

**T.C.
TÜRKİYE CUMHURİYETİ
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STRES UYARANLARI İLE KOŞULLANDIRILMIŞ İNSAN
ASTROSİTLERİNİN FENOTİPİK VE METABOLİK
PROFİLİNİN İNCELENMESİ**

Necati Alp COŞKUN

Kök Hücre Programı

Yüksek Lisans Tezi

ANKARA

2024

T.C.
TÜRKİYE CUMHURİYETİ
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STRES UYARANLARI İLE KOŞULLANDIRILMIŞ İNSAN
ASTROSİTLERİNİN FENOTİPİK VE METABOLİK
PROFİLİNİN İNCELENMESİ

Necati Alp COŞKUN

Kök Hücre Programı

Yüksek Lisans Tezi

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fahriye Duygu ÇETİNKAYA

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Cansu ÖZDEMİR SAKA

ANKARA

2024

**STRES UYARANLARI İLE KOŞULLANDIRILMIŞ İNSAN
ASTROSİTLERİNİN FENOTİPİK VE METABOLİK
PROFİLİNİN İNCELENMESİ**

Necati Alp COŞKUN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahriye Duygu Çetinkaya

Jüri Başkanı:	<i>Doç. Dr. Arzu ATALAY</i>	<i>(İmza)</i>
	<i>Ankara Üniversitesi</i>	
Tez Danışmanı:	<i>Prof. Dr. Fahriye Duygu ÇETİNKAYA</i>	<i>(İmza)</i>
	<i>Hacettepe Üniversitesi</i>	
Üye:	<i>Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU</i>	<i>(İmza)</i>
	<i>Hacettepe Üniversitesi</i>	

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

10 Eylül 2024

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir⁽³⁾

11.09.2024

(İmza)

Necati Alp COŞKUN

“**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metodların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir
* Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Fahriye Duygu ÇETİNKAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığını beyan ederim.

Necati Alp COŞKUN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli düşünceleriyle bana yol gösteren, beni sürekli motive eden, tecrübesiyle ve bilgisiyle ufkumu genişleten ve bu zorlu süreci bana sevdiren, her daim güler yüzlü ve kibar olan, tez danışmanım ve çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Fahriye Duygu ÇETİNKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte gerek laboratuvar ortamında gerekse laboratuvar dışında bana yol gösteren, fikir veren, beni destekleyen, bana abla/kardeş olan ekip üyelerim, başta ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Cansu ÖZDEMİR SAKA olmak üzere, çok değerli mentorum, kurtarıcım Bihter MURATOĞLU'na ve Beyza TURGUT'a teşekkür ederim.

Farklı bir alandan gelmeme rağmen bana kök hücre bilimini sabırla anlatan, yeni yaklaşımlar sunan ve bu bilimi sevdiren saygıdeğer Kök Hücre Anabilim Dalı hocalarıma teşekkür ederim.

Her zaman bana destek veren, yardımcı olan ve bir sorum/sorunum olduğu zaman yardımına koşan öğretim görevlisi hocalarım başta olmak üzere tüm bölüm arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu zorlu dönemde birlikte sevinip birlikte üzüldüğüm, bir sorun olduğunda birlikte çözüm ürettiğim, dostum ve meslektaşım olan Ali Berk ALIŞAN'a ve lisans eğitimimden beri beni her konuda destekleyen ve bana kardeş olan Berke Can DEMİRCİOĞLU'na teşekkür ederim.

Son olarak tezimi, bana en zorlu dönemlerde destek olan ve manevi desteğini asla esirgemeyen ailem; Leyla COŞKUN ve Gökhan COŞKUN'a, kardeşim Tuana Göksu COŞKUN'a ve hayat ortağım, ilham perim ve dünyanın en güzel varlığı Gülru KARAAHMETOĞLU'na adanmak istiyorum.

Ek olarak 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında beni destekledikleri için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB) ve bu tez çalışması kapsamında verdikleri maddi destekten dolayı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP-Proje No: TYL-2022-20617) teşekkür ederim.

ÖZET

COŞKUN N.A, Stres Uyarıları ile Koşullandırılmış İnsan Astrositlerinin Fenotipik ve Metabolik Profilinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2024

Astrositler, enerji metabolizmasını düzenleyerek, iyon dengesini koruyarak ve nörotransmitter seviyelerini modüle ederek nöronlara temel metabolik destek sağlar. Ancak, stres maruziyetine bağlı olarak astrositler nöron koruyucu özellikleri yerine nörotoksik bir fenotipe geçerek nörodejenerasyona katkıda bulunabilir. Bu çalışmada, astrositlere farklı uyarılar uygulanmış, çevresel toksinlere ve stres faktörlerine hücrel yanıtı ile aracılık ettiği bilinen Aril Hidrokarbon Reseptörü (AhR) sinyalizasyonu ile ilişkileri araştırılmıştır. Ölümsüzleştirilmiş insan astrositleri 24 saat boyunca farklı ajanlar ve dozlarına (TNF- α 10,100 ng/mL, LPS 100 ng/mL, TGF- β 1 2,5,10 ng/mL, AhR agonisti 6-Formylindolo[3,2-b] carbazole/FICZ 100,1000 nM; AhR-antagonisti 1,5 μ M Stem Regenin-1 /SR1) maruz bırakıldıktan sonra moleküler ve metabolomik (GC-MS) analizler gerçekleştirilmiştir; RT-qPCR kullanılarak nöroprotektif/nörotoksik astrositler ve AhR'ye özgü gen ifadeleri analiz edilmiştir. TNF- α ve LPS gruplarında inflamatuvar gen ifadelerinin arttığı, TGF- β 1 grubunda ise azaldığı gözlemlenmiştir. Tüm gruplarda nörotoksik/nöroprotektif genlerin ifadelerinde anlamlı değişiklikler göze çarpmıştır. Hücre kültür ortamlarının metabolom analizleri sonucunda TNF- α , LPS, SR1 ve düşük doz TGF- β 1 gruplarında ornitin seviyelerinde yükseklik ve enerji metabolitlerinin seviyelerinde düşüş görülmüş, ornitinin nörodejenerasyonda potansiyel bir terapötik hedef olabileceği düşünülmüştür. Bu bulgularla birlikte, astrositlerin AhR agonist (FICZ) ve antagonist (SR1)leri ile uyarılması sonucu astrositlerin hem A1 hem de A2 fenotipine özgü genlerde değişiklikler olması astrositlerin bir ara fazına işaret etmiştir.

Anahtar Kelimeler: Astrosit, stres, nörotoksik/nöroprotektif fenotip, AhR sinyalizasyonu, nörodejenerasyon.

Bu çalışma HÜ-BAP (Proje no: TYL-2022-20617) ve kısmen TÜBİTAK (Proje no: 220S759) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

COŞKUN N.A, Investigation of Phenotypic and Metabolic Profiles of Human Astrocytes Conditioned with Stress Stimuli, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Stem Cell Program Master Thesis, Ankara, 2024

Astrocytes provide essential metabolic support to neurons by regulating the supply of energy substrates, maintaining ion balance, and modulating neurotransmitter levels; however, under conditions of metabolic stress, their dysfunction can contribute to neurodegeneration by shifting from a neuroprotective to a neurotoxic phenotype. This study investigates the effects of stress factors applied on astrocytes and their relationship with Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) signaling, which is known to mediate cellular responses to environmental toxins and stressors. Immortalized human astrocytes were treated for 24 hours with various agents and doses: TNF- α 10,100 ng/mL, LPS 100 ng/mL, TGF- β 1 2,5,10 ng/mL, AhR agonisti 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole/FICZ 100,1000 nM; AhR-antagonisti 1,5 μ M Stem Regenin-1 /SR1. Metabolome analyses of the supernatants (conditioned medium) were performed using GC-MS. RT-qPCR was used to analyze seventeen genes involved in neuroprotective and neurotoxic astrocyte responses and AhR-signaling. Increased expression of inflammatory genes was observed in the TNF- α and LPS groups and decreased expression in TGF- β 1 group. Significant changes in the expression of both neurotoxic and neuroprotective-specific genes were noted in all groups. Metabolome analysis revealed higher ornithine levels and lower level of energy metabolites in the TNF- α , LPS, SR1, and low-dose TGF- β 1 groups suggesting ornithine as a potential therapeutic target in neurodegeneration. Together with these findings, AhR agonist FICZ- and antagonist SR1- induced alterations in expression of the astrocyte A1 and A2 genes suggested the presence of an intermediate phase in astrocytes.

Keywords: Astrocyte, stress, Neurodegeneration, neurotoxic/neuroprotective phenotypes, AhR-signaling

This work was supported by the HU-BAP (Grant no: TYL-2022-20617), and partially by the TUBITAK (Grant no: 220S759)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Santral Sinir Sistemi (SSS)	3
2.1.1. Santral Sinir Sisteminin Oluşumu	3
2.1.2. Santral Sinir Sistemi Bileşenleri ve Nöral Mikroçevre	5
2.2 Nörodejenerasyon ve Nörodejeneratif Hastalıklar	9
2.2.1. Alzheimer Hastalığı (AD/Alzheimer Disease)	10
2.2.2. Frontotemporal Demans (FTD)	11
2.2.3. Parkinson Hastalığı (PD)	12
2.2.4. Huntington Hastalığı (HD)	13
2.2.5. Amyotrofik lateral skleroz (ALS)	14
2.2.6. Prion Hastalıkları	15
2.2.7. Diğer Nörodejeneratif Hastalıklar	16
2.3 Nörodejeneratif Hastalıkların Moleküler Gelişim Özellikleri:	17
2.4 Nörodejenerasyonda Nöron Mikroçevresinin Rolü	19
2.5 Aril Hidrokarbon Reseptör (AhR) Yolağı ve Nörodejenerasyon	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1 Glial Hücre Kültürü ve Optimum Stres Dozlarının Belirlenmesi	25
3.2 Stres Faktörlerinin Belirlenmesi	25
3.3 WST-1 Testi	25
3.4 Morfolojik Analiz	26

3.5 RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Gerçek zamanlı q-PCR Ölçümleri	27
3.6 Metabolom Analizleri	31
3.7 Metabolom Verilerinin değerlendirilmesi	32
4. BULGULAR	33
4.1 WST-1 Analizleri	33
4.2 Morfolojik Analizler	36
4.3 Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları	38
4.4 Metabolom Analizleri	47
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	81
7. KAYNAKLAR	84
8. EKLER	90
EK 1. Orijinallik Raporu	90
EK 2. Dijital Makbuz	91
9. ÖZGEÇMİŞ	92

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AD	Alzheimer Hastalığı
AhR	Aril Hidrokarbon Reseptörü
APC	Astrosit Progenitör Hücresi
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Beta Protein Öncüsü
aRGC	Apikal Radyal Glial Hücreler
Aβ	Amiloid Beta
BBB	Kan-Beyin Bariyeri
BOS	Beyin-Omurilik Sıvısı
bRGC	Bazal Radyal Glial Hücreler
c9orf72	Chromosome 9 Open Reading Frame 72
CJD	Creutzfeldt-Jakob Hastalığı
ER	Endoplazmik Retikulum
ES	Endoplazmik Retikulum kaynaklı Stres
FICZ	6-Formylindolo(3,2-b) carbazole
FTD	Frontotemporal Demans
FUS	Fused in Sarcoma
G6P	Glikoz-6-Fosfat
GC-MS	Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi
GLUT1	Glikoz Transporter 1
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Sendromu
HD	Huntington Hastalığı
Htt	Huntingtin Protein
IPC	Ara Progenitör Hücreler
LPS	Lipopolisakkarit
LRRK2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2
MAPT	Microtubule Associated Protein Tau

NEC	Nöroepitelyal Hücreler
ng	Nanogram
nIPC	Nöron Ara Progenitör Hücresi
NSC	Nöral Kök Hücreler
OPC	Oligodentrosit Progenitör Hücresi
OS	Oksidatif Stres
PD	Parkinson Hastalığı
PINK1	PTEN-induced Kinase 1
PPP	Pentoz-Fosfat Yolağı
PrD	Prion Hastalıkları
PrP	Prion Proteini
PSEN1	Prenisilin-1
PSEN2	Prenisilin-2
RGC	Radyal Glial Hücreler
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sCJD	Sporadik Creutzfeldt-Jakob Hastalığı
SOD1	Superoxide Dismutase 1
SR1	StemRegenin 1
SSS	Santral Sinir Sistemi
SVZ	Subventriküler Bölge
TAP	Tumor Associated Protein
TBK1	TANK-binding Kinase 1
TCA	Krebs Döngüsü
TDP43	TAR DNA-binding Protein 43
TGF-β1	Transforming Growth Factor-Beta
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-Alpha
TREM2	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2

UPR	Katlanmamış Protein Yanıtı
UPS	Ubikuitin Proteazom Sistemi
VZ	Ventriküler Bölge
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
β	Beta
γ	Gamma
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar



ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1	Embriyonik nörogenezde bölünme ve farklılaşmalar. (SB= Simetrik Bölünme, AB= Asimetrik Bölünme F= Farklılaşma., Biorender)	3
2.2	Nöron ve glial hücrelerin oluşumu ((1-3) kaynaklarından ve Biorender şablonlarından üretilmiştir.)	4
2.3	Astrosit Metabolizması ((10, 16, 17) numaralı kaynaklardan esinlenerek Biorender üzerinden çizilmiştir.)	8
2.4	AHR Sinyalizasyonu ((60) kaynağından esinlenerek Biorender üzerinden çizilmiştir.)	22
3.1	WST-1'de kullanılan dozlar.	26
4.1	Astrosit hücrelerine uygulanan farklı TNF- α dozlarının canlılık üzerine olan etkisi.	33
4.2	Astrosit hücrelerine uygulanan farklı TGF- β 1 dozlarının canlılık üzerine olan etkisi.	34
4.3	Astrosit hücrelerine uygulanan farklı SR1 dozlarının canlılık üzerine olan etkisi.	34
4.4	Astrosit hücrelerine uygulanan farklı FICZ dozlarının canlılık üzerine olan etkisi.	35
4.5	Doz uygulanmayan (KONTROL) kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saat (t24) morfolojik görüntüleri (20x).	36
4.6	TNF- α uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).	36
4.7	2,5 ng/mL TGF- β 1 uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).	36
4.8	1,5 μ M SR1 uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).	37
4.9	100 nM FICZ uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).	37
4.10	1000 nM FICZ uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).	37
4.11	Astrosit Hücrelerinde TNF- α ve LPS dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) VIM, B) GFAP, C) SRGN, D) IL-6, E) FBLN5 ve F) FKBP5 gen ifade analizleri.	38
4.12	TNF- α ve LPS dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) PDL-1, B) IL-8, C) S100B, D) S100A10, E) BDNF ve F) STAT3 gen ifadeleri.	39

4.13	TNF- α ve LPS dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) COL1A1, B) IL-10, C) CYP1A1, D) CYP1B1 ve E) AHR gen ifadeleri.	40
4.14	TGF- β 1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) VIM, B) GFAP, C) SRGN, D) IL-6, E) FBLN5 ve F) FKBP5 gen ifadeleri.	41
4.15	TGF- β 1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) PDL-1, B) IL-8, C) S100B, D) S100A10, E) BDNF ve F) STAT3 gen ifadeleri.	42
4.16	TGF- β 1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) COL1A1, B) IL-10, C) CYP1A1, D) CYP1B1 ve E) AHR gen ifadeleri.	43
4.17	FICZ ve SR1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) VIM, B) GFAP, C) SRGN, D) IL-6, E) FBLN5 ve F) FKBP5 gen ifadeleri.	44
4.18	FICZ ve SR1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) PDL-1, B) IL-8, C) S100B, D) S100A10, E) BDNF ve F) STAT3 gen ifadeleri.	45
4.19	FICZ ve SR1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) COL1A1, B) IL-10, C) CYP1A1, D) CYP1B1 ve E) AHR gen ifadeleri.	46
4.20	Kontrol hücrelerinin bulunduğu ortamın, hücresiz ortama kıyasla metabolit karşılaştırılması.	47
4.21	24 saat boyunca TNF- α 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	48
4.22	24 saat boyunca TNF- α 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	49
4.23	24 saat boyunca TNF- α 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	50
4.24	24 saat boyunca TNF- α 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	51
4.25	24 saat boyunca TNF- α 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca TNF- α 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla PLS-DA A) Skor Plot ve B) VIP Plot karşılaştırmaları.	52
4.26	24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	53

4.27	24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	54
4.28	24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	55
4.29	24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	56
4.30	24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	57
4.31	24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	58
4.32	24 saat boyunca LPS 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol grubu hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	59
4.33	24 saat boyunca LPS 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	60
4.34	24 saat boyunca SR1 1,5 μ M dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol grubu hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	61
4.35	24 saat boyunca SR1 1,5 μ M dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	62
4.36	24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol grubu hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	63
4.37	24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	64
4.38	24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol grubu hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	65

4.39	24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	66
4.40	24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.	67
4.41	24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.	68
5.1	Ornitin yolağı (74) (Heinrich Wiesinger, Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system,2001).	77
5.2	Metabolom sonuçlarına göre SR1 1,5 µM dozu uygulanan hücre kültür ortamı ile FICZ 100 nM dozu uygulanan hücre kültür ortamlarının karşılaştırması	79

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1	Nörodejeneratif Hastalıklar ve Biriken Proteinler.	17
3.1	Tasarlanan genler ve <i>forward/reverse</i> dizileri.	28
3.2	Seçilen genler, fonksiyonları ve ilişkili oldukları grup.	29
3.3	Tasarlanan genler ve forward/reverse dizileri.	30
3.4	RT-qPCR aşamaları, sıcaklıkları ve süreleri.	31
5.1	Bölüm 4.3'teki RT-qPCR PCR sonuçlarının özetlendiği, genlerin kontrol grubuna kıyasla ifade değişimlerinin ısı haritası.	72
5.2	Metabolom sonuçlarının özetlendiği, dozların kontrol grubuna ve birbirine kıyasla metabolit değişimleri ve ısı haritası (AD = anlamlı değil).	75

1. GİRİŞ

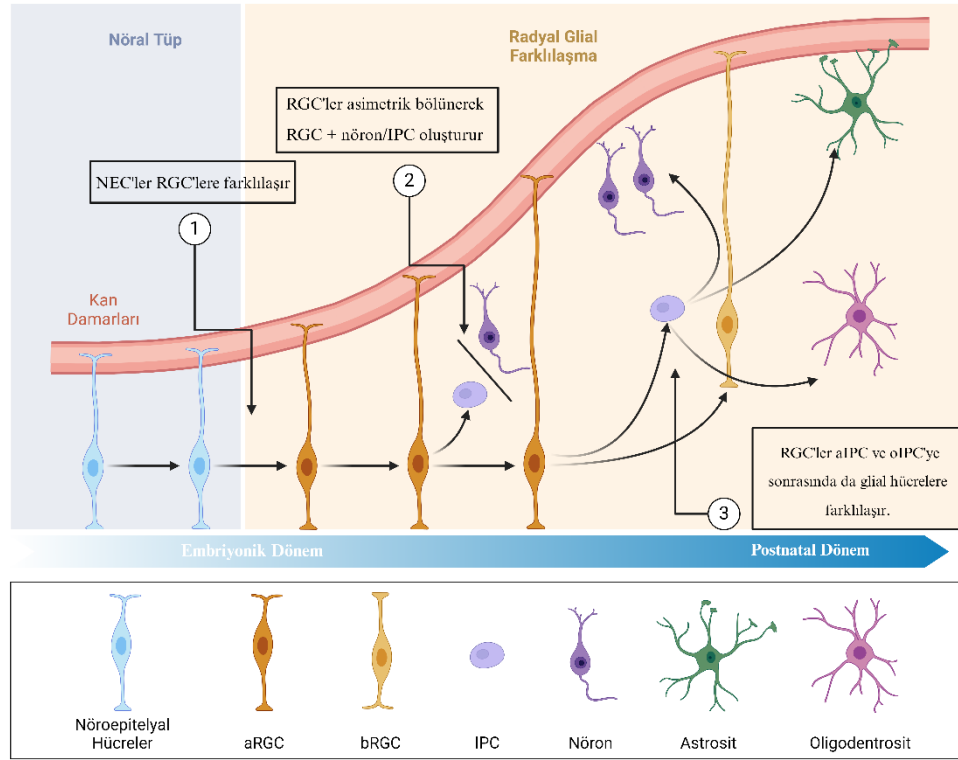
Yaşlanan dünya nüfusuna paralel olarak Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların artan insidansı ve yapay zekâ, derin öğrenme konuları ile nörobilim alanı günümüzün önde gelen bilim alanlarının başında gelmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi bulunmamakta, hasta ve ailelerin yaşam kalitesini azaltmakta, topluma ağır sosyal ve ekonomik yük getirmektedir. Buradan hareketle, beyin sağlığının korunması ve iyileştirilmesi toplumların gelişimi/refahı için öncelikli konudur. Beyin fonksiyonlarının iyileştirilmesi ve terapötik stratejilerin geliştirilmesi için nörodejenerasyona sebep olan bozuklukların patogenezinin anlaşılması, olumlu, olumsuz uyarıların ortaya çıkarılması yönünde her geçen gün daha fazla araştırma yapılmaktadır.

Nöronal mikroçevre nöronun büyümesini, gelişmesini, farklılaşmasını ve kaderini etkileyen ortamdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda nörodejenerasyonda nöron fonksiyonlarının bozulmasından önce nöronal destek hücreleri olan glial hücrelerde bozulmalar göze çarpmıştır. İlk olarak glial hücre tiplerinden biri olan mikrogliaların stres halinde nörotoksik ve nöroprotektif fenotipe farklılaşabileceği gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise diğer bir glial hücre tipi olan astrositlerin de mikroçevre koşullarına bağlı olarak aynı mikroglialar gibi nörotoksik (A1) ve nöroprotektif (A2) fenotipe farklılaşabileceği ortaya atılmıştır. Astrositler, beyin enerji metabolizmasının düzenlenmesi, santral sinir sistemi fonksiyonlarının yürütülmesinde temel role sahip hücreleridir. Astrositler ile nöron hücreleri arasında sürekli döngü halinde bir nörotransmitter geçişi bulunmaktadır. Nöronal iletim fonksiyonunun yürütülmesinde kritik olan nörotransmitter (glutamat/GABA/glutamin) döngüsü astrosit metabolizması ile düzenlenmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda astrosit metabolizması ve fenotipinde önemli değişiklikler bildirilmiş, ancak halen ilk olarak hangi hücrelerin fonksiyonları bozuluyor ve hangi hücreler arası iletişim/iletişimsizlik, hastalık patolojisinin ilerlemesine sebep oluyor bilinmemektedir. Diğer taraftan, çevresel kirliliğin hızla artmakta olduğu günümüzde olumsuz çevresel etkenler/kirleticiler/zenobiyotiklerin, başta santral sinir sistemi (SSS) olmak üzere insan sağlığı üzerine etkilerinin araştırılması da kritik bir konu halini almaktadır.

Bu tez çalışmasında, astrositler (İzmir Biyotıp ve Genom Merkezinden temin edilen ölümsüzleştirilmiş insan astrosit hattı) 24 saat boyunca TNF- α , LPS gibi inflamatuvar faktörler yanında TGF- β 1 ve zenobiyotik/dioksin reseptörü olarak bilinen Aril hidrokarbon reseptör (AhR) agonist (6-Formylindolo[3,2-b]carbazole/FICZ) ve antagonist (Stem Regenin-1 /SR1) uyarımlarına maruz bırakıldıktan sonra morfolojik, moleküler ve metabolik analizler yapılmıştır. Bu amaçla, literatürde yer alan 17 tane A1 ve A2 astrosit spesifik genler ile AhR sinyalizasyonu ile ilişkili gen ifadeleri RT-qPCR ile ölçülmüş, hücre kültürlerinin süpernatantları ise gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) ile incelenerek metabolomik analizleri yapılmıştır.



Nörogenezin başında kök hücre havuzunu genişletmek için NSC'ler simetrik bölünmeye başlar. Ancak zamanla asimetrik bölünerek bir aRGC bir NEC oluşturur. Daha sonra aRGC'ler simetrik bölünerek, havuzunu genişletebilirken veya iki tane IPC oluştururlarken ; asimetrik bölünerek bir adet aRGC, bir adet IPC veya bir adet bRGC bir adet aRGC oluşturabilirler. Oluşan IPC'ler nöron üretmek için tekrardan simetrik bölünürler. bRGC'ler ise simetrik bölünerek iki bRGC; asimetrik bölünerek bir bRGC bir nöron oluşturabilirler. (4)



Şekil 2.2: Nöron ve glial hücrelerin oluşumu ((1-3) kaynaklarından ve Biorender şablonlarından üretilmiştir.)

Embriyonik dönemin geç dönemlerinde ve/veya postnatal dönemde gliogenez başlamaktadır. Bu sırada RGC'ler tarafından astrosit IPC (aIPC) ve oligodentrosit IPC (oIPC)'ler ve son olarak da glial hücreler farklılaşmaya başlamaktadır (2, 3).

2.1.2. Santral Sinir Sistemi Bileşenleri ve Nöral Mikroçevre

Bir hücrenin mikroçevresi, fiziksel, mekanik ve biyokimyasal mekanizmalar yoluyla hücresel fenotipini, kaderini, farklılaşmasını ve potansiyelini etkileyen ekstraselüler matriks (ECM), hücreler ve interstisyel sıvının organize bir kombinasyonudur (5). Yapılan çalışmalarda nöron mikroçevre elemanlarının hem embriyonik nörogenezde hem de yetişkin nörogenezde nöron göçünü, farklılaşmasını, yapışmasını etkilediği görülmüştür (3). Santral sinir sisteminde birçok yapı nörona destek vermekte ve nöron mikroçevresini oluşturmaktadır. Bu yapılar:

- Beyin-Omurilik Sıvısı (BOS) üretiminde görev alarak nöronları dış darbelerden koruyan, nörona enerji sağlayan, nörotransmitter trafiğini düzenleyen, immün yanıt oluşumuna destek veren ve çeşitli büyüme faktörleri ve sinyallerle nörogenezi destekleyen *choroid plexus* (3),
- Nörona besin taşıyan, atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan, homeostazi sağlayan ve nörogenezde özellikle RGC'lerin gelişiminde aktif görev alan kan damarları (3),
- Beyni ve dolayısıyla nöronları fiziksel etkenlere karşı koruyan, BOS akışını sağlayarak nöronlara dolaylı destek sağlayan, nöral göç ve farklılaşmada görev alan meninksler (3),
- Nörona yapısal destek sağlayan ve farklılaşması, morfolojisi, proliferasyonu, göçü gibi fonksiyonların gerçekleşmesi için gerekli ortam olan ECM (3),
- Kan-Beyin Bariyeri (Blood Brain Barrier/BBB) oluşumunda görev alan, damarlanma sağlayan ve çeşitli büyüme faktörleriyle nörogeneze katkı sağlayan perisitler (3) ve son olarak
- Glial hücreler olarak bilinen mikroglialar, astrositler ve oligodentrositlerdir (3).

Beyin hücrelerinin yaklaşık %35ini oluşturan glial hücreler makroglialar (astrosit, oligodentrosit, vb.) ve mikroglialar olarak iki ana kategoriye ayrılmaktadır.

Mikroglialar, merkezi sinir sisteminin makrofaj hücreleridir. Mikroglialar, gelişim sırasında sinaptik yeniden modelleme, BBB geçirgenliğini kontrol etme, metabolik ürünlerin ve hasarlı hücrelerin temizlenmesi, hastalık durumlarında Amiloid β (A β) plaklarının, virüs ve bakterilerin parçalanması, miyelinasyonun düzenlenmesi,

vasküler bütünlüğün sağlanması ve kontrol edilmesi, sinaptik plastisitenin düzenlenmesi, eksitotoksitenin (aşırı nörotransmitter salınması) önlenmesi ve nörogenez/gliogenezde görev alma gibi önemli görevleri üstlenerek sağlıklı bir beyinde nörona destek sağlamaktadır. Ayrıca bir diğer glial hücre olan astrositlerle sürekli iletişim halinde olarak astrosit aktivitesinin de düzenlenmesinde görev almaktadır.

Oligodentrositler ise aksonları sarıp elektrik sinyallerini hızlı ve etkili bir şekilde iletilmesini sağlayan myelin kılıf üretiminde görev alan glial hücrelerdir. Ek olarak immün modülasyonda rol oynar, aksonlara metabolik ve trofik destek sağlamaktadır (6).

Son olarak astrositler, BBB oluşumunda, beyne oksijen ve besin iletiminde, sinaptik taşımanın düzenlenmesinde, nöronlara metabolik destek sağlanmasında, iyon homeostazında, nörotransmitter metabolizmasında, oksidatif stres yanıtında ve zararlı moleküllerin arıtılmasında, inflamatuvar ve immün yanıt üretiminde ve çeşitli büyüme faktörlerinin salgısında görev alan yıldız şekilli glial hücrelerdir (7, 8). Ayrıca nörogenezi düzenlemekte ve yüksek nöronal aktivite sırasında nörona enerji sağlamaktadır (9). Astrosit metabolizmasındaki bazı değişiklikler nöron sağlığını doğrudan etkilemektedir.

- Enerji metabolizması yönünden astrositler:

Astrositler, çevresindeki nöronlara enerji sağlamak için kan damarlarından glikozu GLUT1 aracılığıyla alır. Astrositlere alınan glikoz, glikoz-6-fosfata (G6P) dönüşür ve ardından glikolize uğrar veya Pentoz-Fosfat-Yolağına (PPP) girer. Glikolize giren G6P, pirüvata dönüşerek Krebs Döngüsü'ne (TCA) girebilir, laktata dönüşebilir ya da asetil koenzim A'ya dönüşerek amino asitlerin, fosfolipitlerin, keton cisimlerinin ve diğer substratların sentezi için bir öncü görevi görebilir.

Glikoliz yan ürünü olarak oluşturulan laktat, astrositler tarafından dışarı salınır ve oksidatif metabolizmayı desteklemek için nöronlar tarafından alınır. Ardından nöronlarda tekrar pirüvata çevrilir ve enerji üretmek için mitokondriye taşınır. Bu olayın gerçekleştiği mekanizma astrosit-nöron laktat mekiğı (ANLS/ astrocyte neuron lactate shuttle) olarak adlandırılmaktadır (10). Ancak nöronun ne gibi durumlarda

laktatı kullandığı, enerji substratı olarak glikozu mu yoksa laktatı mı tercih ettiği bilinmese de tahminlere göre laktat düşük glikoz durumlarında astrositlerin nöronlara sağladığı enerji desteği olarak görülmektedir (10-12).

PPP'ye giren G6P ise, Ribuloz-5-Fosfata (R5P) dönüşerek oksidatif stresi baskılayabilir ve/veya nükleotid biyosentezinde görev alabilir. PPP, nöronları oksidatif strese karşı koruyan bir mekanizma olarak görev almaktadır (10). Hipoksi koşulları altında astrositlerde PPP'ye giren glikoz oranı arttığı; nöronlarda ise azaldığı görülmektedir (13). Bu durum astrositlerin nöronlara antioksidan savunma sağlayarak nöron ölümünü engellediğini göstermektedir (10). İhtiyaç duyulmadığı zaman G6P glikojene dönüştürülerek depolanmaktadır (14).

- Aminoasit metabolizması yönünden astrositler:

Astrositler, glutamat ve γ -aminobütirik asit (GABA) gibi nörotransmitterleri alabilir ve bunları glutamine çevirerek tekrar nöronlara aktarabilmektedir. Bu mekanizma Glutamat/GABA-Glutamin Döngüsü olarak bilinmektedir (10). Nöronlar tarafından salınan GABA, astrositlere alınarak TCA döngüsüne girmekte ve tekrardan glutamata ve glutamine dönüştürülebilmektedir. Glutamin enerji metabolit desteği olarak astrositlerden nöronlara salınmaktadır ve bozulmuş TCA döngüsü, astrositler tarafından glutamin sentezini bozarak bu desteği olumsuz etkilemektedir. Ek olarak GABA, astrositlerde putresin kullanılarak sentezlenebilmektedir ve GABA nörotransmitter dengesinin sağlanmasında önemli roller almaktadır (10).

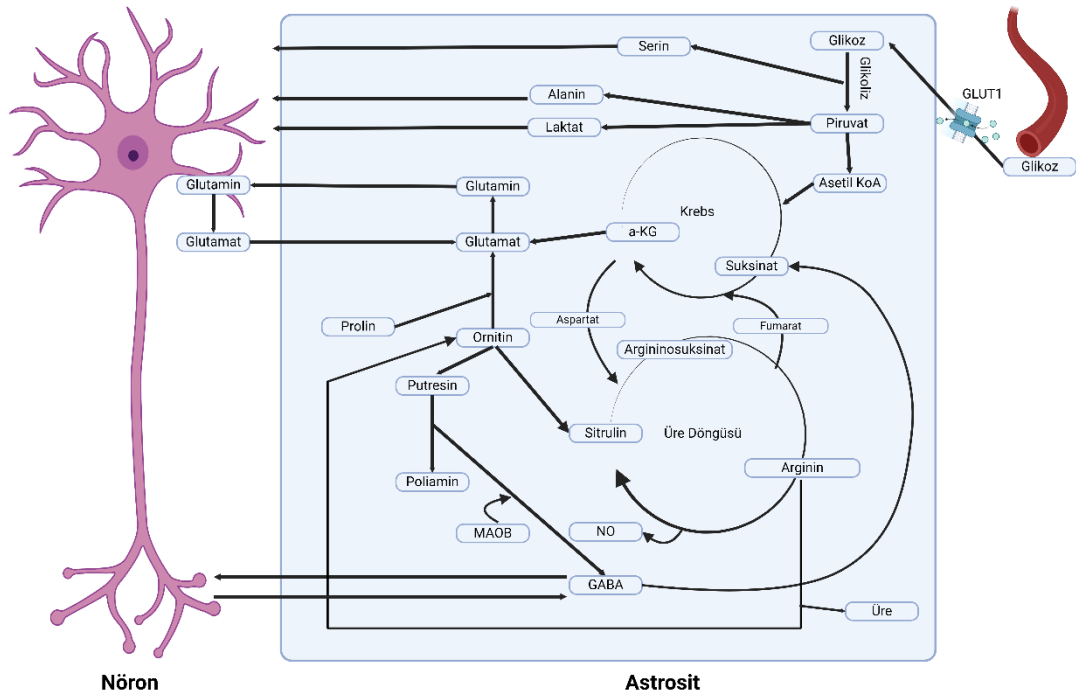
Ek olarak yağ asitleri astrosit metabolizmasında TCA'yı ve oksidatif fosforilasyonu desteklemeye yardımcı olabilir. Enerji kıt olduğunda yağ asitleri β -hidroksibutirat (BHB)'ye dönüştürülür. BHB tekrardan ya asetil-CoA'ya dönüşür ya da enerji üretmek için TCA döngüsüne girer (10). Astrositler BHB'yi nöronlara da aktarabilmektedir. Nöronlara aktarılan BHB yine aynı astrositlerdeki gibi TCA'ya girerek nörona enerji desteği sağlayabilir (10).

