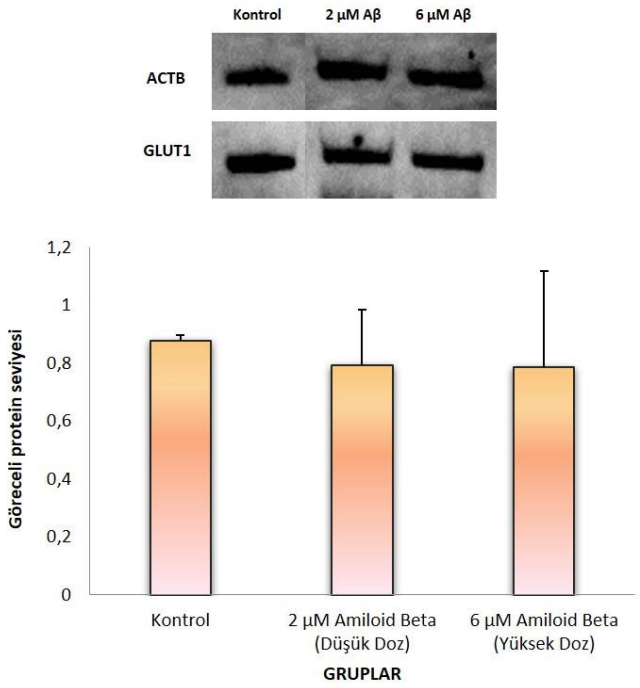
Şekil 4-43: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak yakın anlamlı fark saptandı (p=0,0722).

4.4.3.2. Hippokampus Bölgesindeki GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-44'te gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

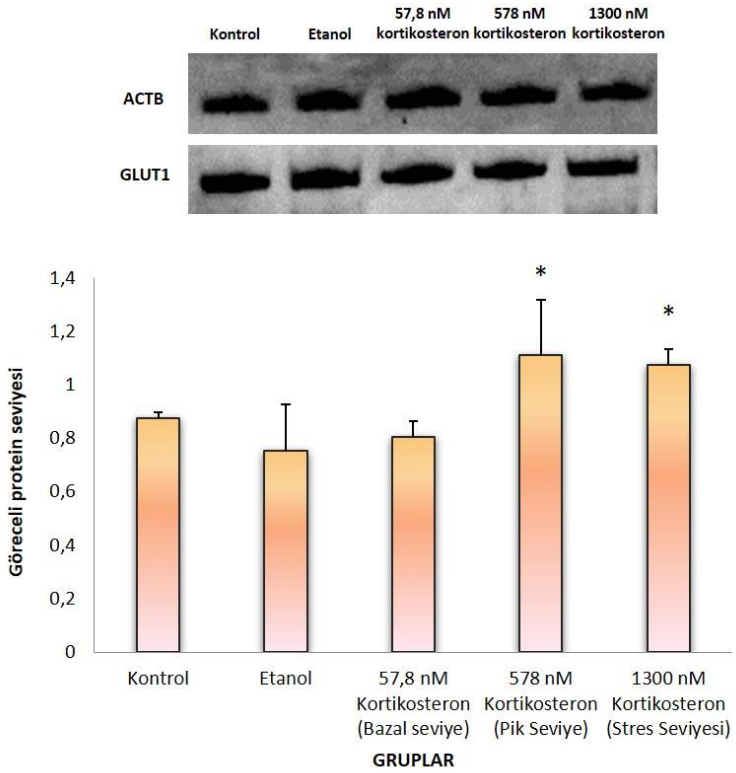


Şekil 4-44: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-45'te gösterilmiştir. 578 nM kortikosteron ve 1300 nM kortikosteron uygulanan grupların GLUT1 protein ekspresyon seviyesinin çözücü madde olarak kullanılan etanol uygulanan kontrol grubuna ve 57,8 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,001$).



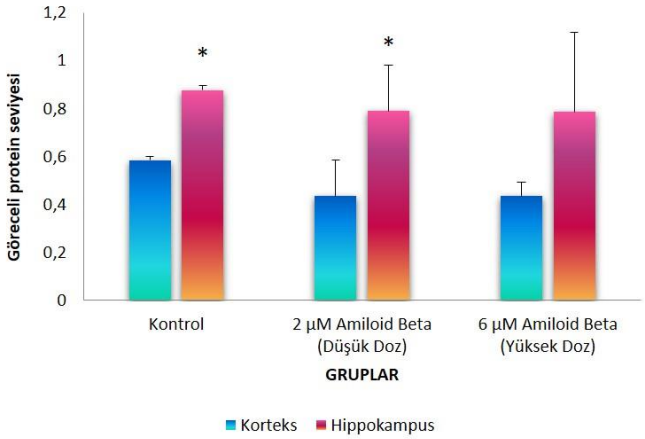
Şekil 4-45: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Etanol ve 57,8 nM kortikosteron uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak arttı (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,001$).

4.4.3.3. GLUT1 Protein Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT1 Protein Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GLUT1 protein ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubu ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun hippokampus bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0002$; $p=0,0002$). Bulgular Şekil 4-46'da gösterilmiştir.

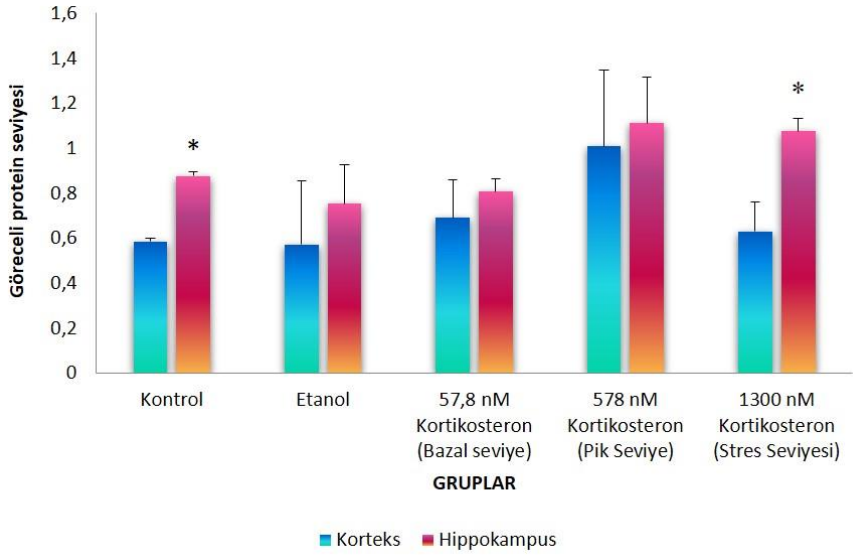


Şekil 4-46: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GLUT1 protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT1 Protein Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GLUT1 protein ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubu ve 1300 nM kortikosteron uygulanan grubun hippokampus bölgesindeki GLUT1 protein ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002). Bulgular Şekil 4-47'de gösterilmiştir.



Şekil 4-47: Kortikosteron uygulamaları sonucu GLUT1 protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

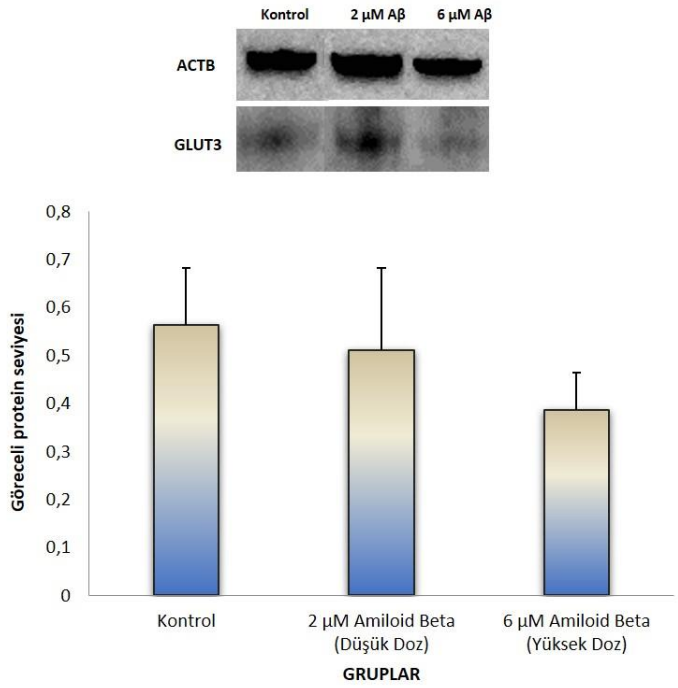
* Korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002).

4.4.4. GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

4.4.4.1. Korteks Bölgesindeki GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-48'de gösterilmiştir. 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun GLUT3 protein ekspresyon seviyesinin diğer gruplara kıyasla azaldığı, ancak bu farkın istatistiksel olarak yakın anlamlı olduğu saptandı (p=0,0531).

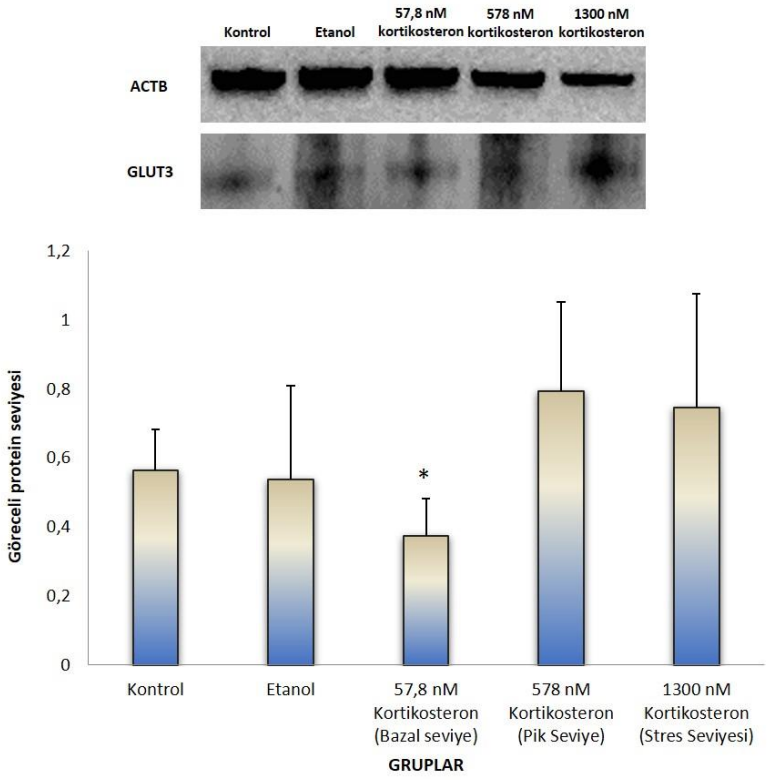


Şekil 4-48: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak yakın anlamlı fark saptandı (p=0,0531).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-49'da gösterilmiştir. 57,8 nM kortikosteron uygulanan grubun GLUT3 protein ekspresyon seviyesinin 578 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu saptandı ($p<0,01$).



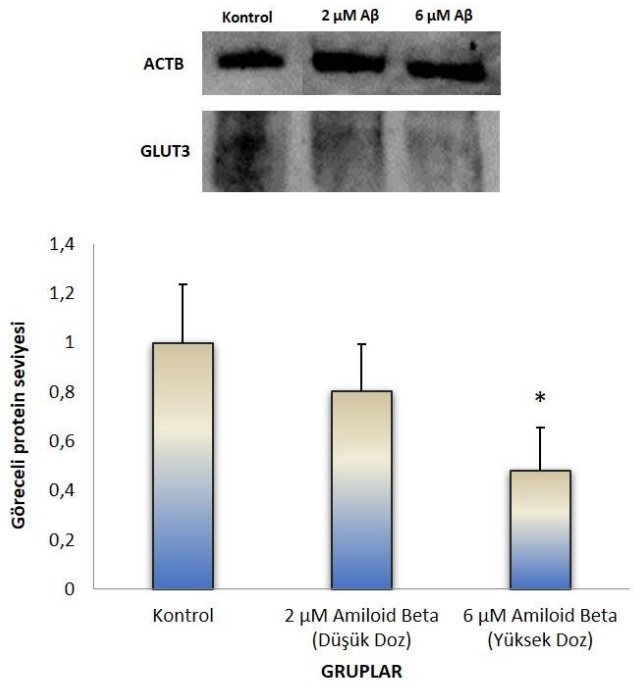
Şekil 4-49: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* 578 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak daha düşük ($p<0,01$).

4.4.4.2. Hippokampus Bölgesindeki GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-50'de gösterilmiştir. 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun GLUT3 protein ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p<0,001$).

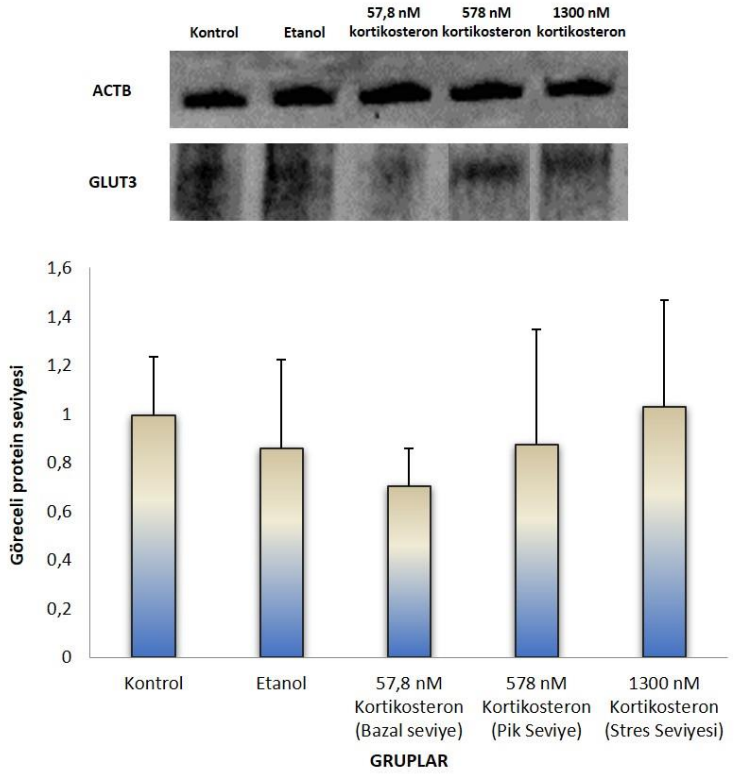


Şekil 4-50: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldı ($p<0,001$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-51'de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.



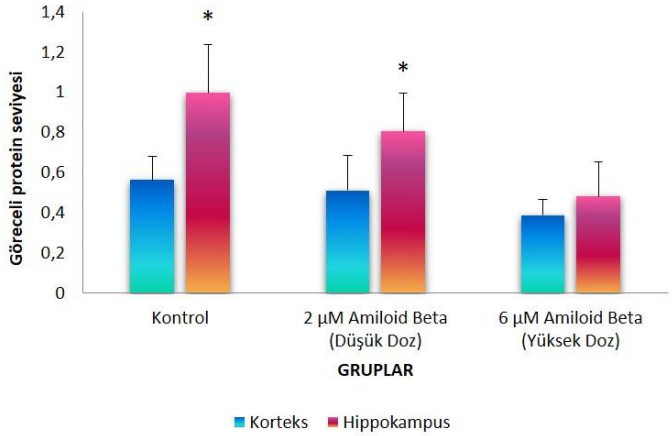
Şekil 4-51: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

4.4.4.3. GLUT3 Protein Ekspresyon Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu GLUT3 Protein Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GLUT3 protein ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubu ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun hippokampus bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=0,0002; p=0,0379). Bulgular Şekil 4-52'de gösterilmiştir.

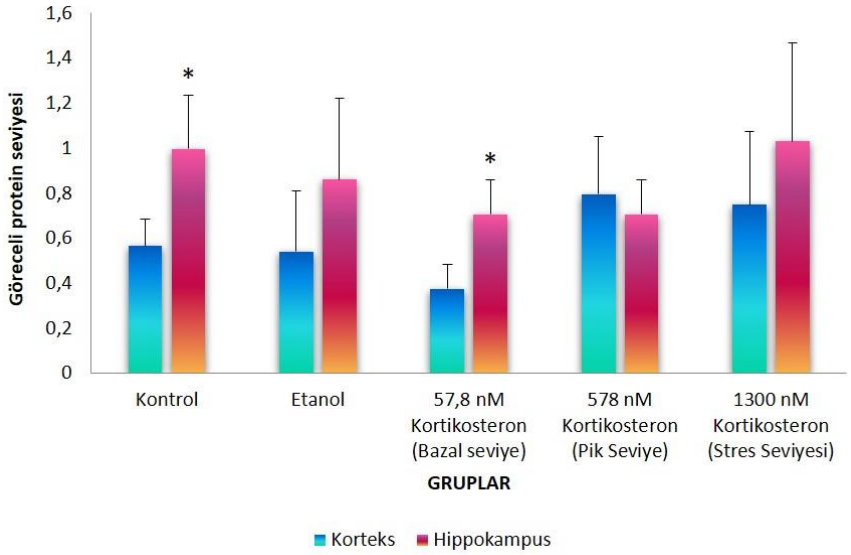


Şekil 4-52: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GLUT3 protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (sırasıyla p=0,0002; p=0,0379).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu GLUT3 Protein Ekspresyonunda Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

GLUT3 protein ekspresyon seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubu ve 57,8 nM kortikosteron uygulanan grubun hippokampus bölgesindeki GLUT3 protein ekspresyon seviyesinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002). Bulgular Şekil 4-53'te gösterilmiştir.



Şekil 4-53: Kortikosteron uygulamaları sonucu GLUT3 protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

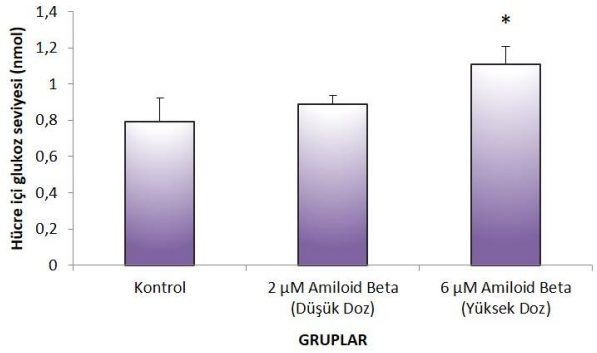
* Korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (sırasıyla p=0,0002; p=0,0002).

4.5. Hücre İçi Glukoz Seviyesi

4.5.1. Korteks Bölgesindeki Glukoz Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu Hücre İçi Glukoz Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-54'te gösterilmiştir. 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun hücre içi glukoz seviyesinin kontrol grubuna ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,05$).