Glutatyon (GSH), antioksidan savunmayı sağlayan bir tripeptittir. Glutatyon sistein, glisin ve glutamik asit tarafından oluşturulur ve santral sinir sisteminde oksidatif strese karşı hücreyi korumada görev almaktadır. Bozulmuş GSH sentezi,

hücre sinyalleşmesinin bozulmasına ve nörolojik hastalık riskinin artmasına yol açabilmektedir (10, 15).

Glikoliz sırasında ortaya çıkan L-serin de astrositler tarafından sentezlenmekte ve ilk olarak D-serine sonrasında da pirüvat sentezi için nöronlara taşınabilmekte ve böylelikle nörona enerji desteği sağlayabilmektedir. (10).

Bir diğer aminoasit metabolizması ise Triptofanın Kinürenine parçalanmasını içermektedir. İlk olarak Kinürenine parçalanan triptofan, sonrasında kinolinik asit, pikolinik asit, asetil-CoA ve NAD'a dönüştürülerek enerji metabolizmasını desteklemektedir. TNF- α ve lipopolisakkarit (LPS) gibi bazı inflamatuvar faktörler, bu metabolizmayı aktive ederek immün yanıtı uyarabilmektedir. Ancak bu metabolizmanın bozulması aşırı kinürenik asit oluşumuna sebebiyet vererek reaktif oksijen türleri üretebilmekte, BBB'yi bozabilmekte, tau fosforilasyonunu teşvik etmekte ve otofajiyi bozabilmektedir (10).



Şekil 2.3: Astrosit Metabolizması ((10, 16, 17) numaralı kaynaklardan esinlenerek Biorender üzerinden çizilmiştir.)

Glial hücrelerin, özellikle de astrositlerin kültür ortamının yetişkin nörogenezinde ve gliogenezinde aktif rol oynadığı literatürde gösterilmiştir. (18) Bu

çalışmada embriyonik gün 14'ten alınan korteks kaynaklı NSC'ler astrosit kültür ortamıyla beslenmiş ve NSC popülasyonunun çok küçük bir kısmı nöronal farklılaşmaya giderken büyük bir kısmının astrosit farklılaşmasına gittiği gözlemlenmiştir (18). Yine bir başka çalışmada ise glutamat, GABA, monoaminler ve TGF- β ailesinin kök hücre farklılaşmasını, göçünü ve proliferasyonunu etkileyerek kaderini değiştirebileceğinden bahsedilmiştir (19). Ek olarak SVZ'deki nöron progenitör hücrelerinin GFAP pozitif olup astrositik özellik gösterdiğine değinilmiştir (20). Ek olarak yetişkin parankimal astrositlerinin bir stres/yaralanma anında nöronlara farklılaşarak nöron havuzunu oluşturduğu literatürde görülmektedir (21, 22). Sonuç olarak astrositler nöronlarla aynı soydan gelen, salgılarıyla nörona destek vermekle kalmayıp aynı zamanda nöron/astrosit farklılaşmasını kolaylaştıran ve bazı durumlarda ihtiyaç anında nörona farklılaşabilen hücrelerdir. Bu da nörodejenerasyon durumunda astrositlerin hem yapıcı hem onarıcı bir görev üstlenebildiğini göstermektedir.

Nöron mikroçevresi, nörona sürekli destek sağlamak ve koruyucu rol oynamaktadır. Ancak bazı durumlarda nöron mikroçevresi yetersiz kalmakta ve sonucunda geri dönüşü olmayan nöron ölümü gerçekleşmektedir. Özellikle stres anında mikrogliyalardaki ve astrositlerdeki değişimler nöron nişinin sadece koruyucu özelliğinin zayıfladığını değil nöron nişinin de hastalık patolojisinin ilerlemesine sebep olabileceği ihtimalini kuvvetlendirmektedir. (Bkz. Nörodejenerasyonda Nöron Mikroçevresinin Rolü)

2.2 Nörodejenerasyon ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejenerasyon, bazı problemlerden dolayı beynin belli bölgelerindeki yavaş yavaş ve sürekli ilerleyen, nöron yapı ve fonksiyonunun bozulması durumudur (23). Bu şekilde gerçekleşen hastalıklara nörodejeneratif hastalıklar denir. Bu hastalıklar Alzheimer Hastalığı (AD), Parkinson Hastalığı (PD), Frontotemporal Demans (FTD), Amyotrofik lateral skleroz (ALS), Huntington Hastalığı (HD) ve Prion Hastalıklarıdır. Dünya üzerinde 55 milyondan daha fazla insan Alzheimer ve diğer demans hastalıklarından biriyle yaşamaktadır (Alzheimer Association). Bu sayı 2018 yılında 50 milyon olarak belirtilmektedir (23). Ayrıca yine aynı yıl, risk grubu kişiler 65 yaş ve üstü olarak belirtilmiştir ancak bu sayının ilerleyen zamanlarda 45

yaş ve üzeri olarak güncelleneceği düşünülmektedir (Alzheimer's Association). Tahminlere göre gelecek 30 yıl içerisinde 65 yaş üstü popülasyon 2 katına çıkacak ve dolayısıyla nörodejeneratif hastalıklara sahip birey sayısı artacaktır (WHO). Bu derece yaygın ve ölümcül olan nörodejeneratif hastalıkların hala bir tedavi yönteminin olmamasının sebebi nöronların ileri özelleşmiş bir hücre grubu olması, post mitotik olması ve patofizyolojiye yönelik sınırlı bilgi birikiminden kaynaklanmaktadır. Aşağıda nörodejeneratif hastalıkların gelişim basamakları detaylı olarak özetlenmiştir.

2.2.1. Alzheimer Hastalığı (AD/Alzheimer Disease)

1901 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından, çeşitli yanılsamalar, hafızada azalma, günlük işlerde dikkatsizlik ve yetenek kaybı, konuşma ve yazmada sorun yaşama, yön duygusu kaybı ve uykusuzluk şikayetlerine sahip hastanın uzun süre semptomları incelenmiş ve hastanın 1906 yılında hayatını kaybetmesini takiben hastanın beyin dokusu incelenmeye başlanmış, serebral korteksin incelendiği, hafızayı, dili, muhakemeyi ve düşünmeyi kontrol eden beyin bölgelerinin önemli ölçüde dejenere olduğu gözlemlenmiştir. Detaylı incelemelerde nöronlarda senil plaklar olduğu ve sinir liflerinde düğümler olduğu gösterilmiştir. (23, 24).

AD, bilişsel işlemlerde bozulma, davranışsal ve psikolojik bozukluklarla sonuçlanan, sürekli ilerleyen bir nörodejeneratif bir hastalıktır. Demansın ana nedenlerinden biri olup (demans vakalarının %60-80'i), bulunduğumuz yüzyılın en ölümcül ve pahalı hastalığı haline gelmiştir (23, 24). Hastalık kendini hipokampus ve neokorteksteki dejenerasyon sonucu hafıza ve bilişte azalmayla gösterir, semptomların görülmesinden hastanın ölüme kadar ortalama 8 yıl sürer ancak bazı vakalarda 20 yıl sürdüğü de gözlemlenmiştir (23).

AD, 2013 yılında dünyada 35 milyon kişide görünürken, bu sayı 2018'de 50 milyon, günümüzde 55 milyon ve tahminlere göre 2050 yılında 152 milyon civarında olması beklenmektedir (23-25). Genellikle 65 yaş üstünü daha çok etkilese de vakaların %1-%2'lik kısmı (Auguste Deter vakası gibi) daha erken başlar (23, 24). 45 yaş ve üzeri her beş kadından birinde AD'ye yakalanma riski bulunmaktayken bu sayı erkeklerde onda birdir (Alzheimer's Association)

Semptomların görülmesinden 25 yıl önce birikmeye başlayan amiloid beta (A β) ve nöron kaybıyla bölge ve zaman olarak ilişkili olan ve A β birikiminden çok daha sonra gerçekleşen Tau birikimi ile karakterizedir (23-25). Yapılan araştırmalara göre A β birikimi patojenik olarak hastalığı başlatıcısı; tau ise nörodejenerasyonun nedenidir. Diğer bir patolojik olay ise, nöron ölümüne ve/veya nöron fonksiyon kaybına neden olan veya bunu şiddetlendirebilen nöroinflamasyondur (23, 26).

Genetik olarak AD, erken başlangıçlı (ailesel) ve geç başlangıçlı (sporadik) olarak ikiye ayrılmaktadır. Ailesel erken başlangıçlı AD, AD vakalarının %5'lik bir kısmını oluşturmaktadır ve üç gende otozomal baskın yanlış anlamalı mutasyon bölgesi bulunmaktadır: Amiloid β -protein öncüsü (APP), presenilin-1 (PSEN1) ve presenilin-2 (PSEN2). APP, A β peptitinin öncüsü olan uzun bir proteindir. β -sekretaz ve γ - sekretazın fonksiyonları sonucunda A β peptidine parçalanmaktadır (23, 27, 28). Prenisilin ise, A β üretiminde görev alan γ -sekretazın katalitik bileşenidir.

Sporadik geç başlangıçlı AD'de ise önemli olan gen, bir kolesterol taşıma proteinini kodlayan APOE genidir. APOE geninin E4 varyantı AD için riski arttırırken, E2 varyantı azaltır, E3 varyantı ise nötrdür (23). Bağışıklık hücresi reseptörü olan triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) genindeki bir yanlış anlamalı mutasyon da geç başlangıçlı AD riskini arttırır (23).

2.2.2. Frontotemporal Demans (FTD)

Frontotemporal demans (FTD), sıklıkla subkortikal beyin alanlarının dejenerasyonu ile, frontal ve temporal lobların korteksindeki nörodejenerasyonla ilişkili klinik bir hastalıktır (29, 30). Klinik semptomları dil yeteneğindeki azalma, hareket bozuklukları, dramatik kişilik değişiklikleri ve kompulsif davranışlardır. Dejenerasyon öncelikle beynin frontal ve temporal loblarında meydana gelir. Demansın en yaygın üçüncü, 65 yaş altı demansın (erken başlangıçlı) en yaygın ikinci nedenidir (23, 30, 31). Vakaların yaklaşık %40'ının ailesel kökenlidir ve %13,4'ü otozomal baskın kalıtıma sahiptir (23, 31).

Görülme sıklığı 40-49 yaşları arasında yüz binde 2, 50-59 yaşları arasında yüz binde 3, 60-69 yaşları arasında ise yüz binde 9 olarak belirlenmiştir (31). Artan yaşlı

nüfusla orantılı olarak bu sayıların da artacağı öngörülmektedir. Erkek ve kadınlarda eşit oranda görülmektedir (31).

FTD vakalarının yüzde ellilik bir kısmında tau negatif, ubiquitin pozitif protein birikimleri gözlemlenmiştir (23, 31). Bu birikimler RNA bağlayıcı protein olan TDP43 proteininin anormal kümeleşmesi sonucu oluşmaktadır. Normalde nükleer bir protein olan TDP-43, sitoplazmaya taşınır ve frontal ve temporal lobdaki nöronlarda toplanır. TDP-43 aynı zamanda çoğu ALS vakasında bulunan motor nöronlar içindeki birikimlerin ana bileşenidir ve bu ve diğer kanıtlar FTD ve ALS'nin TDP-43 proteinopatileri spektrumunun farklı uçlarındaki ilişkili hastalıklar olabileceğini düşündürmektedir (23, 32). Vakaların yüzde kırk beşlik bir kısmında anormal tau birikiminden oluşan nörofibriler yumaklar bulunmuştur. AD'den farklı olarak A β birikiminin bağımsız oluşan tau birikimi, FTD'yi AD'den ayırmakta ve A β 'nın, Tau birikimi sebeplerinden yalnızca biri olduğunu göstermektedir (23, 31, 32). Geriye kalan yüzde beşlik kısma ise tümörle ilişkili proteinlerin (TAP/tumor associated proteins) sebebiyet verdiği görülmüştür (31).

FTD'nin genetik nedenlerinin araştırılması sonucu mikrotübülle ilişkili tau proteinindeki (MAPT) mutasyonlar göze çarpmaktadır (23, 32). Bu mutasyonlar çoğunlukla protein birikimine yol açan nokta mutasyonlardır. Tau-negatif ubiquitin-pozitif protein birikimli vakalarda ise MAPT geninin on yedinci kromozomuyla aynı bölgede yer alan progranulin (PRG) genindeki fonksiyon kaybı mutasyonları görülmüştür. FTD'ye yol açan baskın olarak kalıtsal mutasyonların bir başka ana bölgesi, bu genin promotöründe bir hekzanükleotid tekrarının genişlemesinin neden olduğu c9orf72(chromosome 9 open reading frame 72)'dir ve bu da RNA transkriptinin nörotoksik bir rolünü düşündürmektedir (23, 33, 34).

2.2.3. Parkinson Hastalığı (PD)

Parkinson Hastalığı 65 yaş üzerindeki insanların yüzde birini etkileyen en yaygın nörodejeneratif hareket bozukluğudur (23, 35). Hastalığın semptomları uzuvlarda ve yüzde titreme, bradikinezi (hareket yavaşlaması), uzuvlarda ve gövdede sertlik ve postüral bozukluktur. Bu semptomlar, orta beyindeki substantia nigra'nın pars kompaktasındaki nöronların, yani bazal gangliyonların istemli hareketle ilgili

alanlarını kontrol eden devrelere entegre olan nöronların dejenerasyonundan kaynaklanmaktadır. Dejenere olan nöronların dopaminerjik olması uzun süredir dopamin öncüsü olan L-DOPA ile semptomların önüne geçmeyi sağlamıştır ancak nörodejenerasyonun önüne geçemediğinden dolayı bir tedavi metodu değildir. Teşhis konulduktan sonra yaşam süresi yedi ila on bir yıl arası değişmektedir (23, 36).

Nüfusun binde bir veya ikisini etkileyen bu hastalığın gelecekte yaşlanan nüfusla birlikte artacağı düşünülmektedir. Son yirmi yılda özellikle erkeklerin bu hastalığa yakalanma sıklığı daha da artmıştır. Elli yaş ve altında görülmesi oldukça nadir olup 65 ve üstü hastalarda görülme sıklığı pik yapmıştır.

PD, nöronal hücre gövdelerinde Lewy cisimciklerinin varlığı ve substantia nigra'nın pars kompakta bölgesinde nöron kaybı ile karakterize edilir. Lewy cisimcikleri, α -sinüklein protein birikimidir ve dejenere olan nöronlar dopaminerjiktir, bazal ganglionları innerve eder ve motor işlevler için kritik öneme sahiptir. A β veya tau birikimi, kişi aynı zamanda demans bulguları göstermediği sürece PD'de tipik olarak görülmez (23, 37-39).

Ailesel PD ile ilişkili genler arasında bir E3 ubiquitin ligazı olan Parkin ve mitokondriyal ilişkili bir kinaz olan PTEN-indüklü kinaz 1 (PINK1) yer alır. Bu iki proteinin, hasarlı mitokondriyi otofaji ile parçalama işleminde yani mitofaji de birlikte çalıştığı bilinmektedir. Bu iki gende görülen mutasyonlar hasarlı mitokondrinin onarılmasını engelleyerek PD'ye yol açmaktadır. Bu da substantia nigra nöronlarının mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna duyarlı olduğunu göstermektedir (23).

PD'de karakterize Lewy cisimciklerini oluşturan α -sinüklein kodlayan gendeki genetik mutasyonlar da ailesel PD'ye sebebiyet verir. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) proteinini kodlayan gendeki ve nöronları oksidatif strese koruyan DJ-1 genindeki mutasyonlar da PD'ye sebep olmaktadır (23).

2.2.4. Huntington Hastalığı (HD)

Huntington Hastalığı %100 kalıtsal olan tek nörodejeneratif hastalıktır (23, 40). Hastalık genellikle bir hareket bozukluğu olarak kabul edilir ve semptomlar arasında koordinasyon bozukluğu ve bilişsel gerilemenin yanı sıra, depresyon ve sinirlilik gibi

davranış bozuklukları da yer alır. Hastalığın başlangıcı herhangi bir yaşta görülebilen, genellikle orta yaşlardır. Hastalığın seyri genellikle 10-20 yıl sürer ve tüm ilerleyici nörodejeneratif hastalıklar gibi ölümcüldür. Erken aşamada etkilenen alanlar arasında motor koordinasyon, biliş, ödül ve motivasyonla ilgili olan striatum adı verilen bazal ganglionların bir kısmı yer alır. Etkilenen diğer alanlar arasında substantia nigra, serebral korteksin bazı kısımları ve hipokampus bulunmaktadır (23).

HD, kalıtsal olduğu için her yüz bin insanın beş ila yedisinde sabit bir prevalans göstermektedir. Hastalık, Asya kıtasında diğer kıtaların %10'u oranında (0.5/100.000) görülmektedir (23, 40).

Beyinde, özellikle basal gangliada sitoplazmik agregatlar ve nükleer kalıntılara rastlanmıştır. Bu birikmelerin en önemli bileşeni, N terminalinde poliglutamin bölgesinin genişlemesine neden olan bir mutasyona uğramış Huntingtin (Htt) proteinidir. Normalde, tekrar sayısı 10 ila 35 arasında değişen Htt geninin ekzon 1'indeki CAG trinükleotid tekrarının, 36 tekrar ve ötesinde genişlemesi proteinin birikerek HD'ye yol açmasını sağlar (23, 40, 41).

2.2.5. Amyotrofik lateral skleroz (ALS)

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), beyin ve omurilikteki motor nöronları etkileyen ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır ve yetişkinlerde en sık görülen motor nöron hastalığıdır (23, 42). Sonucunda kasların azalan innervasyonu kasların erimesine yol açar ve lateral omurilikteki aksonların yaralı görünmesine neden olur. ALS nispeten nadir bir hastalıktır. Hastalığın ilerlemesi genellikle çok hızlıdır; ölüm, tanının konulmasından yaklaşık 3-5 yıl sonra gelir, ancak bazı vakalarda çok yavaş ilerleyebilir. Hastalığın ortalama başlangıç yaşı 55'tir, ilk belirtileri uzuvlarda veya konuşma ve yutma ile ilgili kaslarda hafif kramp veya zayıflık şeklinde ortaya çıkar. Sonuçta hastalık iskelet kaslarının felce uğramasına kadar ilerler (23, 42).

ALS'nin küresel insidansı yılda yaklaşık yüz bin kişi başına iki vakadır ve prevalans yaklaşık yüz bin kişi başına altı vakadır. Bu değerler tarih boyunca birçok kez azalıp artsa da son yıllarda ALS kaynaklı ölümlerin arttığı görülmektedir (42, 43). Erkeklerde kadınlara oranla %20 daha fazla görülmekle birlikte yaş ilerledikçe bu oran eşitlenmektedir. Vakaların %90'ında herhangi bir genetik risk faktörü bulunmayan

kişilerdir; kalan %10'luk kısım ise hastalıkla bağlantılı bir genin mutasyonu sonucu kalıtsaldır. (ALS Association) ALS görülme oranı gazilerde daha yüksektir. Özellikle Körfez Savaşı ve sonraki 8 yıllık dönemde insidans normal sayının 5 katına kadar çıkmıştır (42, 43).

İlk kez karşımıza FTD'de çıkan TDP43 aynı zamanda çoğu ALS vakasında motor nöronlar içindeki birikimlerin ana bileşenidir (Vakaların %95'i) ve bu durum FTD ve ALS'nin TDP-43 proteinopatilerinin farklı uçlarındaki ilişkili hastalıklar olabileceğini düşündürmektedir (23, 43). Süperoksit dismutaz 1 (SOD1) ve TDP-43 ile ilgili bir RNA bağlayıcı protein olan Fused in Sarcoma (FUS) gibi diğer proteinlerin nöronal birikimleri, ALS'nin nadir genetik formlarında bulunabilir. Birçok ALS vakasında c9orf72 geninin hekzanükleotid tekrar bölgesinin genişlemesini içeren transkriptlerinden oluşan RNA odakları da bulunur (23). C9orf72'deki hekzanükleotid tekrar genişlemesi ailesel vakaların %25'ini ve sporadik vakaların ise %10'unu oluşturur (23, 32, 44). ALS'ye neden olan diğer iki sebep de TAR DNA-binding protein (TARDBP), ve TANK-binding kinase 1 (TBK1) proteinlerinde gerçekleşen mutasyonlardır (43).

2.2.6. Prion Hastalıkları

Prion hastalıkları, Kuru, Creutzfeldt-Jakob Hastalığı (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker Sendromu (GSS) ve fatal familial insomniayı (FFI) içeren ölümcül nörodejeneratif bozukluklardır. Farklı semptomlar ve nöropatolojilerle ortaya çıkabilmektedir, ancak tamamı Prion adı verilen bir protein ajanından kaynaklanmaktadır. Prion hastalıklarının tümü uzun bir kuluçka dönemi içerir ve başladıktan sonra hızlı bir ilerleme gösterir. Postmortem analizlere göre Prion hastalıkları süngerimsi bir patolojiyi ve PrP'nin yoğun plak birikimini ortaya koymaktadır. Prion hastalıkları aynı zamanda ineklerde (sığır süngerimsi ensefalopati veya deli dana hastalığı), koyunlarda (scrapie) ve geyiklerde ve elklerde (kronik zayıflama hastalığı) de görülmektedir (23, 45).

CJD ilk olarak 1920'lerin başında tanımlanmıştır. İnsan prion hastalıklarının baskın alt tipi olan sporadik CJD (sCJD), her iki cinsiyette de eşit olarak görülür ve en yüksek başlangıç yaşı 60 ila 69 yaş arasındadır. Görme ve beyincik fonksiyon

anormalliklerinin eşlik ettiği ilerleyici demans, miyokloni, piramidal ve ekstrapiramidal fonksiyon bozukluğu semptomları arasında yer almaktadır. Hastaların %78,5'i başlangıçtan sonraki bir yıl içinde ölmektedir. (27) sCJD vakalarında yaşla birlikte artan yakalanma oranı görülmektedir. sCJD vakalarının %10'u, prion protein geninin (PRNP) otozomal dominant kalıtsal mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir (45, 46).

Kuru Hastalığının ise, Papua Yeni Gine'de etnik grubun ölen aile üyeleriyle temas ve/veya beyinlerinin yutulmasını içeren ritüeller sonucu yayıldığı tespit edilmiştir. Daha sonra çevredeki insanlarla etkileşimler hastalığın yayılmasına olanak sağlamıştır. Hastalık başlangıcından itibaren bir yıldan kısa bir süre içinde ölüme yol açmaktadır.

PrD, sünger formu bir patolojiyle birlikte yoğun plak birikimi gösterir. Bu plakların birincil bileşeni, beyin boyunca topaklanma ve yayılma yeteneğine sahip çeşitli konformasyonları ve glikozilasyon modellerini üstlenebilen PrP'dir (23). Bu çeşitli konformasyonların ve glikozilasyonların PrP'nin bulaşıcı formlarına yol açtığı düşünülmektedir. Bir proteinin tek başına hastalık aktarma ve hatta farklı enfeksiyon türlerini kodlama yeteneği, Dr. Stanley Prusiner'e 1997'de Nobel Ödülü'nü kazandıran ve paradigmaları değiştiren bir keşiftir. Prion hastalıkları, proteinli bulaşıcı parçacıklar yoluyla bulaşabilmeleri bakımından benzersizdir. Bununla birlikte PrP'yi kodlayan PrP genindeki genetik mutasyonlardan da kaynaklanabilir. Bu mutasyonlar beyinde protein birikmesine ve plak oluşumuna yol açar. Farklı mutasyonlar, farklı proteaz direnci modellerine, nörodejenerasyonlu farklı beyin bölgelerine yol açabilir (23).

2.2.7. Diğer Nörodejeneratif Hastalıklar

Çoklu sistem atrofisi (MSA/multiple system atrophy), klinik olarak parkinsonizm, serebellar bozukluklar, otonomik ve motor disfonksiyonların kombinasyonu ile karakterize edilen, nadir görülen, hızlı ilerleyen, ölümcül bir nörodejeneratif hastalıktır. Fibriller α -sinüklein (α S)'nin anormal birikimi ile karakterizedir. Bilinen nöropatolojik özelliği oligodentrositlerdeki α S inklüzyonlarıdır (47, 48).

Multipl skleroz (MS), santral sinir sisteminin kronik inflamatuvar ve nörodejeneratif bir hastalığıdır. MS'in baskın özelliği, beyin, optik sinir ve omuriliğin beyaz cevher bölgelerinde görülen fokal inflamatuvar ve demiyelinizan lezyonların gelişmesidir. İnflamatuvar demiyelinizasyon ve bozulan iyileşme aksonal dejenerasyona ve sonucunda nöron ölümüne yol açmaktadır (49).

Lewy cisimcikli demans (DLB), yaygın bir demans nedenidir ve görsel halüsinasyonlar, bilişsel dalgalanmalar ve REM uyku davranış bozukluğu ile karakterizedir. Hem nörobiyolojik hem klinik özellikleri bakımından PD ile örtüşür.

2.3 Nörodejeneratif Hastalıkların Moleküler Gelişim Özellikleri

Birçok nörodejeneratif hastalığın altında yatan ortak nedenler; anormal protein dinamikleri (Yanlış katlanma, bozunma, proteazomal işlev bozuklukları, protein agregasyonu vb.), oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, Golgi aygıtının parçalanması, aksonal taşınmanın bozulması, nörotrofin fonksiyon bozukluğu, nöroinflamasyondur (50).

Yanlış katlanmış proteinlerinin hücre içi ve hücre dışı birikmesiyle sonuçlanan etkileşimleri çoğu nörodejeneratif hastalıkta ortak olarak görülmektedir. Normalde çözülebilir olan bu proteinler, çeşitli anormallikler ve yanlış katlanma sonucunda çözünemeyen büyük protein agregatlarına dönüşür. Bu durum ise nöronal ve glial hücrelerin fonksiyonunun bozulmasını ve hatta ölümünü tetikler (23, 50).

Tablo 2.1: Nörodejeneratif Hastalıklar ve Biriken Proteinler.

NÖRODEJENERATİF HASTALIK	BİRİKEN PROTEİN
Alzheimer Hastalığı	Erken aşamada A β ; Geç aşamada hiperfosforile Tau
Frontotemporal Demans	TDP-43, Tau
Parkinson Hastalığı	α -sinüklein
Huntington Hastalığı	Poliglutamin genişlemeli Huntingtin
Amyotrofik lateral skleroz	TDP43
Prion Hastalıkları	Prion Proteini (PrP)

AD'de normal çözülebilir olan A β oligomerleri hücre içinde ve dışında artış gösterir. Yapılan çalışmalarda A β türlerinden bazılarının toksik etkisinin olduğu bazılarının ise toksik etkiden uzak oligomerler olarak toplandığı bulunmuştur (50). Artan A β sayısı ve/veya toplanması bilişsel işlevsizlik ile doğru orantılıdır ve tau proteininin hiper fosforilasyonuna sebebiyet vererek tau birikimine de katkı sağlar. Böylelikle hastalığın ilerlemesine hem doğrudan hem de dolaylı olarak sebebiyet vermektedir (23, 50). A β birikiminin baskılanması ise AD patolojisinde uzun vadeli azalmaya yol açar (50). Yüksek oranda çözülebilen α -sinüklein oligomerleri ise yanlış katlanmaya oldukça elverişlidir ve bunun sonucunda çözünemeyen agregatlara/Lewy cisimciklerine yol açabilir.

Protein agregasyonu, fonksiyonel bir proteinin yapısal değişikliğine yol açan yanlış katlanmanın bir sonucu olarak meydana gelir ve çeşitli moleküller tarafından da protein agregatlarının oluşumunu indüklenir. Progresif hücre içi protein birikimi; anormal sentez ve/veya katlanma, diğer proteinlerle anormal etkileşim, protein bileşenlerinin aşırı üretimi, bozulmuş degradasyon, proteinlerin translayon sonrası modifikasyonları, protein oksidasyonu, nükleik asit kaynaklı yapısal değişimler, anormal proteolitik bölünme, uygunsuz ifade veya değiştirilmiş gen eklenmesi, yetersiz moleküler şaperon aktivitesi ve proteinlerin hücre içi taşınmasında bozulma nedenlerinden kaynaklanabilir (50). Protein bazlı bu hataların engellenmesi için protein oluşumu, katlanmamış protein yanıtı (UPR), heatshock tepkisi, ubikuitin proteazom sistemi (UPS) gibi protein sentezini, katlanmasını, trafiğini, toplanmasını, parçalanmasını ve bozulmasını kontrol eden yolları içeren bir sistem tarafından korunmaktadır (51). Ek olarak şaperonlar da yanlış protein katlanmasının, amiloid plak oluşumunun ve oksidatif stresin baskılanmasında görev alarak bu sisteme yardımcı olur. UPR, salgı proteinlerinin transkripsiyonunu aşağı yönde düzenleyerek katlanmamış proteinlerin birikimini engellemeye çalışır ve ER ile ilişkili bozunma (ERAD) veya lizozomal bozunma yoluyla yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlar (23, 52). UPS ise, gen ifadeleri, DNA onarımı, nükleer kalite kontrolü, hücre döngüsü ve sinyal kontrolünü kontrol eden ATP'ye bağımlı bir proteolitik sistemdir (50). Ancak sözü edilen bu sistemler yaşlanma, metabolik ve/veya çevresel stres sonucu bozulabilir (23, 50).

Oksidatif stres (OS), serbest radikallerin ve ürünlerinin üretiminin kontrol dışına çıkarak antioksidan savunma mekanizmasını aşmasından kaynaklanır. OS, biyolojik moleküller zarar verir, mitokondriyal solunum fonksiyon bozukluğuna, eksitotoksositeye ve hücrel fonksiyon bozukluğuna sebep olarak hücreyi ölüme sürükleyebilir. Ayrıca aşırı nitrik oksit ve ROS üretimi, proteinin yanlış katlanmasına aracılık edebilir ve bu yüzden nörodejeneratif hastalık patolojisinin altında yatan önemli sebeplerden biri haline gelir. OS, AD'de A β proteininin makro otofajisini ve bunu takip eden apoptozu indükler, PD'de ise α Syn protofibrillerinin oluşumunu uyarır. Bu nedenle hastalık patolojisini ilerleterek nörodejenerasyonun en önemli nedenlerinden biri ve aynı zamanda olası tedaviler için terapötik hedef haline gelir (50).

Hücresin enerji üretim merkezi olan mitokondriler, reaktif oksijen türlerinin hem hedefi hem de önemli bir kaynağıdır. Hasarlı ve fonksiyon bozukluğı olan mitokondrilerde ROS üretiminin arttığı görülmüştür. OS ve yaşlanma sonucu bozulan mitokondriyal enerji metabolizması, aksonal fonksiyon kaybına sebebiyet verir, ATP üretimini azaltır, nöronlardaki iyon dengesini bozar ve nöronları dejenerasyona karşı savunmasız hale getirir (23, 50, 52).

2.4 Nörodejenerasyonda Nöron Mikroçevresinin Rolü

Nörodejenerasyon sırasında nöron mikroçevre hücrel bileşenlerinin, özellikle glial hücre fonksiyonlarında değişimler meydana gelmektedir.

Mikroglialar: Olası bir nöroinflamasyon, enfeksiyon, nörodejeneratif hastalık durumunda mikroglialar uyarılarak dinlenme durumundan aktif duruma geçer. Aktif hale geçen mikroglialarda iki farklı fenotip görülmektedir: M1 pro-inflamatuar fenotip ve M2 anti-inflamatuar fenotip (53). M1 aktivasyonu interferon- γ (IFN- γ) ve lipopolisakkarit (LPS) tarafından indüklenir. Ardından tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlekin (IL)-6, IL-1 β , IL-12 ve CC kemokin ligandı (CCL) 2 gibi inflamatuvar sitokinler ve kemokinler üretir, hücre içi ROS seviyelerini arttırarak nöron hasarına yol açar (53). M2 aktivasyonu ise IL-4 ve IL-13 gibi anti-inflamatuar sitokinler tarafından indüklenir. Ardından IL-10, TGF- β 1 gibi anti-inflamatuar sitokinleri, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), fibroblast büyüme faktörü

(FGF) gibi büyüme faktörlerini, sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofinler ve glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) gibi nörotrofik büyüme faktörlerini salgılar, hasarlı dokuların ve yanlış katlanmış proteinlerin fagositozunu sağlar. Doku onarımını ve nöronal sağkalımı artırır. Yani mikroglialar bir stres karşısında merkezi sinir sistemini hem koruyan hem de sinir sistemimize saldıran “iki uçlu kılıç” gibi davranır (53).

AD’de mikroglialar, A β plaklarının tanınmasında ve temizlenmesinde görev almaktadır. Ancak herhangi bir stres ile birlikte azalan ve/veya değişen mikroglial aktivite sonucunda A β plaklarının temizlenmesi sekteye uğrar, A β üretim ve birikimi artış gösterir. Yapılan çalışmalarda AD’li farelerden alınan mikroglialarda A β -fagositik ve A β yıkıcı enzimlerin ifadelerinde azalma görülmüş, proinflatuar sitokin üretme yetenekleri korunmuştur (53, 54). Sürekli A β -mikroglia etkileşimi, erken sinaps kaybına, aşırı ROS üretimine ve sonuçta nörotoksositeye sebep olmaktadır. Ek olarak, M1 mikroglialar tarafından salgılanan pro-inflatuar sitokinler tau fosforilasyonunu artırarak hastalığın ilerlemesine yol açabilir. Hemen hemen benzer olaylar diğer nörodejeneratif hastalıklarda da görülmektedir. PD’de α Syn fibrillerini temizleyememe, MS’de mikroglial ROS salgılanması ve mikrogliaların reaktif T lenfositlerini toplayarak nöronlarda toksositeye sebep olması, HD’de IL-6 ve TNF- α ifadelerini artırarak nörodejenerasyonu şiddetlendirmesi, ALS’de artan mikroglial mSOD1 ifadesinin nörotoksositeye sebep olması, Prion hastalığında mikroglial ROS üretimi hastalık patolojisini ilerletmiştir (54). Genel olarak yapılan çalışmalarda, sağlıklı beyinde ve hastalığın erken safhalarında nöron koruyucu ve direnç artırıcı görev üstlenen mikrogliaların yerini işlevini kaybeden ve hatta nöron öldürücü kimlikli mikrogliaların aldığı gösterilmiştir. Birçok hastalık modelinde beyinde M1 mikrogliaların bulunması da bu genellemeyi doğrular niteliktedir.

Oligodentrositler: Nörodejenerasyon sonucunda oligodentrositlerde bozulmalar gözlemlenmiştir. Bu da nöron iyon dengesini bozarak oksidatif strese ve sonucunda nöron ölümüne yol açmaktadır (55). Ancak oligodentrositlerin nörodejenerasyondaki rolü hakkında henüz yeterli veri bulunmamaktadır.

Astrositler: Normalde dinlenme durumunda olan astrositler(A0), mikroglialar tarafından salgılanan C1q, TNF- α , IL-1 tarafından nörotoksik (A1) fenotipine

indüklenir. Ardından sinaptogenez kaybına, oligodendrositlerin uyarılmasına ve nöron ölümüne yol açabilir. Ancak travmatik beyin hasarı sonucunda yine mikroglia-astrosit iletişimi sonucunda nöroprotektif (A2) fenotipine dönüşüp nöronların sinaptik onarımını, büyümesini ve hayatta kalmasını destekleyebilmektedir (7).

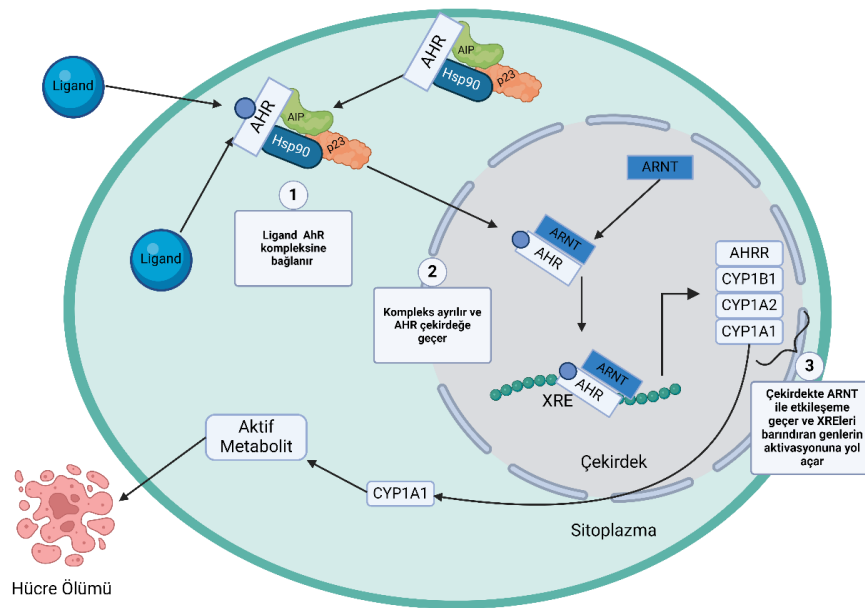
AD'de A β plaklarının birikimi ve ileri süreçte ApoE4, astrositleri A1 fenotipine dönüştürerek proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve ROS üretmesine sebebiyet vererek nöron hasarına neden olur. Ancak yine bu süreçte aktive edilen astrositler, A β plaklarının etrafını sararak birikimi engelleyebilmekte ve nöroprotektif rol oynayabilmektedir (7, 8). Bozulmuş astrosit fonksiyonu aynı AD'de söz edildiği gibi diğer nörodejeneratif hastalıkların da ilerlemesine sebep olmaktadır. Bozulan glutamat homeostazisi eksitotoksositeye yol açarken potasyum kanallarındaki fonksiyonunu kaybeden astrositler sonucunda PD ve HD ilerleyebilir (9, 56, 57). Ayrıca astrosit-nöron laktat transferindeki bozulmalar nöronların enerjisiz kalmasına sebep olabilir. Stres altında astrositlerde putresinden GABA sentezi göze çarpmıştır. GABA sentezi başlangıçta nöron sağ kalımını destekliyor olsa da, GABA sentezi için monoamin oksidaz B (MAO-B) ifadesindeki artış, durumu kötüleştirebilecek yüksek hidrojen peroksit üretimine neden olabilir (10). Yine bozulmuş glutamin sentezi, nöronları enerjisiz bırakarak nörodejenerasyona katkı sağlayabilmektedir (10).

Astrositlerdeki bu ikili fenotip ve fenotipler arası geçiş birçok çalışmada terapötik hedef olarak gösterilmiştir ancak hala somut bir sonuç ortaya çıkmamıştır. Yapılan bir çalışmada SMA hastalarından elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücreden (induced pluripotent stem cell/ uPKH) motor nöron sayılarında bir düşüş gözlemlenmediği, ancak yine SMA uPKH 'den elde edilen astrositlerin hücre kültür ortamının hem sağlıklı motor nöronlarda hem de SMA uPKH'den elde edilen motor nöronlarda ölümlere yol açtığını göstermiştir (58, 59). Bu sonuçla birlikte bozulmuş astrositlerin ve hatta astrosit kültür ortamının bile sağlıklı nöronlarda sağkalımı etkilediği gözlemlenmiştir.

A1 ve A2 astrositleriyle ilgili yapılan çalışmalarda A1 fenotipine ve A2 fenotipine özgü genler belirtilmiştir (9, 56, 57). Bu çalışmalarda LPS uygulanmış ve orta serebral arter tıkanıklığı oluşturulmuş fare modellerinin beyinlerindeki gen ifadeleri kontrol grubuna göre karşılaştırılmış ve en çok değişen genler listelenmiştir.

2.5 Aril Hidrokarbon Reseptör (AhR) Yolağı ve Nörodejenerasyon

Nörodejenerasyonun en büyük nedenlerinden biri de yaşlanma ve yaşlanma sonucu oluşan hücresel fonksiyon kayıplarıdır. İnsan ömrünün uzamasıyla birlikte artması öngörülen nörodejeneratif hastalığa sahip birey sayısı, yaşlanma karşıtı terapötik hedef aranmasına yol açmaktadır. Son zamanlarda adından çokça söz edilen, yaşlılık ve yaşla ilgili hastalıklarla ilişkili AHR bu hedeflerden biridir (60). AhR, toksik kirleticiler (ksenobiyotikler) tarafından aktifleşen, PAS (Per-ARNT-Sim) ailesine ait bir proteindir. AhR proteini ligand bağımlı olarak aktive olan, sitoplazmik bir proteindir. Ligandın bağlanması takiben, AhR proteini sitoplazmik partnerlerinden ayrılır ve nükleusa lokalize olur, Nükleusta ARNT ile dimerize olarak, XRE (*Xnebiotic responce element*) promotor dizisine bağlanır ve hedef gen transkripsiyonu aktif hale gelir. AhR sinyalizasyonu aktivasyonunda özellikle CYP1A1, CYP1B1 (sitokrom p450 ailesi üyeleri) transkripsiyonunda artış beklenmektedir. Bu nedenle CYP proteinleri AhR yolak aktivasyonunda belirteç olarak analiz edilen genlerdir (61).



Şekil 2.4: AHR Sinyalizasyonu ((61) kaynağından esinlenerek Biorender üzerinden çizilmiştir.)

En çok bilinen AhR ligandı olan 2,3,7,8-Tetraklorodibenzodioxin (TCDD)'ye ve ilgili kimyasal bileşiklere maruz kalma sonucunda meydana gelen AhR'nin CYP enzim ailesini uyarımı ile birlikte toksisite görülmekte, bunun yanında farklı ligandlarla AhR uyarımının bağışıklık tepkileri, inflamasyon, nörolojik gelişim, beyin gelişimi gibi fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde de rol aldığı bilinmektedir (60, 62, 63). AhR sinyal olaylarının, mitokondriyel toksisite, glial hücrelerin aktivasyonu, inflamasyon gibi nörodejenerasyona sebep olan olaylarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (62). AhR aktivasyonunun beyinde oksidatif stres oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir. AhR aktivasyonu, CYP1A1 ve CYP1B1'in ifadesini indüklemekte, nörodejenerasyona sebep olabilen H₂O₂ salınmasına yol açıp sonuç olarak ROS seviyelerini arttırabilmektedir (64, 65). Mikroglialarda AhR'nin, inflamasyon sırasında NF- κ B yolağını baskılayarak reaktif astrositlerin aktivasyonunu azalttığı gözlenmiş, nörodejeneratif hastalıklarda AhR'nin koruyucu rolüne işaret etmiştir. LPS aracılığıyla AhR aktivasyonu, proinflamatuvar ve nörotoksik faktörleri indüklerken, LPS'nin endojen AhR ligandı olan 6-formilindolo(3,2-b) karbazol (FICZ) ile birlikte aktivasyonu, anti-inflamatuvar olan mikroglial aracılı bir bağışıklık tepkisini indüklediği görülmüştür (66). AD otopsilerinde beyindeki AhR seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu bildirilmiş, ancak AD'de AhR'nin glial fonksiyon üzerindeki etkileri hakkında bilgiler kısıtlıdır. Diğer taraftan AhR sinyalizasyonu ile nörodejeneratif hastalıklar konusunda literatür bilgileri çelişkilidir. HD'de AhR baskılanmasının davranışsal ve nörolojik iyileşmeyi sağladığı gözlemlenmiştir. PD'de nöron koruyucu bir fonksiyon üstlenerek α -sinüklein bozulmasını sağladığı gözlemlenmiştir. ALS'de eksojen ve endojen ligandlar tarafından aktivasyonu TDP-43 seviyelerini arttırırken bu etkinin AhR antagonistleri tarafından tersine çevrildiği gözlemlenmiştir (60, 62). Ayrıca AhR'nin, reaktif astrositleri A2 fenotipine yönlendirerek inflamasyonunu sınırlayabildiği bildirilmiştir (60). Sigara, alkol gibi bazı etkenlerin ise AhR baskılayıcılarının demetilasyonu yoluyla AhR sinyallerinin baskıladığı ve böylelikle hastalık patolojisinin ilerlemesine sebep olduğu bildirilmiştir (60).

Bu tez çalışmasında öncelikli olarak nöron hücre fonksiyonu üzerinde önemli bir role sahip olan astrositlerin çeşitli stres faktörleri ile uyarılarak astrosit stres modellerinin oluşturulması hedeflenmektedir. Ardından stres uygulanan hücrelerde gen ifadeleri ve metabolit düzeylerinin analizleri yapılarak astrositlerin ve astrosit metabolizmasının nörodejenerasyondaki rolü hakkında bilgi edinmek hedeflenmektedir.

Ayrıca literatürde AhR yolağının nörodejenerasyon gelişim basamaklarında ve/veya hastalığın patofizyolojisinin bir sonucu olarak sürece katkı sağladığına dair sınırlı sayıda farklı niteliksel verilere sahip çalışmalar bulunmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak, astrosit hücrelerinde AhR agonist ve antagonistleri ile uyarımlar sağlanarak, AhR sinyalizasyonunun astrosit hücre biyolojisi üzerine olan etkileri A1 ve A2 astrosit koşullandırması gerçekleştirilen deney grupları ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiş olup, AhR sinyalizasyonunun astrosit hücrelerinde pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar fenotipik geçişte ne gibi bir etkisi olduğu hem gen ifadesi hem de metabolik regülasyon yönünde araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Glial Hücre Kültürü ve Optimum Stres Dozlarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında kullanılan ölümsüzleştirilmiş insan astrosit hücre hattı, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG)'nde görev yapan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz OKTAY tarafından laboratuvarımıza hediye edilmiştir. Astrosit hücreleri 5000 hücre/cm² olacak şekilde T75 kültür kaplarına ekilmiş ve üzerine 10 mL DMF10 (%10 oranında fetal sığır serumu (FBS, Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Serana) ve %1 L-glutamin (Serana) içeren DMEM-High Glucose (Biowest, Kat no: L0102)) hücre kültür ortamı eklenerek 37°C, 5% CO₂ içeren humidifiye inkübatörlerde kültüre edilmiştir. Hücre yoğunluğu her gün kontrol edilmiş, üç günde bir hücre kültür ortamı değiştirilmiş ve %80 yoğunluğa ulaştığında 5000 hücre/cm² olacak şekilde pasajlanarak hücrelerin çoğaltılması sağlanmıştır.

3.2 Stres Faktörlerinin Belirlenmesi

- Astrositlerin stres faktörleri ile koşullandırılması için mikroglialar tarafından astrositleri A1 fenotipine dönüştüren üç faktörden biri olan **TNF- α** , (Bkz. Bölüm 2.4),
- İnflamasyon sırasında immün yanıtı uyarak ve sağkalımı arttırarak astrositleri A2 fenotipine dönüştüren **TGF- β 1**,
- İnflamasyon oluşturup A1 fenotipine dönüştürmek için **LPS**,
- Ek olarak AHR sinyal yolağı değişimlerinin astrosit biyolojisi üzerine olan etkilerini incelemek için AHR agonisti olarak **FICZ**, antagonisti olarak ise **SR1** kullanılmıştır.

3.3 WST-1 Testi

Belirlenen, stres faktörlerinin, uygulama dozunun belirlenmesi için WST-1 (Sigma Aldrich) analizi yapılmıştır. WST-1 testinde kullanılan Tetrazolyum tuzları hücrelerle etkileşime girer, hücresel enzimler tarafından formazana dönüşür. Canlı hücre sayısının artması mitokondriyel dehidrogenazın artmasına dolayısıyla oluşan formazan boyasının miktarının artmasına neden olur. Böylelikle oluşan renk (dalga boyu) değişiminin spektrofotometre ile ölçülmesi ile ilgili ajanların hücresel canlılık üzerine olan etkileri analiz edilerek uygun doz değeri belirlenebilmektedir.

Tez çalışması kapsamında hücreler 96-kuyucuklu plakaya kuyu başına 3000 hücre olacak şekilde 100 μ L astrosit hücre kültür ortamıyla ekilmiş ve hücrelerin %90 yoğunluğa ulaşması için 37°C %5 CO₂'li etüvde kültür işlemine devam edilmiştir. Uygun hücre yoğunluğuna ulaşılmasını takiben belirlenen dozlar 100 μ L hacimde olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. (Bkz. Şekil 3.1) 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 10 μ L WST-1 ajanı eklendi ve hücreler inkübatöre kaldırılmıştır. 37°C, 2 saat inkübasyon sonunda örneklerin absorbans değerleri microplate okuyucuda (Tecan, İsviçre) 450 nm dalga boyunda okunmuştur. Ardından Excel (Microsoft Office) üzerinden analizleri yapıp veriler grafik haline getirilmiştir.



Şekil 3.1: WST-1'de kullanılan dozlar.

3.4 Morfolojik Analiz

Stres faktörleri uygulanan astrositlerin morfolojik değişimlerinin incelenmesi için literatürde kullanılan dozlar astrositlere uygulanmış ve morfolojik olarak analiz edilmiştir. Bu kapsamda 12 kuyucuklu hücre tabakalarına kuyu başı 1 ml kültür ortamı içerisinde 3×10^5 hücre ekilip hücrelerin kültür kabına tutunması için bir gece inkübe edilmiştir. Ardından stres faktörü uygulanmadan önce fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraf çekildikten sonra kuyucuklardaki kültür ortamı uzaklaştırılarak stres faktörleri

eklenmiştir. Stres faktörü uygulandıktan 24 saat sonra fotoğrafları çekilerek, ilgili dozların hücre morfolojisi üzerine olan etkileri analiz edilmiştir.

3.5 RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Gerçek zamanlı q-PCR Ölçümleri

Astrosit hücreleri 5000 hücre/cm² olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Canlılık testleri sonucu belirlenen dozlar hücrelere uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kuyucuklardaki hücre kültür ortamı 1,5 mL tüplere aktarılarak metabolom testleri için -80 °C'ye kaldırılmıştır. Kuyucuklarda kalan hücreler 1X PBS ile bir kez yıkandıktan sonra üzerine 500 µL Trizol (ABP Bioscience, Kat no: FP312) eklenmiş ve pipetaj ile hücreler 1,5 mL tüplere aktarılmıştır. Tüpler izolasyonun gerçekleştirileceği güne kadar -80 °C'de saklanmıştır. İzolasyon başlatılacağı gün, örnekler çözündürüldükten sonra üzerlerine çeker ocak altında 100 µL kloroform eklenmiştir. Tüpler 5 saniye vortekslenmiştir. Vortekslenen tüpler 3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir (Vortekslenen hücrelerde açık pembe renk görüldü.) 3 dakika sonunda +4°C, 12000 xg de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Kloroform ve santrifüj yardımıyla oluşturulan faz ayrımı ile üst fazda RNA, orta (bulutsu) fazda proteinler, en alt fazda ise tuzlar, Trizol, kloroform elde edilmiştir. Üst faz, faz ayrımı bozulmadan yeni 1,5 mL santrifüj tüplerine alınmış, ardından üst fazın hacmi kadar 2-izopropanol eklenmiştir. Tüpler yeniden vortekslenmiş ve ardından -20 °C, gece boyu (yaklaşık 16 saat) bekletilmiştir. Ertesi gün bekletilen tüpler +4°C, 12000 xg de 15 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından pelet üzerine yine -20°C'den çıkarılan 1 mL %75 EtOH eklenmiş, +4°C, 7500 xg de 10 dakika santrifüj edilerek yıkanmış ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Bu aşama iki kez tekrarlanmıştır. Ardından etanol pelete dokunulmadan tüplerden uzaklaştırılmıştır. Kalan etanolü de uzaklaştırmak için tüplerin ağzı açık olacak şekilde çeker ocak altında etanolün uçması sağlanmış ve ardından tam kuruma sağlanması için daha önceden 56°C'ye getirilen ısı bloğuna kapaklar açık bir şekilde tüpler yerleştirilmiş ve 7 dakika boyunca tutulmuştur. Böylelikle saf RNA elde edilmesi amaçlanmıştır. Daha sonra tüplere 15 µL nükleaz içermeyen su konulmuş ve peletin çözülmesi için vortekslenmiştir. Son olarak örnekler buza alınarak RNA konsantrasyonları NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, ABD)

spektrofotometrede ölçüm yapılarak ve kalitesi A260/280 ve A260/230 değerleri belirlenerek ölçülmüştür.

RT-qPCR için 1 µg RNA'dan cDNA sentezlenmiştir. Üreticinin protokolünde uygun olarak 10 µL RT, 2 µL Enzim Mix, 1 µL OligoDT, 1 µL Random Hekzomer (Nepenthe cDNA Synthesis Kit, Kat no: NP041011610) ilave edilmiştir. Daha sonra her örnek için 1 µg RNA miktarı ve toplam hacim 30 µL'ye tamamlanmak üzere nükleaz içermeyen su ilave edilerek cDNA sentez reaksiyonu BİORAD T2400 Thermal Cycler cihazı ile gerçekleştirilmiştir. cDNA'lar 60 µL hacimde olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile sulandırılmıştır.

Tablo 3.1: cDNA sentez reaksiyon döngüleri, dereceleri ve süreleri.

Döngü	Zaman	Derece °C
1	4 dakika	95
35	30 saniye	94
	30 saniye	57
	30 saniye	72
1	5 dakika	72

Literatür taraması sonucu “A1 astrocyte spesifik genes”, “A2 astrocyte spesifik genes”, “Astrocyte spesifik genes” ve “AhR-related genes” hakkında en çok atıf alan makalelerden 17 gen seçilmiştir. (L Zamanian,2012 ve A Liddlelow,2017)

Tablo 3.2: Seçilen genler, fonksiyonları ve ilişkili oldukları grup.

Genler	Fonksiyon	Grup
VIM	Hücre bağlanması, hücre göçü ve yapısal destek	Hem A1 hem A2 ilişkili
GFAP	Yapısal destek ve astrosit belirteci	Hem A1 hem A2 ilişkili
SRGN	İnflamatuvar yanıt ve biyoaktif molekül salgısı	A1-İlişkili
IL-6	İnflamatuvar yanıt	A1-İlişkili
FBLN5	Yapısal destek, hücre yapışma ve hücre göçü	A1-İlişkili
FKBP5	Stres yanıtının düzenlenmesi, inflamatuvar yanıt	A1-İlişkili
PDL-1	İnflamatuvar yanıtın düzenlenmesi	A1-İlişkili
IL-8	İmmün yanıt, nötrofil aktivasyonu	A1-İlişkili
S100B	Kalsiyum sinyalizasyonu ve nörotrofik etki	A1-İlişkili
S100A10	Hücre göçü, adezyonu ve vezikül taşınımı	A2-İlişkili
BDNF	Nörotrofik destek ve sinaptik plastisite	A2-İlişkili
STAT3	İmmün yanıt	A2-İlişkili
COL1A1	Yapısal destek	A2-İlişkili
IL-10	İmmün yanıt, doku onarımı	A2-İlişkili
CYP1A1	Zararlı maddelerin detoksifikasyonu ve metabolik yan ürünlerin işlenmesi	AHR-İlişkili
CYP1B1	Detoksifikasyon, biyoaktif metabolitlerin üretim	AHR-İlişkili
AHR	Çevresel toksin ve endojen sinyal moleküllerine yanıt	AHR-İlişkili

Seçilen genlerin forward ve reverse primerleri NCBI Primer Designing Tool kullanılarak tasarlandı. Aşağıda ilgili genlerin forward, *reverse* primer dizileri sunulmuştur.

Tablo 3.3: Tasarlanan genler ve forward/reverse dizileri.

Gen Adı	Primer Dizisi (5'→3')
STAT3	F: GGAATAAAACACCCGCGAGC
	R: ATTCGTGCACTGTGCCTGT
GFAP	F: ACCGCTTTGCCAGCTACATC
	R: TTCATCCTGGAGCTTCTGCCT
IL-8	F: AGAGCCAGGAAGAAACCACC
	R: CCTTGGCAAACTGCACCTTC
FKBP	F: GCGGCGACAGGTTCTCTA
	R: TGTCTCCAATCATCGGCGTT
SRGN	F: ATCAAGAAGTTGGCGTGCAG
	R: TCCGCGTAGGATAACCTTGAAC
FBLN5	F: GGAATAAAACACCCGCGAGC
	R: ATTCGTGCACTGTGCCTGT
S100B	F: GGTGAGACAAGGAAGAGGATGT
	R: TGATGAGCTCCTTCAGTTCGG
S100A10	F: CACGTACTAAGGAAGGCGCA
	R: TGTGGTCCGTTGAAGCCTTG
BDNF	F: ATCCGAGGACAAGGTGGC
	R: CCGAACTTCTGGTCCTCATC
IL-6	F: AGACAGCCACTCACCTCTTCAG
	R: TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
IL-10	F: CAGGGCACCCAGTCTGAGAAC
	R: TGGCAACCCAGGTAACCCTTAAA
AHR	F: GTCCCATATCCGAATGATTAAGAC
	R: GTAAATGCTCTGTTTCCTTCCTC
COL1A1	F: AGGGCTCCAACGAGATCGAGA
	R: TACAGGAAGCAGACAGGGCCA
CYP1A1	F: AAGAGGAGCTAGACACAGTG
	R: TTTACAAAGACACAACGCCC
ACTB	F: CACAGAGCCTCGCCTTTGC
	R: ATATCATCATCCATGGTGAGCTGG
VIM	F: AGGCGAGGAGAGCAGGATTT
	R: AGTGGGTATCAACCAGAGGGA
PDL1	F: TGCAGGGCATTCCAGAAAGA
	R: ACCGTGACAGTAAATGCGTTC
CYP1B1	F: AACGTACCGGCCACTATCAC
	R: CTCGAGTCTGCACATCAGGA

Gerçek zamanlı PCR’da 384 kuyucuklu plaka, kuyu başı 10 µL olacak şekilde, 5 µL Nepenthe Sybr Green Mix (2x) (RefNo:NP041010210), 1 µL forward primer, 1 µL reverse primer, 1 µL nükleazdan bağımsız su ve 1 µL cDNA olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Gerçek zamanlı PCR, Roche LightCycler 480 II cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4: RT-qPCR aşamaları, sıcaklıkları ve süreleri.

İlk denatürasyon aşaması	95°C ,2 dakika	
Amplifikasyon aşaması	Denatürasyon için 95°C, 10 saniye	45 Döngü
	Annealing 60°C, 1 dakika	
	Elongasyon 72°C,	
Melting Curve analizi	60- 95°C arası, süresiz	

Ardından Ct değerleri ve erime eğrileri kontrol edilerek bir Excel dosyasında toplanmıştır. Normalizasyon için ACTB geni kullanılmıştır. Daha sonra $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu (67) ile gen ifadeleri analiz edilerek GraphPad 10 yardımıyla istatistiksel analizi için 2-way ANOV testi uygulanmış ve grafik oluşturulmuştur.

3.6 Metabolom Analizleri

Örnekler için 33 tane, kalite kontrolleri (QC) için 6 tane ve hücre kültür ortamı için 3 tane 2 mL santrifüj tüpleri etiketlenmiştir. Her bir örneğe ait 600 µL hücre kültür ortamı etiketlenen tüplere aktarılmıştır. Ayrıca, her bir örnekten 66 µL alınarak kalite kontrol havuzu oluşturulmuş ve 600’er µL QC etiketli tüplere aktarılmıştır. Tüm tüpler uçurma işlemi için 25 °C’ye ayarlı (LABCONCO, refrigerated centriVap Concentrator) cihazına yerleştirilmiştir. Bir gece boyunca uçurulan örnek peletlerine 9:1 h/h oranında MeOH: H₂O karışımı 900 µL eklenmiştir. Ardından her tüp onar saniye vortexlenmiş ve 12.000 xg’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak şişelere konulmuştur. Tüplerin çeperinde tuz çözeltileri kalıntılarına değmeden süpernatant aynı etiketli yeni tüplere aktarılmış ve tekrar uçurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme deney aşaması gelene kadar örnekler -80 °C’de saklanmıştır. GC-MS metabolomik analiz hazırlığı uçurulmuş örneklerin üzerine eşit

hacimde eklendiğine dikkat edilerek taze hazırlanmış 20 µL 20 mg/mL *Methoxyamine hydrochloride* (ALDRICH, Kat no: 226904-25G): pridin çözeltisi eklenmiş ve örnek başına 45 sn vorteks uygulanmıştır. 37 °C çalkalamalı etüvde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde örnek başına 50 µL MSFTA (Sigma, 69478-1 ML-F-KC) türevlendirme ajanı eklenmiş ve örnek başına 30 sn vorteks uygulanmıştır. GC-MS viallerine insert eklenerek ve insert içerisine pelete değmeden süpernatantın tamamı aktarılmıştır. Vialler GC-MS cihazına yerleştirilmiştir (SHİMADZU, GC-MS-QP2010 Ultra) ve analiz gerçekleştirilmiştir.

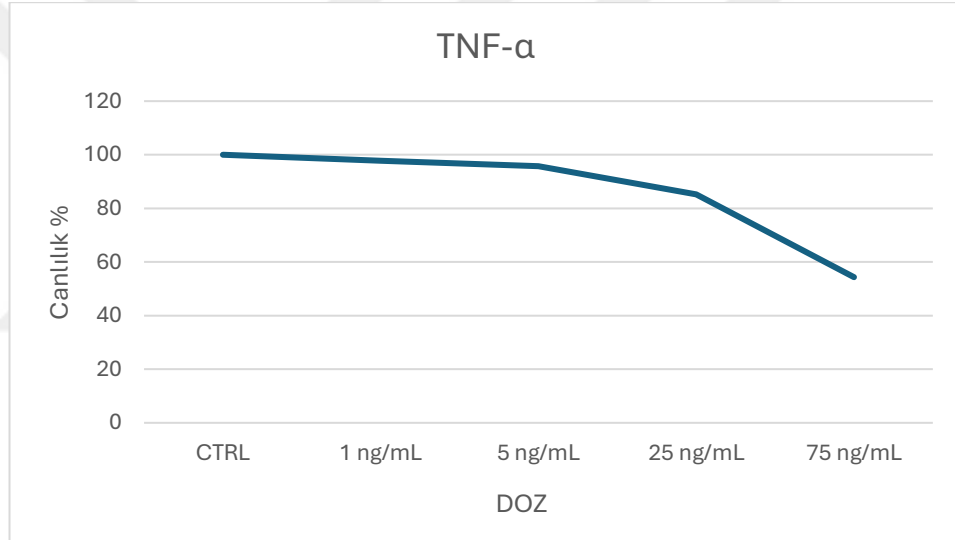
3.7 Metabolom Verilerinin değerlendirilmesi

Analizler için MSDIAL4, METLIN gibi araçlar kullanılmıştır. Metabolomik analizler için MetaboAnalyst 6.0 (www.metaboanalyst.ca/) programı kullanılarak *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) ve *Variable Importance in Projection* (VIP) grafikleri, ikili karşılaştırmalarda değişen metabolitlerdeki kat değişimlerinin incelenmesi için volkan grafikleri ve en çok değişen metabolitler için de ısı-haritası oluşturulmuştur. Yolak analizleri de tamamlanmıştır.

4. BULGULAR

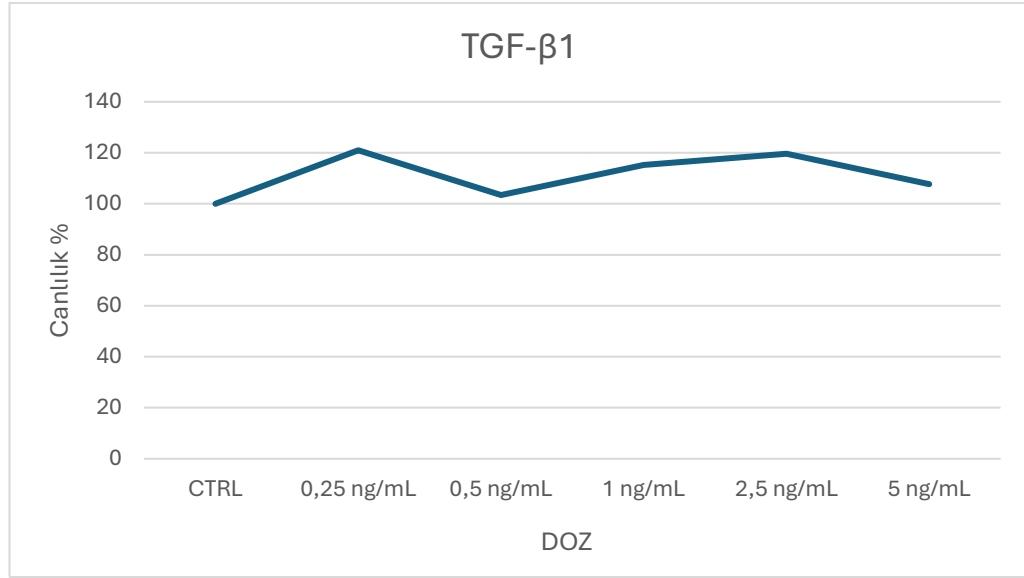
4.1 WST-1 Analizleri

3.4 kısmında gerçekleştirilen WST testlerinin ölçüm sonuçları Excel'e geçirilmiştir. Ardından her stres faktörü için kontrol grubu ortalamaları alınıp, farklı dozlardaki sonuçlar, kontrol grubu ortalamasıyla oranlanmıştır. Böylelikle kontrol grubu hücre canlılığı 1 olmuş, diğer gruplarda ise kontrol grubuna kıyasla canlılığın nasıl değiştiği gösterilmiştir. Daha sonra canlılık değişimlerinin yüzdelik değişimlerini gözlemleyebilmek için tüm grupların ortalaması 100 ile çarpılmıştır. Ardından değerler Excel üzerinden grafiklerle gösterilmiştir. (Bkn. Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4)



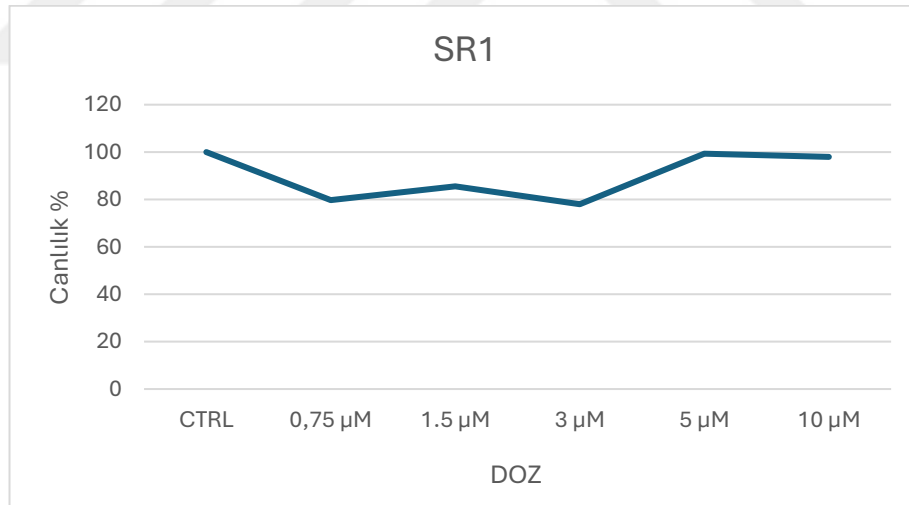
Şekil 4.1: Astrosit hücrelerine uygulanan farklı TNF- α dozlarının canlılık üzerine olan etkisi.

TNF- α uygulamasını takiben gerçekleştirilen WST analizi sonucunda TNF- α 'nın 25 ng/mL doz değerine kadar %80 oranında canlılığın korunduğu, bu değer üzerinde canlılık değerinin %50 kadar azaldığı gözlenmiştir.



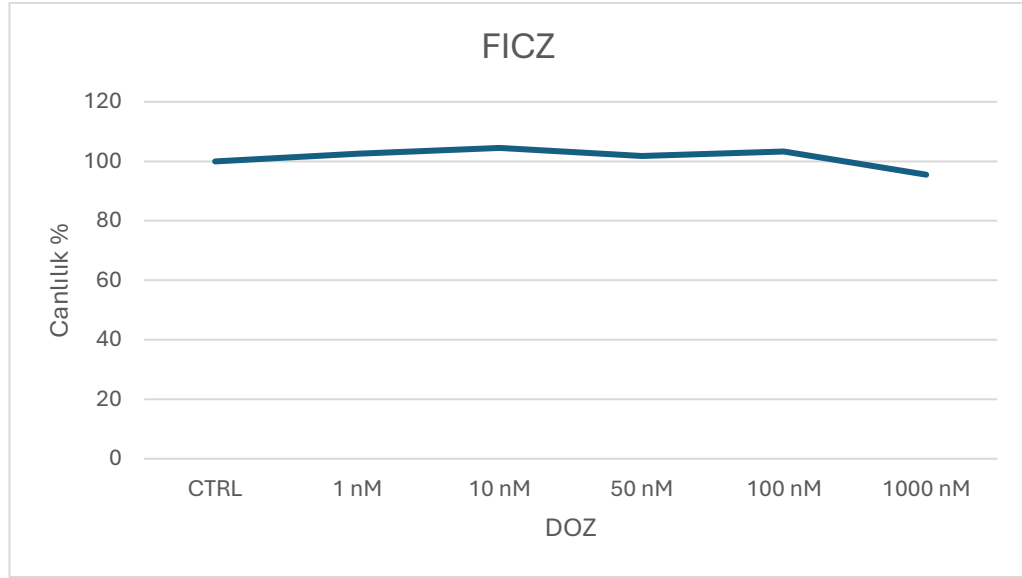
Şekil 4.2: Astrosit hücrelerine uygulanan farklı TGF- β 1 dozlarının canlılık üzerine olan etkisi.

TGF- β 1 uygulamasını takiben gerçekleştirilen WST analizi sonucunda TGF- β 1'in 5 ng/mL doz değerine kadar hücre canlılığı üzerine olumsuz bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.3: Astrosit hücrelerine uygulanan farklı SR1 dozlarının canlılık üzerine olan etkisi.