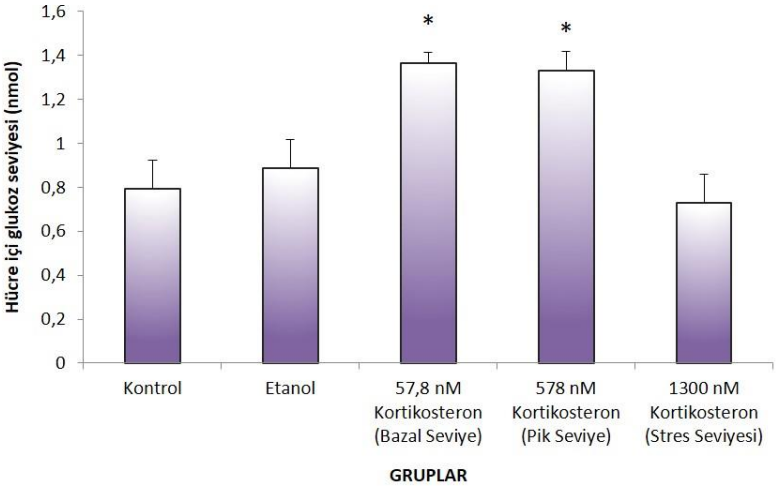


Şekil 4-54: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubu ve 2 µM Aβ1-42 uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak arttı (sırasıyla p<0,01; p<0,05).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu Hücre İçi Glukoz Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda korteks bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-55'te gösterilmiştir. 57,8 nM kortikosteron ve 578 nM kortikosteron uygulanan grupların hücre içi glukoz seviyesinin kontrol grubu ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla p<0,05; p<0,05; p<0,01; p<0,01).



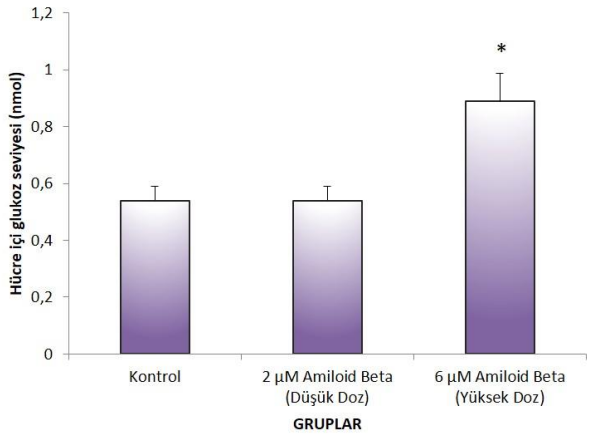
Şekil 4-55: Kortikosteron uygulamaları sonucu korteks bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubu ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak arttı (sırasıyla p<0,05; p<0,05; p<0,01; p<0,01).

4.5.2. Hippokampus Bölgesindeki Glukoz Seviyesi

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu Hücre İçi Glukoz Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-56'da gösterilmiştir. 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grubun hücre içi glukoz seviyesinin kontrol grubuna ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,01$).

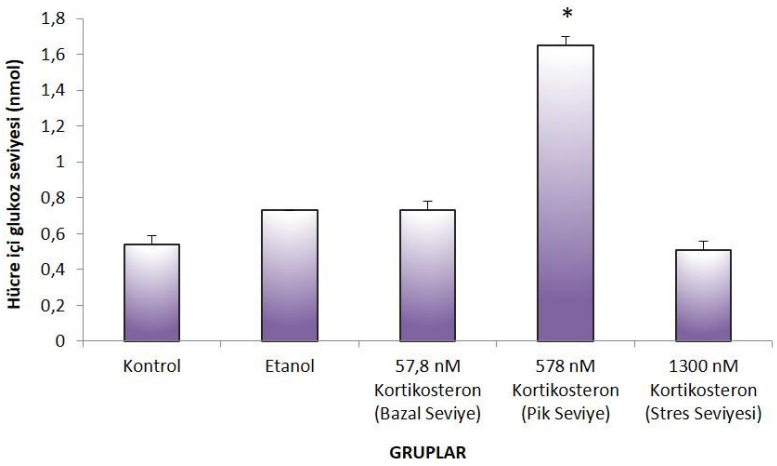


Şekil 4-56: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubu ve 2 µM Aβ1-42 uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak arttı (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,05$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu Hücre İçi Glukoz Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler**

Beyin organotipik kesit kültürüne 96 saat süreyle yapılan kortikosteron uygulamaları sonucunda hippokampus bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-57'de gösterilmiştir. 578 nM kortikosteron uygulanan grubun hücre içi glukoz seviyesinin kontrol grubu ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$).



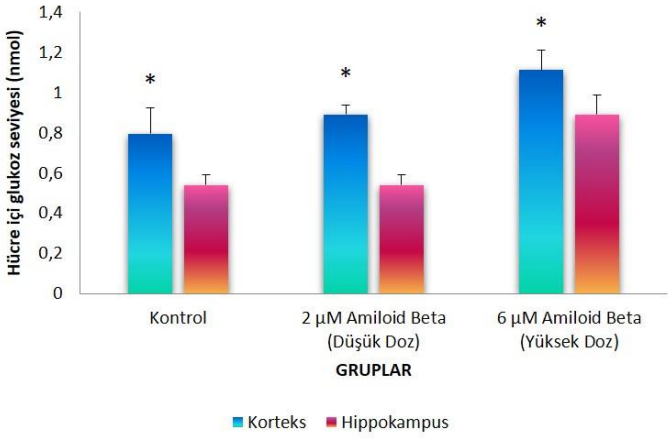
Şekil 4-57: Kortikosteron uygulamaları sonucu hippokampus bölgesindeki hücre içi glukoz seviyesinde görülen değişimler.

* Kontrol grubu ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak arttı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$).

4.5.2.1. Hücre içi Glukoz Seviyesinin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması

- **$A\beta_{1-42}$ Uygulamaları Sonucu Hücre İçi Glukoz Seviyesinde Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

Hücre içi glukoz seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; tüm grupların korteks bölgesinde glukoz seviyesinin hippokampus bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,0022$; $p=0,0022$; $p=0,0022$). Bulgular Şekil 4-58'de gösterilmiştir.

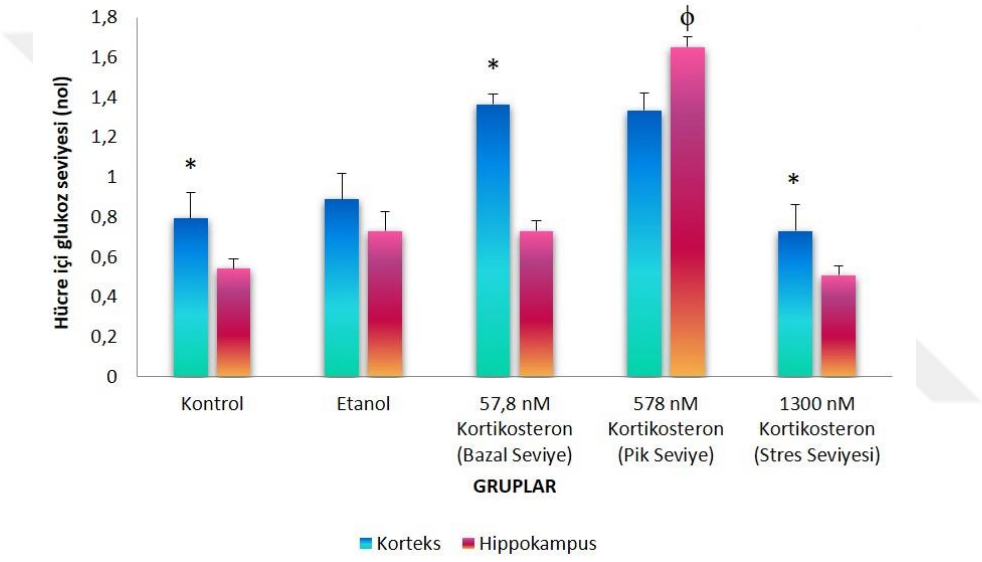


Şekil 4-58: $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu hücre içi glukoz seviyesinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Hippokampus bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (sırasıyla $p=0,0022$; $p=0,0022$; $p=0,0022$).

- **Kortikosteron Uygulamaları Sonucu Hücre İçi Glukoz Seviyesinde Meydana Gelen Değişimlerin Beyin Bölgeleri Arasında Karşılaştırılması**

Hücre içi glukoz seviyeleri korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubu, 57,8 nM kortikosteron ve 1300 nM kortikosteron uygulanan grupların korteks bölgesindeki glukoz seviyesinin hippokampus bölgesine kıyasla, 578 nM kortikosteron uygulanan grubun ise hippokampus bölgesindeki glukoz seviyesinin korteks bölgesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=0,0022; p=0,0022; p=0,0022; p=0,0127). Bulgular Şekil 4-59'da gösterilmiştir.



Şekil 4-59: Kortikosteron uygulamaları sonucu hücre içi glukoz seviyesinde meydana gelen değişimlerin korteks ve hippokampus bölgeleri arasında karşılaştırılması.

* Hippokampus bölgesine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek (sırasıyla p=0,0022; p=0,0022; p=0,0022).

ϕ Korteks bölgesine göre istatistiksel olarak daha yüksek (p=0,0127).

Elde edilen tüm mRNA ve protein seviyelerindeki değişim bulguları Tablo 4-1'de özetlenmiştir.

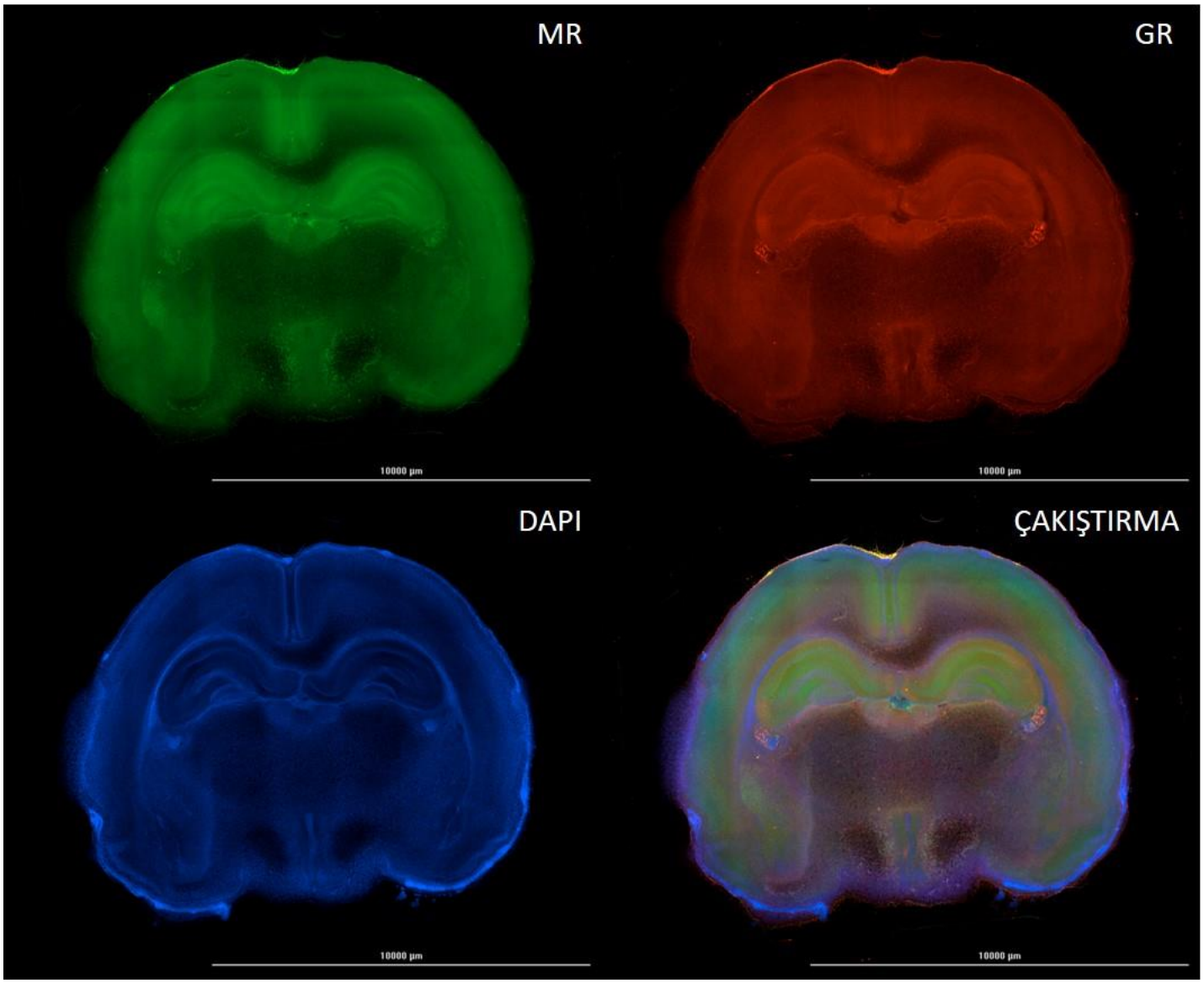
Tablo 4-1: Tüm bulguların özetlenmesi.

	2 µM $A\beta_{1-42}$ (Düşük Doz)		6 µM $A\beta_{1-42}$ (Yüksek Doz)		57,8 nM kortikosteron (Bazal seviye)		578 nM kortikosteron (Pik seviye)		1300 nM kortikosteron (Stres seviyesi)	
	Korteks	**Hippokampus**	**Korteks**	**Hippokampus**	**Korteks**	**Hippokampus**	**Korteks**	**Hippokampus**	**Korteks**	**Hippokampus**
GR mRNA seviyesi	-	-	Kontrol ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ gruplarına göre **artmış**	-	-	-	-	Kontrol grubuna göre **azalmış**	Kontrol ve etanol gruplarına göre **azalmış**	-
GR protein seviyesi	Kontrol ve 6 µM $A\beta_{1-42}$ gruplarına göre **artmış**	-	-	-	-	Kontrol grubuna göre **azalmış**	-	Kontrol grubuna göre **azalmış**	Kontrol ve 57,8 nM kortikosteron gruplarına göre **artmış**	57,8 nM kortikosteron grubuna göre **artmış**
MR mRNA seviyesi	Kontrol ve 6 µM $A\beta_{1-42}$ gruplarına göre **artmış**	-	Kontrol grubuna göre **artmış**	2 µM $A\beta_{1-42}$ grubuna göre **artmış**	-	-	Diğer gruplara göre **azalmış**	Diğer gruplara göre **azalmış***	-	-
MR protein seviyesi	-	-	-	-	Diğer gruplara göre **azalmış***	-	-	Kontrol ve 57,8 nM kortikosteron gruplarına göre **azalmış**	-	-
GLUT1 mRNA seviyesi	-	-	Kontrol grubuna göre **azalmış**	Kontrol ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ gruplarına göre **artmış**	-	-	Etanol, 57,8 nM ve 1300 nM kortikosteron gruplarına göre **artmış**	-	-	Etanol, 57,8 nM, 578 nM kortikosteron gruplarına göre **artmış**
GLUT1 protein seviyesi	Kontrol grubuna göre **azalmış**	-	Kontrol grubuna göre **azalmış**	-	-	-	Diğer gruplara göre **artmış***	Etanol ve 57,8 nM kortikosteron gruplarına göre **artmış**	-	Etanol ve 57,8 nM kortikosteron gruplarına göre **artmış**
GLUT3 mRNA seviyesi	-	-	-	-	-	-	-	57,8 nM ve 1300 nM kortikosteron gruplarına göre **artmış**	-	-
GLUT3 protein seviyesi	-	-	Kontrol ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ gruplarına göre **azalmış***	Kontrol grubuna göre **azalmış**	578 nM kortikosteron grubuna göre **azalmış**	-	-	-	-	-
Hücre içi glukoz seviyesi	-	-	Kontrol ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ gruplarına göre **artmış**	Kontrol ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ gruplarına göre **artmış**	Kontrol ve 1300 nM kortikosteron gruplarına göre **artmış**	-	Kontrol ve 1300 nM kortikosteron gruplarına göre **artmış**	Kontrol ve 1300 nM kortikosteron gruplarına göre **artmış**	-	-

* İstatistiksel olarak yakın anlamlı

4.6. İMMÜNFLORESAN İŞARETLEME SONUÇLARI

Kontrol grubuna ait beyin koronal kesitinde yer alan ventriküler sistem hariç korteks, hippokampus, talamus, bazal ön beyin ve hipotalamus dahil olmak üzere tüm beyin bölgelerinde yaygın bir şekilde GR ve MR immünpozitifliği görüldü (Şekil 4-60).



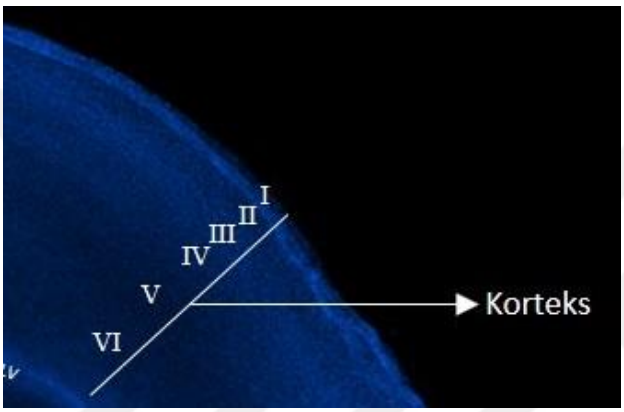
Şekil 4-60: GR ve MR'nin beyindeki dağılımlarının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

Kesitler, Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılarak görüntülendi. Elde edilen 81 adet görüntü, Gen5 (Biotek) yazılımı kullanılarak montaj ve dekonvolüsyon işlemleri sonrası birleştirilerek tek bir görüntü haline getirildi. MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Büyütme: 4X.

Tüm görüntüler, aynı floresans görüntüleme koşullarında elde edildi. Yeşil (GFP) filtre için LED yoğunluğu: 10, integrasyon süresi: 100 milisaniye, kamera gürültüsü: 0,112; kırmızı (TR) filtre için LED yoğunluğu: 10, integrasyon süresi: 100 milisaniye, kamera gürültüsü: 12,6; mavi (DAPI) filtre için ise LED yoğunluğu: 5, integrasyon süresi: 46 milisaniye, kamera gürültüsü: 0 olarak ayarlandı.