SR1 uygulamasını takiben gerçekleştirilen WST analizi sonucunda SR1'in 0,75-3 μ M doz değerine kadar hücre canlılığını % oranında olumsuz yönde etkilediği ancak 5 ve 10 μ M değerlerinde canlılığın kontrol grubu ile uyumlu olacak şekilde korunduğu gözlenmiştir.



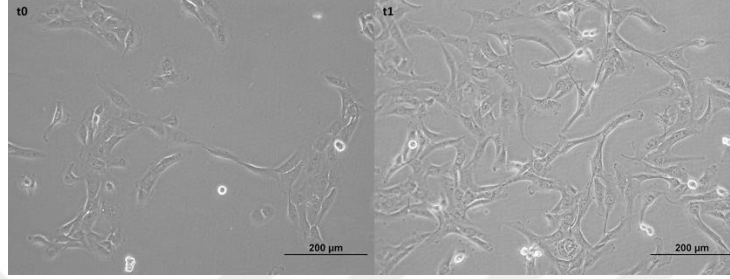
Şekil 4.4: Astrosit hücrelerine uygulanan farklı FICZ dozlarının canlılık üzerine olan etkisi.

FICZ uygulamasını takiben gerçekleştirilen WST analizi sonucunda uygulanan FICZ dozlarının canlılığın kontrol grubu ile uyumlu olacak şekilde korunduğu gözlenmiştir.

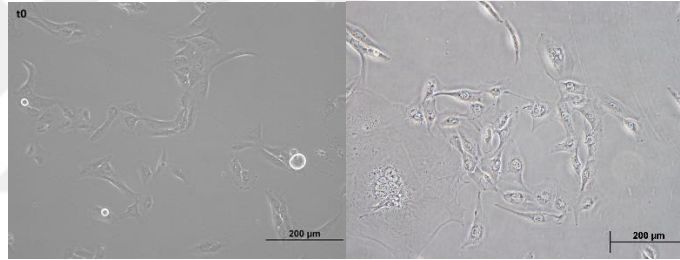
Tez çalışması kapsamında seçilen doz aralıkları literatür araştırması kapsamında referans alınan doz değerlerinin aşağısı ve yukarısı olacak şekilde seçilmiştir. WST analizi ile doz değerlerinin insan ölümsüzleştirilmiş astrosit hücre hattında 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına olan etkileri araştırılmıştır. Literatür verileri ve WST analizi birlikte değerlendirildiğinde ilgili çalışma kapsamında; TNF- α için 10 ng/mL ve 100 ng/mL, TGF- β 1 için 2,5 ng/mL ve 10ng/mL, FICZ için 100 nM ve 1000 nM, SR1 için 1,5 μ M doz değerlerinin uygulanması kararlaştırılmıştır. LPS değeri için WST analizi yapılmamış olup, literatürde LPS ve astrosit özelinde gerçekleştirilmiş olan çalışmalar incelenmiştir. 100ng/mL doz değerinin uygulanması kararlaştırılmıştır. TNF- α , TGF- β 1 ve FICZ için ikişer farklı doz değerinin seçilmesinin ana nedeni, 24 saatlik inkübasyon süresinde A1 ve A2 astrosit fenotipleri oluşturulmaya çalışılacak olup, düşük ve yüksek doz değerlerinde beklenen fenotipik etkinin karşılanmasına yönelik bir strateji olarak uygulanmıştır.

4.2 Morfolojik Analizler

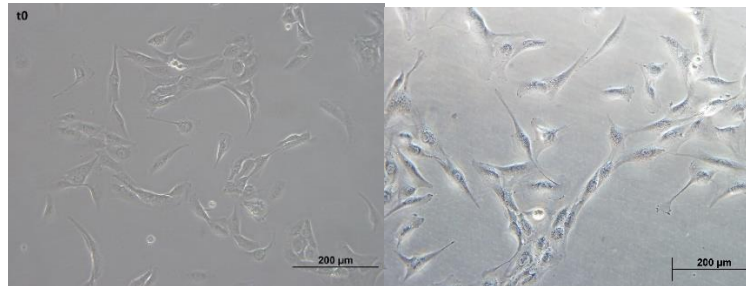
Wst-1 analizi sonucunda seçilen doz değerlerine ait morfolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Dozun uygulandığı an (t0) ve doz uygulamasından 24 saat sonra (t24) olacak şekilde mikroskop altında 20x büyütmede fotoğraflar çekilmiştir (Bkz. Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).



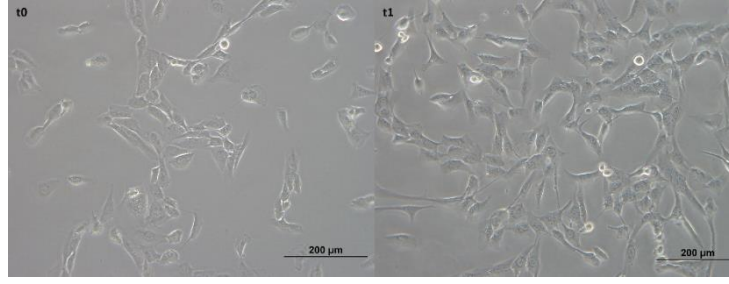
Şekil 4.5: Doz uygulanmayan (KONTROL) kuyucukların 0.saat t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).



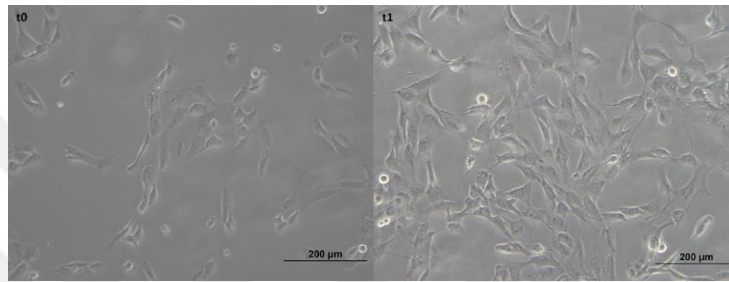
Şekil 4.6: TNF- α uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).



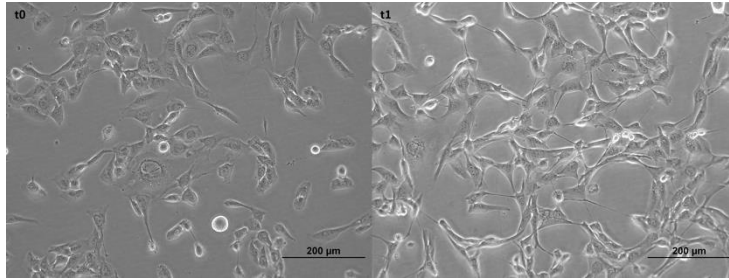
Şekil 4.7: 2,5 ng/mL TGF- β 1 uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).



Şekil 4.8: 1,5 μ M SR1 uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).



Şekil 4.9: 100 nM FICZ uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).

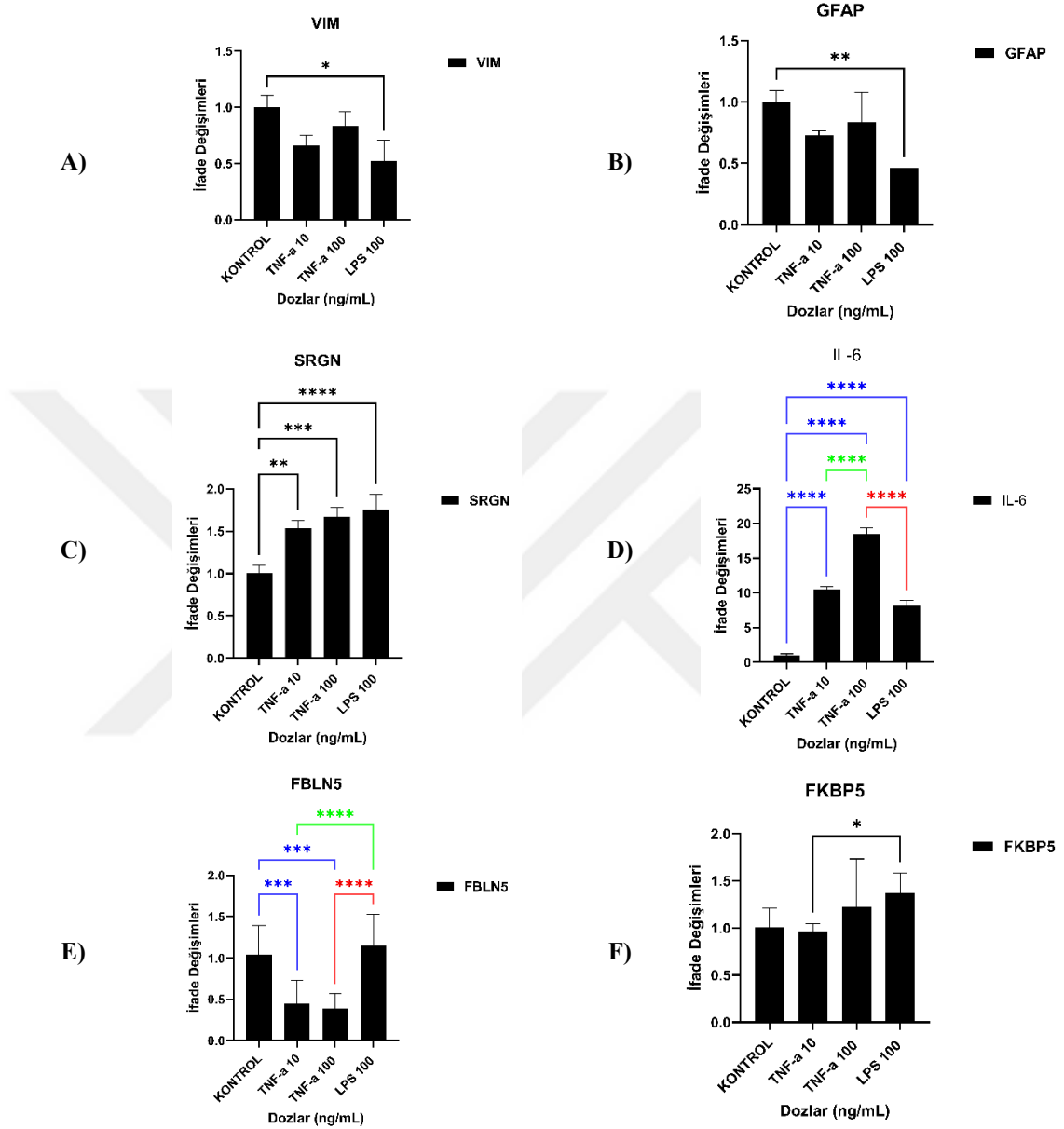


Şekil 4.10: 1000 nM FICZ uygulanan kuyucukların 0.saat (t0) ve 24.saatteki (t24) morfolojik görüntüleri (20x).

Gerçekleştirilen morfolojik analizler kapsamında, ajan uygulanan gruplar uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kontrol örneklerinde olduğu gibi hücre sayısında artış gerçekleşmiş olup, hücre morfolojilerinde hücre canlılığını olumsuz yönde etkileyen herhangi bir morfolojik değişimin olmadığı gözlenmiştir.

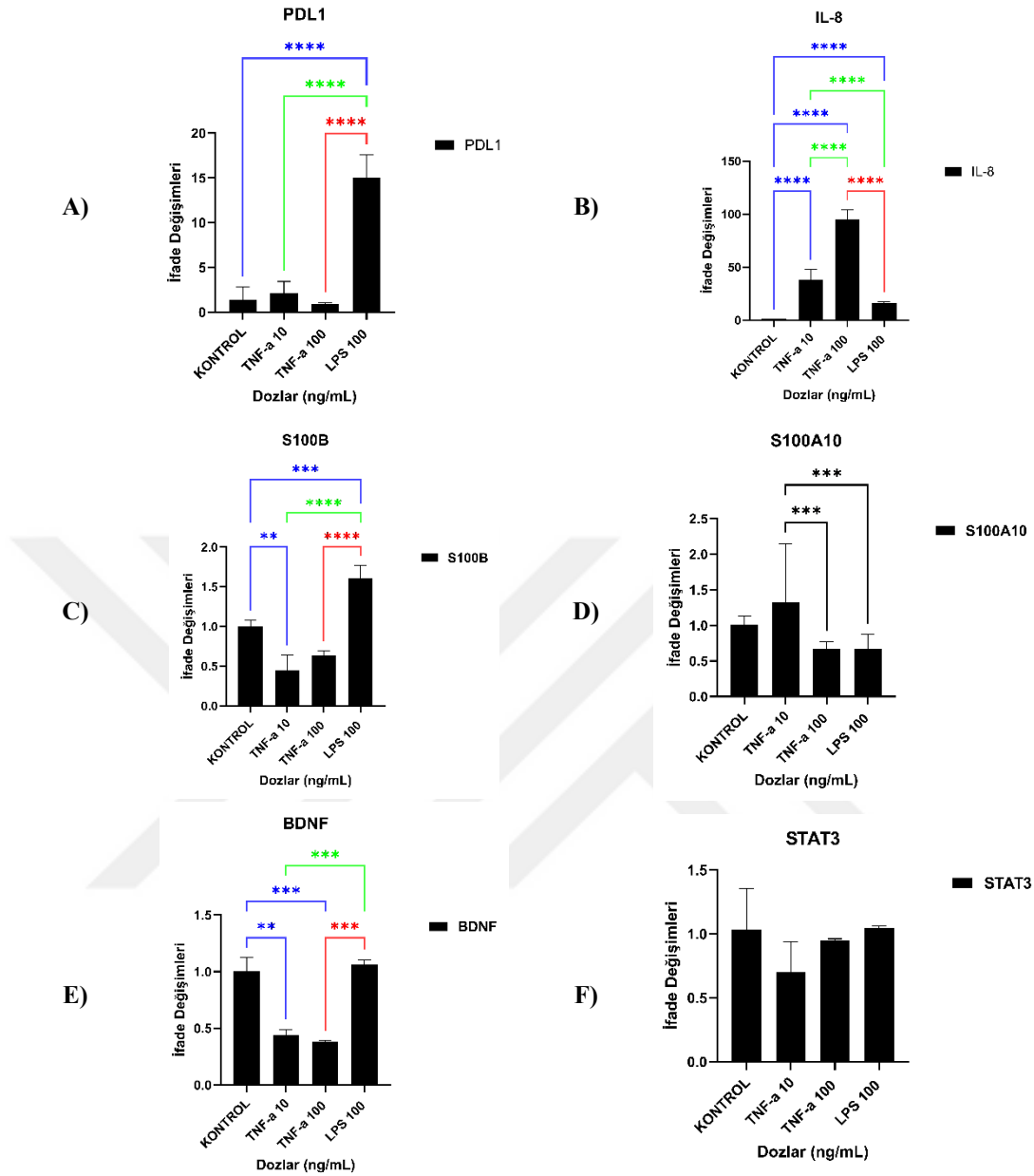
4.3 Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

TNF- α / LPS



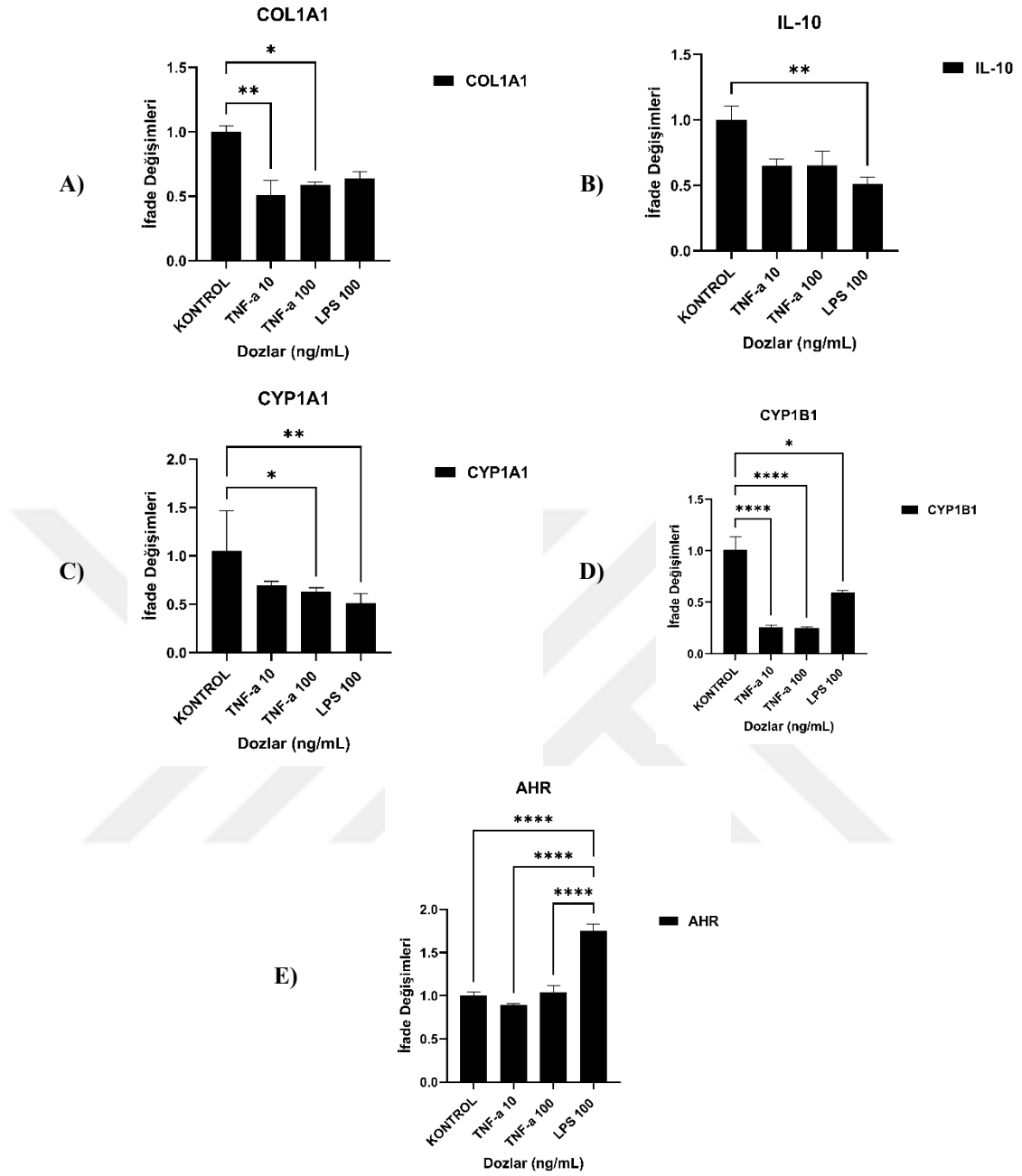
Şekil 4.11: Astrosit Hücrelerinde TNF- α ve LPS dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) VIM, B) GFAP, C) SRGN, D) IL-6, E) FBLN5 ve F) FKBP5 gen ifade analizleri.

Şekil 4.11’de VIM (A) ve GFAP(B) ifadelerinde TNF- α dozlarında değişme gözlenmezken LPS dozunda düşüş görülmektedir. Artan TNF- α dozlarında ve LPS dozunda, KONTROL grubuna kıyasla SRGN (C) ve IL-6 ifadelerinde (D) anlamlı bir artış görülmektedir. FBLN5 (E) ifadesinde ise TNF- α dozlarında KONTROL grubuna ve LPS dozuna kıyasla düşüş görülmektedir. FKBP5 geninde ise düşük TNF- α dozuna kıyasla LPS ifadelerinde artış göze çarpmaktadır.



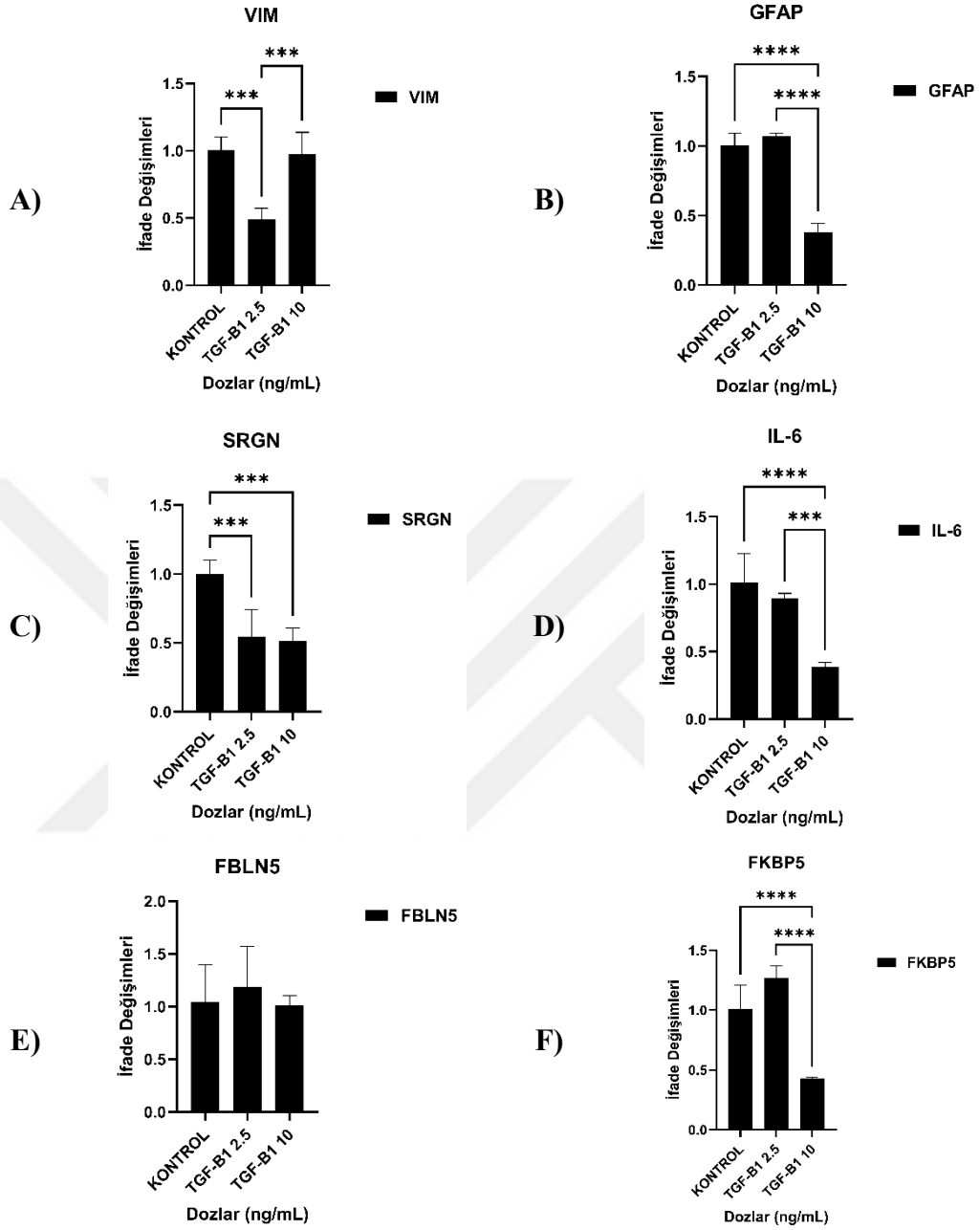
Şekil 4.12: TNF- α ve LPS dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) PDL-1, B) IL-8, C) S100B, D) S100A10, E) BDNF ve F) STAT3 gen ifadeleri.

Şekil 4.12’de artan TNF- α dozlarında ve LPS dozunda, KONTROL grubuna kıyasla PDL-1 (A) ve IL-8 (B) ifadelerinde artış görülmekte iken S100B (C) ifadesinde TNF 10 ng/mL dozunda KONTROL grubuna göre düşüş; LPS 100 ng/mL dozunda ise kontrol grubuna ve TNF- α dozlarına kıyasla artış görülmektedir. Düşük TNF- α dozuna kıyasla, yüksek TNF- α dozunda ve LPS dozunda S100A10 (D) ifadesinin azaldığı görülmektedir. BDNF ifadesinde ise (E) TNF- α dozlarında KONTROL grubuna kıyasla düşüş göze çarparken; LPS dozlarında TNF- α dozlarına kıyasla artış görülmüştür.



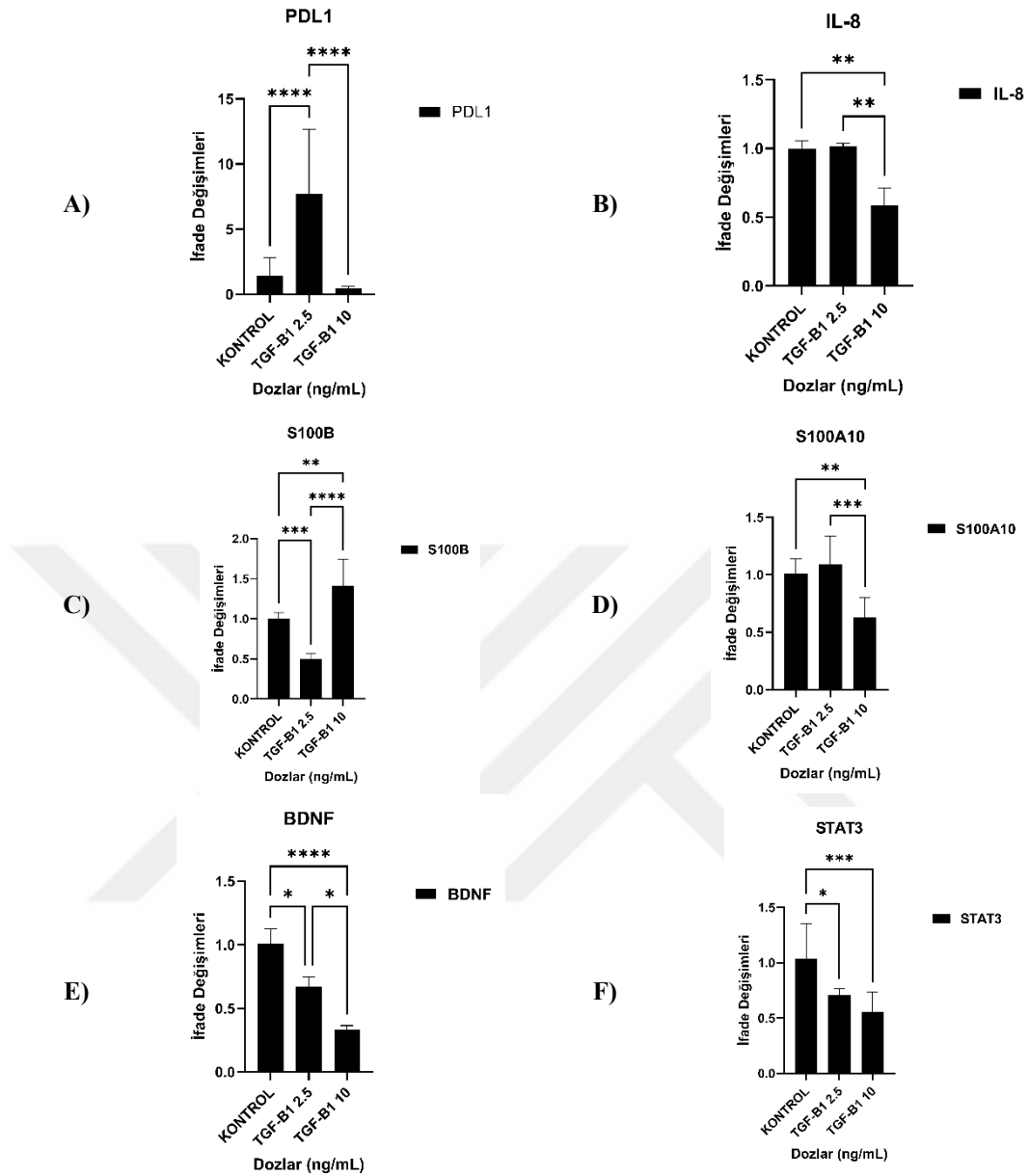
Şekil 4.13: TNF- α ve LPS dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) COL1A1, B) IL-10, C) CYP1A1, D) CYP1B1 ve E) AHR gen ifadeleri.

Şekil 4.13'te TNF- α dozlarında COL1A1 (A) ve CYP1B1 (D) ifadelerinde azalış görülmekte iken; CYP1A1 (C) ifadelerinde yüksek TNF- α ve LPS dozunda düşüş; CYP1B1(D) ifadelerinde ise KONTROL grubuna kıyasla tüm uyarıların ifadelerinde düşüş görülmektedir. AHR (E) ifadesinde ise LPS dozunda diğer gruplara kıyasla artış görülmektedir.

TGF- β 1

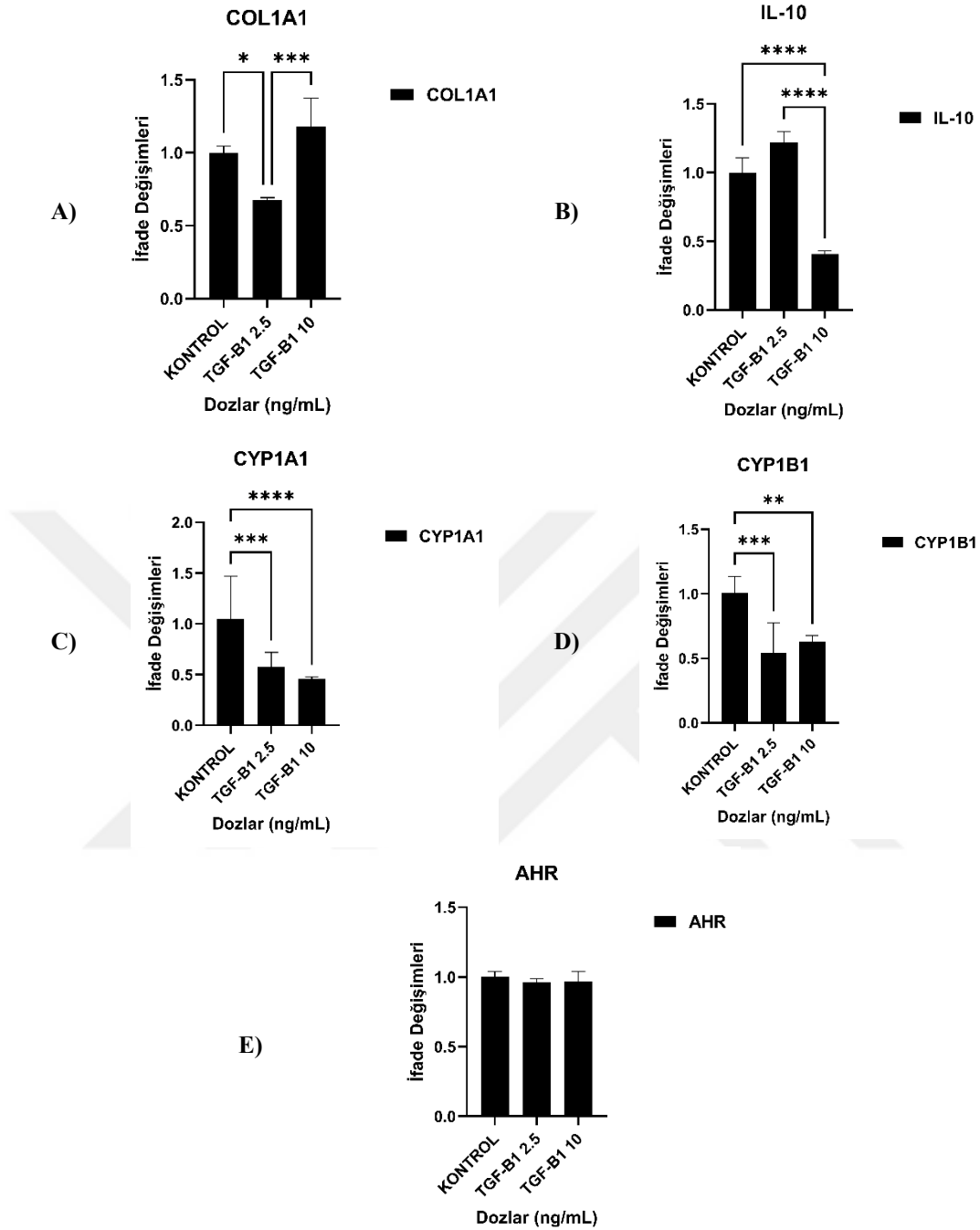
Şekil 4.14: TGF- β 1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) VIM, B) GFAP, C) SRGN, D) IL-6, E) FBLN5 ve F) FKBP5 gen ifadeleri.

Şekil 4.14'te VIM(A) ifadelerinde TGF- β 1 10 ng/mL dozuna ve KONTROL grubuna kıyasla TGF- β 1 2,5 ng/mL dozunda düşüş görülmektedir. GFAP(B), IL-6 (D) ve FKBP5(F) ifadelerinde ise KONTROL grubuna ve TGF- β 1 2,5 ng/mL dozuna kıyasla TGF- β 1 10 ng/mL dozunda düşüş görülmektedir. SRGN(C) ifadelerinde ise her iki TGF- β 1 dozunda düşüş göze çarpmaktadır.



Şekil 4.15: TGF-β1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) PDL-1, B) IL-8, C) S100B, D) S100A10, E) BDNF ve F) STAT3 gen ifadeleri.

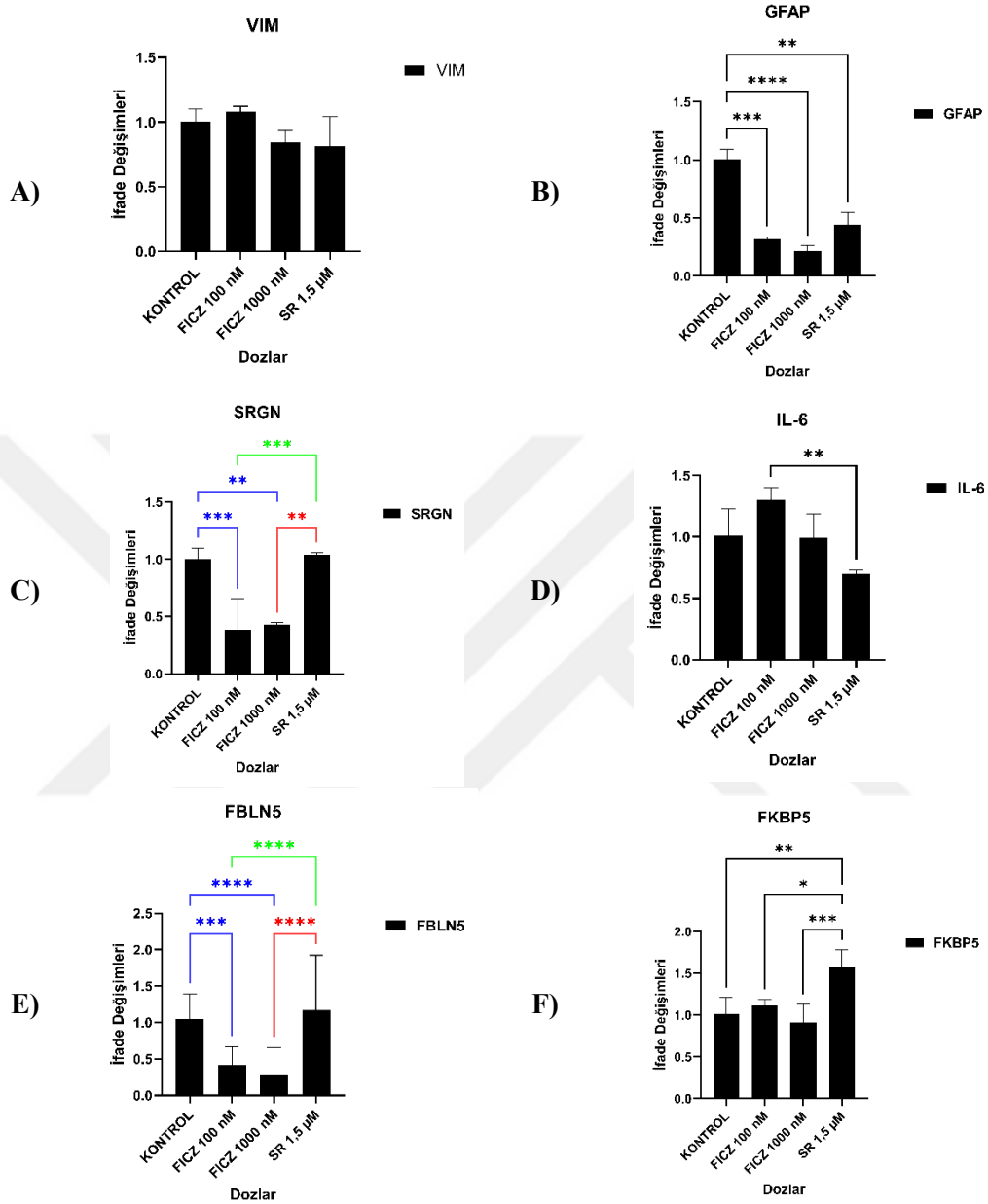
Şekil 4.15'te TGF-β1 2,5 ng/mL dozunda, KONTROL grubuna ve TGF-β1 10 ng/mL dozuna kıyasla PDL-1 (A) ifadelerinde anlamlı bir artış görülmektedir. TGF-β1 10ng/mL dozunda KONTROL grubuna ve TGF-β1 2,5 ng/mL dozuna kıyasla IL-8 (B), S100A10(D), ifadelerinde de düşüş görülmektedir. S100B(C) ifadelerinde KONTROL grubuna kıyasla TGF-β1 2,5 ng/mL dozunda düşüş görülürken; TGF-β1 10 ng/mL dozunda ise artış görülmektedir. Ancak, A2 fenotip dönüşümü için seçtiğimiz BDNF(E) ve TGF-β1 'in aşağı regülatörlerinden olan STAT3(F) geninin ifade değerlerinde artan TGF-β1 dozu ile ters orantılı olarak düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.16: TGF-β1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) COL1A1, B) IL-10, C) CYP1A1, D) CYP1B1 ve E) AHR gen ifadeleri.

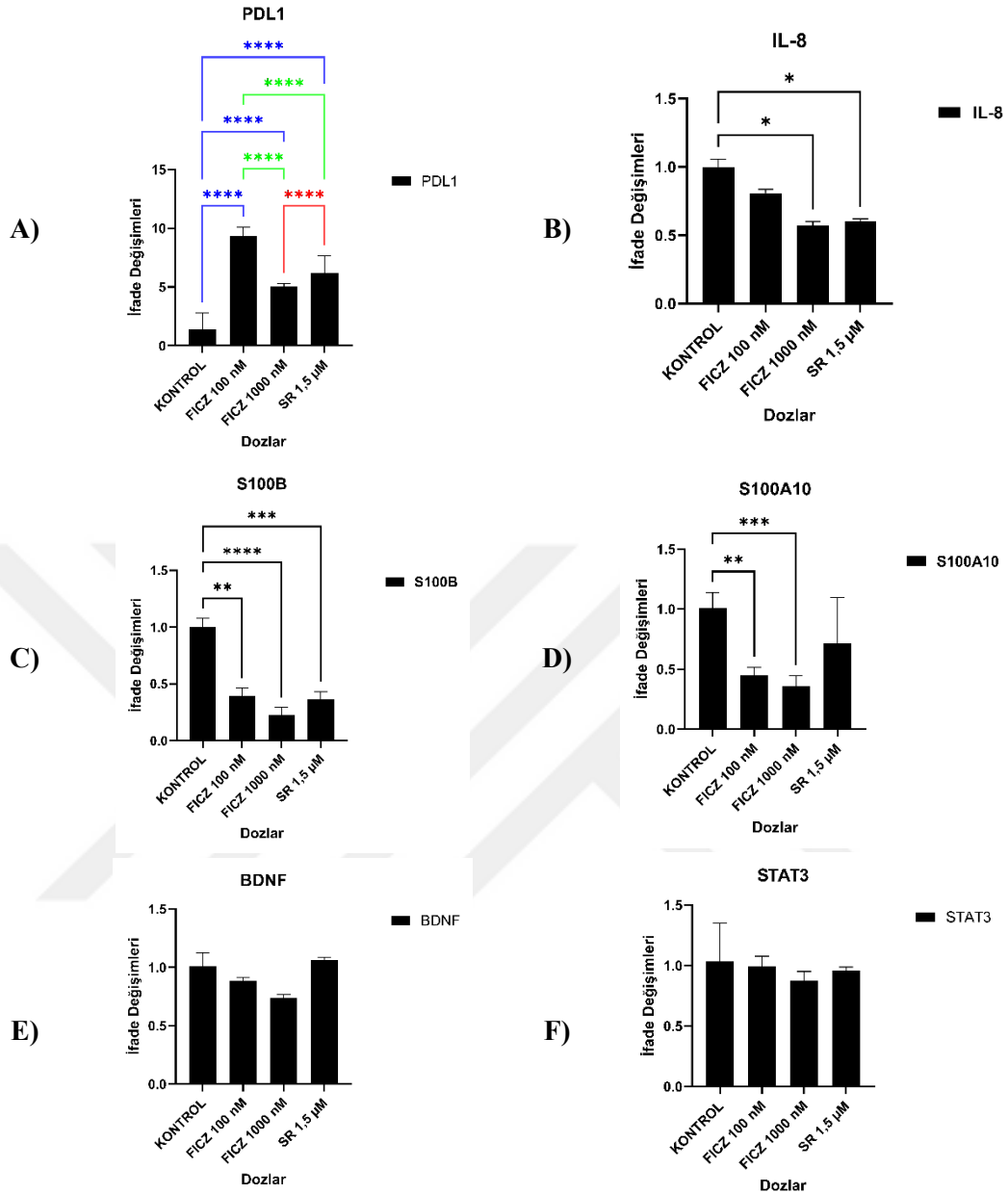
Şekil 4.16’da COL1A1(A) ifadelerinde KONTROL ve TGF-β1 10ng/mL dozuna kıyasla TGF-β1 2,5 ng/mL dozunda düşüş görülmektedir. IL-10(B) ifadesinde ise TGF-β1 10ng/mL dozunda, diğer gruplara kıyasla düşüş göze çarpmaktadır. AHR yolağı ile ilişkili genler olan CYP1A1(C) ve CYP1B1(D) ifadelerinde KONTROL grubuna kıyasla her iki TGF-β1 dozunda da düşüş görülmekte iken AHR ifadesinde bir değişiklik görülmemektedir.

FICZ / SR1



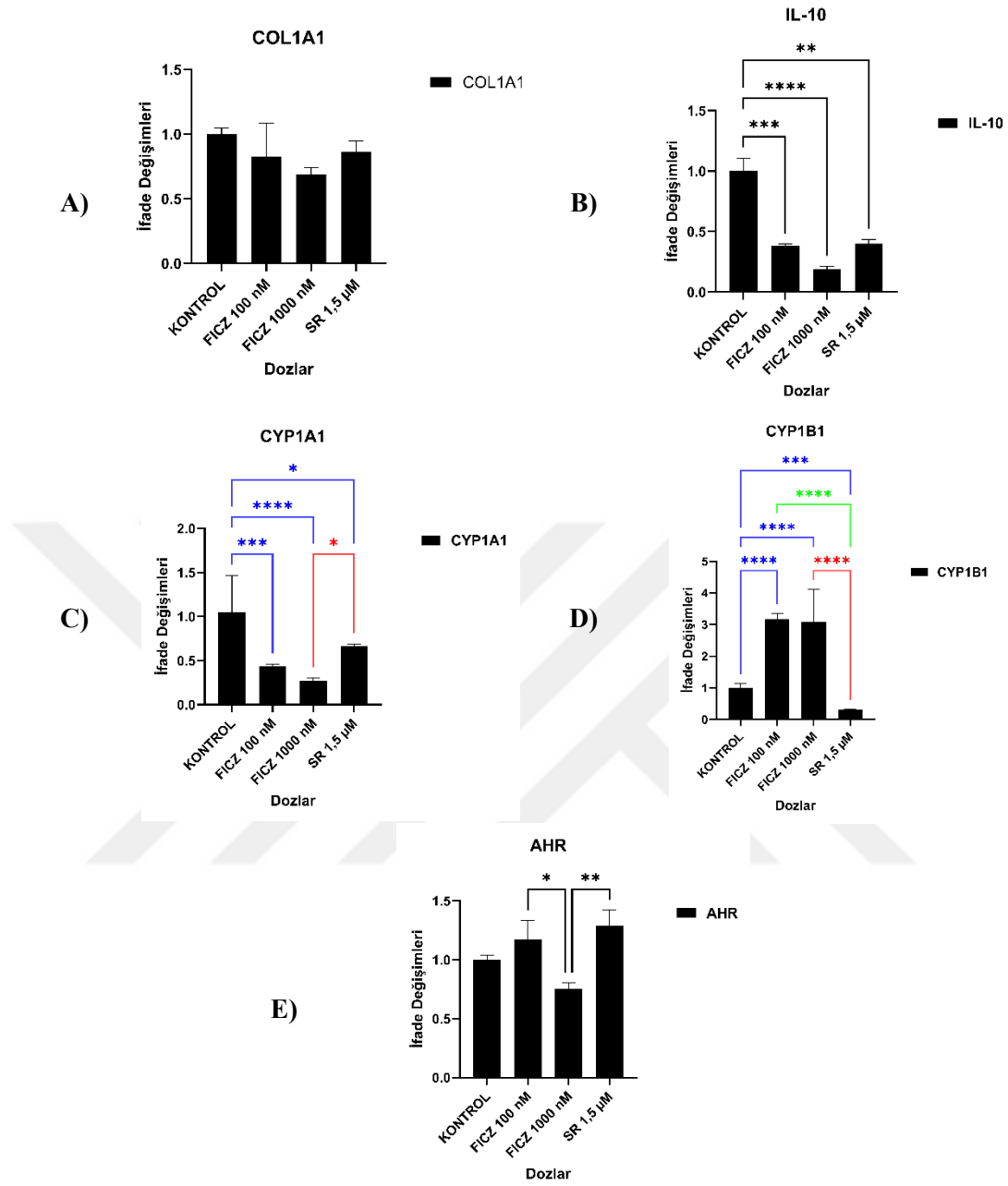
Şekil 4.17: FICZ ve SR1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) VIM, B) GFAP, C) SRGN, D) IL-6, E) FBLN5 ve F) FKBP5 gen ifadeleri.

Şekil 4.17’de GFAP (B) ifadelerinde artan FICZ dozlarında ve SR1 dozunda, KONTROL grubuna kıyasla düşüş görülmektedir. Ek olarak SRGN (C) ve FBLN5 (E) ifadelerinde KONTROL ve SR1 grubuna kıyasla FICZ dozlarında anlamlı bir düşüş görülmektedir. Ayrıca IL-6 (D) ifadelerinde FICZ 100 nm dozunda SR1 dozuna kıyasla artış; FKBP5 (F) ifadelerinde ise SR1 dozunda KONTROL ve FICZ gruplarına kıyasla artış görülmektedir.



Şekil 4.18: FICZ ve SR1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) PDL-1, B) IL-8, C) S100B, D) S100A10, E) BDNF ve F) STAT3 gen ifadeleri.

Şekil 4.18’de PLD-1 (A) ifadelerinde KONTROL grubuna kıyasla FICZ ve SR1 gruplarında anlamlı bir artış görülmektedir. Ayrıca FICZ 100 nM dozunda yine PDL1 (A) ifadelerinde FICZ 1000 nM ve SR1 gruplarına göre anlamlı artış; SR1 grubunda ise FICZ 1000 nM dozuna kıyasla anlamlı artış görülmüştür. IL-8 geninde FICZ 1000 nM ve SR1 dozunda KONTROL grubuna göre düşüş; S100B (C) ifadelerinde ise KONTROL grubuna kıyasla diğer gruplarda anlamlı düşüş görülmektedir. Ek olarak S100A10 (D) ifadelerinde ise FICZ gruplarında KONTROL gruplarına kıyasla anlamlı düşüş görülmektedir.

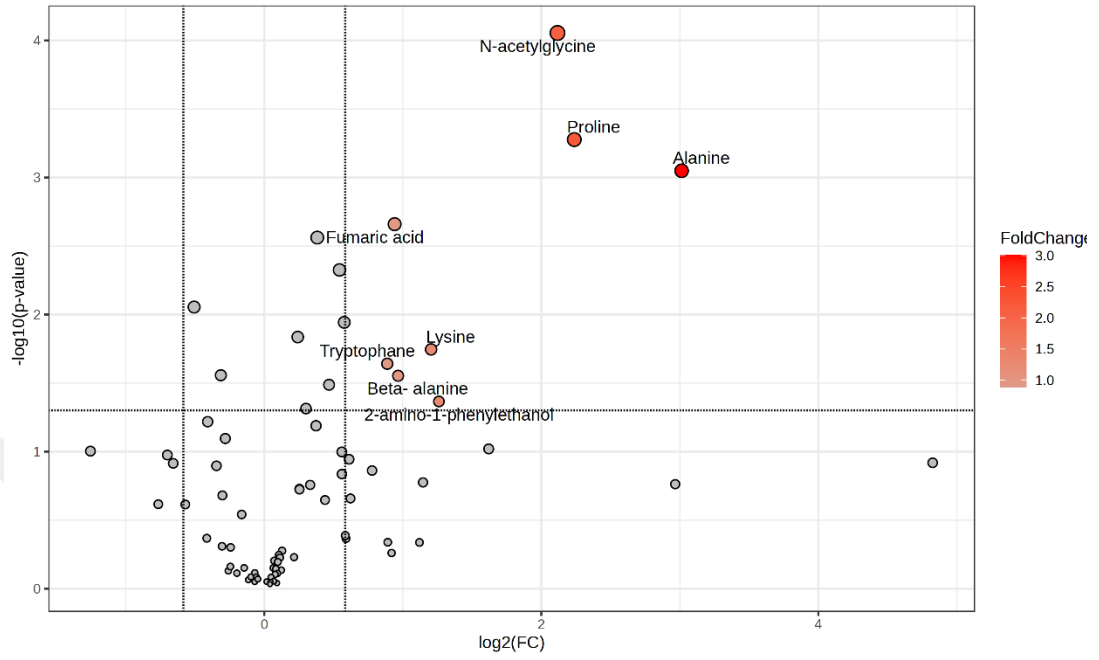


Şekil 4.19: FICZ ve SR1 dozlarında kontrol grubuna kıyasla A) COL1A1, B) IL-10, C) CYP1A1, D) CYP1B1 ve E) AHR gen ifadeleri.

Şekil 4.19'da IL-10 (B) ifadelerinde FICZ dozlarında ve SR1 dozunda, KONTROL grubuna kıyasla düşüş görülmektedir. CYP1A1 (C) ifadelerinde KONTROL grubuna kıyasla FICZ dozlarında düşüş görülmekte iken SR1 dozunda FICZ dozlarına kıyasla ifadesi artmaktadır. CYP1B1 (D) ifadelerinde FICZ gruplarında KONTROL grubuna kıyasla artış; SR1 ifadelerinde ise düşüş görülmektedir. FICZ 1000 nM dozunda AHR(E) geninin ifadesi FICZ100 nM ve SR 1,5 µM dozuna kıyasla düşüş göstermektedir.

4.4 Metabolom Analizleri

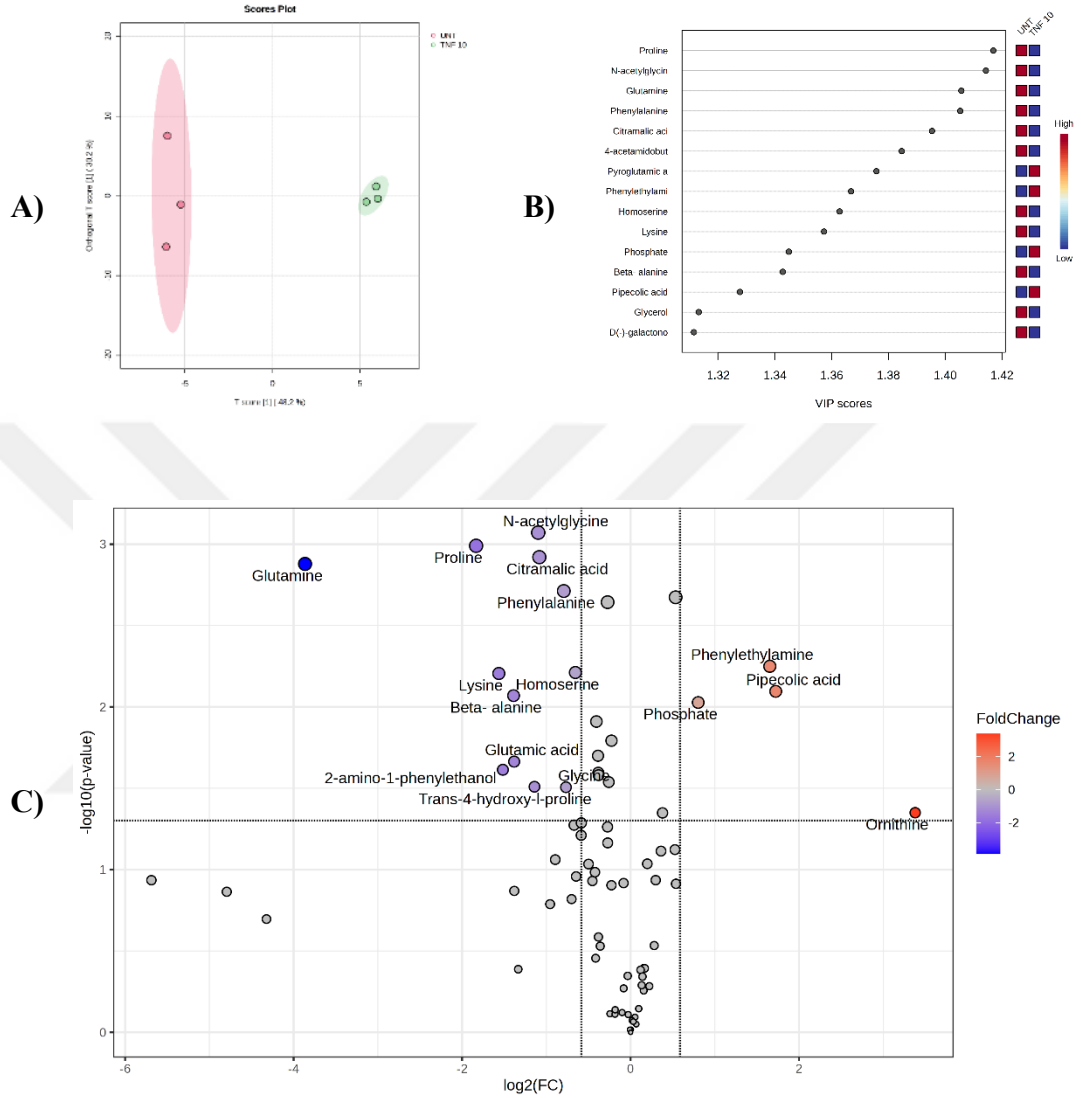
KONTROL / MED



Şekil 4.20: Kontrol hücrelerinin bulunduğu ortamın, hücresiz ortama kıyasla metabolit karşılaştırılması.

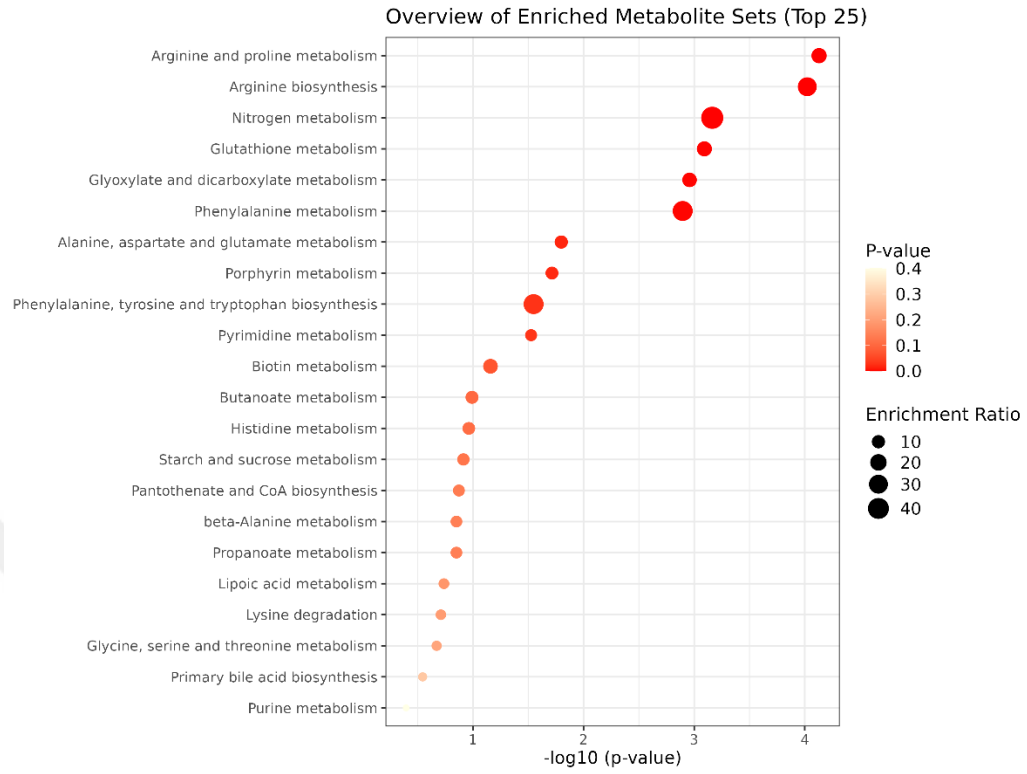
Şekil 4.20’de kontrol hücrelerinin hücre kültür ortamının, boş hücre kültür ortamına kıyasla Prolin, Alanin, N-asetilglisin, Lizin, β -alanin ve Fumarat seviyelerinin arttığı görülmektedir.

TNF- α 10 ng/mL / KONTROL



Şekil 4.21 : 24 saat boyunca TNF- α 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.

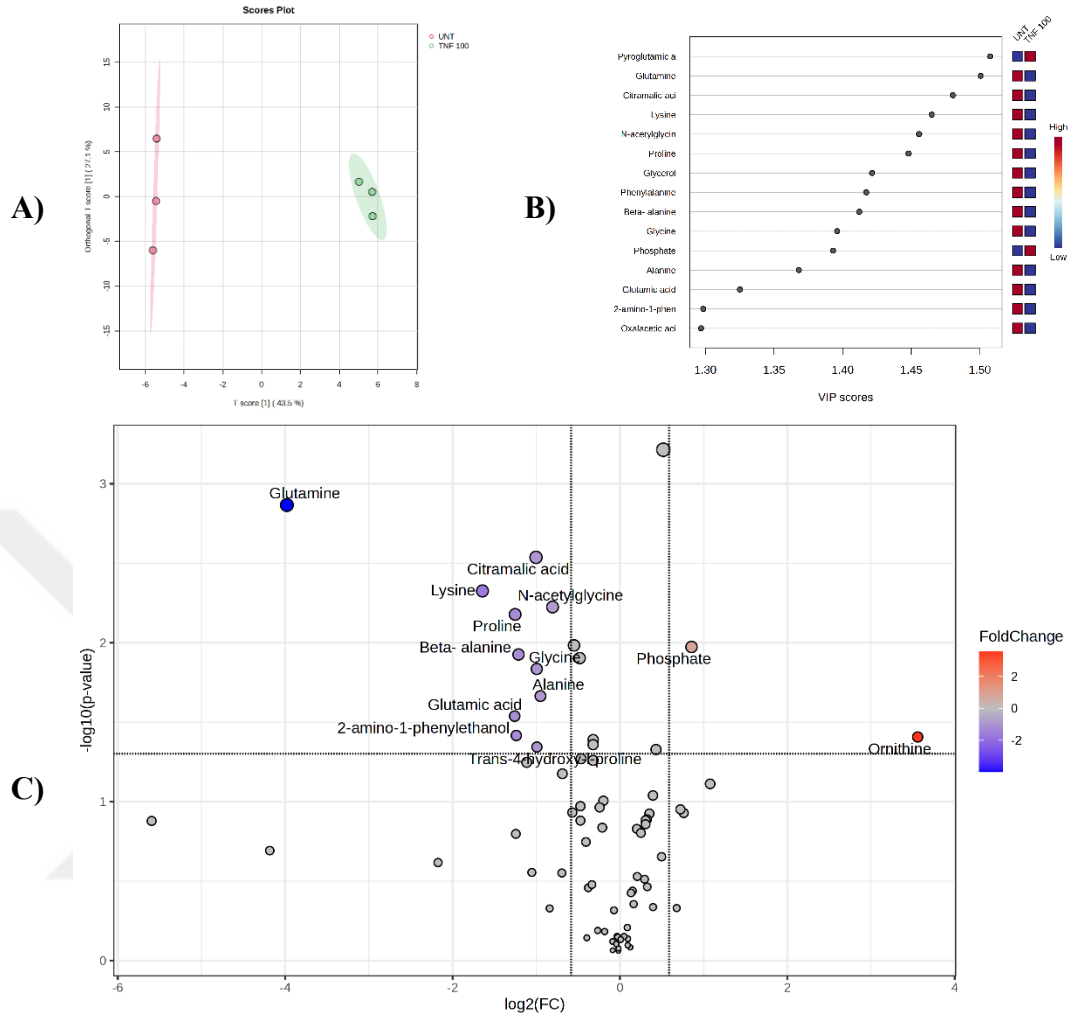
Şekil 4.21’de 24 saat boyunca TNF- α 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volkan analizinde ise 24 saat boyunca TNF- α 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyasla Ornitin, Feniletilamin ve Pipekolik Asit seviyelerinin arttığı; Glutamin, Prolin, N-Asetilglisin, Lizin, Glutamat, Homoserin ve Fenilalanin seviyelerinin ise azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.22: 24 saat boyunca TNF- α 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

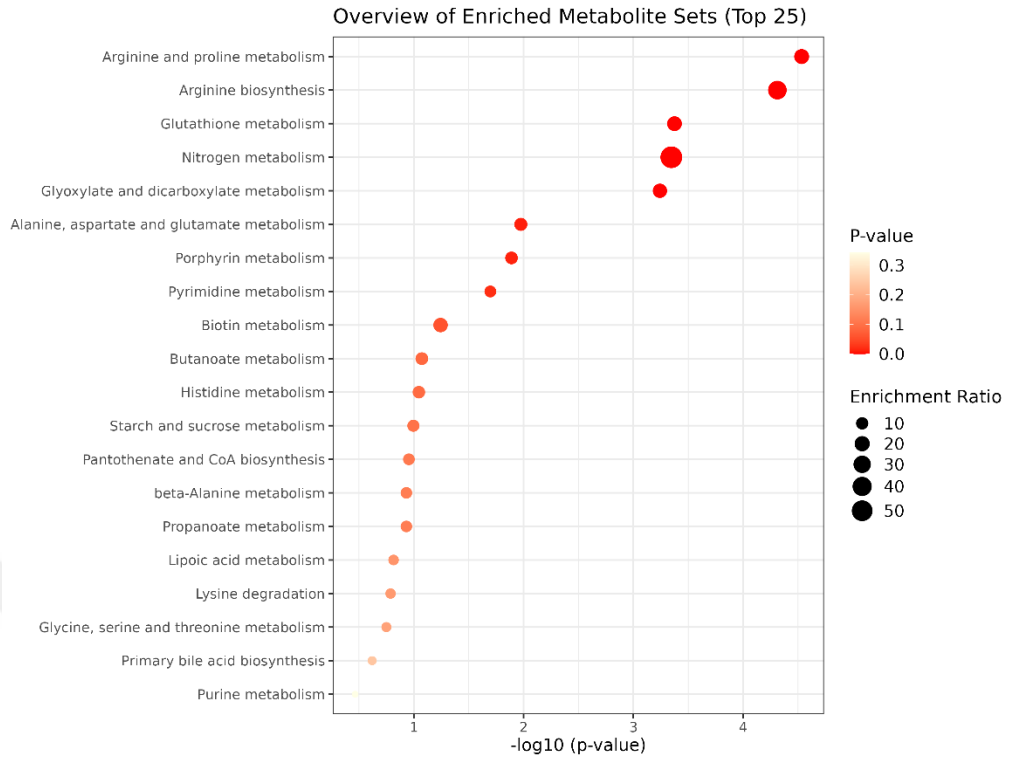
Şekil 4.22'deki zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin arginin ve prolin metabolizmasında, nitrojen metabolizmasında ve glutatyon metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir.

TNF- α 100 ng/mL / KONTROL



Şekil 4.23: 24 saat boyunca TNF- α 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.

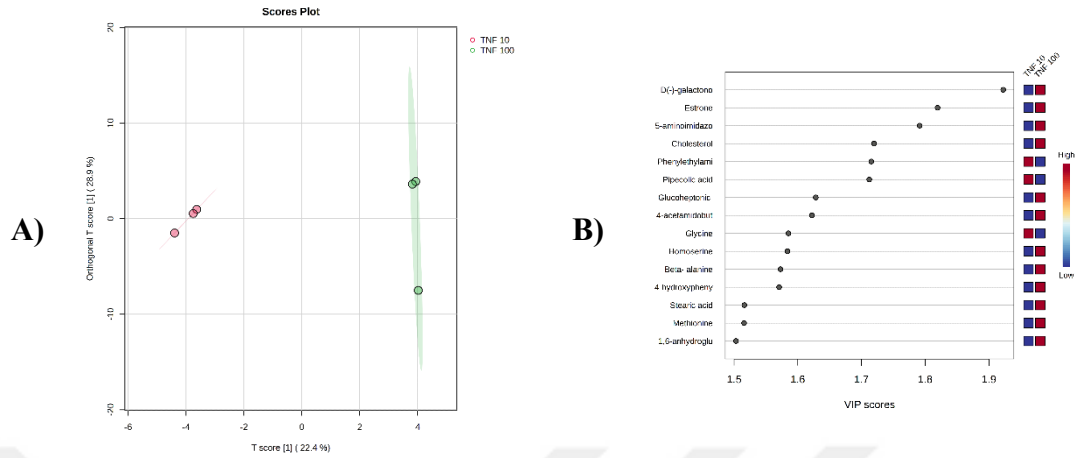
Şekil 4.23'te 24 saat boyunca TNF- α 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volkan analizinde ise 24 saat boyunca TNF- α 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyasla Ornitin ve Fosfat seviyelerinin arttığı; Glutamin, Prolin, N-Asetilglisin, Lizin, Glutamat, β -alanin, Sitramalat ve Glisin seviyelerinin ise azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.24: 24 saat boyunca TNF- α 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

Şekil 4.24'teki zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin arginin ve prolin metabolizmasında, nitrojen metabolizmasında ve glutatyon metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir.

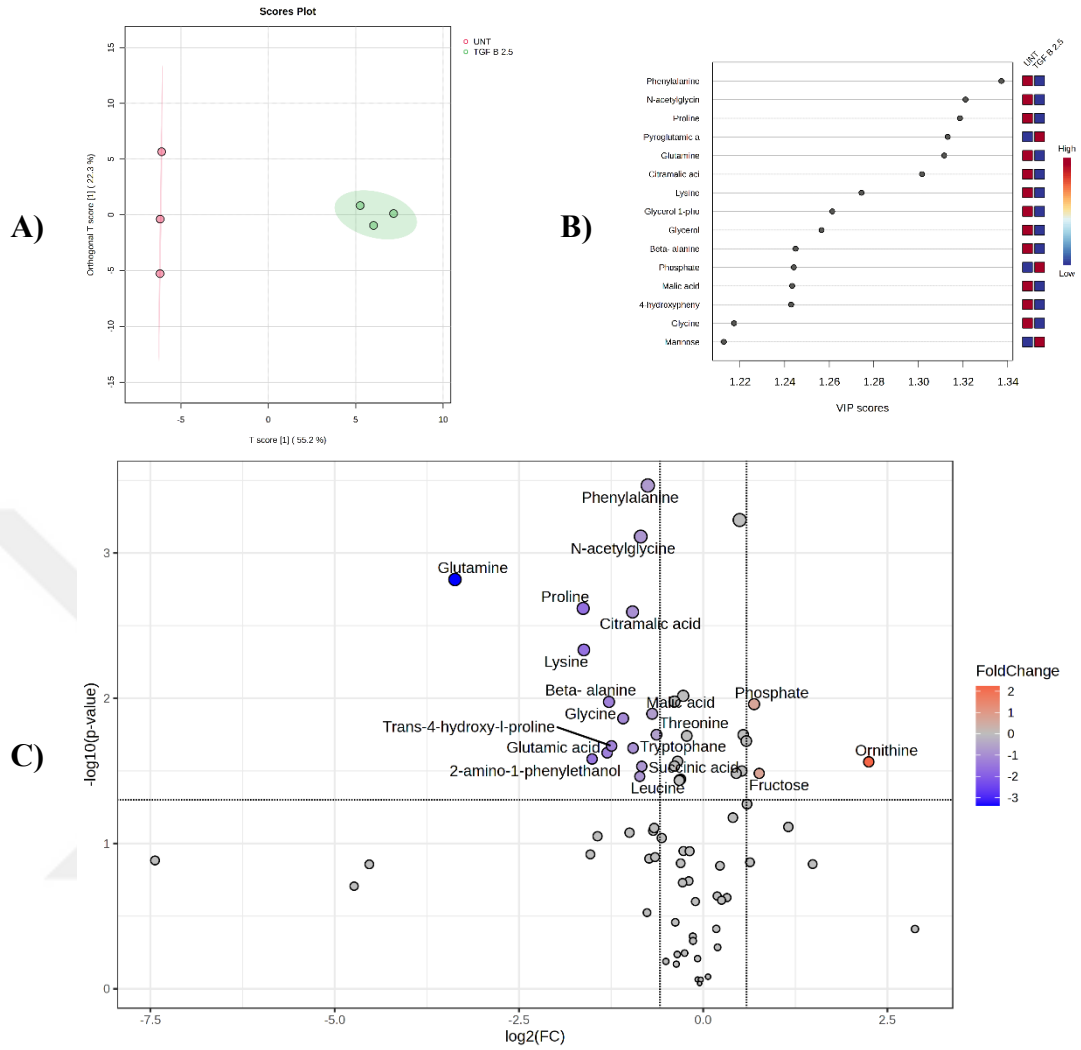
TNF- α 100 ng/mL / TNF- α 10 ng/mL



Şekil 4.25: 24 saat boyunca TNF- α 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca TNF- α 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla PLS-DA A) Skor Plot ve B) VIP Plot karşılaştırmaları.