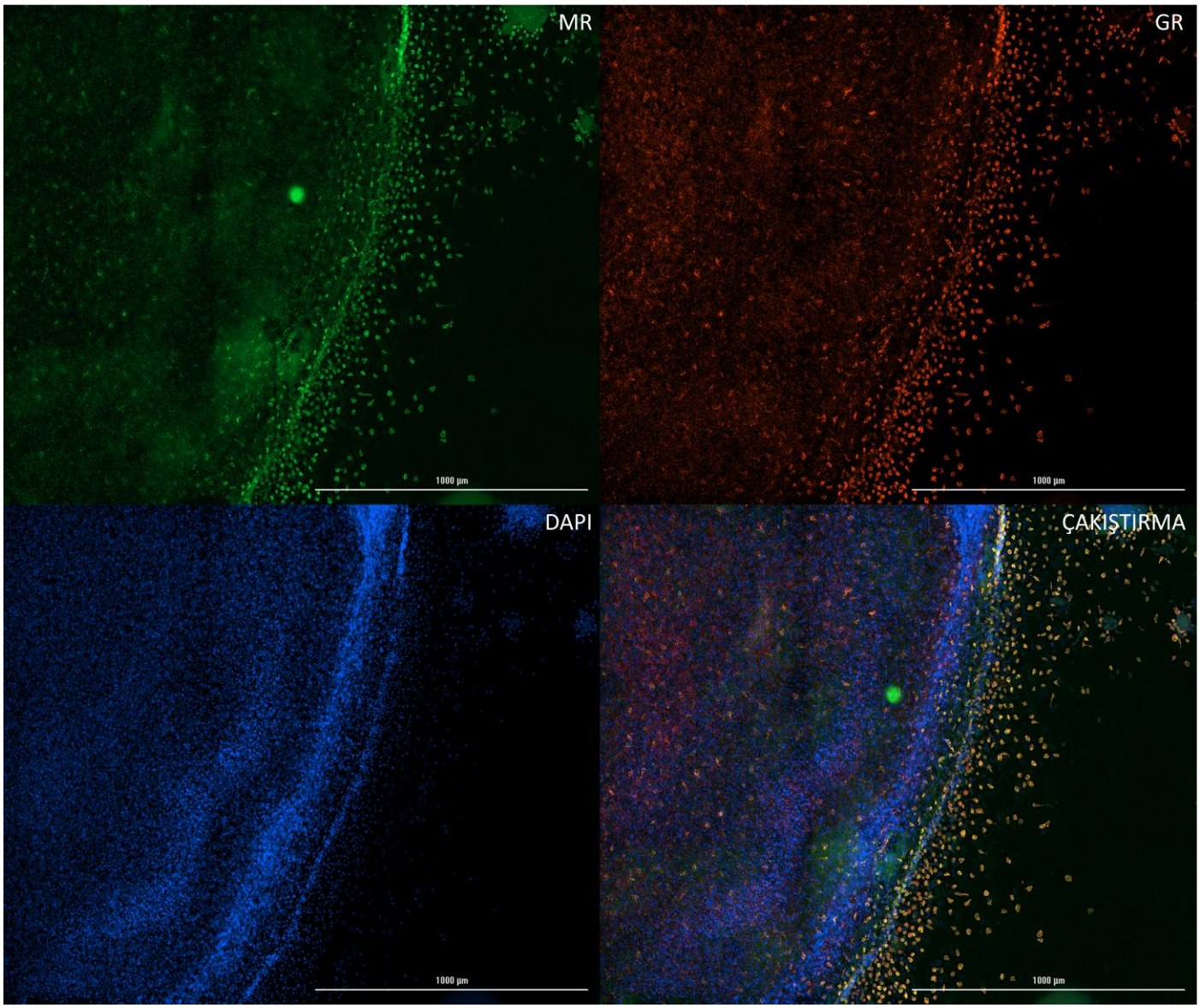
4.6.1. Korteks Bölgesinin İmmünfloresan Değerlendirmesi

Yapılan uygulamalar sonucu GR ve MR'nin dağılımlarının, korteksin alt tabakalarında (Şekil 4-61) nasıl değiştiği immünfloresan işaretleme yöntemi ile incelendi.



Şekil 4-61: Korteksin alt tabakaları.

Herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda, korteksin I. tabakasında daha güçlü olmak üzere tüm tabakalarında GR ve MR immünpozitifliği saptandı. Bu immünpozitiflik GR için daha kuvvetliydi. Ayrıca daha fazla sayıda kortikal hücrenin GR immünpozitif olduğu görüldü. Dokunun sağlıklı olduğunun bir belirtisi olan dışa yayılım gösteren tüm hücrelerde ise GR ve MR immün işaretlenme şiddetinin kortikal hücrelere göre daha fazla olduğu ve tüm hücrelerde kolokalize oldukları saptandı (Şekil 4-62).

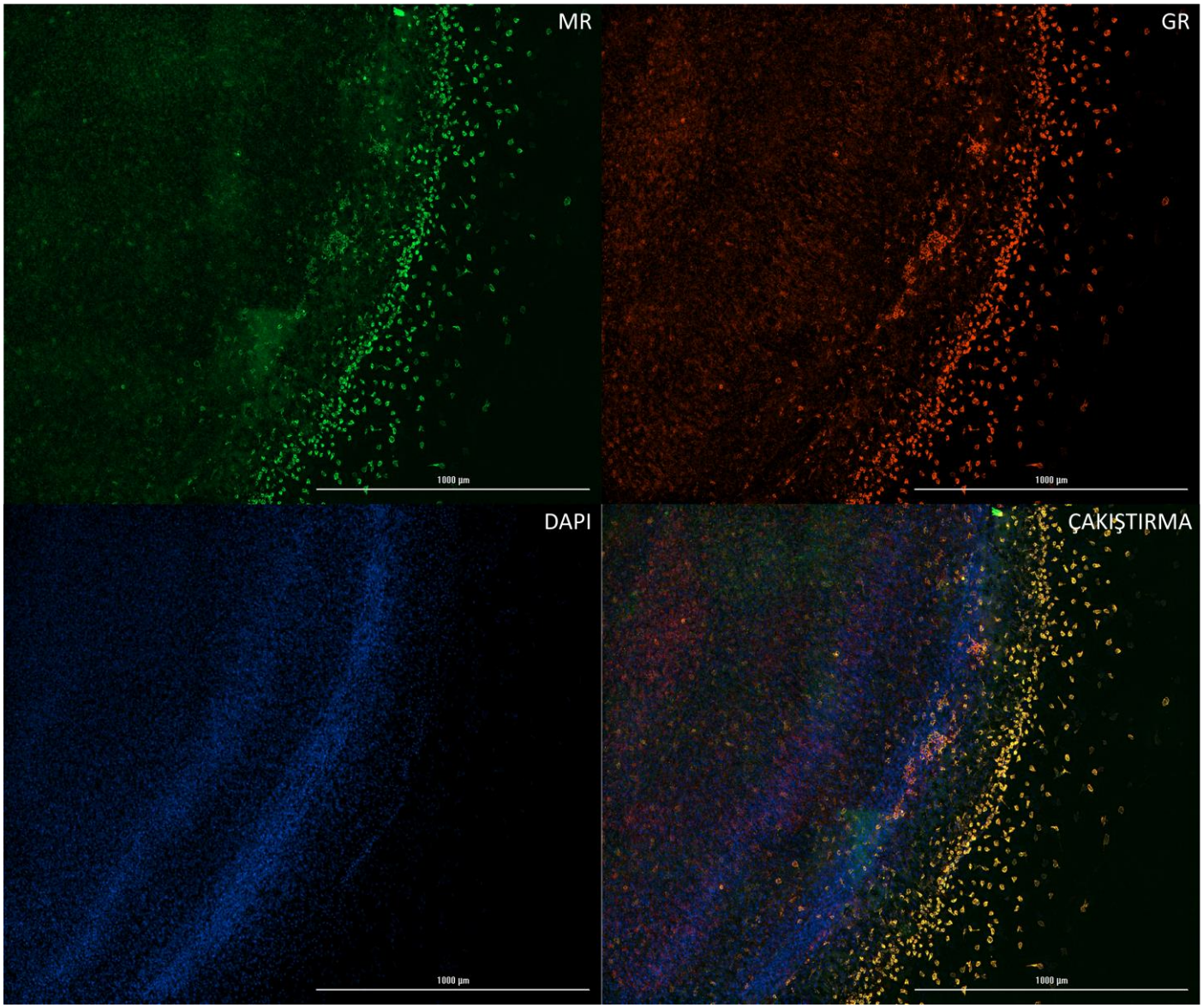


Şekil 4-62: Herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

Çözücü madde etkisini görmek üzere ikinci kontrol grubu olarak etanol uygulanan grupta da korteksin tüm tabakalarında GR ve MR immünpozitifliği saptandı, ancak korteksin I. tabakasında immünpozitiflik daha kuvvetliydi. Korteksin I. tabakasındaki GR ve MR immün işaretlenme şiddeti kontrol grubuna göre daha fazlaydı. Kontrol grubuna benzer şekilde, etanol uygulanan grupta da diğer korteks tabakalarında immünpozitiflik GR için MR'ye kıyasla daha şiddetliydi ve daha fazla sayıda kortikal hücrede GR için immünpozitiflik saptandı. Dokudan dışarıya doğru yayılım gösteren tüm hücrelerin ise

immünpozitiflik şiddeti ve GR-MR kolokalizasyonları kontrol grubuna benzerdi (Şekil 4-63).

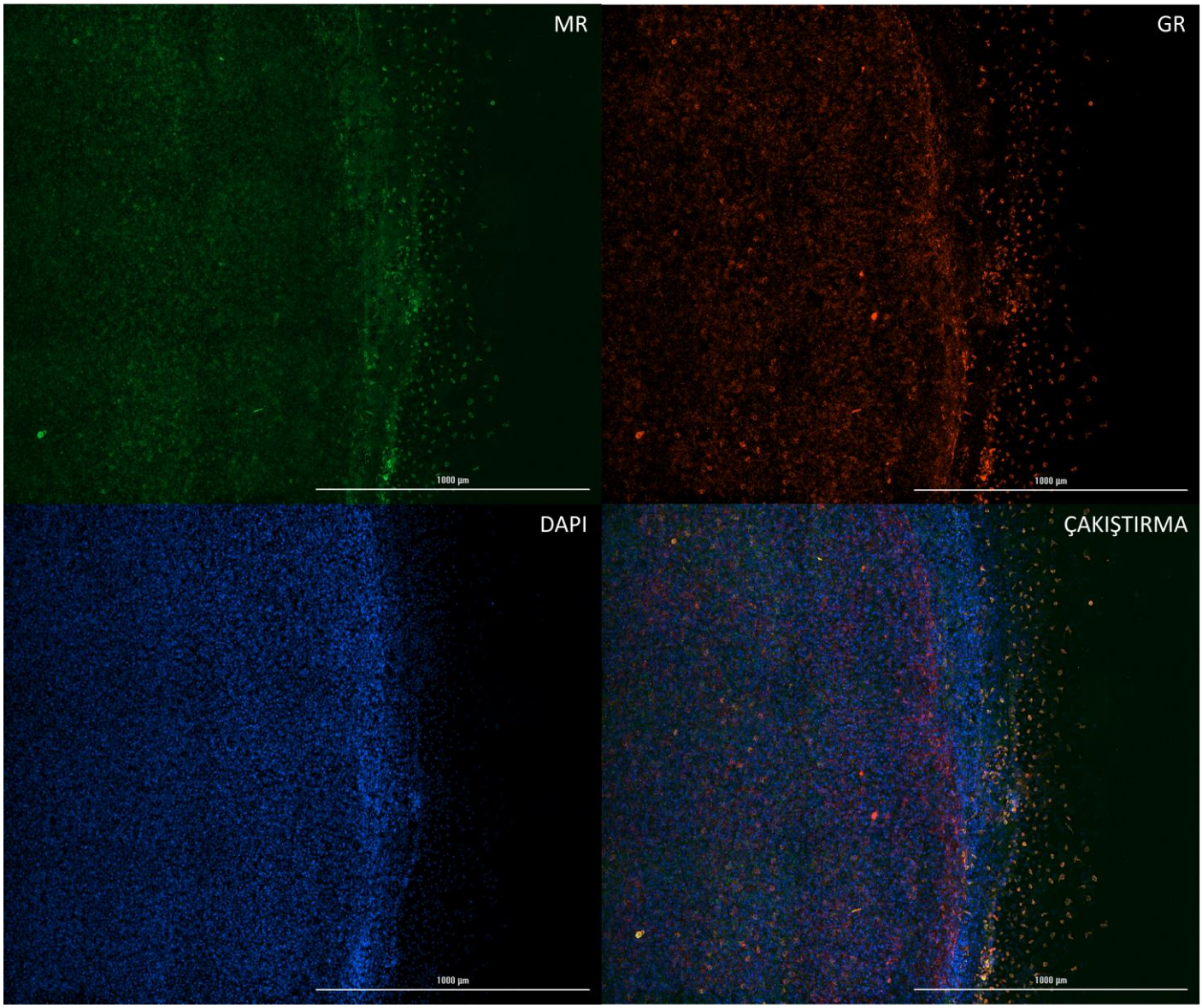


Şekil 4-63: Etanol uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

57,8 nM kortikosteron uygulanan grupta korteksin her tabakasında GR ve MR immünpozitifliği mevcut olmasına rağmen bu immünpozitifliğin şiddeti kontrol grubu ve etanol uygulanan gruba göre daha zayıftı. Korteksin I. tabakasındaki GR ve MR immün işaretleme şiddeti ve immünpozitif hücre sayısı kontrol grubu, etanol, 578 nM kortikosteron ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruplara kıyasla azalmıştı. Kontrol grubu ve etanol

uygulanan grupta korteksin I. tabakası hariç diğer tabakalarında yer alan hücrelerin hücre gövdelerinde lokalize gözüken GR'nin, 57,8 nM kortikosteron uygulanan grupta immün işaretlenme şiddetinin zayıfladığı görüldü (Şekil 4-64).

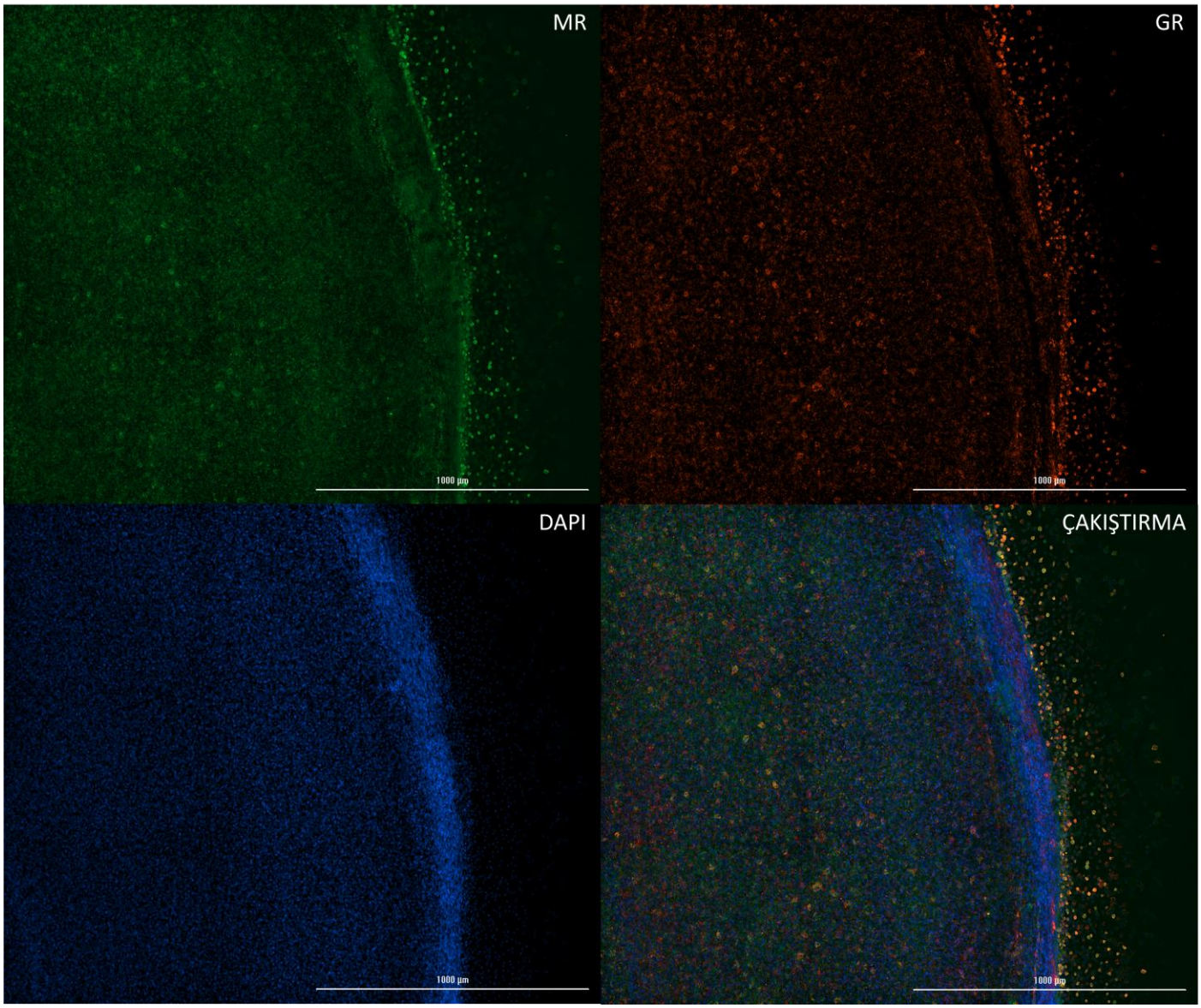


Şekil 4-64: 57,8 nM kortikosteron uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

578 nM kortikosteron uygulanan grupta korteksin her tabakasında GR ve MR immünpozitifliği mevcut olmasına rağmen bu immünpozitifliğin şiddeti 57,8 nM ve 1300 nM kortikosteron uygulanan gruplara benzer şekilde, kontrol grubu ve etanol uygulanan gruba göre daha zayıftı. Korteksin I. tabakasındaki GR ve MR immün işaretleme şiddeti ve

immünpozitif hücre sayısı 57,8 nM kortikosteron uygulanan gruba göre daha fazlaydı. Kontrol grubunda dışa yayılım gösteren tüm hücrelerde GR-MR immünpozitifliği saptanırken, 578 nM kortikosteron uygulanan grupta her hücrenin GR-MR immünpozitif olmadığı ve MR immünpozitifliğinin ise kontrol grubu ve etanol uygulanan gruba göre oldukça az sayıda hücrede olduğu saptandı (Şekil 4-65).

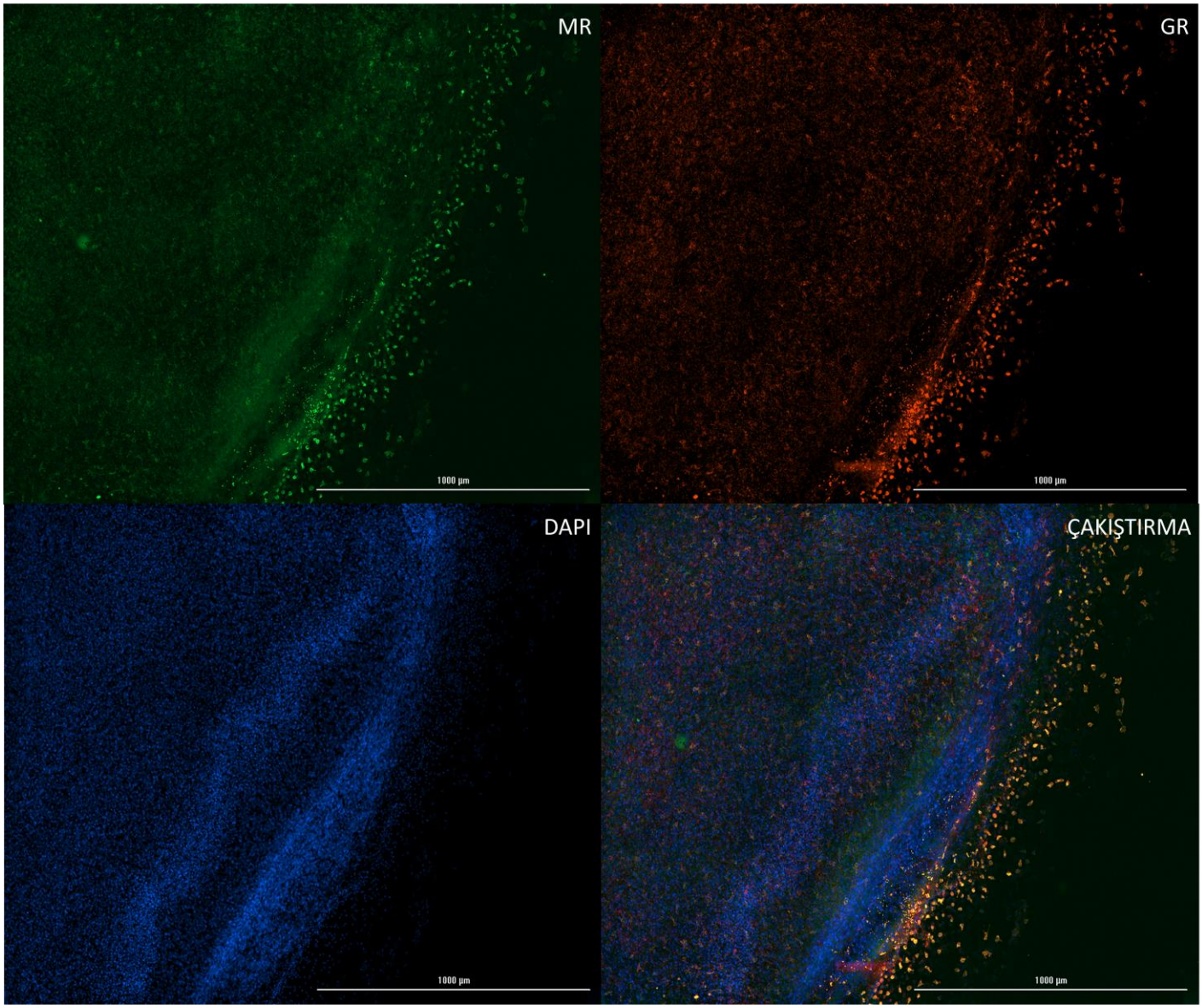


Şekil 4-65: 578 nM kortikosteron uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

1300 nM kortikosteron uygulanan grupta korteksin her tabakasında GR ve MR immünpozitifliği mevcut olmasına rağmen bu immünpozitifliğin şiddeti 57,8 nM ve 578 nM

kortikosteron uygulanan gruplara benzer şekilde, kontrol grubu ve etanol uygulanan gruba göre daha zayıftı. Korteksin I. tabakasındaki GR ve MR immün işaretleme şiddeti 578 nM kortikosteron uygulanan gruba göre daha fazlaydı (Şekil 4-66).

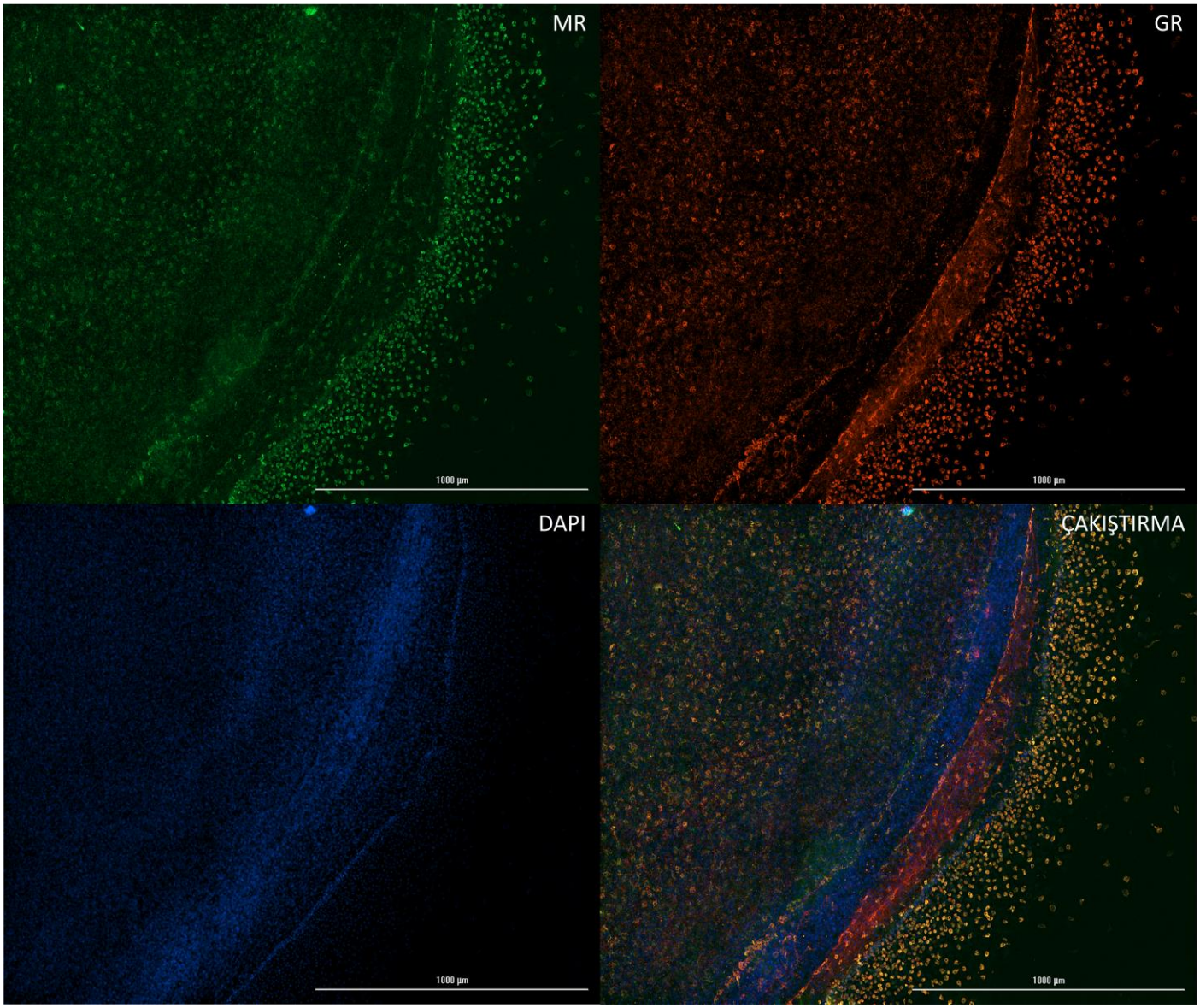


Şekil 4-66: 1300 nM kortikosteron uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta korteksin her tabakasında GR ve MR immünpozitifliği mevcuttu ve bu immünpozitifliğin şiddeti kontrol grubuna göre daha güçlüydü. Ayrıca yine kontrol grubuna kıyasla daha fazla sayıda kortikal hücrenin GR ve

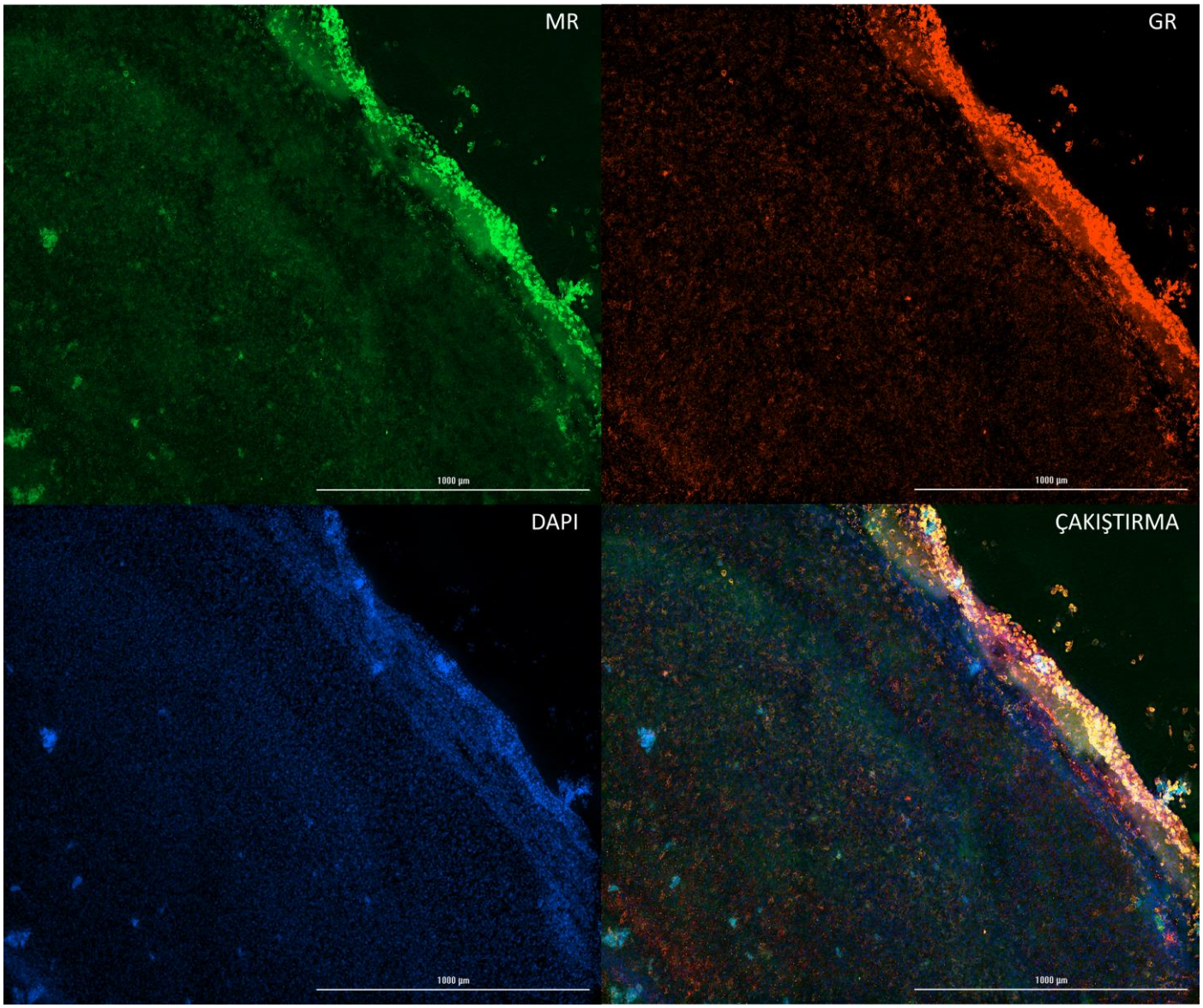
MR immünpozitif olduğu görüldü. GR lokalizasyonunun ise hücre gövdesinde belirgin bir şekilde arttığı görüldü (Şekil 4-67).



Şekil 4-67: 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta korteksin her tabasında GR ve MR immünpozitifliği mevcuttu ve bu immünpozitifliğin şiddeti kontrol grubuna göre daha güçlüydü. Korteksin I. tabakasındaki GR ve MR immün işaretlenme şiddeti kontrol grubu ve 2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan gruba göre daha fazlaydı. Dokunun sağlıklı olduğununun bir belirteci olan dışa yayılım gösteren hücrelerin ise sayısının azaldığı saptandı (Şekil 4-68).

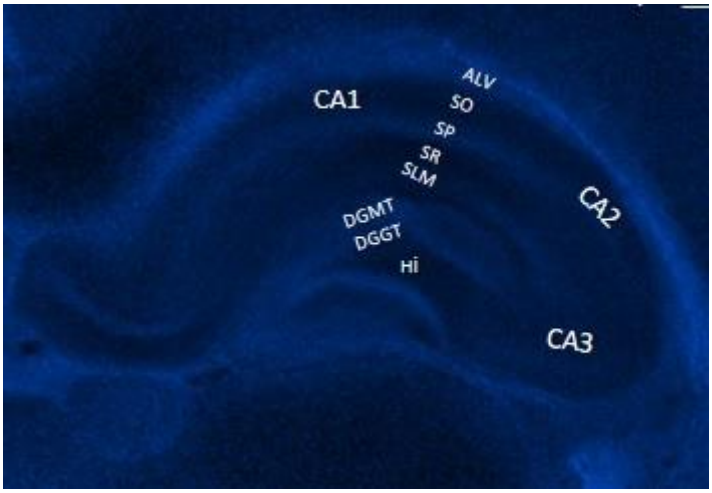


Şekil 4-68: 6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta korteks bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

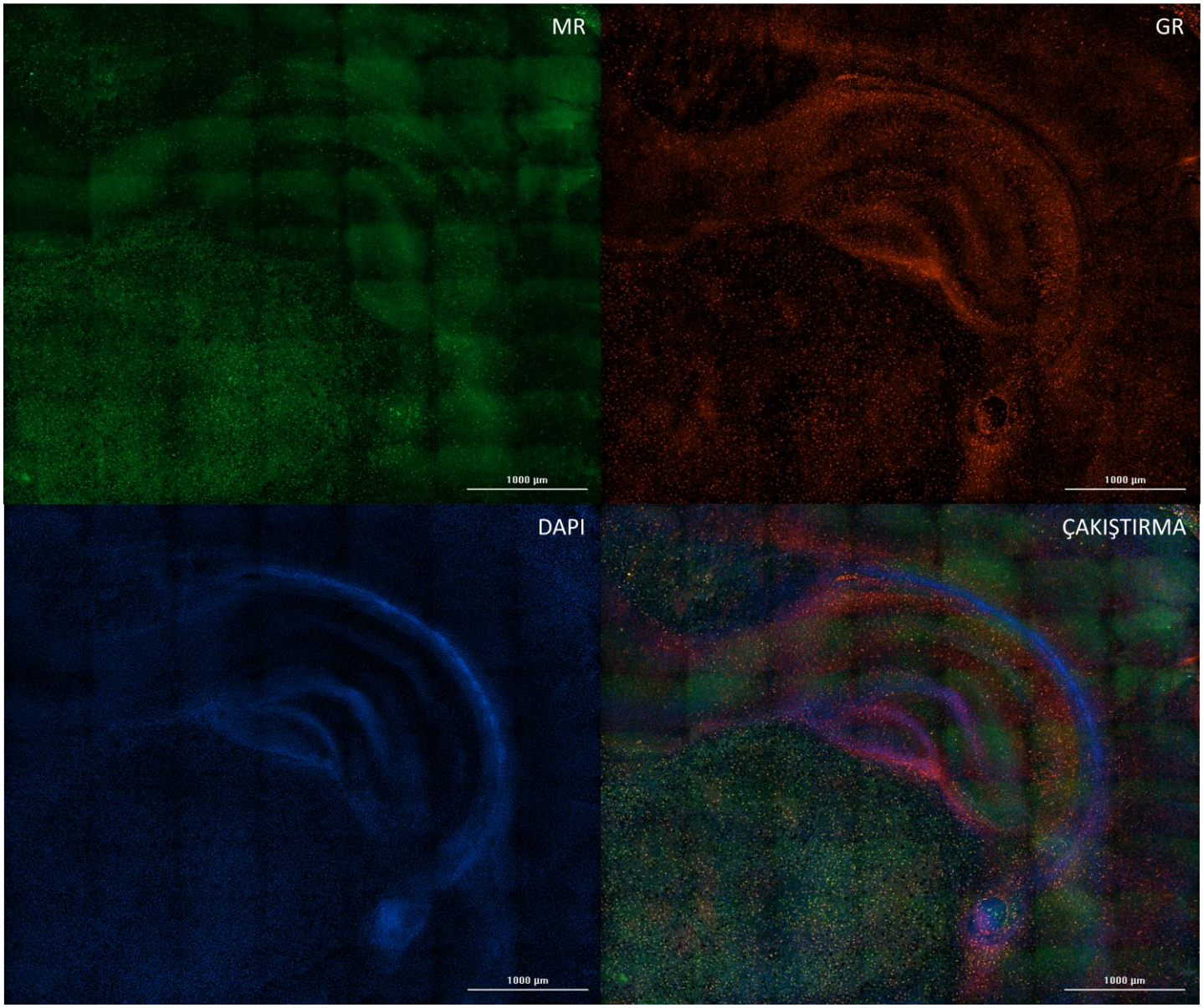
4.6.2. Hippokampus Bölgesinin İmmünfloresan Değerlendirmesi

Yapılan uygulamalar sonucu GR ve MR'nin dağılımlarının, hippokampusun alt tabakalarında (Şekil 4-69) nasıl değiştiği immünfloresan işaretleme yöntemi ile incelendi.



Şekil 4-69: Hippokampusun alt tabakaları.