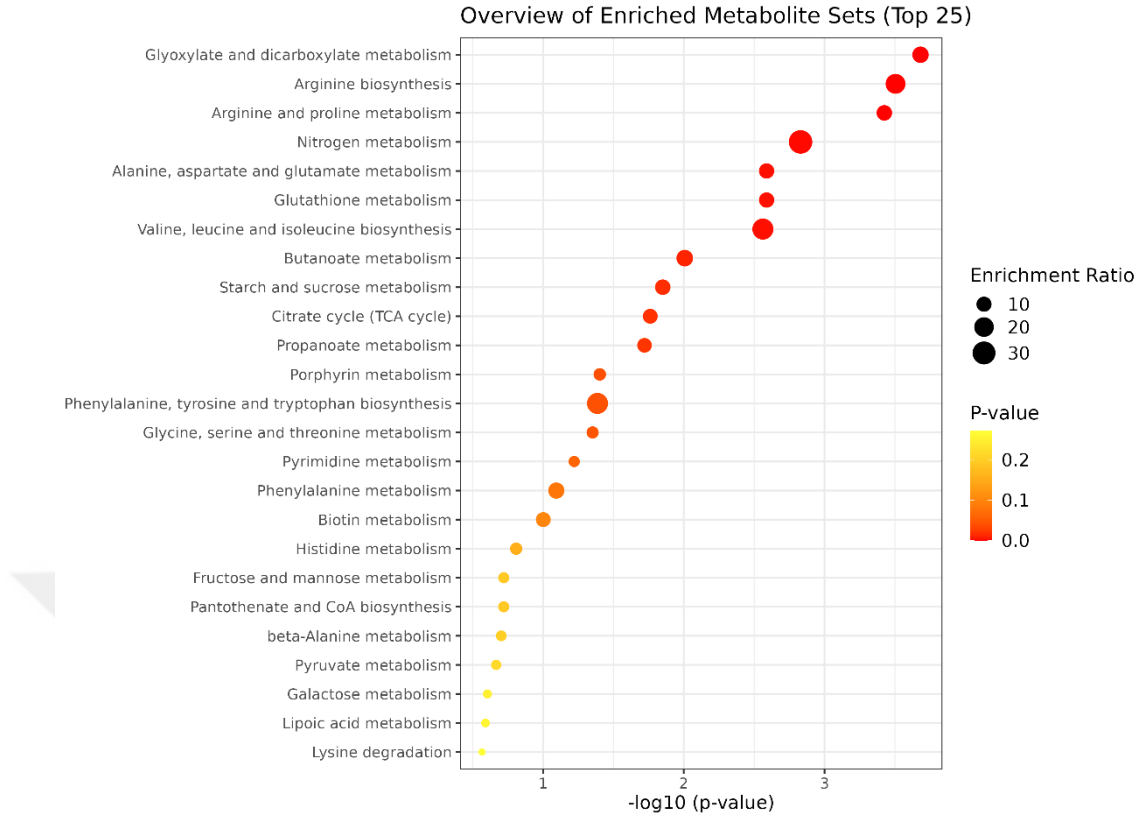
Şekil 4.25'te 24 saat boyunca TNF- α 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, TNF- α 10 ng/mL hücrelerinin ortamıyla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ancak metabolit seviyeleri anlamlı çıkmadığı için Volkan Plot ve Zenginleştirilmiş Set sonucu bulunmamaktadır.

TGF- β 1 2,5 ng/mL /KONTROL



Şekil 4.26: 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.

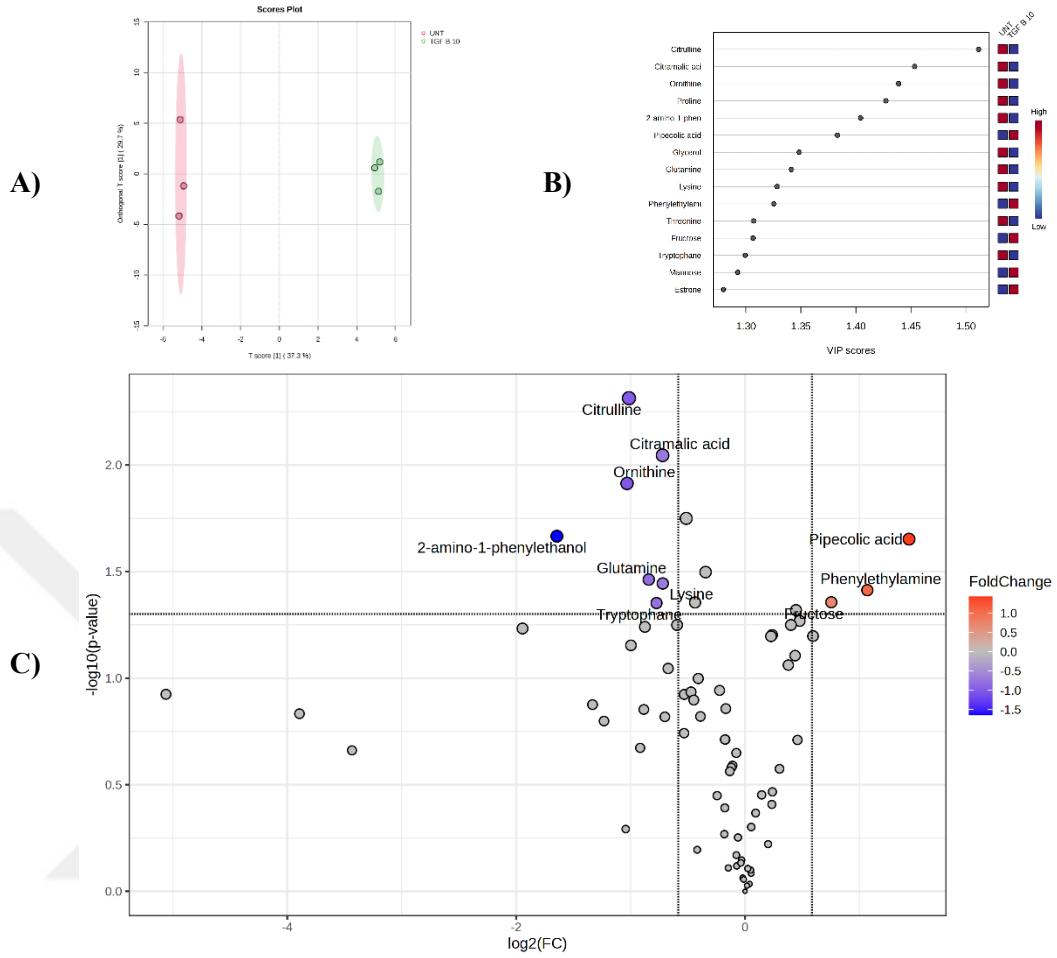
Şekil 4.26’da 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volkan analizinde ise 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyasla Ornitin, Fosfat ve Fruktoz seviyelerinin arttığı; Glutamin, Prolin, N-Asetilglisin, Lizin, β -alanin ve Glisin seviyelerinin ise azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.27: 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

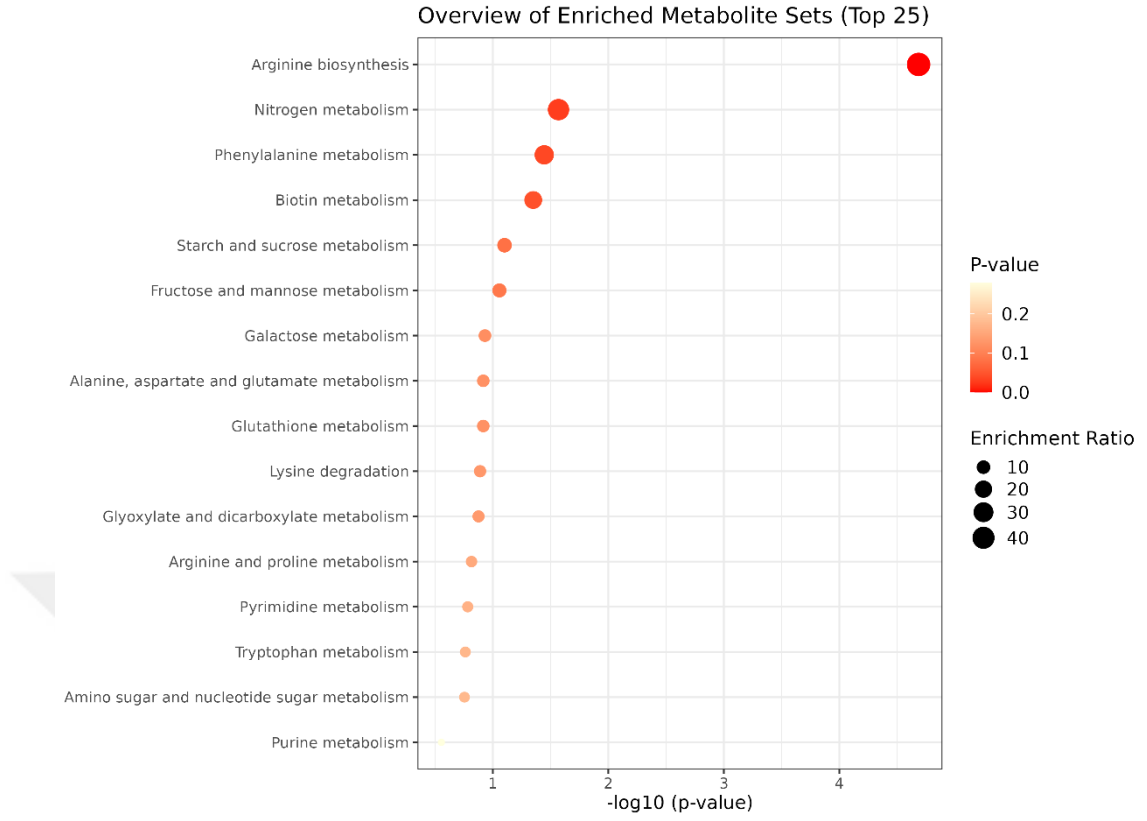
Şekil 4.27’de Zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin arginin ve prolin metabolizmasında, nitrojen metabolizmasında ve glioksilat/dikarboksilat metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir.

TGF- β 1 10 ng/mL /KONTROL



Şekil 4.28: 24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.

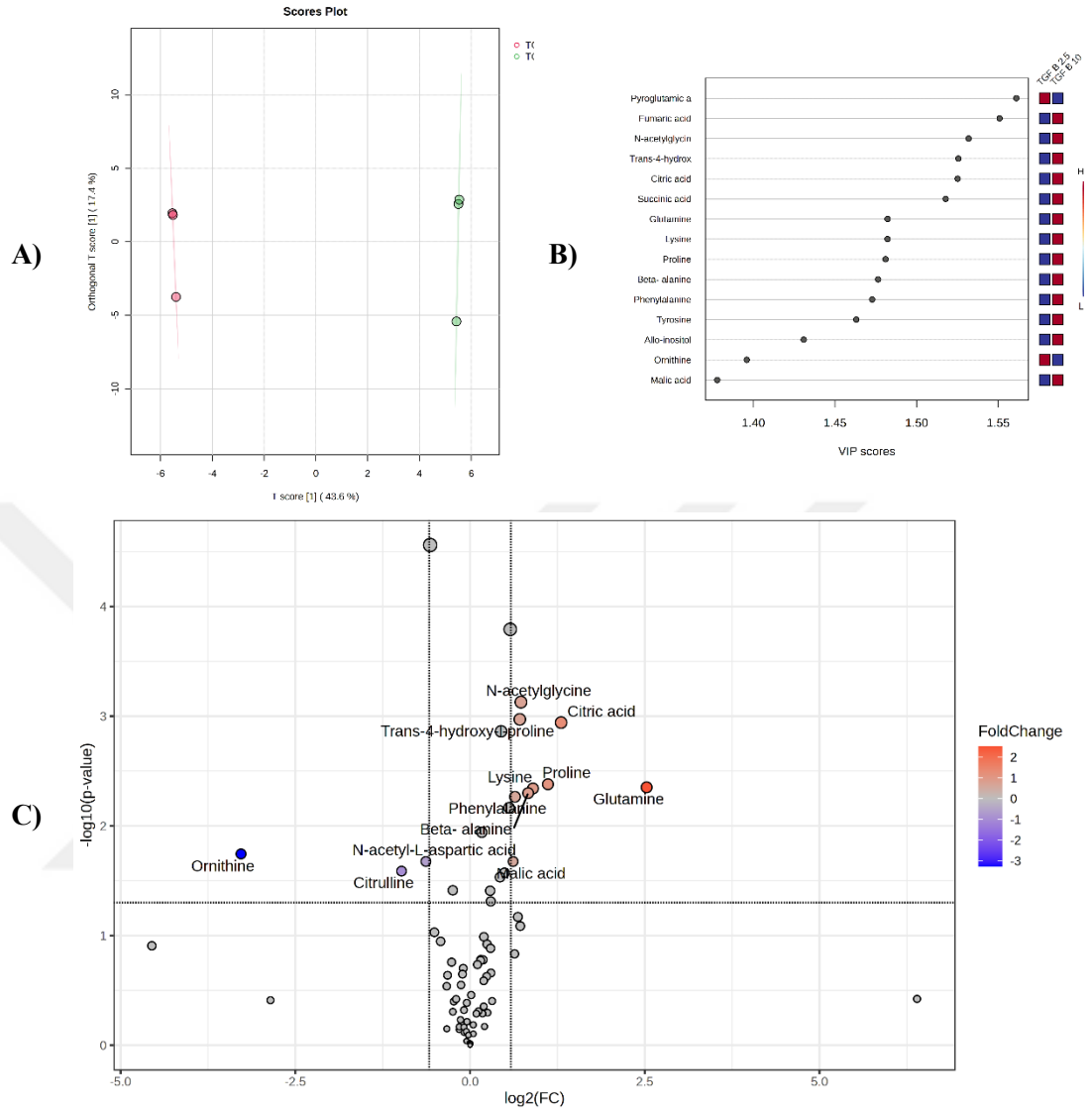
Şekil 4.28’de 24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volkan analizinde ise 24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyasla Pipekolik Asit, PEA ve Fruktoz seviyelerinin arttığı; Ornitin, Sitrulin, Glutamin ve Lizin seviyelerinin ise azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.29: 24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

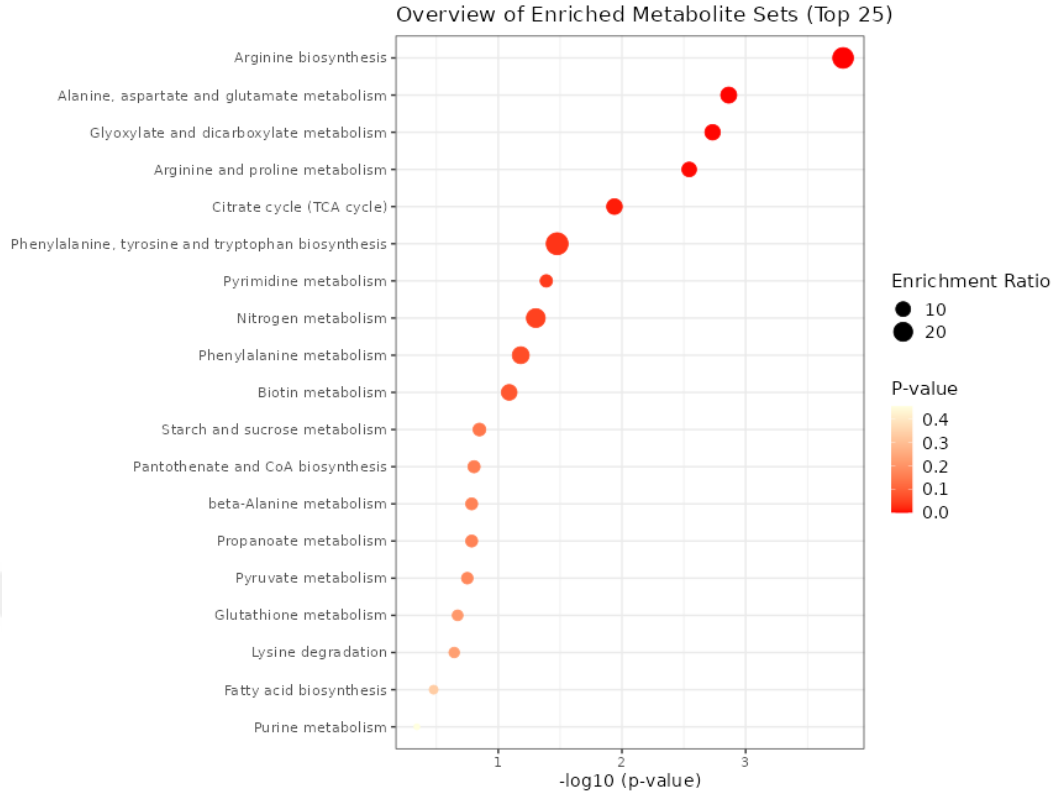
Şekil 4.29'daki zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin arginin biyosentezinde, nitrojen metabolizmasında ve Fenilalanin metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir.

TGF- β 1 10 ng/mL / TGF- β 1 2,5 ng/mL



Şekil 4.30: 24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.

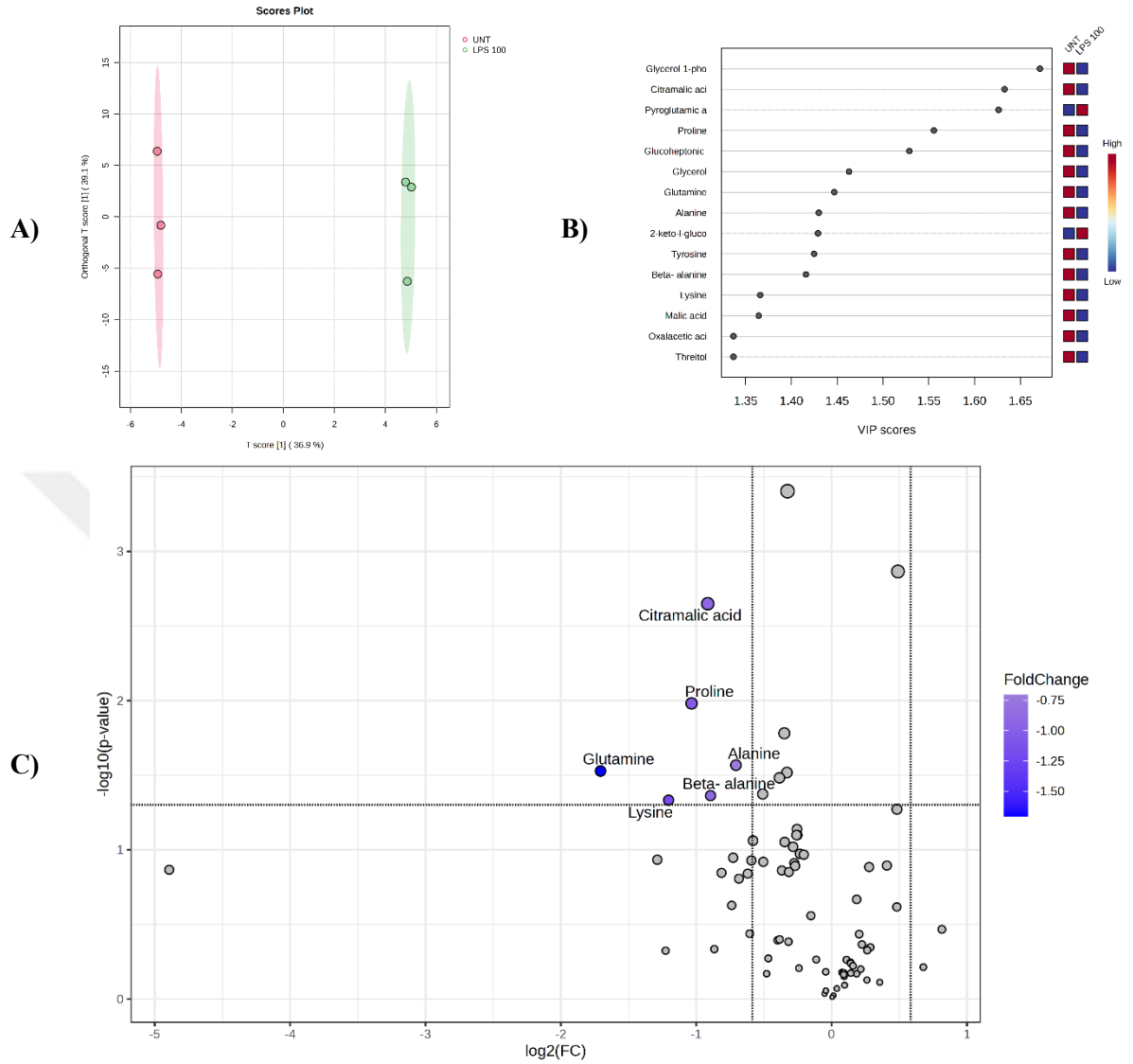
Şekil 4.30’da 24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamlarla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volkan analizinde ise 24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla Glutamin, β -alanin, Sitrik Asit, Prolin, Fenilalanin seviyelerinin arttığı; Ornitin, Sitrulin ve N-Asetil-L-Aspartat seviyelerinin ise azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.31: 24 saat boyunca TGF- β 1 10 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

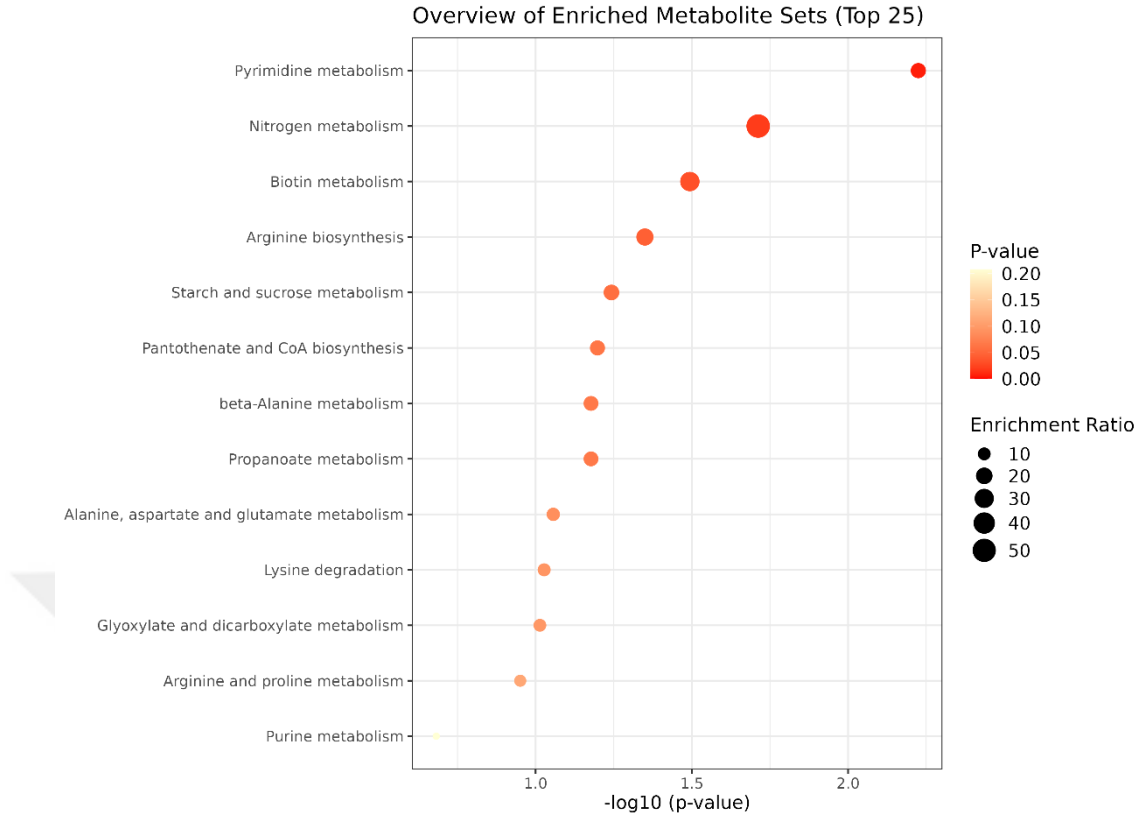
Şekil 4.31'deki zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin arginin biyosentezinde, Alanin/Aspartat/Glutamat metabolizmasında ve Glioksilat/dikarboksilat metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir.

LPS 100 ng/mL /KONTROL



Şekil 4.32: 24 saat boyunca LPS 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol grubu hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.

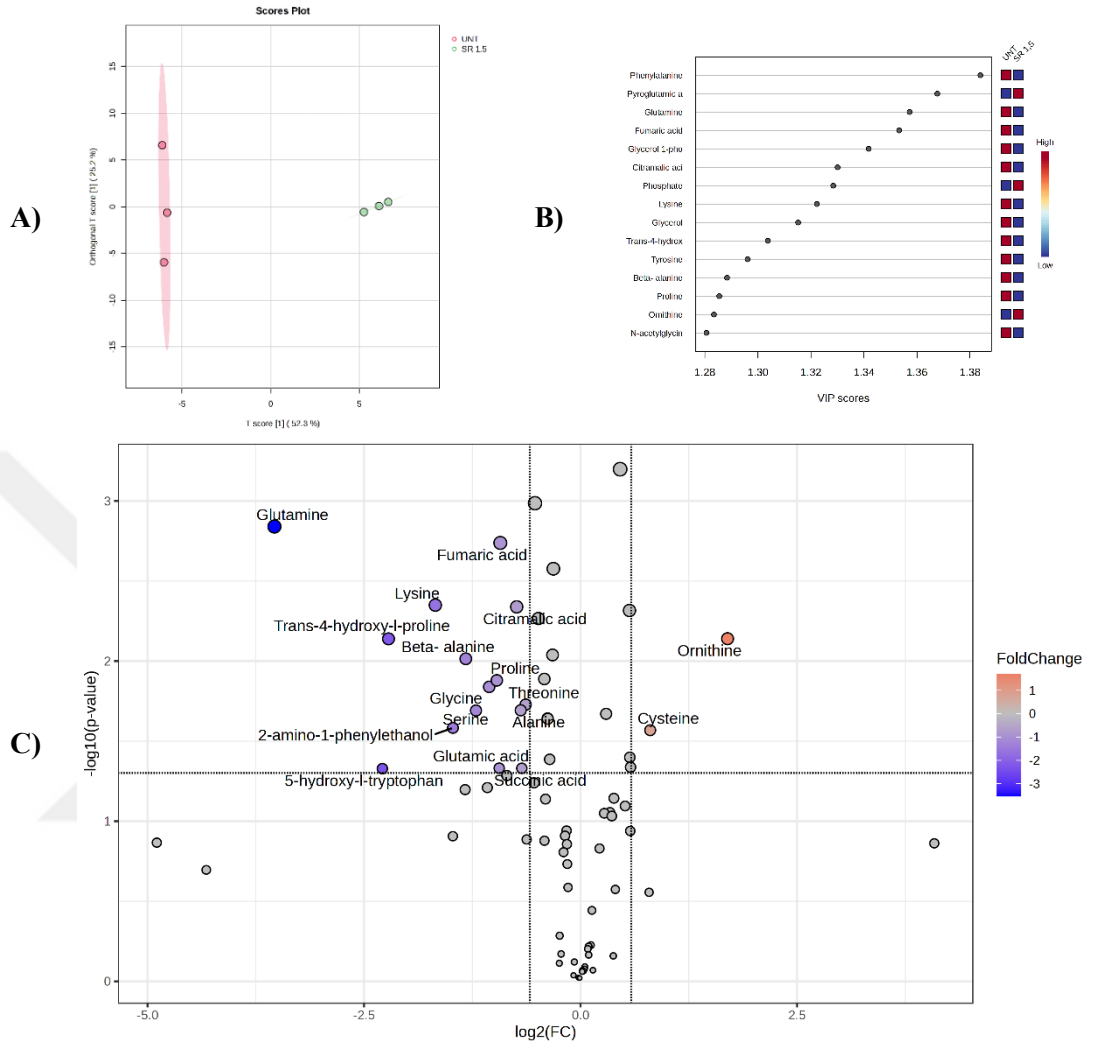
Şekil 4.32’de 24 saat boyunca LPS 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla karşılaştırıldığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volkan analizinde ise 24 saat boyunca LPS 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyasla Glutamin, Lizin, Alanin, β -alanin, Prolin seviyelerinin azaldığı; artan metabolitin olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.33: 24 saat boyunca LPS 100 ng/mL dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

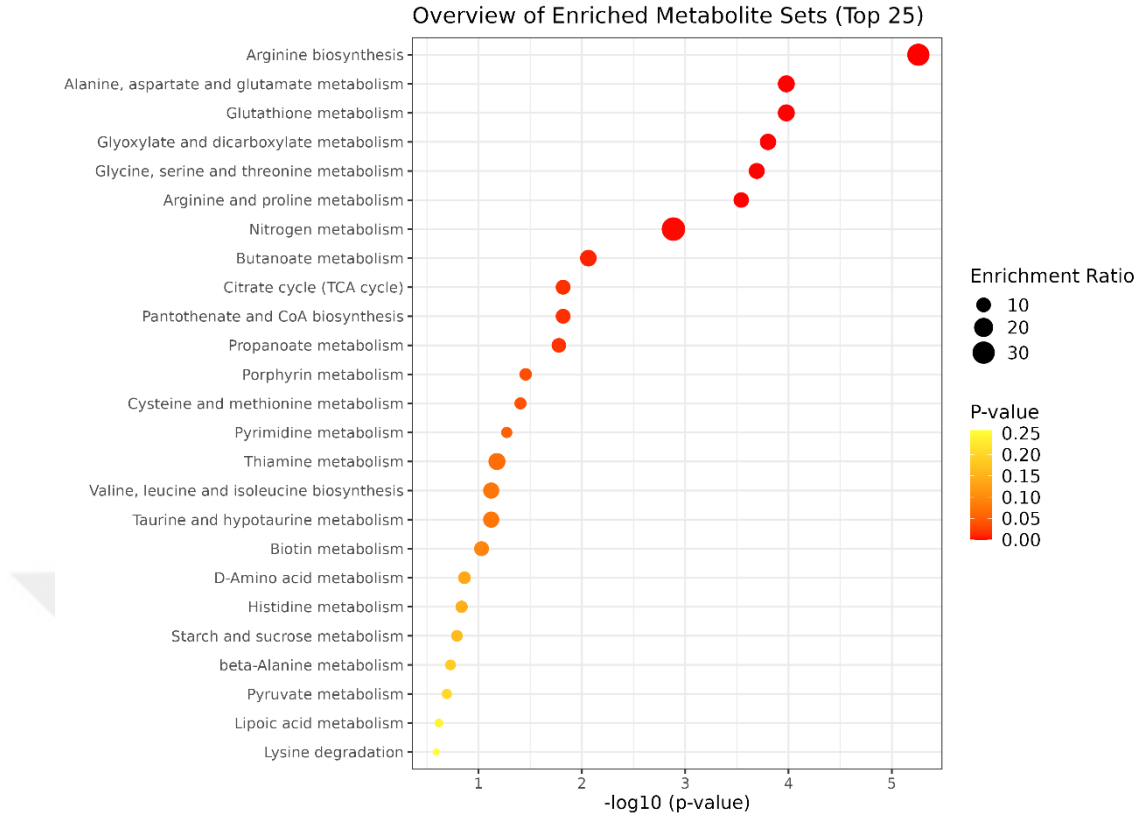
Şekil 4.33'teki zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin Primidin metabolizmasında, Nitrojen metabolizmasında ve Biotin metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir.

SR1 1,5 μ M /KONTROL



Şekil 4.34: 24 saat boyunca SR1 1,5 μ M dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol grubu hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.

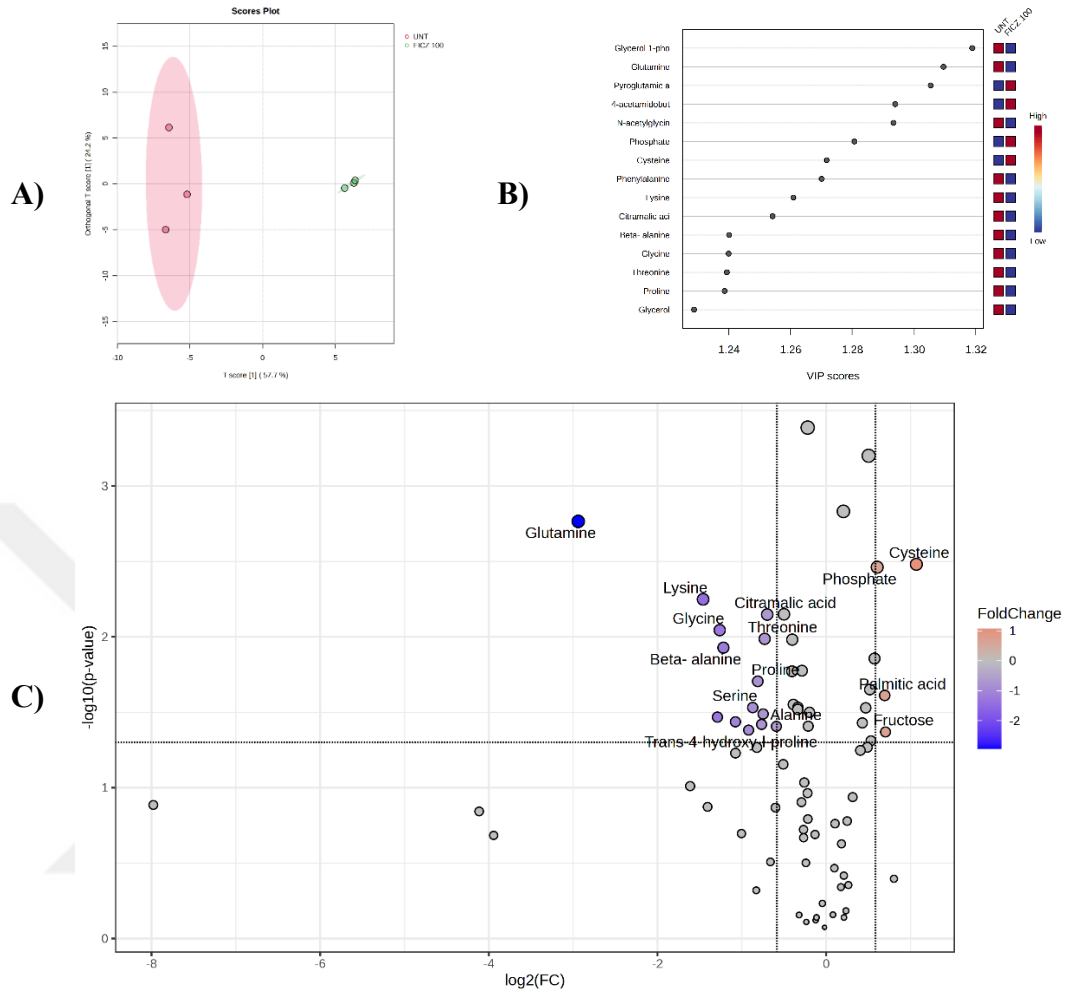
Şekil 4.34'te 24 saat boyunca SR1 1,5 μ M dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volkan analizinde ise 24 saat boyunca SR1 1,5 μ M dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyasla Ornitin ve Sistein seviyelerinin arttığı; Glutamin, Fumarat, Glisin, Alanin, Prolin, Glutamat ve Serin seviyelerinin ise düştüğü görülmektedir.