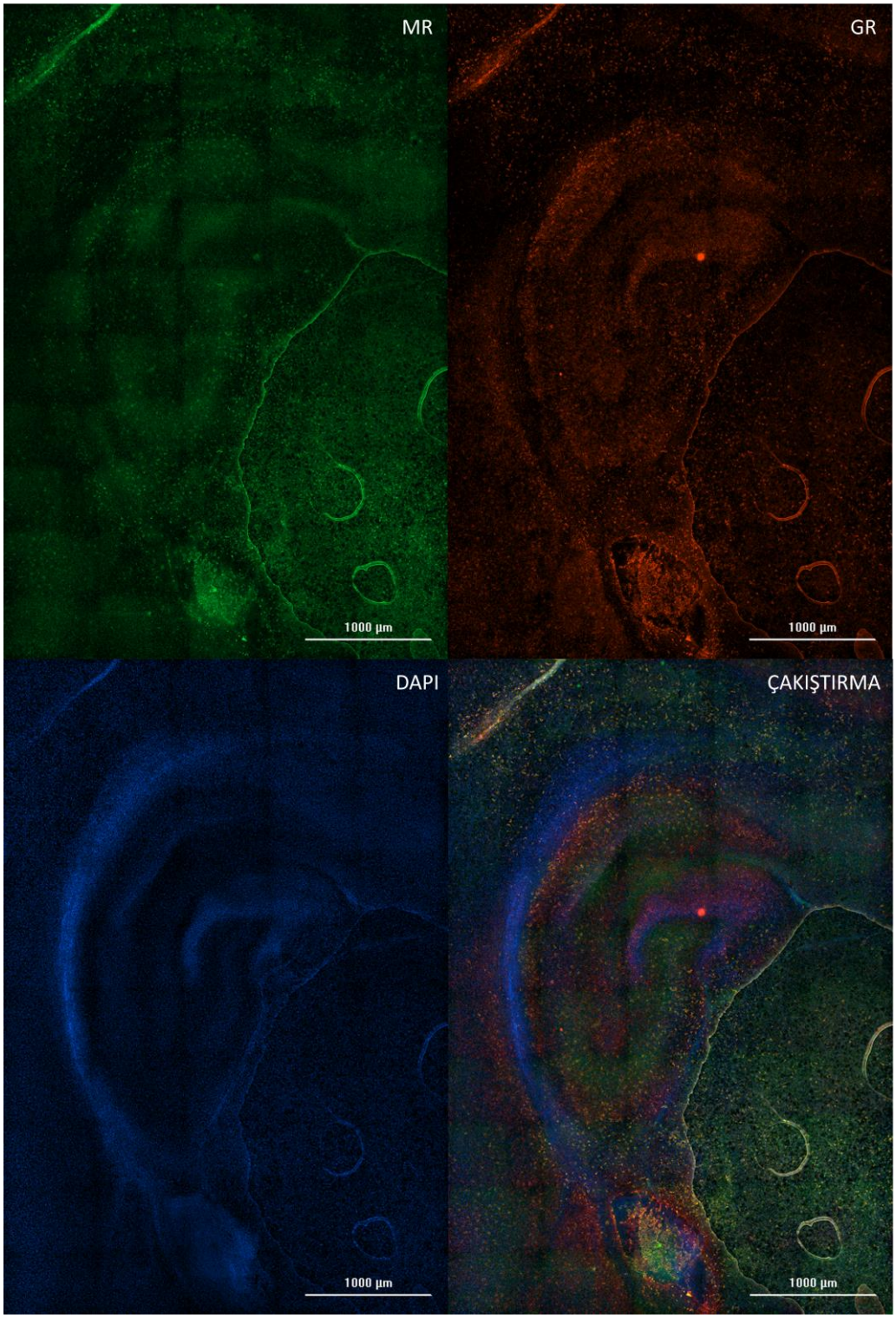
Herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda hippokampusta MR için zayıf, GR için ise güçlü bir immün işaretlenme görüldü. Ayrıca daha fazla sayıda hücrenin GR immünpozitif olduğu görüldü. GR; hippokampusun ALV, SO, SR, DGMT ve DGGT tabakalarında yaygın bir şekilde mevcutken, MR hippokampusun ALV, SO, SP, SLM ve Hİ tabakalarında belirgin şekilde lokalizeydi (Şekil 4-70).



Şekil 4-70: Herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

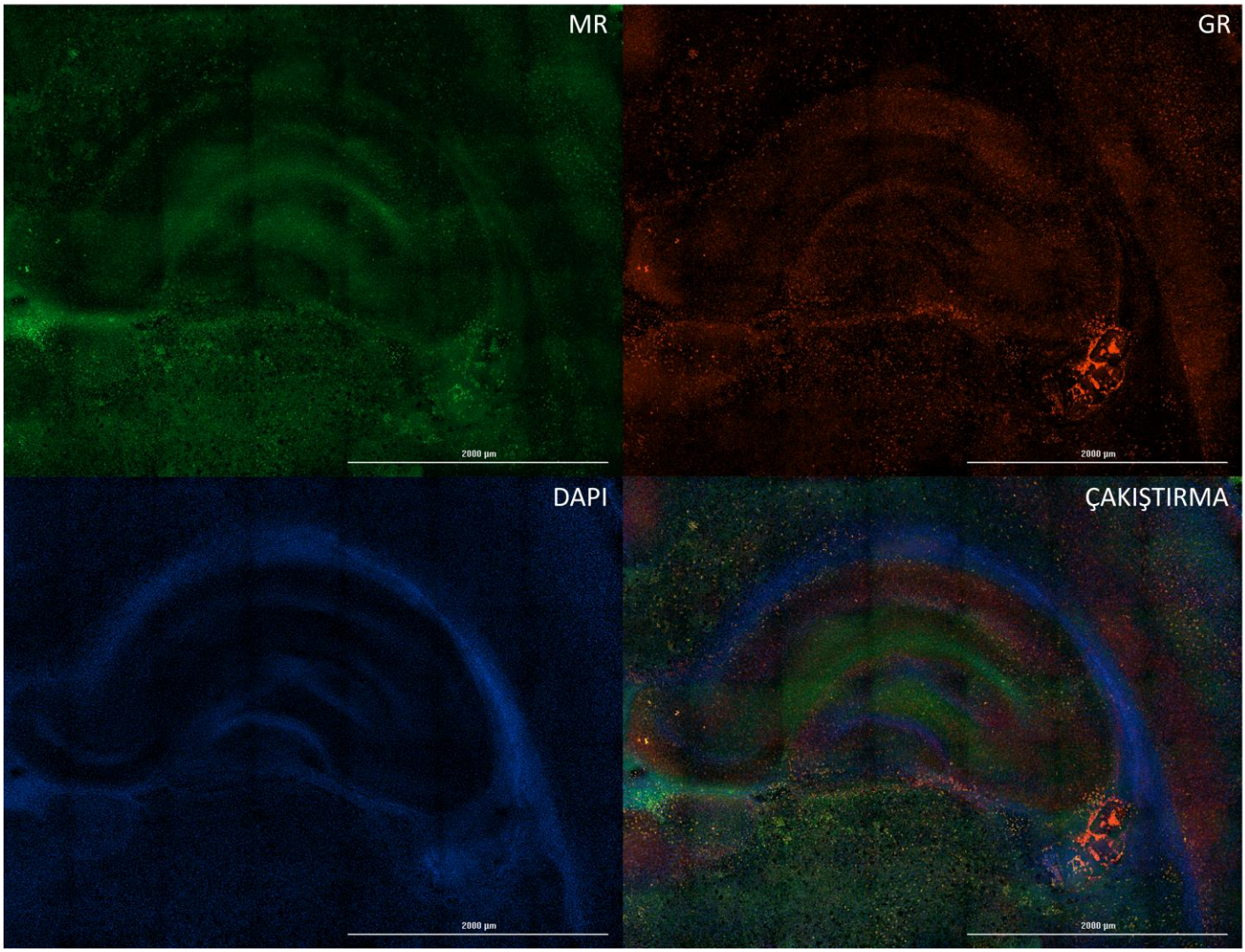
Çözücü madde etkisini görmek üzere ikinci kontrol grubu olarak etanol uygulanan grupta da kontrol grubuna benzer şekilde MR için zayıf, GR için ise güçlü bir immün işaretlenme görüldü. Ancak GR immün işaretlenme şiddetinin kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu gözlemlendi. GR ve MR'nin lokalizasyonları kontrol grubu ile benzerdi (Şekil 4-71).



Şekil 4-71: Etanol uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

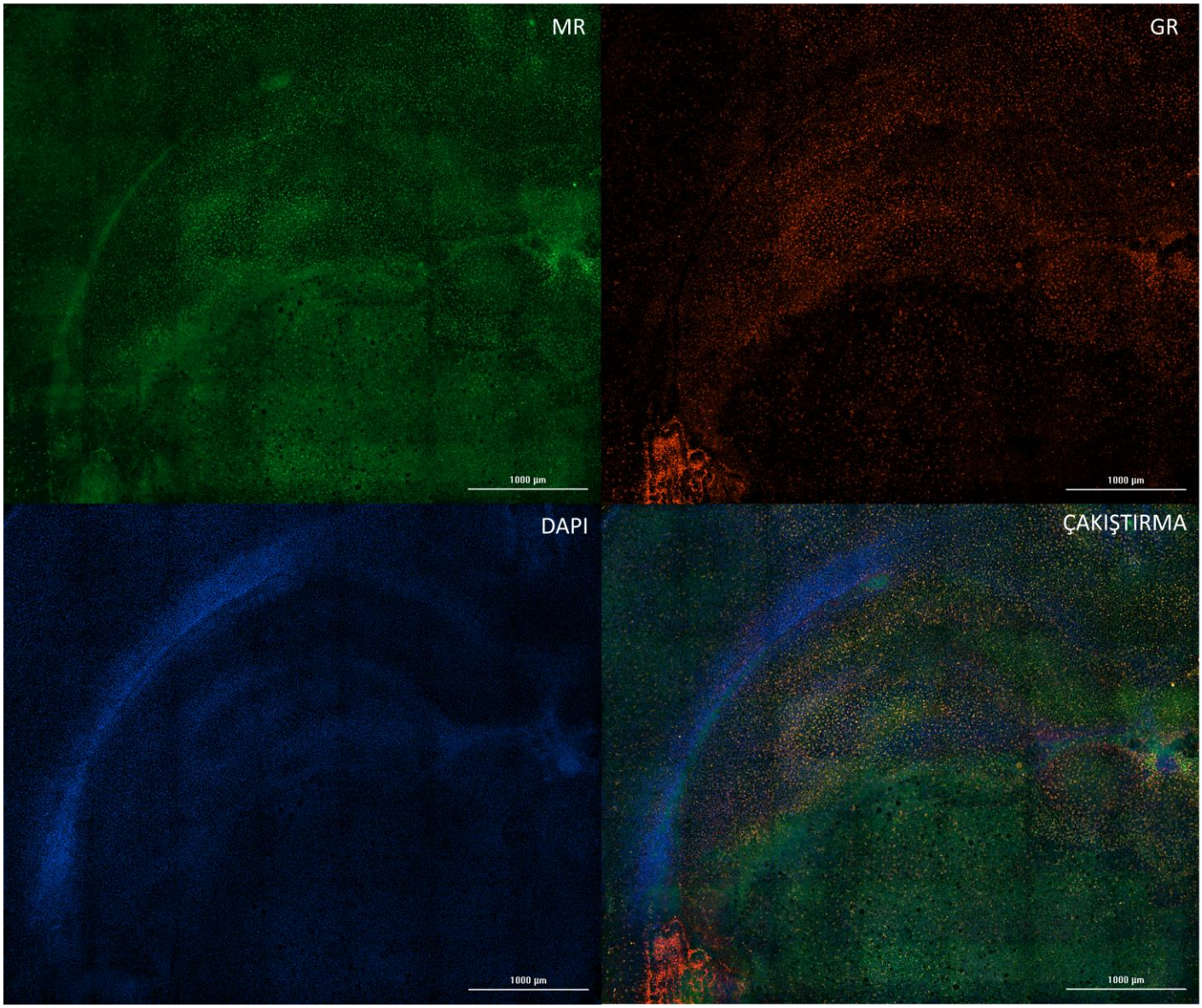
57,8 nM kortikosteron uygulanan grupta, GR'nin lokalizasyonu kontrol grubu ve etanol uygulanan gruplara benzerdi. Ancak MR; kontrol grubu ve etanol uygulanan gruptan farklı olarak hippokampusun SO tabakasında lokalize değildi. SLM ve Hİ tabakalarında MR immün şiddetinin kontrol ve etanol gruplarına kıyasla daha belirgin olduğu gözlemlendi. (Şekil 4-72).



Şekil 4-72: 57,8 nM kortikosteron uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

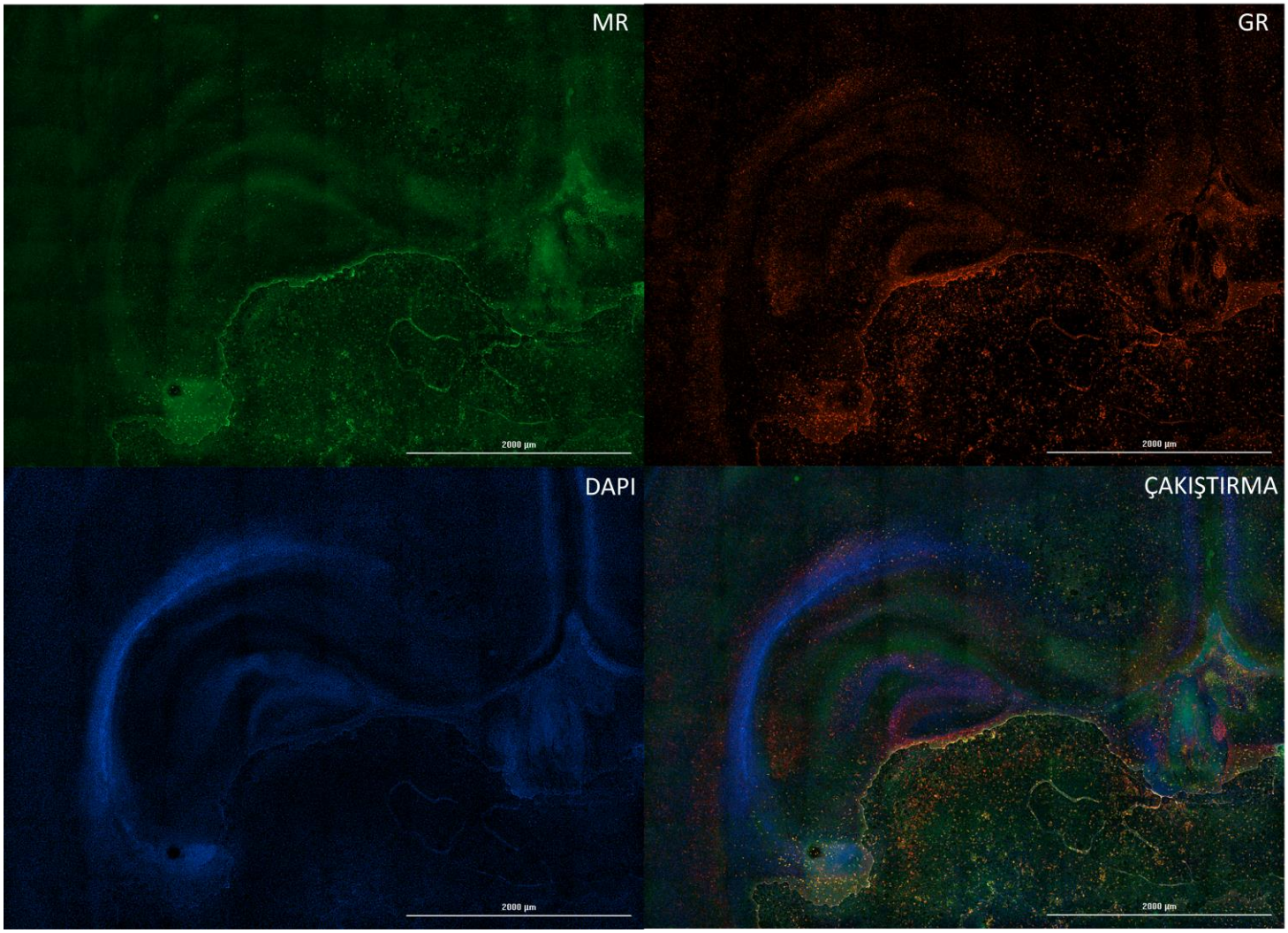
578 nM kortikosteron uygulanan grupta, GR ve MR'nin hippokampusun her tabakasına yayıldığı görüldü. Ayrıca GR ve MR lokalizasyonunun hücre gövdelerinde belirgin bir şekilde arttığı ve kolokalize oldukları görüldü (Şekil 4-73).



Şekil 4-73: 578 nM kortikosteron uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

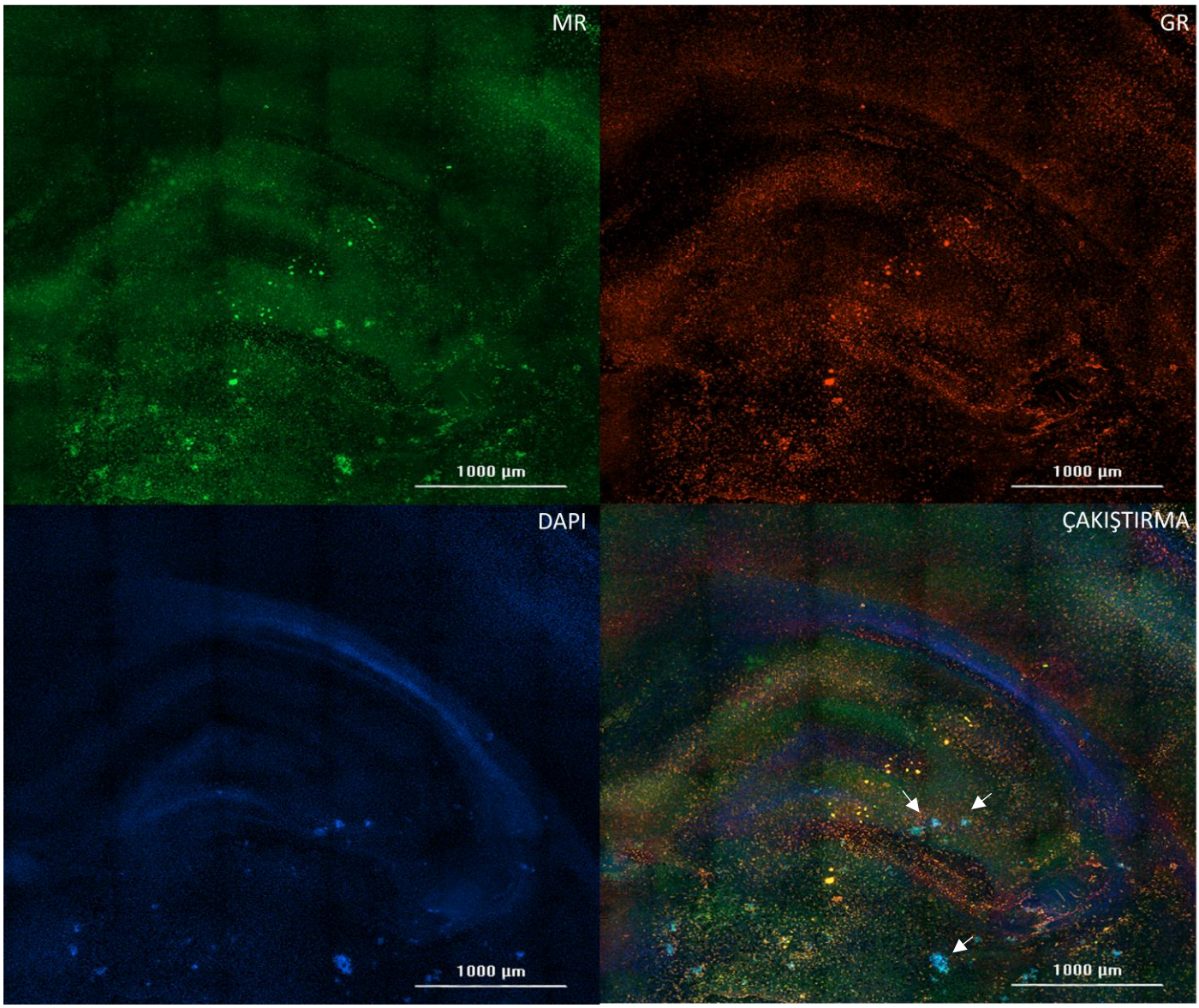
1300 nM kortikosteron uygulanan grupta, GR ve MR immün işaretlenme şiddetinin kontrol grubu ve etanol uygulanan gruba kıyasla daha az olduğu gözlemlendi. GR; kontrol grubuna benzer şekilde hippokampusun SO, DGMT ve DGGT tabakalarında yaygın bir şekilde mevcutken, kontrol grubundan farklı olarak ALV ve SR tabakalarında lokalize olmadığı görüldü. MR ise hippokampusun ALV, SP, SLM ve Hİ tabakalarında belirgin şekilde lokalizeydi. SLM tabakasında MR immün şiddetinin kontrol grubuna kıyasla daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4-74).



Şekil 4-74: 1300 nM kortikosteron uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X.

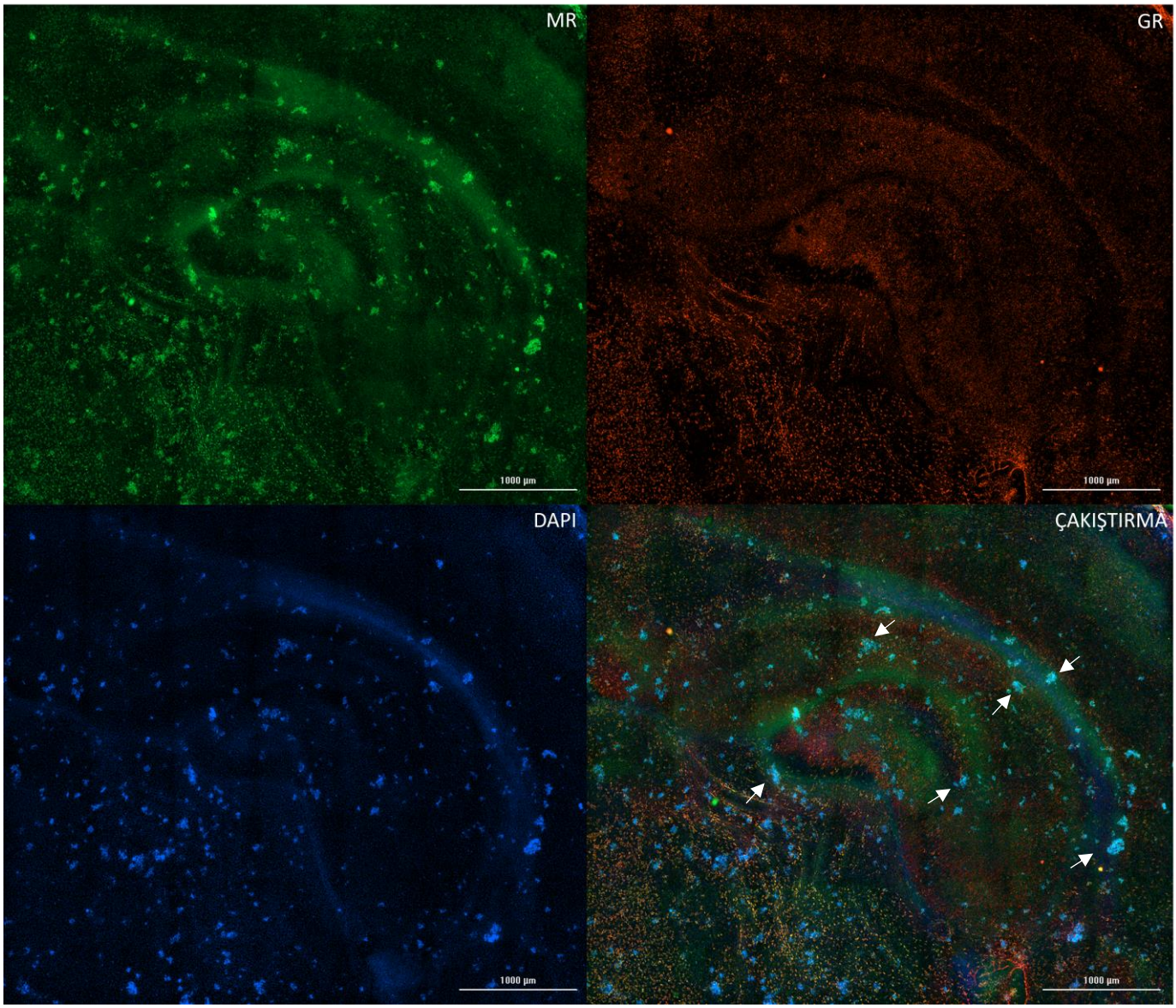
2 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta, GR ve MR immün işaretlenme şiddetinin kontrol grubu ve etanol uygulanan gruba benzer olduğu gözlemlendi. GR; hippokampusun ALV, SO, SP, DGMT ve DGGT tabakalarında yaygın bir şekilde mevcutken, az miktarda Hİ tabakasında yer aldığı görüldü. MR ise hippokampusun SO, SP, SR, SLM ve Hİ tabakalarında belirgin şekilde lokalizeydi. (Şekil 4-75).



Şekil 4-75: 2 µM $A\beta_{1-42}$ $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X. Amiloid plaklar beyaz ok ile gösterilmiştir.

6 µM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta, MR immün işaretlenme şiddetinin kontrol grubu ile benzer olduğu, GR'nin ise azaldığı gözlemlendi. GR; hippokampusun SO, SP, SR, DGMT ve DGGT tabakalarında yaygın bir şekilde mevcutken, MR ise hippokampusun ALV, SLM ve Hİ tabakalarında belirgin şekilde lokalizeydi. (Şekil 4-76).



Şekil 4-76: 6 µM $A\beta_{1-42}$ $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta hippokampus bölgesindeki GR ve MR dağılımının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

MR (yeşil); GR (kırmızı); nükleus (mavi, DAPI); Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu. Büyütme: 10X. Amiloid plaklar beyaz ok işe gösterilmiştir.

Yapılan uygulamalar ile birlikte, GR ve MR lokalizasyonlarının hippokampus bölgesinin alt tabakalarında nasıl değiştiği Tablo 4-2'de özetlenmiştir.

Tablo 4-2: GR ve MR'nin hippokampus bölgesindeki lokalizasyonları.

	Kontrol		Etanol		57,8 nM kortikosteron (Bazal seviye)		578 nM kortikosteron (Pik seviye)		1300 nM kortikosteron (Stres seviyesi)		2 µM $A\beta_{1-42}$ (Düşük Doz)		6 µM $A\beta_{1-42}$ (Yüksek Doz)	
	GR	MR	GR	MR	GR	MR	GR	MR	GR	MR	GR	MR	GR	MR
Alveus	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize değil	lokalize
Stratum Oriens	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil
Stratum Piramidalis	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil
Stratum Radiatum	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize değil	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize değil
Stratum Lacunosum-moleculare	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize
Dentat Girus Moleküler Tabaka	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil
Dentat Girus Granüler Tabaka	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil
Hilus	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize	lokalize	lokalize	lokalize değil	lokalize

5. TARTIŞMA

Stres, tehdit edici fiziksel ya da çevresel değişikliklere verilen fizyolojik bir yanıttır. Strese karşı verilen en belirgin yanıt, adrenal bezlerden glukokortikosteroid (insanda kortizol, kemirgenlerde kortikosteron) salınmasını sağlayan sistemlerin aktive edilmesidir. Kronik stres sonucu ciddi şekilde artan glukokortikosteroid seviyesinin, özellikle hippokampusdaki piramidal nöronlarda görülen dejeneratif kayıp ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (de Kloet 2000, Swaab ve ark. 2005, Huang ve ark. 2009).

Kortizol/kortikosteron, etkilerini hem mineralokortikosteroid reseptörleri (MR) hem de glukokortikosteroid reseptörleri (GR) üzerinden gösterir. Ancak MR reseptörlerine yaklaşık 6-10 kat daha fazla afiniteyle bağlandıkları için, ilk olarak MR'yi kullanmayı tercih ederler. Glukokortikosteroid seviyesi sirkadyen ritim ile birlikte ve stres koşullarında değişiklik gösterdiği için, kortizol ve kortikosteronun gün içerisinde ve stres durumunda kullandıkları reseptörler de farklılık göstermektedir. Glukokortikosteroidler, seviyelerinin en düşük olduğu sirkadiyen ritmin bazal evresinde daha çok MR'ye bağlanır. Seviyenin maksimuma ulaştığı pik evresinde ve stres durumunda ise MR reseptörleri doygunluğa ulaştığı için, glukokortikosteroidlerin GR'ye bağlanma oranları artar (De Kloet ve ark. 1998, de Kloet 2000, de Kloet ve ark. 2000).

Glukokortikosteroidler; stres yanıtında, metabolizma ve immün sistemin düzenlenmesinde rol alan genlerin transkripsiyonlarının düzenlenmesinin yanı sıra, pozitif ve negatif geri bildirim mekanizmaları aracılığıyla da kendi reseptörlerinin transkripsiyonunu ve salınımını düzenlemektedirler (Gomez-Sanchez ve Gomez-Sanchez 2014, Gjerstad ve ark. 2018). Kortikosteron uygulaması yapılarak gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar; kortikosteron dozu arttıkça, özellikle hippokampus bölgesi başta olmak üzere beyindeki GR ekspresyon seviyesinin azaldığını göstermiştir (Sapolsky ve ark. 1984, Kitraki ve ark. 1999, Erdeljan ve ark. 2001, Fuchsl ve Reber 2016). GR'nin aksine; kortikosteron uygulamasının beyindeki MR ekspresyonu üzerine etkisini araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, kortikosteron uygulaması sonucu hippokampus bölgesindeki MR ekspresyon seviyesinde herhangi bir değişiklik olmadığını rapor etmiştir (Helmreich ve ark. 1997, Erdeljan ve ark. 2001). Diğer taraftan Hugin-Flores ve ark. adrenalektomi ile endojenik kortikosteron salınımı inhibe edildikten sonra 1, 10, 50, 100 ve 200 mg olmak üzere farklı dozlarda kortikosteron enjeksiyonu yapılan sıçanlarda, plazma kortikosteron seviyesi arttıkça, hippokampus bölgesinde GR ile birlikte MR mRNA

seviyesinin de azaldığını bildirmiştir. Ancak Hugin-Flores ve ark. bu azalan GR mRNA seviyesinin, plazma kortikosteron seviyesini 100 μg/dl'nin üzerine çıkartan yüksek dozlarda tekrar artmaya başladığını gözlemlemiş ve kortikosteronun GR mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin doza bağlı olarak değişebileceğini belirtmiştir (Hugin-Flores ve ark. 2004).

Beyin organotipik kesit kültürleri kullanarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, sirkadiyen ritimde sıçanların plazmalarında saptanan en düşük (bazal) ve en yüksek (pik) konsantrasyonlar ile stres durumunda saptanan konsantrasyonda kortikosteron uygulamasının, korteks ve hippokampus bölgelerindeki GR ve MR'nin mRNA ve protein seviyeleri üzerine etkilerini araştırdık. Bazal ve pik konsantrasyonlarda kortikosteron uygulaması sonucu hippokampus bölgesindeki GR ekspresyon seviyesi azalırken, stres seviyesindeki konsantrasyonda uygulanan kortikosteronun GR ekspresyonunu arttırdığını belirledik. Bazal ve pik konsantrasyonlarda elde ettiğimiz sonuçlar, literatürde var olan diğer çalışmalarla (Sapolsky ve ark. 1984, Kitraki ve ark. 1999, Erdeljan ve ark. 2001, Fuchsl ve Reber 2016) uyumluluk göstermektedir. Elde ettiğimiz bu bulgular; artan kortikosteron seviyesi ile birlikte MR reseptörleri doygunluğa ulaştığı için GR'ye daha çok bağlandığı bilinen (De Kloet ve ark. 1998, de Kloet 2000, de Kloet ve ark. 2000) glukokortikosteroidlerin, muhtemelen negatif geri bildirim mekanizmaları aracılığıyla (Gomez-Sanchez ve Gomez-Sanchez 2014, Gjerstad ve ark. 2018) GR ekspresyon seviyesini düşürdüğünü, ve böylece GR'ye karşı artan bağlanma kapasitesinin ve sonucunda aktive olan glukokortikosteroid yanıtının dengede tutulmaya çalışıldığını düşündürmektedir. Ek olarak; bazal ve pik dozlarında azalırken stres dozunda artışa geçen GR mRNA ekspresyonunu gösteren bulgularımız, Hugin-Flores ve ark.'ın yüksek dozlardaki kortikosteron ile birlikte GR mRNA ekspresyon seviyesinin tekrar artmaya başladığını bildirdiği çalışmasıyla (Hugin-Flores ve ark. 2004) uyum göstermektedir. Kortikosteronun, GR mRNA ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisinin doza bağlı olarak değişebileceğini belirten söz konusu çalışmaya paralel olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgular; kortikosteronun etkilerini değiştirebilen eşik değeri niteliğinde bir dozun var olabileceğini ve kortikosteron seviyesinin bu eşik değerini geçtikten sonra muhtemel olarak başka mekanizmaların da devreye girmesiyle farklı bir yanıt oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Bunun yanı sıra, çalışmamızda sadece 96 saat süreyle stres dozunda kortikosteron uygulaması sonucunda, beynin korteks bölgesinde GR protein seviyesinin arttığı ancak

mRNA ekspresyon seviyesinin azaldığını saptadık. Bu durum bize; kortikal hücrelerin hippokampal hücrelere göre kortikosteroid reseptörleri ekspresyonu bakımından verdikleri yanıtta, glukokortikosteroid seviyelerindeki değişimlere daha dirençli olabileceğini ve stres durumunda ilk olarak GR seviyesini arttırak verdiği yanıtı, daha sonra ekspresyon seviyesini düşürerek dengelemeye çalışıyor olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu sonucun daha ileri saat aralıklarında teyit edilmesi gerekmektedir. Literatürde, glukokortikosteroidlerin GR ekspresyonu üzerine etkisini hippokampus (Sapolsky ve ark. 1984, Kitraki ve ark. 1999, Erdeljan ve ark. 2001, Fuchsl ve Reber 2016), amigdala (Sapolsky ve ark. 1984), hipotalamus (Sapolsky ve ark. 1984) ve serebellum (Kitraki ve ark. 1999) gibi beyin bölgelerinde araştıran çalışmalar mevcut olmakla birlikte, serebral korteks bölgesinde inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. GR ekspresyonu ile ilgili bu bulgularımız, literatürde ilk kez ortaya konmuştur.

Ayrıca çalışmamızda pik seviyedeki konsantrasyonda uygulanan kortikosteron ile birlikte hem korteks hem de hippokampus bölgesindeki MR mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin azaldığı saptanmıştır. Bu bulgular bize, glukokortikosteroid seviyesiyle birlikte kullanımının arttığı ve doygunluğa ulaştığı bilinen (De Kloet ve ark. 1998, de Kloet 2000, de Kloet ve ark. 2000) MR'nin de, GR'de olduğu gibi, oluşan glukokortikosteroid yanıtının ekspresyon seviyesinin düşürülmesiyle dengede tutulmaya çalışıldığını düşündürmektedir. Buna ek olarak çalışmamızda, stres dozunda uygulanan kortikosteronun MR ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Bu durum; daha önce var olabileceğini ileri sürdüğümüz, kortikosteronun etkilerini değiştirebilmesine neden olabilecek eşik değeri niteliğindeki dozun, GR ve MR için farklı olabileceğini düşündürmektedir.

Stres, çok sayıda genetik ve çevresel etkenin bir araya gelmesi sonucu ortaya çıkan sporadik Alzheimer hastalığı (AH) için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Kronik strese maruz kalan bireylerde AH gelişme riski yaklaşık 2,7 kat daha fazladır (Ricci ve ark. 2012). Postmortem beyin-omurilik sıvıları (BOS) ile yapılan çalışmalar, stres hormonu kortizol seviyesinin Alzheimer hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede fazla olduğunu göstermiştir (Popp ve ark. 2009). Ayrıca yine Alzheimer hastalarında yapılan çalışmalarda, BOS kortizol seviyesinin AH için bir risk faktörü olan *APOE* genotipi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. AH için koruyucu bir etkisi olduğu gösterilen *APOE* ϵ2 genotipini taşıyan hastaların daha düşük kortizol seviyesine, AH riskini

arttıran *APOE* ϵ4 genotipini taşıyan hastaların ise daha yüksek kortizol seviyesine sahip olduğu bildirilmiştir (Burke ve ark. 2016). Alzheimer hastalarının plazma ve serum kortizol seviyelerinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu ve kortizol seviyesi ile bilişsel fonksiyonları arasında negatif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir. Buna ek olarak, kronik kortikosteroid tedavisi gören hastalarda sağlıklı kontrollere göre hippokampus hacminde azalma ve dekleratif hafıza bozuklukları da bildirilmiştir (Huang ve ark. 2009).