Şekil 4.35: 24 saat boyunca SR1 1,5 μ M dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

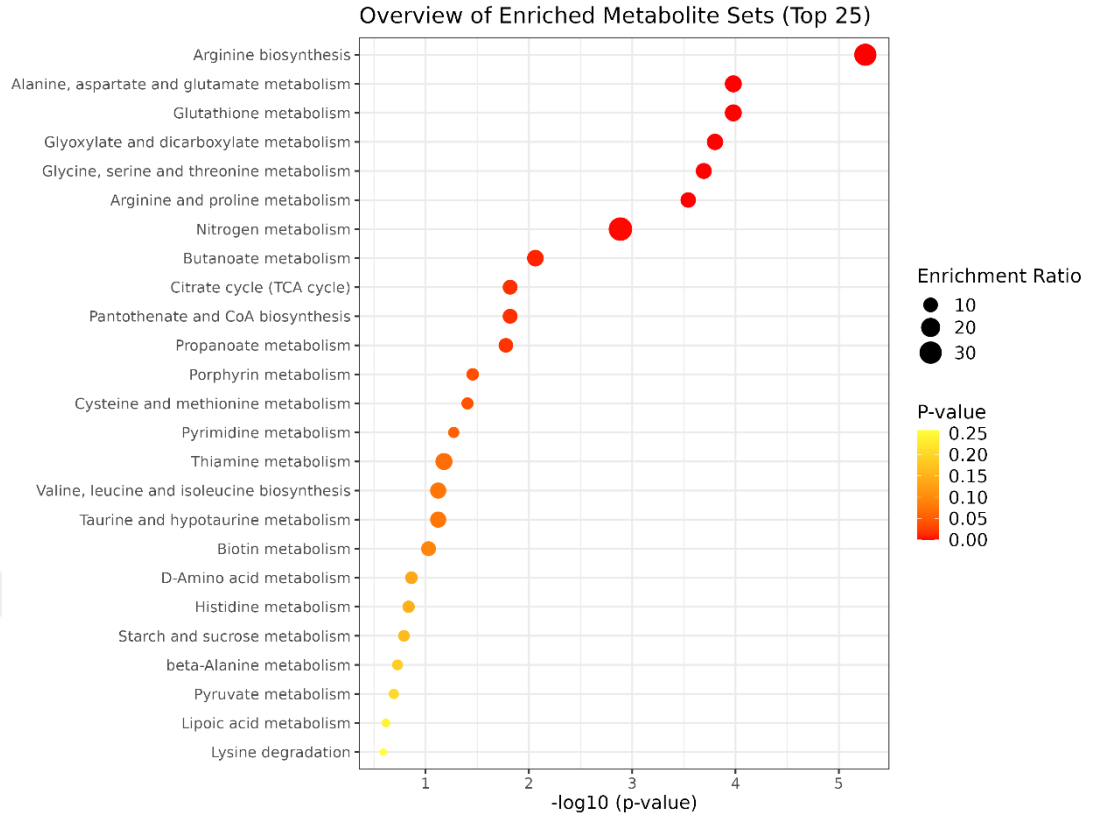
Şekil 4.35'teki zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin Alanin/Aspartat/Glutamat metabolizmasında, Arginin biyosentezinde ve Glutatyon metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir.

FICZ 100 nM /KONTROL



Şekil 4.36: 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol grubu hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volcan Plot karşılaştırmaları.

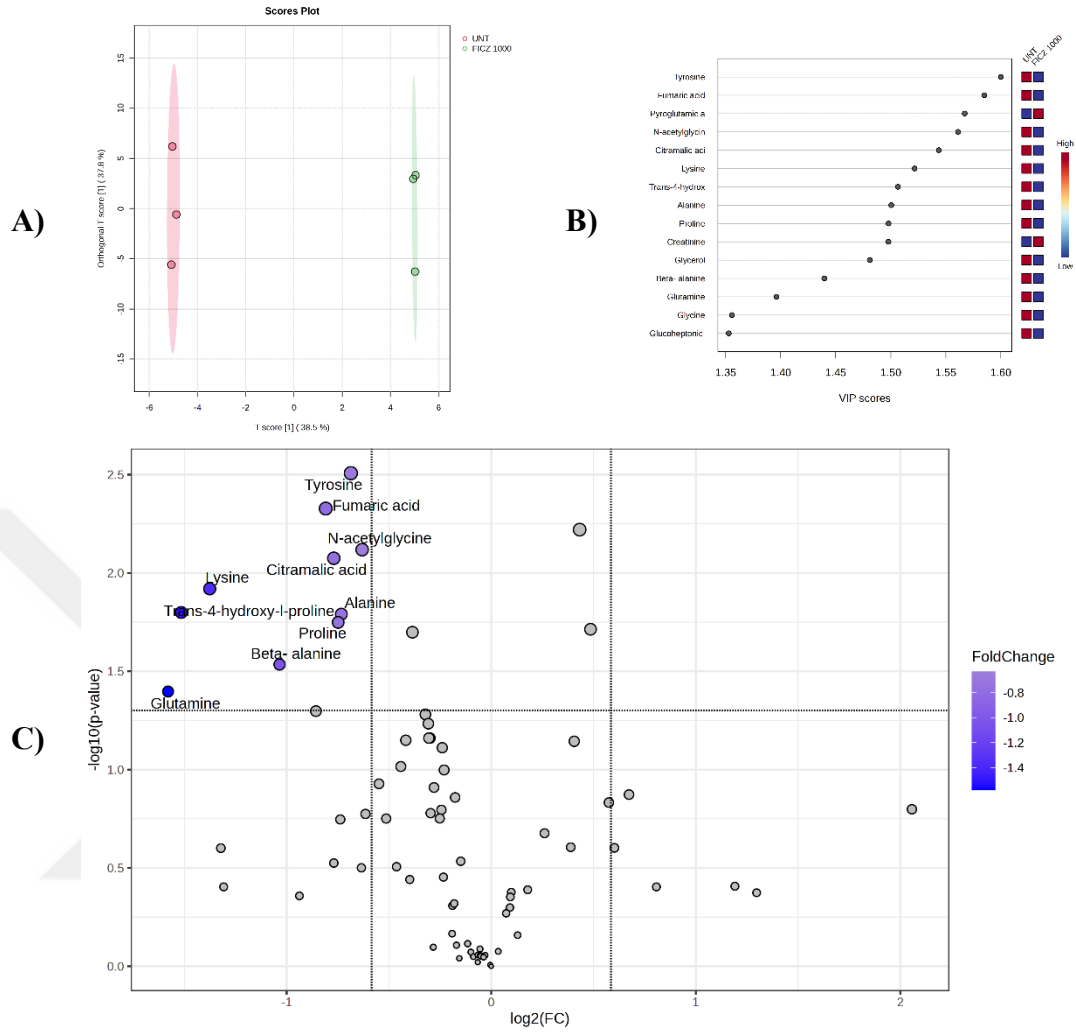
Şekil 4.36'da 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volcan analizinde ise 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyasla Sistein, Fosfat, Palmitik asit, Fruktoz seviyelerinin arttığı; Glutamin, Glisin, Lizin, β -alanin, Prolin seviyelerinin ise düştüğü görülmektedir.



Şekil 4.37: 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

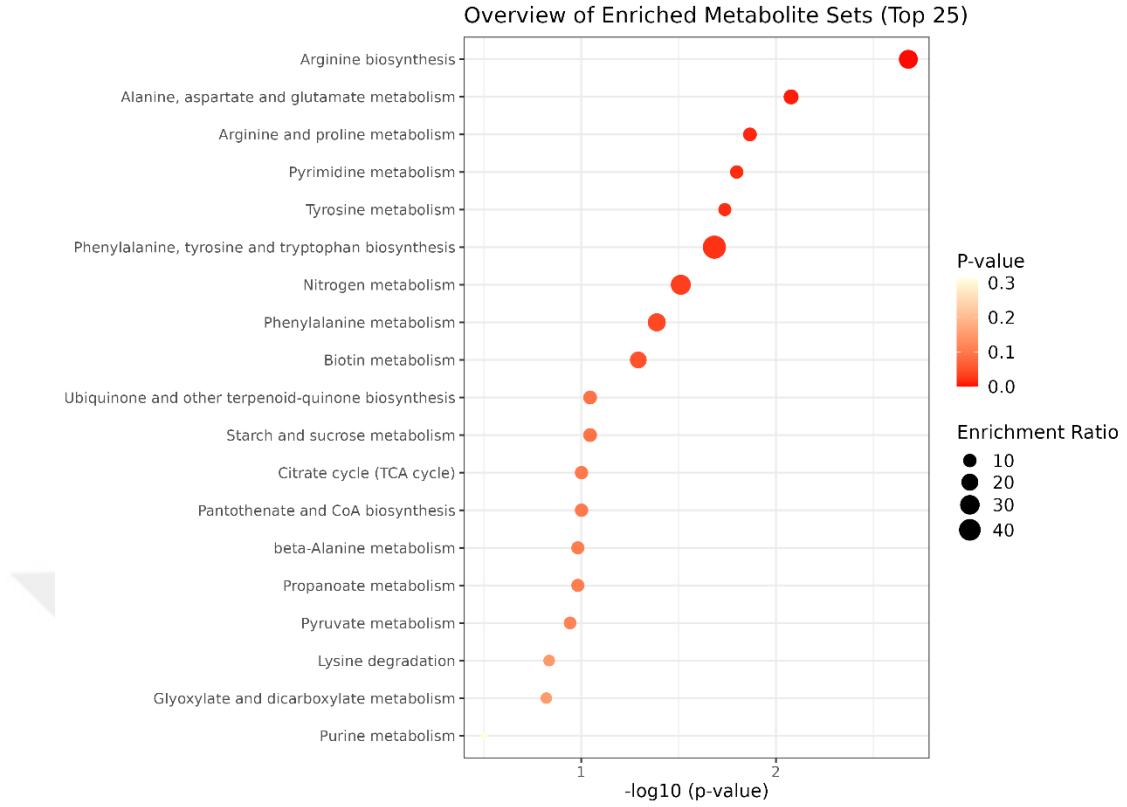
Şekil 4.37'deki zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin Alanin/Aspartat/Glutamat metabolizmasında, Arginin biyosentezinde ve Glutatyon metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir.

FICZ 1000 nM /KONTROL



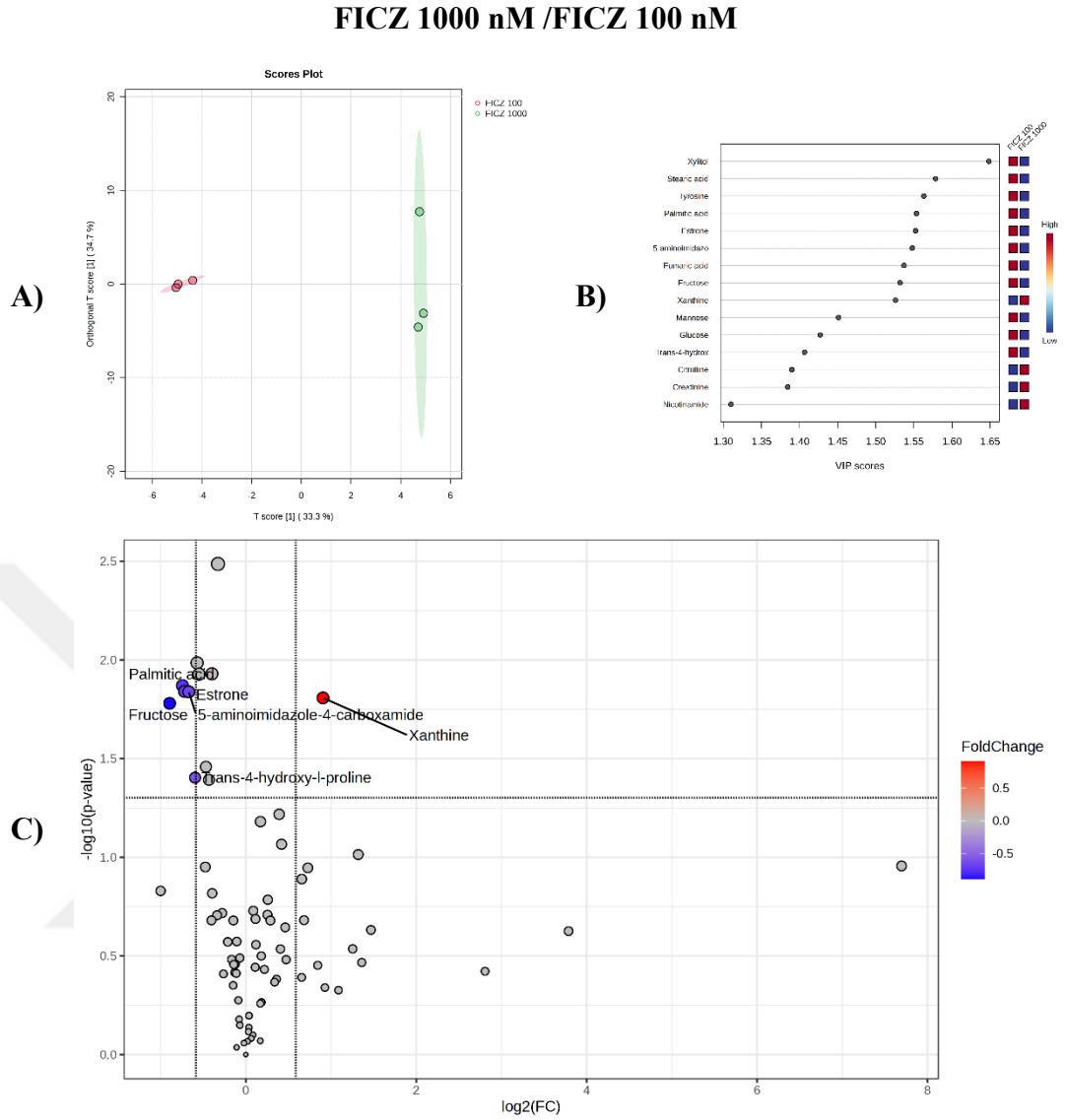
Şekil 4.38: 24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol grubu hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volcan Plot karşılaştırmaları.

Şekil 4.38’de 24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volcan analizinde ise 24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamıyla kıyasla Glutamin, Fumarat, Lizin, β -alanin, Alanin ve Prolin seviyelerinin ise düştüğü görülmektedir. Metabolitler arasında anlamlı olarak artan bir farklılık bulunmamaktadır.



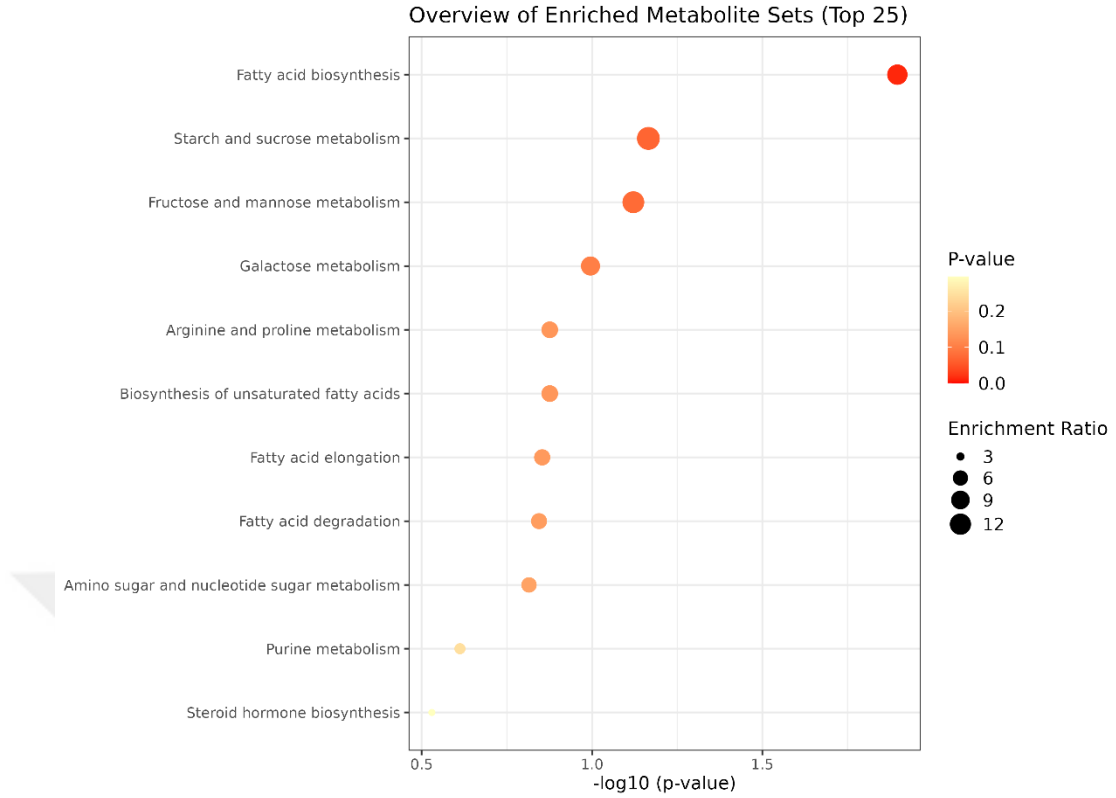
Şekil 4.39: 24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, kontrol hücrelerinin ortamına kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

Şekil 4.39'daki zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin Alanin/Aspartat/Glutamat metabolizmasında, Arginin biyosentezinde ve Arginin/Prolin metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir



Şekil 4.40: 24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla ile PLS-DA A) Skor Plot, B) VIP Plot ve C) Volkan Plot karşılaştırmaları.

Şekil 4.40'ta 24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerin ortamıyla kıyaslandığında Skor Plot analizinde farklı gruplandığı görülmektedir. Ek olarak Volkan analizinde ise 24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerin ortamına kıyasla Ksantin seviyelerinin arttığı; Fruktoz, Palmitik Asit ve Östron seviyelerinin ise düştüğü görülmektedir.



Şekil 4.41: 24 saat boyunca FICZ 1000 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortamın, 24 saat boyunca FICZ 100 nM dozu uygulanan hücrelerinin bulunduğu ortama kıyasla metabolit farklılıklarının zenginleştirilmiş seti.

Şekil 4.41'deki zenginleştirilmiş sete göre ise anlamlı değişikliği olan metabolitlerin Yağ Asidi biyosentezinde, Sükroz metabolizmasında ve Fruktoz metabolizmasında rol oynadığı görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, in-vitro kültür ortamında insan astrositlerinin stres uyaranlarına verdiği biyolojik cevap araştırılmıştır. Nörodejeneratif hastalıklar sadece nöronlarda değil nöronal mikroçevrede de değişim ve disfonksiyona neden olmaktadır. Mikroçevrenin temel elemanlarından olan astrositler SSS'nin en yaygın hücre tipidir, beyin sağlığının korunması ve fonksiyonlarının yürütülmesi, nöronların büyümesi, hayatta kalması, sinaptik ileti ve onarım, beyin enerji metabolizmasının sağlanması, sürdürülmesi, kan beyin bariyerinin korunması, oksidatif hasarın önlenmesi, nöroinflamasyon ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde temel role sahip hücrelerdir (7, 9). Ancak patolojik durumlarda (nörodejeneratif hastalıklar veya diğer SSS hasarlarında) astrositler değişime uğrayarak nörotoksik/pro-inflamatuvar fenotip (A1) kazanabilmekte, reaktif astrogliazis denilen yapısal lezyonlara yol açarak nöron sağlığını negatif yönde etkilemektedirler (7, 9, 56). Bu nedenle, nörodejenerasyona sebep olan bozuklukların patogenezinin anlaşılması, olumlu, olumsuz uyaranların ortaya çıkarılarak beyin fonksiyonlarının iyileştirilmesi için astrosit biyolojisinin detaylarıyla ortaya konması önemlidir. Bu çalışmada inflamatuvar uyaranlar yanında, çevresel etkenler/kirleticiler/zenobiyotiklerin SSS üzerine olumsuz etkileri göz önünde bulundurularak zenobiyotik/dioksin reseptörü olan AHR agonist ve antagonist ligandlarının da insan astrositleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Astrositler, nöronlar, mikroglialar ve diğer mikroçevre komponentleri ile yakın interaksiyon “*cross-talk*” halindedir, nöron hücreleri ile sürekli döngü halinde bir nörotransmitter geçişi bulunmaktadır. Nöronal iletim fonksiyonunun yürütülmesinde kritik olan nörotransmitter (glutamat/GABA/glutamin) döngüsü de astrosit metabolizması ile düzenlenmektedir. Bu özelliklerinden yola çıkılarak bu çalışmada, gen ifadelerine ek olarak 24 saat farklı uyaranlara maruz bırakılan astrositlerdeki metabolomik değişimler de incelenmiş, nöron yaşamına olumsuz etki yapabilecek koşullar ortaya konmaya çalışılmıştır. Güncel çalışmalar, nörodejeneratif hastalığa sahip bireylerden geliştirilmiş astrositlerin sekretomunun bile sağlıklı nöronların yaşamını olumsuz etkilediğini göstermiş ve nöronal patolojilerin gelişiminde astrositlerin başlatıcı/devam ettirici role sahip olabileceklerini göstermiştir (59, 68).

Bu bulgular da beyin sağlığının korunmasında astrositlerin daha önce bilinenden daha kritik önemini gündeme taşımıştır.

Literatürde birçok kaynakta astrositlerin çevre koşullarına bağlı olarak bazal A0 durumundan nörotoksik/inflamatuvar/A1 ve nöroprotektif/nöroregülatör/ A2 fenotipine döndükleri bildirilmekte, bazı kaynaklarda ise yıldızsı çıkıntılar, ince, uzun hücre uzantıları ile karakterize reaktif astrosit olarak adlandırılmaktadır. Bu tez çalışmasında astrositleri A1 ve A2 fenotipine yönlendirmek üzere sırayla, inflamatuvar uyaranlar (TNF- α , LPS) ve TGF- β 1 kullanılmış, ayrıca AhR agonist ligandı FICZ, antagonist ligandı SR-1 uyarımları yapılmıştır. Moleküler yanıtlarının ortaya konması amacıyla literatürde in-vitro ve in-vivo deneysel çalışmalarda A1 ve A2 astrositlerde tespit edilen gen ifadeleri göz önüne alınmıştır. Astrositlerle ilgili çalışmaların büyük çoğunluğu hayvan deneyleridir. Primer insan astrositleri ile çalışmalar sınırlıdır, otopsi bulgularında reaktif astrositlerin oluşturduğu astroglizis patolojisi tanımlanmıştır. Son yıllarda nörodejeneratif hastalıklara sahip bireylerden geliştirilmiş uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH-induced pluripotent stem cells/iPSC) teknolojilerinin geliştirilerek bu hücrelerin astrosit yönünde farklılaştırma yöntemlerinin oluşturulmuş olması astrositlerin nöron sağlığına direkt etkilerini ortaya koymuştur. Bu çalışmamızda, astrositlerin stres cevabının değerlendirilmesi amacıyla hücrelerdeki morfolojik değişimler, proliferasyon özellikleri, seçilen genlerin ifade analizleri ve hücre kültür ortamındaki metabolik değişimler incelenmiştir. İlgili tez çalışmasında, literatür araştırması sonucunda belirli bir doz aralığı seçilerek, sitotoksisite analizi gerçekleştirilmiştir. Bu doz çalışmasında, TNF- α dozları arttıkça hücre canlılığının azaldığı; TGF- β 1 artan dozlarının %100-%120 arası değiştirdiğini; SR1 dozlarının canlılığı %80-%100 arası değiştirdiğini ve FICZ dozlarının canlılığı değiştirmediği görölmüştür (Bkz. Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). WST-1 analizini takiben seçilen doz değerleri, 24 saat astrosit hücrelerine uygulandıktan sonra morfolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Ancak, koşullandırma sonucunda, hücre morfolojisinde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Astrositlerin fenotipik değişimleri ortamın koşullarına, başta aktif mikroglialar olmak üzere hücre-hücre, hücre-matriks ilişkilerine bağlıdır (56). Bu nedenle hücre kültüründe in-vivo ortamda gözlenen değişimler tam olarak ortaya çıkmamaktadır

J. Zamanian, S. Liddlelow ve ark. nın çalışmalarından yola çıkarak seçmiş olduğumuz A1 spesifik (VIM, GFAP, SRGN, FBLN5, FKBP5, S100B), A2 spesifik (S100A10, STAT3) genlere ek olarak A1, A2 ve AhR ile ilişkili olan AhR, CYP1A1, CYP1B1 (AHR tarafından düzenlenen, ilaç, yağ ve steroid metabolizmasında görev alan genler) ve diğer gen ifadeleri de araştırılmıştır. Bunlar arasında inflamasyon ilişkili IL-6, IL-8, PDL-1 (akut ve/veya kronik inflamasyonla ifadesi artar), BDNF (astrozitler tarafından BDNF salınımının nöron sağkalımını ve fonksiyonlarında iyileşmeyi artırır (69-71)), COL1A1 (Herhangi bir hasar durumunda *scar-forming* astrosit oluşturmada görev olan önemli bir ECM elemanı (72)), IL-10 (anti-inflamatuar yanıt oluşturan bir sitokin) yer almaktadır. Kontrol gruplarına göre gen ifade değişimleri ve ısı haritası incelendiğinde A1-ilişkili uyaranlarda inflamasyon belirteci olarak seçtiğimiz IL-6 ve IL-8 gen ifadelerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin yükseklik olduğu görülmektedir.

Yine inflamasyon belirteci olarak eklenen PDL-1’da TNF- α grubunda anlamlı bir değişiklik görülmezken; LPS 100 ng/mL dozunda 15 katlık istatistiksel anlamlı bir artış görülmüştür. A1-ilişkili genler olarak bildirilmiş olan SRGN seviyelerinde TNF- α ve LPS grubunda anlamlı artışlar görülürken; FKBP5 genlerinde ise KONTROL grubuna kıyasla anlamlı bir değişim görülmemiştir. Bazı A1 genlerinin ifadelerinin literatürdekilerle çelişkili olarak azaldığı bulunmuştur. Seçilen A2 genlerinde kontrol grubuna kıyasla, artan TNF- α dozlarında ve LPS dozunda anlamlı azalma görülmektedir. AhR geninde ise TNF- α grubunda anlamlı görülmezken LPS dozunda AHR ifadelerinin arttığı görülmüştür. A2-ilişkili uyaranlarda ise TGF- β 1 2,5 ng/mL dozunda, PDL-1 seviyelerinde hem kontrol hem de TGF- β 1 10 ng/mL dozuna kıyasla anlamlı bir artış görülmektedir. A1-ilişkili genlerde artan TGF- β 1 dozlarında azalan ifadeler göze çarpmaktadır. Ancak A2-ilişkili genlerde de benzer azalma görülmesi beklenmedik bir gelişmedir. AhR-ilişkili genler olarak seçtiğimiz CYP1A1 ve CYP1B1 seviyelerinde anlamlı bir düşüş görülmekte iken AHR ifadesi değişmemiştir.

Tablo 5.1: Bölüm 4.3'teki RT-qPCR PCR sonuçlarının özetlendiği, genlerin kontrol grubuna kıyasla ifade değişimlerinin ısı haritası.

		A1-ilişkili genler									A2-ilişkili genler					AHR-ilişkili genler		
		VIM	GFAP	SRGN	IL-6	PDL-1	IL-8	FBLN5	FKBP5	S100B	BDNF	S100A10	STAT3	COL1A1	IL-10	CYP11A1	CYP11B1	AHR
A1-ilişkili uyarılar	TNF- α 10 ng/ml	0.66	0.73	1.53	10.48	2.15	37.85	0.45	0.96	0.45	0.44	1.32	0.70	0.51	0.65	0.70	0.26	0.88
	TNF- α 100 ng/ml	0.84	0.83	1.67	18.46	0.94	94.67	0.39	1.22	0.63	0.38	0.67	0.94	0.58	0.65	0.63	0.25	1.04
	LPS 100 ng/ml	0.52	0.46	1.76	8.19	15.04	15.85	1.16	1.37	1.61	1.06	0.68	1.05	0.64	0.51	0.51	0.59	1.75
A2-ilişkili uyarılar	TGF- β 1 2.5 ng/ml	0.49	1.07	0.55	0.90	7.70	1.02	1.19	1.27	0.50	0.68	1.09	0.71	0.68	1.22	0.58	0.54	0.96
	TGF- β 1 10 ng/ml	0.98	0.38	0.52	0.39	0.48	0.58	1.02	0.43	1.41	0.33	0.63	0.55	1.18	0.40	0.46	0.63	0.97
AHR-ilişkili uyarılar	FICZ 100 nM	1.08	0.32	0.38	1.30	9.32	0.81	0.41	1.11	0.39	0.89	0.45	0.99	0.82	0.38	0.43	3.17	1.17
	FICZ 1000 nM	0.84	0.21	0.43	1.00	5.06	0.57	0.29	0.91	0.23	0.73	0.36	0.88	0.69	0.19	0.27	3.08	0.75
	SR1 1.5 μ M	0.82	0.44	1.04	0.70	6.19	0.60	1.17	1.57	0.36	1.06	0.71	0.96	0.86	0.40	0.67	0.30	1.29
A1-ilişkili genler, A2-ilişkili genler ve AHR-ilişkili genler aynı dorecelendirilmiştir.*																		

A1-ilişkili genler, A2-ilişkili genler ve AHR-ilişkili genler aynı dizelemlenmiştir.*

“Stres uyarıları ile 24 saat uyarılan astrositlerin ve hiçbir stres faktörü tarafından uyarılmamış (kontrol grubu) hücrelerin ACTB Ct değerleri RT-qPCR ile ölçülmüştür. Ardından yine RT-qPCR yöntemi ile yukarıda gösterilen genlerin Ct değerleri ölçülüp Excel’e (Microsoft Office) toplanmıştır. İlk olarak kontrol grubunda yukarıdaki genlerin Ctsi, ACTB Ctsinden çıkarılarak her bir gen için Δ CT değeri hesaplanmıştır. Ardından stres faktörü uyarılan astrositlerde de aynı işlem tekrarlanmıştır. Daha sonra kontrol grubu hücrelerinin Δ CT değeri, stres faktörü ile uyarılmış astrositlerdeki Δ CT değerinden çıkarılarak her bir gen için $\Delta\Delta$ CT değeri hesaplanmıştır. Kontrol grubu için $\Delta\Delta$ CT hesaplaması gen Ctlerinden Δ CT değerinin çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Sonra yine her bir gen için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri hesaplanarak kontrol grubu hücrelerinin gen ifadelerine kıyasla ($\cong 1$) stres faktörüyle uyarılmış astrositlerin gen ifade değişimleri (FC) bulunmuştur. Ardından FC değerleri Excel’de (Microsoft Office) tablo haline getirilmiş ve A1-ilişkili genlerin farklı uyarılardaki ifadeleri kendi aralarında; A2-ilişkili genlerin farklı uyarılardaki ifadeleri kendi aralarında; AHR-ilişkili genlerin farklı uyarılardaki ifadeleri kendi aralarında, kırmızı tonları artan, mavi tonları azalan, beyaz ise $\cong 1$ kat değişim olacak şekilde ısı haritaları oluşturulmuştur.”

Bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde astrosit davranışlarının çok heterojen olduğu ortaya çıkmış, ayrıca insan ve hayvan astrosit biyolojisindeki farklılıklar ve in-vitro ortamda hücrel ilişkilerin olmadığı düşünüldüğünde insan astrositlerinin stres cevabının değerlendirilmesinde A1 ve A2 gibi sınıflamanın yetersiz kaldığı düşünülmüştür. Literatürdeki A1 ve A2 astrosit fenotipleri ağırlıklı olarak hayvan deney sonuçlarına dayanmaktadır (9, 56, 57). Bu çalışmalarda da A1/inflamatuvar fenotipe ait belirteçler daha net olarak ortaya konmuş olmasına rağmen nöroprotektif A2 fenotipi ile ilgili daha az, bazen çelişkili veriler dikkati çekmektedir (56, 57, 73). İnsan astrositleri ile yapılan bu çalışmamızın sonuçları,

literatürde bildirilen gen ifade analizleri ile astrositlerin net olarak A1 veya A2 diye sınıflandırılmasını desteklememiştir. Bu sonuçlarla uyumlu olacak şekilde literatürde de astrositleri basitçe A1/A2 fenotiplerine ayırmakla birçok SSS patolojisinde reaktif astrositler tarafından ortaya çıkarılan çok farklı fenotiplerin gözden kaçacağı tartışılmakta, ancak genel anlamda A1 polarizasyonunun nörotoksisite, A2'nin de koruyucu yönde olduğu kabul görmektedir (74).

AhR-ilişkili uyaranlar değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla azalan A1-ilişkili genler olan GFAP, SRGN, FBLN5, S100B'deki düşüşün yanı sıra A2-ilişkili genler olan S100A10 (SR1 uyaranında anlamlı değil) ve IL-10 ifadelerinde de istatistiksel anlamlı bir düşüş görülmüştür. AhR-ilişkili genlerde ise FICZ dozlarında anlamlı bir şekilde azalan CYP1A1; anlamlı bir şekilde artan CYP1B1 ifadeleri görülmekte iken SR1 dozunda ise hem CYP1A1 ifadelerinde hem de CYP1B1 ifadesinde hem kontrol hem de FICZ dozlarına kıyasla anlamlı bir düşüş göze çarpmaktadır. AHR ifadelerinde hem FICZ1000 dozunda FICZ 100 ve SR1 dozlarına kıyasla düşüş göze çarpmaktayken FICZ 100 ve SR1 dozlarında KONTROL grubuna kıyasla anlamlı ifade değişimi görülmemektedir. AhR, ilk olarak zenobiyotik reseptörü olarak tanımlanmış olsa da hem endojen hem eksojen kökenli birçok ligand ile aktive edilebilen bir transkripsiyon faktörüdür ve vücutta birçok sistemde homeostazın sağlanmasında düzenleyici role sahiptir. Bu düzenleyici rolleri ve ortamdaki değişen koşullara bağlı olarak AhR ve ilişkili moleküller zaman ve ortama bağlı olarak son derece dinamik düzenleme sağlamaktadır. Literatürde AhR agonist ve antagonist uyarımlarının deneysel koşullara bağlı olarak büyük değişimler gösterdiği bildirilmektedir. AhR'nin farklı agonist veya antagonist ligandları ile uyarımı sonucu sitokrom p450 ailesi (CYP) uyarılarak ilaç ve diğer molekülleri metabolize eden enzimlerin aktivitesi düzenlenir. CYP 1A1, CYP1A2 ve CYP1B1 ve diğer hedef genler aktive olur. Aşırı aktivasyonun önlenmesi için de hızla represör (AHRR) ve ilgili mekanizmalar devreye girer (75, 76). Bu çalışmada astrositlerin FICZ ile agonistlik uyarımının 24 saat sonunda CYP1B1 artışına, antagonist SR-1 ile uyarımı ise CYP1B1 da azalmaya yol açmış olması bu deneysel sistemde AhR sinyalizasyonunda CYP1B1'in rolüne işaret etmektedir (Bkz. Şekil 4.19). 24 saat sonunda AhR ifadesinde değişiklik gözlenmemesi ise CYP uyarımı sonrası represör molekül olan AHRR'nin devreye girerek AhR'yi baskıladığını düşündürmüştür.