Çalışmamızda ayrıca; stres ile AH arasında kesişen yolakları araştırmak üzere; beyin organotipik kesit kültürlerine düşük doz ve yüksek dozda amiloid beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$) peptidi uygulayarak oluşturduğumuz AH benzeri modelde glukokortikosteroid reseptörlerinin ekspresyon seviyelerini inceledik. Elde ettiğimiz bulgular, hem düşük doz hem de yüksek doz $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucunda korteks bölgesinde GR ve MR ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir. Literatürde glukokortikosteroid reseptörleri ve AH arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. İnsan APP genini aşırı eksprese eden Tg2576 transgenik farelerle yapılan bir çalışmada, fareler izole edilerek stres durumu tetiklenmiş ve bunun sonucunda korteks bölgesinde GR ekspresyon seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Dong ve ark. 2008). Post mortem beyin dokularında yapılan bir çalışmada ise, GR mRNA seviyesinin Alzheimer hastalarının hippokampus bölgesinde arttığı gösterilmiştir (Wetzel ve ark. 1995). GR ekspresyon seviyesi ile ilgili sonuçlarımız literatürde var olan kısıtlı bilgiyle uyumlu olmakla birlikte, MR ekspresyon seviyesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan MR ekspresyon seviyeleri hakkındaki bulgularımız literatürde ilk olarak bildirilmiştir.

İsmini plazma glukoz seviyesi üzerindeki etkisinden alan glukokortikosteroidlerin; çeşitli periferal doku ve hücrelerde glukoneogenezi uyardığı, glukoz taşıyıcı proteinlerin translokasyonlarını inhibe ederek hücre içi glukoz alınımını ve kullanımını azalttığı ve enerji kaynağı olarak glukoz yerine yağ asitlerinin kullanılmasını sağlayarak kan glukoz seviyesinde artışa neden olduğu bilinmektedir (Haber ve Weinstein 1992, Ruzzin ve ark. 2005, Magomedova ve Cummins 2016).

Uzun süre kronik strese maruz bırakılan ya da uzun süreli kortikosteron enjeksiyonu yapılan hayvanlarda, hippokampusta atrofi meydana geldiği bildirilmiştir. Hayvanlarda yapılan deneyler sonucunda glukokortikosteroidler tarafından tetiklenen hippokampal nöron hasarının altında yatan mekanizmanın; hippokampal nöronlar ve glia hücrelerinde glukoz transportunun inhibisyonu olduğu ileri sürülmektedir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada ise

nörodejeneratif hastalığı bulunmayan yaşlı insanlarda kortizol enjeksiyonunun hippokampal glukoz metabolizmasını bozduğu gösterilmiştir (Belanoff ve ark. 2001, Tsigos ve Chrousos 2002).

Literatürde, glukokortikosteroidlerin beyin glukoz seviyesi ve glukoz taşıcıyı proteinler üzerine etkisi hakkında kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Glukoz alımını incelemeyi sağlayan ^{18}F-fluorodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi (FDG-PET) kullanılarak yapılan bir çalışmada, 3 haftalık kronik kortikosteron uygulaması yapılan sıçanların, insular korteks ve striatumlarında glukoz alımının azaldığı, serebellum ve arka beyinde ise arttığı gösterilmiştir (Van Laeken ve ark. 2018). Prenatal stres ve akut stres uygulanan sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise, hippokampus ve frontal korteksteki glukoz seviyesi ile birlikte glukoz taşıyıcı protein 1 (GLUT1), glukoz taşıyıcı protein 3 (GLUT3) ve glukoz taşıyıcı protein 4 (GLUT4) ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve prenatal stres uygulanan sıçanlarda glukoz ve GLUT1 seviyesinin hippokampus bölgesinde arttığı bulunmuştur (Detka ve ark. 2014).

Çalışmamızda; kortikosteronun beyin enerji metabolizması üzerindeki etkilerini belirlemek üzere bazal, pik ve stres dozlarında kortikosteron uygulaması yapılan beyin organotipik kesit kültürlerinde, beyindeki ana glukoz taşıyıcı proteinler olan GLUT1 ve GLUT3 ekspresyon seviyeleri ile hücre içi glukoz seviyesini inceledik. GLUT1 ekspresyon seviyesinin; pik dozda uygulanan kortikosteron sonucu hem korteks hem de hippokampus bölgesinde, stres dozunda uygulanan kortikosteron sonucu ise yalnızca hippokampus bölgesinde arttığını belirledik. Ancak GLUT3 ekspresyon seviyesinin, herhangi bir kortikosteron uygulaması ile değişmediğini saptadık. Ek olarak hücre içi glukoz seviyesinin; bazal dozda uygulanan kortikosteron sonucu korteks bölgesinde, pik dozda uygulanan kortikosteron sonucu ise hem korteks hem de hippokampus bölgesinde arttığını saptadık. Detka ve ark.'ın çalışmasıyla (Detka ve ark. 2014) uyumlu olarak elde ettiğimiz bu bulgular bize; iskelet kası, yağ doku, pankreas gibi periferal doku ve organlarda glukoz taşıyıcı proteinleri inhibe ederek hücre içine glukoz alınımını ve enerji kaynağı olarak yağ asitlerinin kullanılmasını sağlayarak glukoz kullanımını azalttığı bilinen (Haber ve Weinstein 1992, Sugden ve Holness 2003, Ruzzin ve ark. 2005, Magomedova ve Cummins 2016) glukokortikosteroidlerin, enerji metabolizması üzerindeki etkilerinin doku tipine bağlı olarak farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca; sinir sisteminde baskın olarak kan-beyin bariyerini oluşturan ve glukozun beyne girişini sağlayan endoteliyal hücreler ile

astrositlerde bulunan GLUT1'in ekspresyon seviyesinin artması ancak spesifik olarak nöronlarda bulunan GLUT3'ün ekspresyonunun değişmemesi üzerine elde ettiğimiz bulgular, kortikosteron seviyesinin arttığı durumlarda beyin glukoz ihtiyacının da artıyor olabileceğine ve astrositlerin glukozdan laktat üretimini arttırıp nöronların glukoz yerine laktatı kullanmasını sağlayarak stres durumunda nöronların hızlı ve güçlü bir yanıt oluşturmasını sağlıyor olabileceğine işaret etmektedir. Ek olarak yapılan çalışmalarla; yüksek glukoz seviyesinin, reaktif oksijen ara ürünlerinin (ROS) oluşumunu arttırarak, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve dolayısıyla oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir (Greene ve ark. 1999, Russell ve ark. 2002). Sonuçlarımız, kronik streste meydana gelen değişikliklerin fazla enerji üretimiyle birlikte ROS'a bağlı olarak oksidatif stresi ve sonuç olarak hücre ölümünü tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

AH'da, merkezi sinir sistemi (MSS) hücrelerinin glukoz alımı ve kullanımında ciddi bir azalma olduğu ve bu azalışın hastalık sürecinin ilerleyişiyle birlikte arttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Glukoz metabolizmasındaki bu azalışın pre-semptomatik Alzheimer hastalarında da gösterilmesi, glukoz metabolizmasındaki bozulmanın nörodejenerasyona neden olabileceğini düşündürmektedir (Jin ve ark. 2013).

Yapılan FDG-PET çalışmaları, yaş ilişkili bilişsel bozukluk görülen hastaların beyinlerinde fokal hipometabolizmanın mevcut olduğunu göstermektedir. Hücre içi glukoz alımındaki bu azalmaya; serebral kortekste yaygın bir incelme, gri madde yoğunluğunda ciddi bir azalma ve singulat sulkusta genişleme eşlik etmektedir. Yapılan çalışmalar, AH ve hafif kognitif bozukluğu (MCI) olan hastalarda da hücre içi glukoz alımında ilerleyici bir azalma olduğunu göstermiştir. Bu durum, normal yaşlanmayla birlikte görülen demans ve Alzheimer tipi demansla, hücre içi glukoz alımı ve enerji metabolizmasındaki bozulmalar arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir (Yin ve ark. 2016).

AH'de özellikle hippokampus, temporal, parietal ve frontal kortekste glukoz alımında belirgin bir azalma görülmektedir. Azalmış glukoz alımı, bilişsel bozukluk ve Alzheimer tipi demansın gelişiminde bir belirteç olarak kabul edilse de, bu azalışın glukoz taşıyıcı proteinlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı halen belirsizliğini korumaktadır (Yin ve ark. 2016). Yapılan çok az sayıda çalışma ile Alzheimer hastalarının beyinlerinde GLUT1 ve GLUT3 seviyesinin sağlıklı bireylere kıyasla düşük olduğu gösterilmiştir. Ancak bu düşüşün nedeninin ne olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir (Jin ve ark. 2013). An ve ark.'ın postmortem beyin dokuları kullanarak yaptığı bir çalışmada, AH şiddeti ve

semptomların başlangıcıyla ilişkili olarak beyin glukoz seviyesinin arttığı ve GLUT3 seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (An ve ark. 2018).

Çalışmamızda; GLUT1 ekspresyon seviyesinin korteks bölgesinde hem düşük hem de yüksek dozda uygulanan $A\beta_{1-42}$ sonucu azaldığı, ancak hippokampus bölgesinde yüksek dozda uygulanan $A\beta_{1-42}$ sonucu ise arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, yüksek dozda uygulanan $A\beta_{1-42}$ sonucu hem korteks hem de hippokampus bölgesinde GLUT3 ekspresyon seviyesi azalırken glukoz seviyesinin arttığını saptadık. Yapılan çalışmalar, patolojik konsantrasyonlardaki amiloid beta oligomerlerinin, ekstrasinaptik glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasını tetikleyerek nöronal iyon dengesinin bozulmasına, biyoenerjitik zayıflığa yol açan mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve oksidatif strese, sinaptik plastisitede bozulmalara ve sonuç olarak nöronal kayba yol açtığını göstermiştir (Tu ve ark. 2014). Oksidatif strese bağlı olarak serbest radikallerin ve reaktif oksijen ara ürünlerinin (ROS) oluşumu, nörodejenerasyonda görülen patolojik mekanizmalardan biridir (Guo ve ark. 2013). Bu bilgiler ışığında; An ve ark.'ın da çalışmasıyla uyum gösteren bu bulgularımız bize, amiloid plak miktarının artması sonucu hücrelerde ilk yanıt olarak hücre içi glukoz miktarının arttığını, ancak bu glukoz artışı sonucunda daha sonra hücre içerisinde oluşabilecek muhtemel oksidatif stresi azaltmak üzere glukoz taşıyıcı proteinlerin ekspresyonunun baskılanarak hücre içerisine glukoz alımını azalttığını düşündürmektedir.

Reseptör otoradyografisi, in situ hibridizasyon ve immünohistokimya çalışmaları MR reseptörlerinin; limbik sistemde, hippokampusta, parahippokampal girusta, entorinal ve insular kortekste, GR reseptörünün ise; paraventriküler nukleus ve diğer hipotalamik nukleuslar, hippokampus ve parahippokampal girus gibi subkortikal yapılarda ve prefrontal korteks başta olmak üzere kortikal yapılarda yaygın bir şekilde bulunduğunu göstermiştir (Herman ve ark. 1989, Ahima ve ark. 1991, De Kloet ve ark. 1998, de Kloet 2000, de Kloet ve ark. 2000, Bizon ve ark. 2001, Swaab ve ark. 2005). Literatürde, sıçan beyninin hippokampus ve hipotalamus bölgelerindeki GR ve MR dağılımlarını immünfloresan olarak inceleyen tek bir çalışma bulunmakta olup, çalışma Wistar cinsi sıçanlarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya göre; GR ve MR'nin hippokampusun piramidal tabakasının CA1 ve CA2 bölgesindeki piramidal nöronlarda ve dentat girusun moleküler hücrelerinde kolokalize oldukları gösterilmiştir (Han ve ark. 2005).

Sprague-Dawley cinsi sıçanların hippokampus ve korteks bölgelerinin alt tabakalarında glukokortikosteroid reseptörlerinin dağılımlarını incelediğimiz çalışmamızda;

GR ve MR'nin korteksin I. tabakası olan moleküler tabakada daha güçlü olmak üzere korteksin her tabakasında lokalize olduğunu ve GR'nin hippokampusun alveus (ALV), stratum oriens (SO), stratum radiatum (SR), dentat girus moleküler tabakası (DGMT) ve dentat girus granüler tabakasında (DGGT), MR'nin ise ALV, SO, stratum piramidalis (SP), stratum lacunosum moleculare (SLM) ve hilus (Hİ) tabakalarında belirgin şekilde lokalize olduğunu immünfloresan yöntemiyle gösterdik. Ayrıca, GR ve MR'nin hippokampustaki bu lokalizasyonlarının kortikosteron ve $A\beta_{1-42}$ uygulamalarıyla değiştiğini ve bu değişimin doza bağlı olarak farklılık gösterdiğini belirledik. Bazal seviyede kortikosteron uygulaması sonucu SO tabakasında MR'nin; pik seviyede kortikosteron uygulaması sonucu SP, SLM ve Hİ tabakalarında GR'nin ve SR, DGMT ve DGGT tabakalarında MR'nin; stres seviyesinde kortikosteron uygulaması sonucu ALV ve SR tabakalarında GR'nin ve SO tabakasında MR'nin; düşük doz $A\beta_{1-42}$ uygulaması sonucu SP, SR ve Hİ tabakalarında GR'nin ve ALV ve SR tabakalarında MR'nin; yüksek doz $A\beta_{1-42}$ uygulaması sonucu ise ALV ve SP tabakalarında GR'nin ve SO ve SP'de MR'nin lokalizasyonlarının değiştini saptadık. Enthorinal korteks ve hippokampusun alt tabakalarında bulunan nöronların, direkt ve indirekt yolaklar aracılığıyla etkileşerek hafıza oluşumunda yer aldığı bilinmektedir. Direkt yolakta, enthorinal korteksin III. tabakasında yer alan nöronların uzantıları doğrudan hippokampusun SP tabakasınının CA1 alanında yer alan piramidal nöronlarla bağlantı kurar. İndirekt yolakta ise; enthorinal korteksin II. tabakasında yer alan nöronların aksonları, hippokampusun DGGT tabakasında yer alan nöronlara uzanarak uyarıcı sinaps oluştururlar. DGGT tabakasındaki nöronlar bu sinyali SP tabakasının CA3 alanında yer alan piramidal nöronlara iletir. CA3'te yer alan piramidal nöronlar ise Schaffer kollateral yolak aracılığıyla CA1 alanındaki piramidal nöronları uyarak hafıza oluşumunu gerçekleştirir (Kandel 2013). Bu bilgiler doğrultusunda; elde ettiğimiz bulgular bize, GR ve MR'nin hafıza oluşumu ve hafıza bozukluklarında bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Pik seviyede kortikosteron uygulaması sonucu GR'nin SP tabakasındaki lokalizasyon değişikliği ile direkt hafıza yolağında değişikliğe yol açabileceği ileri sürülebilir. SP tabakasındaki aynı lokalizasyon değişikliği hem düşük hem de yüksek doz $A\beta_{1-42}$ uygulaması ile görülmekte, ayrıca yüksek doz Aβ1-42 uygulaması ile aynı tabakada MR'nin lokalizasyonu da değişmektedir. Alzheimer hastalığında ilk olarak etkilenen nöronların enthorinal kortekste olduğu ve özellikle direkt yolağı etkileyerek spatial öğrenmeyi ve hafızayı etkilediği bilinmektedir (Yang ve ark. 2018). Bunun sebebi tam bilinmemekle birlikte, GR ve MR'deki bu lokalizasyon değişikliği Alzheimer patolojisinin ortaya çıkışında etken bir yol olabilir ve

stres ile ilişkisini ortaya koyabilir. Bundan farklı olarak yine pik seviyede kortikosteron uygulaması sonucu MR'nin DGGT tabakasındaki lokalizasyon değişikliği indirekt hafıza yolağı ile ilişkili olabilir. Beyin bögelerinin alt tabakalarının detaylı bir şekilde incelenmesiyle elde ettiğimiz bu bulgular literatürde bir ilktir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları değerlendirdiğimizde; kortikosteron ve $A\beta_{1-42}$ uygulamaları sonucu GR protein seviyesi, GLUT1 mRNA seviyesi ve hücre içi glukoz seviyesi ile hippokampusun özellikle stratum piramidalis bölgesindeki GR lokalizasyonunun benzer şekilde etkilendiğini gözlemledik. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular; stres sonucu meydana gelen kortikosteron artışının, glukoz metabolizmasında değişikliklere neden olarak AH'de görülen patolojik mekanizmaların oluşumu sürecine katılabileceğini düşündürmekte ve stresin nörodejenerasyona neden olan yolakları tetikleyebileceğine işaret etmektedir. Bulgularımız; kronik stresin hücresel enerji metabolizması gibi önemli mekanizmalar üzerinde uzun yıllar boyunca oluşturabileceği olası etkinin, AH gibi nörodejeneratif hastalıkların temelinde yatan önemli bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca sonuçlarımız; stres sonucu başta GR olmak üzere glukokortikosteroid reseptörlerinde ve ilişkili oldukları yolaklarda meydana gelen değişimlerin, AH'de görülen mekansal öğrenme ve hafıza bozukluklarının ortaya çıkışında etken bir faktör olabileceğine dair fikir oluşturmakta ve stresin AH için önemli bir risk faktörü olabileceği üzerindeki görüşleri desteklemektedir. Sonuç olarak yıllardır çeşitli fizyolojik çalışmalar ve davranış testleri stres ve AH arasındaki ilişkinin önemine işaret ediyor olsa da bu çalışmamız ile elde ettiğimiz bulgular, henüz tam olarak anlaşılmamış bu ilişkinin moleküler temellerinin açıklanmasına katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

Ahima, R., Z. Krozowski and R. Harlan (1991). "Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids." J Comp Neurol **313**(3): 522-538.

Alaylıoğlu, M., E. Dursun, S. Yılmazer and D. Gezen-Ak (2020). "A Bridge Between in vitro and in vivo Studies in Neuroscience: Organotypic Brain Slice Cultures." Nöropsikiyatri Arşivi.

Alzheimer's, A. (2016). "2016 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimers Dement **12**(4): 459-509.

An, Y., V. R. Varma, S. Varma, R. Casanova, E. Dammer, O. Pletnikova, C. W. Chia, J. M. Egan, L. Ferrucci, J. Troncoso, A. I. Levey, J. Lah, N. T. Seyfried, C. Legido-Quigley, R. O'Brien and M. Thambisetty (2018). "Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **14**(3): 318-329.

Aznar, S. and G. M. Knudsen (2011). "Depression and Alzheimer's disease: is stress the initiating factor in a common neuropathological cascade?" J Alzheimers Dis **23**(2): 177-193.

Barrett, E. J. (2009). The Adrenal Gland. Medical physiology : a cellular and molecular approach.

Bear, F. B., B. W. Connors and M. A. Paradiso (2016). The structure of the nervous system. Neuroscience: Exploring the brain.

Belanoff, J. K., K. Gross, A. Yager and A. F. Schatzberg (2001). "Corticosteroids and cognition." J Psychiatr Res **35**(3): 127-145.

Bizon, J. L., K. A. Helm, J. S. Han, H. J. Chun, J. Pucilowska, P. K. Lund and M. Gallagher (2001). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats." Eur J Neurosci **14**(10): 1739-1751.

Boron, W. and E. Boulpaep (2016). The Adrenal Cortex: Cortisol. Medical Physiology.

Brattsand, R. and M. Linden (1996). "Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies." Aliment Pharmacol Ther **10 Suppl 2**: 81-90; discussion 91-82.

Burke, S. L., P. Maramaldi, T. Cadet and W. Kukull (2016). "Associations between depression, sleep disturbance, and apolipoprotein E in the development of Alzheimer's disease: dementia." Int Psychogeriatr **28**(9): 1409-1424.

Camandola, S. and M. P. Mattson (2017). "Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration." EMBO J **36**(11): 1474-1492.

Cappaert, N. L. M., N. M. Van Strien and M. P. Witter (2015). Hippocampal formation. The rat nervous system.

Chakravarty, K., H. Cassuto, L. Reshef and R. W. Hanson (2005). "Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C." Crit Rev Biochem Mol Biol **40**(3): 129-154.

Chong, F. P., K. Y. Ng, R. Y. Koh and S. M. Chye (2018). "Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease." Cell Mol Neurobiol **38**(5): 965-980.

Costanzo, L. (2013). Adrenal Medulla and Cortex. Physiology.

Crain, S. M. (1966). "Development of "organotypic" bioelectric activities in central nervous tissues during maturation in culture." Int Rev Neurobiol **9**: 1-43.

de Kloet, E. R. (2000). "Stress in the brain." Eur J Pharmacol **405**(1-3): 187-198.

de Kloet, E. R., S. A. Van Acker, R. M. Sibug, M. S. Oitzl, O. C. Meijer, K. Rahmouni and W. de Jong (2000). "Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions." Kidney Int **57**(4): 1329-1336.

De Kloet, E. R., E. Vreugdenhil, M. S. Oitzl and M. Joels (1998). "Brain corticosteroid receptor balance in health and disease." Endocr Rev **19**(3): 269-301.
De Simoni, A. and L. M. Yu (2006). "Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method." Nat Protoc **1**(3): 1439-1445.
Detka, J., A. Kurek, A. Basta-Kaim, M. Kubera, W. Lason and B. Budziszewska (2014). "Elevated brain glucose and glycogen concentrations in an animal model of depression." Neuroendocrinology **100**(2-3): 178-190.
Dong, H., C. M. Yuede, H. S. Yoo, M. V. Martin, C. Deal, A. G. Mace and J. G. Csernansky (2008). "Corticosterone and related receptor expression are associated with increased beta-amyloid plaques in isolated Tg2576 mice." Neuroscience **155**(1): 154-163.
Doussau, F., J. L. Dupont, D. Neel, A. Schneider, B. Poulain and J. L. Bossu (2017). "Organotypic cultures of cerebellar slices as a model to investigate demyelinating disorders." Expert Opin Drug Discov **12**(10): 1011-1022.
Drolle, E., F. Hane, B. Lee and Z. Leonenko (2014). "Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease." Drug Metab Rev **46**(2): 207-223.
Erdeljan, P., J. F. MacDonald and S. G. Matthews (2001). "Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor (GR) but not mineralocorticoid receptor (MR) mRNA levels in fetal mouse hippocampal neurons, in vitro." Brain Res **896**(1-2): 130-136.
Foidl, B. M., B. Ucar, A. Schwarz, A. L. Rebelo, A. Pandit and C. Humpel (2018). "Nerve growth factor released from collagen scaffolds protects axotomized cholinergic neurons of the basal nucleus of Meynert in organotypic brain slices." J Neurosci Methods **295**: 77-86.
Fuchsl, A. M. and S. O. Reber (2016). "Chronic Psychosocial Stress and Negative Feedback Inhibition: Enhanced Hippocampal Glucocorticoid Signaling despite Lower Cytoplasmic GR Expression." PLoS One **11**(4): e0153164.
Fuller, P. J., J. Yang and M. J. Young (2019). "Mechanisms of Mineralocorticoid Receptor Signaling." Vitam Horm **109**: 37-68.
Gahwiler, B. H. (1981). "Organotypic monolayer cultures of nervous tissue." J Neurosci Methods **4**(4): 329-342.
Gahwiler, B. H., M. Capogna, D. Debanne, R. A. McKinney and S. M. Thompson (1997). "Organotypic slice cultures: a technique has come of age." Trends Neurosci **20**(10): 471-477.
Gaillard, P. J. (1954). "Differentiation phenomena in explants of the embryonic chick thyroid gland." Acta Physiol Pharmacol Neerl **3**(3): 439-448.
Gao, Y., L. Tan, J. T. Yu and L. Tan (2018). "Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies." Curr Alzheimer Res **15**(3): 283-300.
Gjerstad, J. K., S. L. Lightman and F. Spiga (2018). "Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility." Stress **21**(5): 403-416.
Gomez-Sanchez, E. and C. E. Gomez-Sanchez (2014). "The multifaceted mineralocorticoid receptor." Compr Physiol **4**(3): 965-994.
Greene, D. A., M. J. Stevens, I. Obrosova and E. L. Feldman (1999). "Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy." Eur J Pharmacol **375**(1-3): 217-223.
Guerreiro, R. J., D. R. Gustafson and J. Hardy (2012). "The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE." Neurobiol Aging **33**(3): 437-456.
Guo, C., L. Sun, X. Chen and D. Zhang (2013). "Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases." Neural Regen Res **8**(21): 2003-2014.

Haber, R. S. and S. P. Weinstein (1992). "Role of glucose transporters in glucocorticoid-induced insulin resistance. GLUT4 isoform in rat skeletal muscle is not decreased by dexamethasone." Diabetes **41**(6): 728-735.
Hagan, C. E., B. Bolon and C. D. Keene (2012). Nervous system. Comparative anatomy and histology.
Hammond, C. (2015). The adult hippocampal network. Cellular and molecular neurophysiology.
Han, F., H. Ozawa, K. Matsuda, M. Nishi and M. Kawata (2005). "Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus." Neurosci Res **51**(4): 371-381.
Hardy, J. (1997). "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease." Trends Neurosci **20**(4): 154-159.
Harrison, R. G. (1907). "Observations on the living developing nerve fiber." Exp Biol Med **4**(1): 140-143.
Helmreich, D. L., M. I. Morano, H. Akil and S. J. Watson (1997). "Correlation between Changes in Stress-Induced Corticosterone Secretion and GR mRNA Levels." Stress **2**(2): 101-112.
Herman, J. P., P. D. Patel, H. Akil and S. J. Watson (1989). "Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat." Mol Endocrinol **3**(11): 1886-1894.
Hogue, M. J. (1947). "Human fetal brain cells in tissue cultures; their identification and motility." J Exp Zool **106**(1): 85-107.
Holmes, C., S. A. Jones and S. A. Greenfield (1995). "The influence of target and non-target brain regions on the development of mid-brain dopaminergic neurons in organotypic slice culture." Brain Res Dev Brain Res **88**(2): 212-219.
Huang, C. W., C. C. Lui, W. N. Chang, C. H. Lu, Y. L. Wang and C. C. Chang (2009). "Elevated basal cortisol level predicts lower hippocampal volume and cognitive decline in Alzheimer's disease." J Clin Neurosci **16**(10): 1283-1286.
Huang, L. T. (2014). "Early-life stress impacts the developing hippocampus and primes seizure occurrence: cellular, molecular, and epigenetic mechanisms." Front Mol Neurosci **7**: 8.
Hubner, S., L. Dejager, C. Libert and J. P. Tuckermann (2015). "The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: transrepression is not enough." Biol Chem **396**(11): 1223-1231.
Hugin-Flores, M. E., T. Steimer, M. L. Aubert and P. Schulz (2004). "Mineralo- and glucocorticoid receptor mrnas are differently regulated by corticosterone in the rat hippocampus and anterior pituitary." Neuroendocrinology **79**(4): 174-184.
Humpel, C. (2015). "Organotypic brain slice cultures: A review." Neuroscience **305**: 86-98.
Ingebrigtsen, R. (1913). "Studies of the Degeneration and Regeneration of Axis Cylinders in Vitro." J Exp Med **17**(2): 182-191.
Ito, Y., R. Banno, S. Hagimoto, Y. Ozawa, H. Arima and Y. Oiso (2012). "TNFalpha increases hypothalamic PTP1B activity via the NFkappaB pathway in rat hypothalamic organotypic cultures." Regul Pept **174**(1-3): 58-64.
Jin, N., W. Qian, X. Yin, L. Zhang, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, C. X. Gong and F. Liu (2013). "CREB regulates the expression of neuronal glucose transporter 3: a possible mechanism related to impaired brain glucose uptake in Alzheimer's disease." Nucleic Acids Res **41**(5): 3240-3256.
Jouanne, M., S. Rault and A. S. Voisin-Chiret (2017). "Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents." Eur J Med Chem **139**: 153-167.

Kadmiel, M. and J. A. Cidlowski (2013). "Glucocorticoid receptor signaling in health and disease." Trends Pharmacol Sci **34**(9): 518-530.
Kandel, E. R. (2013). The organization of the central nervous system. Principles of neural science.
Kitraki, E., D. Karandrea and C. Kittas (1999). "Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain." Neuroendocrinology **69**(5): 331-338.
Lane, C. A., J. Hardy and J. M. Schott (2018). "Alzheimer's disease." Eur J Neurol **25**(1): 59-70.
Lee, D. Y., E. Kim and M. H. Choi (2015). "Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress." BMB Rep **48**(4): 209-216.
Loffredo Sampaolo, C. and G. Sampaolo (1956). "[Organotypic cultures of chick embryo lung; some histologic and histochemical aspects]." Boll Soc Ital Biol Sper **32**(7-8): 797-801.
Magistretti, P. J. and I. Allaman (2015). "A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging." Neuron **86**(4): 883-901.
Magomedova, L. and C. L. Cummins (2016). "Glucocorticoids and Metabolic Control." Handb Exp Pharmacol **233**: 73-93.
Monesi, V. (1960). "Differentiation of argyrophil and argentaffin cells in organotypic cultures of embryonic chick intestine." J Embryol Exp Morphol **8**: 302-313.
Mravec, B., L. Horvathova and A. Padova (2018). "Brain Under Stress and Alzheimer's Disease." Cell Mol Neurobiol **38**(1): 73-84.
Mueckler, M. and B. Thorens (2013). "The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters." Mol Aspects Med **34**(2-3): 121-138.
Nicolaides, N. C., Z. Galata, T. Kino, G. P. Chrousos and E. Charmandari (2010). "The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function." Steroids **75**(1): 1-12.
O'Brien, R. J. and P. C. Wong (2011). "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease." Annu Rev Neurosci **34**: 185-204.
Oakley, R. H. and J. A. Cidlowski (2013). "The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease." J Allergy Clin Immunol **132**(5): 1033-1044.
Ortsäter, H., A. Sjöholm and R. Rafacho (2012). Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess. State of the Art of Therapeutic Endocrinology.
Ostergaard, K., B. Finsen and J. Zimmer (1995). "Organotypic slice cultures of the rat striatum: an immunocytochemical, histochemical and in situ hybridization study of somatostatin, neuropeptide Y, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase, and enkephalin." Exp Brain Res **103**(1): 70-84.
Patching, S. G. (2017). "Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery." Mol Neurobiol **54**(2): 1046-1077.
Piaceri, I., B. Nacmias and S. Sorbi (2013). "Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease." Front Biosci (Elite Ed) **5**: 167-177.
Plenz, D. and S. T. Kitai (1996). "Generation of high-frequency oscillations in local circuits of rat somatosensory cortex cultures." J Neurophysiol **76**(6): 4180-4184.
Popp, J., K. Schaper, H. Kolsch, G. Cvetanovska, F. Rommel, D. Klingmuller, R. Dodel, U. Wullner and F. Jessen (2009). "CSF cortisol in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." Neurobiol Aging **30**(3): 498-500.
Pragallapati, S. and R. Manyam (2019). "Glucose transporter 1 in health and disease." J Oral Maxillofac Pathol **23**(3): 443-449.
Price, D. L., A. V. Savonenko, M. Albert, J. C. Troncoso and P. C. Wong (2009). Aging of the Brain and Alzheimer's Disease. Encyclopedia of Neuroscience**:** 187-195.

Reinbold, R. (1954). "[Organotypic differentiation of the eye of the chick embryo in vitro]." C R Seances Soc Biol Fil **148**(15-18): 1493-1495.
Reiss, A. B., H. A. Arain, M. M. Stecker, N. M. Siegart and L. J. Kasselman (2018). "Amyloid toxicity in Alzheimer's disease." Rev Neurosci **29**(6): 613-627.
Ricci, S., A. Fuso, F. Ippoliti and R. Businaro (2012). "Stress-induced cytokines and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **28**(1): 11-24.
Russell, J. W., D. Golovoy, A. M. Vincent, P. Mahendru, J. A. Olzmann, A. Mentzer and E. L. Feldman (2002). "High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons." FASEB J **16**(13): 1738-1748.
Ruzzin, J., A. S. Wagman and J. Jensen (2005). "Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor." Diabetologia **48**(10): 2119-2130.
Sapolsky, R. M., L. C. Krey and B. S. McEwen (1984). "Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain." Endocrinology **114**(1): 287-292.
Segeritz, C. P. and L. Vallier (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. Basic Science Methods for Clinical Researchers. M. Jalali, F. Saldanha and M. Jalali**:** 151-172.
Shah, K., S. Desilva and T. Abbruscato (2012). "The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease." Int J Mol Sci **13**(10): 12629-12655.
Sieg, F., K. Obst, T. Gorba, B. Riederer, H. C. Pape and P. Wahle (1998). "Postnatal expression pattern of calcium-binding proteins in organotypic thalamic cultures and in the dorsal thalamus in vivo." Brain Res Dev Brain Res **110**(1): 83-95.
Spencer, R. L. and T. Deak (2017). "A users guide to HPA axis research." Physiol Behav **178**: 43-65.
Spiga, F., J. J. Walker, J. R. Terry and S. L. Lightman (2014). "HPA axis-rhythms." Compr Physiol **4**(3): 1273-1298.
Stahn, C., M. Lowenberg, D. W. Hommes and F. Buttgereit (2007). "Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists." Mol Cell Endocrinol **275**(1-2): 71-78.
Stoppini, L., P. A. Buchs and D. Muller (1991). "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue." J Neurosci Methods **37**(2): 173-182.
Sugden, M. C. and M. J. Holness (2003). "Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(5): E855-862.
Swaab, D. F., A. M. Bao and P. J. Lucassen (2005). "The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration." Ageing Res Rev **4**(2): 141-194.
Tilley, L., K. Morgan and N. Kalsheker (1998). "Genetic risk factors in Alzheimer's disease." Mol Pathol **51**(6): 293-304.
Tsigos, C. and G. P. Chrousos (2002). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress." J Psychosom Res **53**(4): 865-871.
Tu, S., S. Okamoto, S. A. Lipton and H. Xu (2014). "Oligomeric Abeta-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **9**: 48.
Van Laeken, N., G. Pauwelyn, R. Dockx, B. Descamps, B. Brans, K. Peremans, C. Baeken, I. Goethals, C. Vanhove and F. De Vos (2018). "Regional alterations of cerebral [(18)F]FDG metabolism in the chronic unpredictable mild stress- and the repeated corticosterone depression model in rats." J Neural Transm (Vienna) **125**(9): 1381-1393.

Viengchareun, S., D. Le Menuet, L. Martinerie, M. Munier, L. Pascual-Le Tallec and M. Lombes (2007). "The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology." Nucl Recept Signal **5**: e012.
Wang, Y. and E. Mandelkow (2016). "Tau in physiology and pathology." Nat Rev Neurosci **17**(1): 5-21.
Weintraub, S., A. H. Wicklund and D. P. Salmon (2012). "The neuropsychological profile of Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(4): a006171.
Wetzel, D. M., M. C. Bohn, A. M. Kazee and R. W. Hamill (1995). "Glucocorticoid receptor mRNA in Alzheimer's diseased hippocampus." Brain Res **679**(1): 72-81.
Wilkins, H. M. and R. H. Swerdlow (2017). "Amyloid precursor protein processing and bioenergetics." Brain Res Bull **133**: 71-79.
Xu, C., J. He, H. Jiang, L. Zu, W. Zhai, S. Pu and G. Xu (2009). "Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes." Mol Endocrinol **23**(8): 1161-1170.
Yang, X., C. Yao, T. Tian, X. Li, H. Yan, J. Wu, H. Li, L. Pei, D. Liu, Q. Tian, L. Q. Zhu and Y. Lu (2018). "A novel mechanism of memory loss in Alzheimer's disease mice via the degeneration of entorhinal-CA1 synapses." Mol Psychiatry **23**(2): 199-210.
Yau, J. L. and J. R. Seckl (2012). "Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory." Front Aging Neurosci **4**: 24.
Yin, F., H. Sancheti, I. Patil and E. Cadenas (2016). "Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease." Free Radic Biol Med **100**: 108-122.

ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ALZHEIMER HASTALIĞI İLE KORTİKOSTEROİD YOLAKLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN GLUKOZ METABOLİZMASI AÇISINDAN BEYİN ORGANOTİPİK KESİT KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%7	%5	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	www.selcukkoksal.com İnternet Kaynağı	%1
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	tbgder.org İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Kirikkale University Öğrenci Ödevi	<%1
6	www.readperiodicals.com İnternet Kaynağı	<%1
7	www.noropsikiyatriarsivi.com İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Bahcesehir University Öğrenci Ödevi	<%1

nek.istanbul.edu.tr:4444

ÖZGEÇMİŞ