Bu çalışmada TNF- α ve LPS uyarımı ile inflamasyonun tetiklendiği görülmüş, ancak literatürde sözü edilen A1-ilişkili genlerin bir kısmında beklenen yükselme gözlenmemiş veya düşüş görülmüştür. Bu durumun, uyarıların dozları ve/veya uygulama süreleri ile ilişkili olabileceği, ayrıca insan-hayvan, in-vitro, in-vivo farklı deneysel metodolojiler ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. TGF- β 1 uygulamalarında ise IL-6 ve IL-8'den bağımsız olarak, 2,5 ng/mL dozda artan PDL-1 ifadesinin 10 ng/mL dozunda hem 2,5 ng/mL hem de kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan artan TGF- β 1 dozları ile birlikte astrosit aktivasyonu (A1) ile arttığı bildirilen GFAP ve SRGN ifadelerinde azalma gözlenmiş, buna karşın A2-ilişkili gen olarak seçtiğimiz BDNF ve STAT3 seviyelerinde artan TGF- β 1 dozları ile beklenen aksine koordineli azalma gözlenmiş, uygulanan dozların ve/veya uygulama süresinin birçok kaynaktan sözü edilen "A2 astrositlerine" döndürmekte yetersiz kalmış olabileceğini düşündürmüştür. Literatüre ek olarak uyguladığımız AhR antagonisti SR1 ve AhR agonisti FICZ dozlarındaki değişimlere baktığımızda ortak olarak, normalde reaktif astrosit belirteci olan GFAP ve S100B ifadelerinde düşüş, IL-6 ve IL-8'den bağımsız olarak artan PDL-1 seviyeleri ve tam tersi düşen IL-10 seviyeleri göze çarpmaktadır. Ayrıca artan FICZ dozlarında ifadesi azalan A1 astrosit belirteci FBLN5 seviyelerine ek olarak A2 astrosit belirteci S100A10 ifadelerinin de azalması FICZ ile uyarılan astrositlerin ne A1 ne A2 fenotipine gittiğini, astrositleri ara bir faza yönlendiriyor olabileceğini düşündürmüştür. Diğer taraftan literatürde farklı hücrelerle yapılan çalışmalarda AhR 'nin agonistik ve antagonistik ligandlarla uyarımlarına ilişkin veriler, hücre tipine, hayvan-insan veya farklı hayvan türlerine, uyarı dozuna, uygulama süresine ve mikroçevre ortamına göre çok büyük değişiklikler gösterdiği bilinmektedir (77). Bu nedenle, insan astrositlerinin AhR uyarımına cevabının değerlendirilmesi için çok farklı dozlar ve zamanlama ile tekrarlı deneylerin yapılması gerekmektedir. Çalışmamızda 24 saat uygulama sonrası değerlendirmeler yapılmıştır. Çevresel etkenlerin sensör reseptörü olan AhR uyarımına cevap çok hızlı ortaya çıkmakta, ilerleyen zamanda kompanse edici mekanizmalarla regülasyon sağlanmaktadır. Bu nedenle sadece 24. saat verileri ile net bir değerlendirme yapılamamaktadır.

Bu çalışmada 24 saat stres uyarımının gen ifadelerine etkileri yanında kültür ortamında yaptığı metabolik değişimler incelenmiştir. GC-MS sonuçlarının

Metaboanalyst uygulaması ile analizinde çıkan sonuçlardan istatistiksel anlamlı değişim gösterenler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 5.2: Metabolom sonuçlarının özetlendiği, dozların kontrol grubuna ve birbirine kıyasla metabolit değişimleri ve ısı haritası (AD = anlamlı değil).

	A1 Uyarıcıları (ng/mL)				A2 Uyarıcıları (ng/mL)			AHR Uyarıcıları (SR1-µM : FICZ nM)			
	TNF10	TNF100	TNF100/10	LPS100	TGF 2,5	TGF 10	TGF 10/2,5	SR1 1,5	FICZ 100	FICZ 1000	FICZ1000/100
Ornitin	10,39	11,78	AD	AD	4,74	0,49	0,10	3,24	AD	AD	AD
Feniletilamin	3,14	AD	AD	AD	AD	2,10	AD	AD	AD	AD	AD
Fosfat	1,74	1,81	AD	AD	1,61	AD	AD	AD	1,52	AD	AD
Fruktoz	AD	AD	AD	AD	1,69	1,69	AD	AD	1,63	AD	0,54
Sistein	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	1,75	2,10	AD	AD
Pipekolik Asit	AD	AD	AD	AD	AD	2,7	AD	AD	AD	AD	AD
Palmitik Asit	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	1,62	AD	AD
Trans4hidroksi-L-prolin	0,45	0,50	AD	AD	0,42	AD	1,64	0,22	0,53	0,35	0,66
Ksantin	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	1,87
2-amino 1 feniletanol	0,35	0,42	AD	AD	0,35	0,32	AD	0,36	0,41	AD	AD
Glutamin	0,07	0,06	AD	0,31	0,10	0,56	5,76	0,09	0,13	0,33	AD
Maleik A	0,50	0,47	AD	AD	0,63	AD	1,58	0,55	0,63	AD	AD
Sitramalik A	0,47	0,50	AD	0,35	0,51	0,61	AD	0,60	0,62	0,59	AD
Lizin	0,34	0,32	AD	0,43	0,33	0,61	1,87	0,31	0,36	0,39	AD
Triptofan	AD		AD	AD	0,52	0,58	AD	0,20	0,60	AD	AD
Sitruilin	AD		AD	AD	AD	0,49	0,51	AD	AD	AD	AD
Glutamik Asit	0,38	0,42	AD	AD	0,41	AD	AD	0,52	0,47	AD	AD
Alanin	AD	0,52	AD	0,61	AD	AD	AD	0,62	0,66	0,60	AD
Glisin	0,59	0,50	AD	AD	0,47	AD	AD	0,48	0,42	AD	AD
B-Alanin	0,38	0,43	AD	0,54	0,41	AD	1,78	0,40	0,43	0,49	AD
Prolin	0,28	0,42	AD	0,49	0,32	AD	2,17	0,51	0,57	0,60	AD
N-Acetilglisin	0,47	0,57	AD	AD	0,56	AD	1,66	AD	AD	0,65	AD
Homoserin	0,63	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
Fenilalanin	0,58	AD	AD	AD	0,59	AD	1,56	AD	AD	AD	AD
Leusin	AD	AD	AD	AD	0,55	AD	AD	AD	AD	0,57	AD
Fumarik Asit	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	0,53	AD	AD	AD
Treonin	AD	AD	AD	AD	0,64	AD	AD	0,64	0,60	AD	AD
Serin	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	0,43	0,55	AD	AD
Sukkinik Asit	AD	AD	AD	AD	0,56	AD	AD	0,63	0,59	AD	AD
Triosin	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	0,62	AD

“Stres uyarıcıları ile 24 saat uyarılan astrositlerin hücre kültür ortamı, hiçbir stres faktörü tarafından uyarılmamış (kontrol grubu) hücre kültür ortamı ve hücresiz hücre kültür ortamının GC-MS yöntemi ile metabolomik analizleri yapılmıştır. Metaboanalyst üzerinden Volkan Plot analizinde $FC > 1,5$; $p < 0,05$ ayarlanmış ve böylelikle stres faktörü uygulanan hücrelerin kültür ortamındaki metabolit değişimlerinin, kontrol grubu hücrelerin kültür ortamındaki metabolit değişimleri karşılaştırılmış ve anlamlı çıkan metabolitlerin seviyelerindeki değişimler yukarıdaki şekilde Excel (Microsoft Office) kullanılarak listelenmiştir. Ardından yine Excel (Microsoft Office) üzerinden artan seviyeler kırmızı, azalan seviyeler mavi, anlamlı olmayan değişimler ise beyaz olacak şekilde ısı haritası oluşturulmuştur. Ek olarak TNF- α 100/10, TGF- β 1 10/2,5, FICZ 1000/100 değerlerinde ise iki doz uygulanan faktörlerin, yüksek doz uygulanan hücrelerin kültür ortamındaki metabolit değişimleri

ile düşük doz uygulanan hücrelerin kültür ortamındaki metabolit değişimleri yine Volkan Plot analizinde karşılaştırılarak artan dozlarda metabolitlerin nasıl değiştiğinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.”

Yukarıdaki şekle bakıldığında TNF- α dozlarında, TGF- β 1 2,5 ng/mL dozunda ve SR1 1,5 μ M dozunda kontrol grubuna kıyasla ornitin seviyelerinde dikkati çeken bir artış görülmektedir. LPS ve FICZ uygulanmasında ornitin seviyeleri değişmemiş; TGF- β 1 10 ng/mL dozunda ise azalma görülmüştür. TNF- α , LPS, TGF- β 1 2,5 ng/mL dozu, SR1 ve FICZ maruziyetinin ortak olarak Trans-4-hidroksi-l-prolin, glutamin, lizin, glisin, β -alanin ve prolin seviyelerinde azalmaya yol açtığı görülmektedir. Ancak yukarıdaki değişimlerin tam tersi bir değişim TGF- β 1 10 ng/mL dozunun TGF- β 1 2,5 ng/mL dozuna kıyaslamasında görülmektedir.

Stres uyaranları uygulamadan önce hücrelerin metabolik durumunu değerlendirmek amacıyla hücre eklenmemiş kültür ortamı metabolitleri, kontrol grubu hücrelerin kültür ortamı metabolitleriyle karşılaştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.20). Stres uyaranına maruz kalmamış kontrol grubu hücrelerinden ortama alanin, prolin, n-asetilglisin, lizin, β -alanin, fumarik asit, ksiloz, triptofan ve 2-amino-1-feniletanol geçişi olduğunu görülmüştür. Astrositlerin nöronlara çeşitli şekilde destek verdiği daha önce de bahsedilmiştir (Bkz. Bölüm 2.1.2). Ortama hücrelerden salınan bu metabolitlerin enerji metabolizmasında görev alan, sinaptik taşımada rolü olan ve nöronal aktiviteye destek veren metabolitler olduğu görülmektedir. Ancak bu metabolik aktivitenin, ortamda bir nöron hücre varlığında ne yönde değişeceği de ek olarak araştırılması gereken bir noktadır.

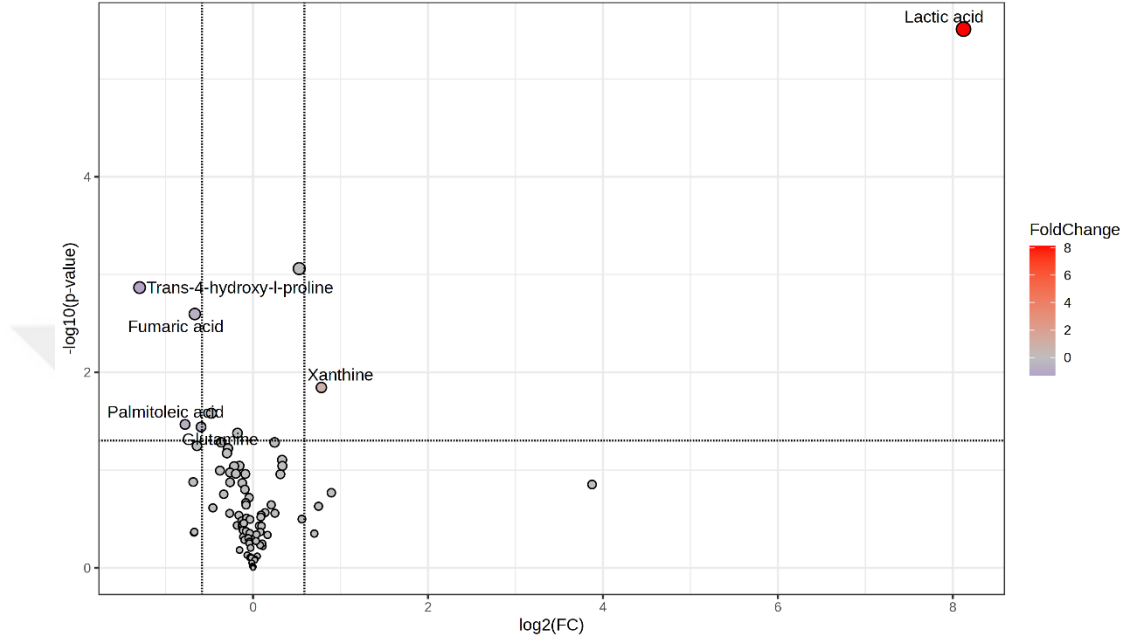
glutamat ve glutamin seviyelerindeki düşüş ornitin glutamata dönüşmediğini işaret ederek enerji metabolizmasındaki bozukluğa işaret etmektedir. Bu bulgular astrosit odaklı terapötik yaklaşımlarda ornitin yolağını olası bir terapötik hedef olarak düşünülebileceğine dair ön bulgular sunmaktadır.

TNF- α uyarımına benzer şekilde yüksek ornitin seviyeleri ve enerji metabolitlerinin düşük seviyeleri TGF- β 1 2,5 ng/mL ve SR1 1,5 μ M dozunda da görülmektedir. LPS 100 ng/mL dozunda ise ornitin seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermemiş ancak enerji ve nöron destek metabolitlerinin seviyeleri TNF- α grubuyla benzer bir şekilde azalmıştır.

TGF- β 1 10 ng/mL dozunda ise yukarıda bahsedilen gruplardan farklı olarak ornitin seviyelerinde düşüş görülmüş, yine enerji ve nöronal destek metabolitlerinin seviyelerinde bir azalma gözlenmiştir. TGF- β 1 dozları arasında her ne kadar ısı haritasında fark görülme de metabolit seviyelerindeki değişim nedeniyle iki dozu karşılaştırıldığında, TGF- β 1 10 ng/mL doz uygulanan hücrelerin kültür ortamında TGF- β 1 2,5 ng/mL doza göre ornitin seviyelerinde belirgin bir azalma görülmüştür. Yine enerji ve nöronal destek metabolitleri olarak belirlediğimiz glutamin, lizin, β -alanin, prolin, n-asetilglisin, malik asit ve fenilalanin seviyelerinde artış, yüksek doz TGF- β 1 uygulamasının, bozulan enerji ve nöronal destek metabolizmasının düzeltilmesinde yararlı olabileceğini düşündürmüş, daha yüksek dozda ve/veya daha uzun süre TGF- β 1 uygulamasının astrositlere nöron koruyucu özellik kazandırdığını ve bozulan astrositleri onarabilir mi sorusunu akla getirmiştir.

Astrositler, ayaksız çıkıntılarla kan beyin bariyerinin kritik regülatör elemanlarıdır. Beyine kan yolu ile ulaşan xenobiyotik/toksik ajanların detoksifikasyonu/metabolize edilmesinde astrositlerin önemli rolü olabileceği düşünülerek bu çalışmada astrositlere AhR agonist ve antagonist ligand uyarımları yapılmış, ön bilgiler elde edilmiştir. AhR-ilişkili uyarımlar incelendiğinde SR1 1,5 μ M dozu daha önce de belirtilmiş olduğu gibi TNF- α dozlarıyla benzer bir değişime yol açmaktadır. Ancak artan sistein ifadesi astrositin antioksidan savunmasının güçlendiğinin ve ornitin zararlı etkilerinin sınırlandırıldığının göstergesi olabilmektedir (79). FICZ 100 nM dozunda ise ornitin seviyeleri artmadan, artan sistein seviyeleri görülmektedir ancak enerji ve nöronal destek metabolitlerinin

seviyeleri kontrol grubuna kıyasla azalmıştır. Bu veriler, AhR agonisti ve antagonisti arasındaki farkı açıklamada yetersiz kaldığı için SR1 1,5 μ M dozu uygulanan hücre kültür ortamı ile FICZ 100 nM dozu uygulanan hücre kültür ortamlarının karşılaştırması da yapılmış, aşağıdaki şekilde verilmektedir.



Şekil 5.2: Metabolom sonuçlarına göre SR1 1,5 μ M dozu uygulanan hücre kültür ortamı ile FICZ 100 nM dozu uygulanan hücre kültür ortamlarının karşılaştırması.

Bu şekilde, SR1 1,5 μ M dozunda FICZ 100 nM dozuna kıyasla laktik asitte aşırı yükselme, palmitoleik asitte ve bazı enerji ve nöronal destek metabolitlerinin seviyelerinde düşüş dikkati çekmektedir. Palmitoleik asitin, piroptoz, apoptoz ve endoplazmik retikulum kaynaklı stresi (ER Stres) inhibe ederek ve LPS toksisitesini engelleyerek hücreyi koruyucu bir etki yaptığı (80) ancak birçok çalışmada da nörodejeneratif hastalıklarda ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir (81). Bu çalışmada palmitoleik asit ve bazı metabolitlerindeki azalma ile birlikte astrositlerden nörona geçen en önemli enerji metaboliti olan laktat seviyelerinde bu denli artış AhR'nin nörodejeneratif hastalıklarda iki uçlu kılıç gibi davrandığını kanıtlar nitelikte olabilmektedir. Ancak AhR'nin astrositlerdeki ifadesi ve nörodejenerasyondaki görevi hakkında yeterli kanıt bulunmamaktadır.

Sonuç olarak, astrosit uyarımlarının moleküler ve metabolik yanıtlarının incelendiği bu çalışmada farklı uyarımların A1/A2 sınıflaması dışında heterojen astrosit profilleri ortaya çıkardığı gösterilmiştir. A1/A2 fenotipindeki astrositlerle

ilgili yapılan çalışmalardaki artışla doğru orantılı olarak değişen profilleri, henüz A1/A2 astrositleriyle ilgili kesin değerlendirme yapmayı zorlaştırmaktadır. Örneğin beynin farklı bölgelerinden alınan astrositlerde A1 ve A2 fenotipine özgü belirteçlerin ifadelerinin de farklı olduğu görölmüştür (73). Ayrıca yapılan hayvan deneylerinde artan yaşla birlikte birçok A1 ve A2 fenotipine özgü belirteçlerin ifadesinin değiştiği gözlemlenmiştir (73). Bu durumda incelenen astrositlerin bulundukları beyin bölgesi ve deneğin yaşının tüm çalışmalarda aynı olmadığı sürece astrositleri bu şekilde sınıflandırmanın nörodejenerasyonda astrositlerin rolünün anlaşılmasını kısıtlandırığını düşünmekteyiz. İnsan beyninin karmaşık yapısı, merkezi sinir sistemi ve nöron mikroçevre elemanlarının ve aralarındaki ilişkinin kesin bir şekilde taklit edilememesi, insan ve hayvan beyni arasında farklılıkların bulunması, astrositlerin beynin farklı bölgelerinde farklı belirteçlerinin bulunması ve artan yaşla birlikte bu belirteçlerin değişmesi insanda nörodejenerasyon sırasında astrositlerin rolünün tam olarak anlaşılamamasına veya yapılan çalışmalarda farklılıklar görölmesine sebebiyet vermektedir. Bu doğrultuda bu çalışmamızda astrositleri A1 ve A2 gibi sınıflandırmaktan ziyade TNF- α , LPS, TGF- β 1, FICZ, SR1 ile uyarılmış/koşullandırılmış astrositler olarak nitelendirmenin daha doğru olduğunu düşünmekteyiz.

Özetle, astrositlerin farklı stres faktörlerine maruz bırakıldığı bu çalışmada astrositlerde fenotipik/morfolojik, moleküler ve metabolik önemli değişimler olduğu gösterilmiştir. Elde edilen veriler nörodejenerasyonda astrositlerin rolü/işlevi ve stres altındaki fenotipleri hakkında bilgi vererek, çevresel toksinlere ve stres faktörlerine karşı hücreyel yanıtları düzenleyen AhR sinyalizasyonunun astrosit ve nörodejenerasyonla ilişkisi konusunda ileride yapılacak araştırmalara ışık tutarak yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sunacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İn-vitro kültür ortamında 24 saat boyunca farklı stres uyaranlarına maruz bırakılan insan astrositlerinde moleküler değişimler yanında kültür ortamının metabolit profilinde de istatistiksel anlamlı değişiklikler saptanmıştır.

RT-qPCR sonuçları değerlendirildiğinde, TNF- α ve LPS uyarımı ile inflamasyonun tetiklendiği görülmüş, ancak literatürde sözü edilen A1-ilişkili genlerin bir kısmında beklenen yükselme görülmemiştir. Diğer taraftan A2 uyarımı amacıyla kullanılan TGF- β 1 uygulamalarında beklenildiği gibi A1 fenotipe özgü genlerin ifadelerinde azalma görülse de aynı anda A2 fenotipe özgü genlerin ifadelerinde de azalma görülmüş, bu durumun, uyaranların dozları ve/veya uygulama sürelerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği, ayrıca, in-vitro, in-vivo farklı deneysel metodolojiler, insan veya hayvan hücreleri kullanımı ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. İleride yapılan çalışmalarda bu sebeplerin göz önünde bulundurulması, nöron-astrosit kokültürlerinde astrositlerin stres faktörleri tarafından uyarılmasının nöronlardaki değişimle birlikte incelenmesi ve insan beynini daha iyi taklit edebilecek sistemlerde yine aynı sistemin kurulması, nörodejeneratif hastalıklarda astrositlerin rolü hakkında daha detaylı bilgi vererek yeni terapötik yaklaşımlara ışık tutabilecektir.

Yine RT-qPCR sonuçlarından yola çıkarak AhR ligandları FICZ/SR1 uygulanan gruplarda hem A1 hem de A2 fenotiplerine özgü belirteçlerde değişimler saptanmış, tipik olarak bir sınıfa dahil edilemeyip AhR agonistik uyarım ile astrositlerin ara bir faza yönlenmiş olabileceği düşünülmüştür. Bu ön bulgular, AhR sinyalizasyonunun nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynayabileceğini ancak bu rol hakkında literatürde çok fazla bilinmeyen olduğunu düşündürmüştür. Astrositlerde AhR sinyalizasyonunun anlaşılması ve eksojen, endojen ligandların etkilerinin ortaya çıkarılmasıyla nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirilebilecektir.

Metabolom sonuçlarına göre TNF- α /LPS/SR1/ TGF- β 1 2,5 ng/mL dozlarında yüksek ornitin seviyeleri göze çarpmaktadır. Literatür araştırması sonucunda nörodejenerasyonda ve nörodejenerasyona sebebiyet verecek bazı bozukluklarda yüksek ornitin seviyeleri bildirilmiştir. Ornitinin astrositlerde birçok yolda rol alması

astrosit metabolizmasında anahtar düzenleyici konumunda olabileceği ve rolü hakkında daha fazla araştırmalar yapılması gerektiğini düşündürmektedir.

Yine metabolom sonuçlarında tüm stres uyarımlarında enerji metabolizmasının bozulması, astrosit enerji metabolizmasının hassas olduğunu ve herhangi bir stres durumunda bozulmaya elverişli olduğunu düşündürmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda nöronların enerji metabolizmasının bozulmasının astrosit kaynaklı da olabileceği ve/veya astrositlerin bu durumu kötüleştirebileceği düşünülmektedir. Bu çalışma sonuçları da destekleyici yöndedir. Ancak yüksek doz TGF- β 1 (10 ng/mL) ile düşük doz TGF- β 1 (2,5 ng/mL) karşılaştırıldığında enerji metabolitleri seviyelerinin yüksek dozda daha fazla olması, yüksek doz TGF- β 1 uygulamasının enerji metabolizmasını daha az bozduğunu ve/veya bozulan enerji metabolizmasının onarılmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir. Konu ile ilgili nörotoksik ve nöroprotektif fenotipteki astrositlere çeşitli dozlarda TGF- β 1 uygulanması ve enerji metabolitlerinin analiz edilmesi, astrosit enerji metabolizmasında ve nörodejenerasyonda TGF- β 1'in rolü hakkında daha fazla bilgi verebilir.

RT-qPCR sonuçlarına göre astrositleri ara bir faza yönlendirdiğini düşündüğümüz FICZ/SR1 uyarıcıları ile metabolom sonuçlarında da çift yönlü etki elde edilmiştir. TNF- α uyarımı benzeri metabolit profili gösteren SR1 maruziyetinde TNF- α 10 ng/ml dozundan farklı olarak bazı enerji ve nöron destek metabolitlerinin seviyesinde azalma olduğu bazılarının ise arttığı görülmüştür. Yine FICZ dozlarında da bazı yararlı metabolit seviyelerinin düşük; bazı yararlı metabolit seviyelerinin yüksek olması RT-qPCR verileri ile uyumludur ve AhR mekanizmasının astrositleri hem yararlı hem zararlı bir şekilde etkileyebileceğini düşündürmüştür.

Ek olarak literatürde A1/A2 fenotipine özgü gen ifadelerinin sürekli güncellendiği tartışma kısmında belirtilmiştir. Bu doğrultuda ileride yapılacak çalışmalarda elde edilen veriler, literatürle uyumsuz olsa dahi yeni bakış açısı getirebilecek ve belirtilen fenotiplerin sınırlarının çizilmesine yardımcı olabilecek çalışmalar olacaktır.

Nörodejenerasyon sırasında ilk bozulan mikroçevre elemanının hangisi olduğu konusunda ise tartışmalar devam etmektedir. Mikroglia-astrosit interaksyonunun nöronal fonksiyonlarda kritik rolü bilinmektedir. İn-vitro ortamda sadece astrositler

üzerinde stres uyaranlarının etkisinin denendiği bu çalışmada bile önemli moleküler, metabolik değişimlerin saptanmış olması astrositlerin kritik rolüne işaret etmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Ferent J, Zaidi D, Francis F. Extracellular Control of Radial Glia Proliferation and Scaffolding During Cortical Development and Pathology. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:578341.
2. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:149-84.
3. Bjornsson Christopher S, Apostolopoulou M, Tian Y, Temple S. It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche. *Developmental Cell.* 2015;32(4):435-46.
4. Taverna E, Götz M, Huttner WB. The Cell Biology of Neurogenesis: Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2014;30(Volume 30, 2014):465-502.
5. Warrick JW, Murphy WL, Beebe DJ. Screening the Cellular Microenvironment: A Role for Microfluidics. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering.* 2008;1:75-93.
6. Han S, Gim Y, Jang E-H, Hur E-M. Functions and dysfunctions of oligodendrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2022;16.
7. Ding ZB, Song LJ, Wang Q, Kumar G, Yan YQ, Ma CG. Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2021;16(9):1702-10.
8. Quincozes-Santos A, Santos CL, de Souza Almeida RR, da Silva A, Thomaz NK, Costa NLF, et al. Gliotoxicity and Glioprotection: the Dual Role of Glial Cells. *Mol Neurobiol.* 2021;58(12):6577-92.
9. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* 2017;46(6):957-67.
10. Zhang Y-m, Qi Y-b, Gao Y-n, Chen W-g, Zhou T, Zang Y, et al. Astrocyte metabolism and signaling pathways in the CNS. *Frontiers in Neuroscience.* 2023;17.
11. Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews Neuroscience.* 2018;19(4):235-49.
12. Barros LF. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends in Neurosciences.* 2013;36(7):396-404.
13. Takahashi S. Neuroprotective Function of High Glycolytic Activity in Astrocytes: Common Roles in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(12):6568.
14. Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K, Ransom BR. Astrocytic Glycogen Influences Axon Function and Survival during Glucose Deprivation in Central White Matter. *The Journal of Neuroscience.* 2000;20(18):6804-10.

15. Aoyama K, Nakaki T. Impaired Glutathione Synthesis in Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(10):21021-44.
16. Andersen JV, Schousboe A, Verkhratsky A. Astrocyte energy and neurotransmitter metabolism in Alzheimer's disease: Integration of the glutamate/GABA-glutamine cycle. *Progress in Neurobiology*. 2022;217:102331.
17. Zanatta Â, Rodrigues MD, Amaral AU, Souza DG, Quincozes-Santos A, Wajner M. Ornithine and Homocitrulline Impair Mitochondrial Function, Decrease Antioxidant Defenses and Induce Cell Death in Menadione-Stressed Rat Cortical Astrocytes: Potential Mechanisms of Neurological Dysfunction in HHH Syndrome. *Neurochem Res*. 2016;41(9):2190-8.
18. Chang M-Y, Son H, Lee Y-S, Lee S-H. Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2003;23(3):414-26.
19. Cameron HA, Hazel TG, McKay RD. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol*. 1998;36(2):287-306.
20. Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. *Current Opinion in Cell Biology*. 2006;18(6):704-9.
21. Michelucci A, Bithell A, Burney MJ, Johnston CE, Wong KY, Teng SW, et al. The Neurogenic Potential of Astrocytes Is Regulated by Inflammatory Signals. *Mol Neurobiol*. 2016;53(6):3724-39.
22. Cassé F, Richetin K, Toni N. Astrocytes' Contribution to Adult Neurogenesis in Physiology and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018;12.
23. Wolfe MS. Chapter 1 - Solving the Puzzle of Neurodegeneration. In: Wolfe MS, editor. *The Molecular and Cellular Basis of Neurodegenerative Diseases*: Academic Press; 2018. p. 1-22.
24. Achike FI, Murugan DD. Chapter 29 - Quercetin and antioxidant potential in diabetes. In: Preedy VR, editor. *Diabetes (Second Edition)*: Academic Press; 2020. p. 293-302.
25. Porsteinsson AP, Isaacson RS, Knox S, Sabbagh MN, Rubino I. Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. 2021;8(3):371-86.
26. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *The Lancet*. 2021;397(10284):1577-90.
27. Yang HD, Kim DH, Lee SB, Young LD. History of Alzheimer's Disease. *Dement Neurocogn Disord*. 2016;15(4):115-21.
28. Wang H, Kulas JA, Wang C, Holtzman DM, Ferris HA, Hansen SB. Regulation of beta-amyloid production in neurons by astrocyte-derived cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(33):e2102191118.
29. Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(4):416-8.
30. Ulugut H, Pijnenburg YAL. Frontotemporal dementia: Past, present, and future. *Alzheimer's & Dementia*. 2023;19(11):5253-63.

31. Geser F, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: A spectrum of TDP-43 proteinopathies. *Neuropathology*. 2010;30(2):103-12.
32. Haeusler AR, Donnelly CJ, Rothstein JD. The expanding biology of the C9orf72 nucleotide repeat expansion in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2016;17(6):383-95.
33. Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 2006;442(7105):920-4.
34. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. 2006;442(7105):916-9.
35. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. 2016;139(S1):318-24.
36. de Lau LM, Schipper CM, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. *Arch Neurol*. 2005;62(8):1265-9.
37. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. *The Lancet*. 2021;397(10291):2284-303.
38. Tysnes O-B, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2017;124(8):901-5.
39. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *The Lancet*. 2015;386(9996):896-912.
40. Walker FO. Huntington's disease. *The Lancet*. 2007;369(9557):218-28.
41. Medina A, Mahjoub Y, Shaver L, Pringsheim T. Prevalence and Incidence of Huntington's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Movement Disorders*. 2022;37(12):2327-35.
42. Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. Chapter 13 - The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In: Aminoff MJ, Boller F, Swaab DF, editors. *Handbook of Clinical Neurology*. 138: Elsevier; 2016. p. 225-38.
43. Masrori P, Van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European Journal of Neurology*. 2020;27(10):1918-29.
44. Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 2016;539(7628):197-206.
45. Chen C, Dong X-P. Epidemiological characteristics of human prion diseases. *Infectious Diseases of Poverty*. 2016;5(1):47.
46. Pedersen NS, Smith E. Prion diseases: Epidemiology in man. *APMIS*. 2002;110(1):14-22.
47. Fanciulli A, Wenning GK. Multiple-system atrophy. *N Engl J Med*. 2015;372(3):249-63.

48. Trojanowski JQ, Revesz T. Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007;33(6):615-20.
49. Mey GM, Mahajan KR, DeSilva TM. Neurodegeneration in multiple sclerosis. *WIREs Mechanisms of Disease.* 2023;15(1):e1583.
50. Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med.* 2010;14(3):457-87.
51. Read A, Schröder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology.* 2021;10(5):384.
52. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine.* 2004;10(7):S10-S7.
53. Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2022;14.
54. Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial Dysfunction and Defective β -Amyloid Clearance Pathways in Aging Alzheimer's Disease Mice. *The Journal of Neuroscience.* 2008;28(33):8354-60.
55. Olufunmilayo EO, Gerke-Duncan MB, Holsinger RMD. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants.* 2023;12(2):517.
56. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-7.
57. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 2012;32(18):6391-410.
58. Martin JE, Nguyen TT, Grunseich C, Nofziger JH, Lee PR, Fields D, et al. Decreased Motor Neuron Support by SMA Astrocytes due to Diminished MCP1 Secretion. *The Journal of Neuroscience.* 2017;37(21):5309-18.
59. Sison SL, Patitucci TN, Seminary ER, Villalon E, Lorson CL, Ebert AD. Astrocyte-produced miR-146a as a mediator of motor neuron loss in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2017;26(17):3409-20.
60. Eckers A, Jakob S, Heiss C, Haarmann-Stemmann T, Goy C, Brinkmann V, et al. The aryl hydrocarbon receptor promotes aging phenotypes across species. *Scientific Reports.* 2016;6(1):19618.
61. Itkin B, Breen A, Turyanska L, Sandes EO, Bradshaw TD, Loaiza-Perez AI. New Treatments in Renal Cancer: The AhR Ligands. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(10):3551.
62. Ojo ES, Tischkau SA. The Role of AhR in the Hallmarks of Brain Aging: Friend and Foe. *Cells.* 2021;10(10):2729.
63. Akahoshi E, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M. Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. *Environmental Health.* 2006;5(1):24.

64. Huang P, Rannug A, Ahlbom E, Håkansson H, Ceccatelli S. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of cytochrome P450 1A1, the aryl hydrocarbon receptor, and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in rat brain and pituitary. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;169(2):159-67.
65. Bansal S, Leu AN, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Chowdhury AR, Anandatheerthavarada HK, et al. Mitochondrial targeting of cytochrome P450 (CYP) 1B1 and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem*. 2014;289(14):9936-51.
66. Lee YH, Lin CH, Hsu PC, Sun YY, Huang YJ, Zhuo JH, et al. Aryl hydrocarbon receptor mediates both proinflammatory and anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-activated microglia. *Glia*. 2015;63(7):1138-54.
67. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
68. Allison RL, Welby E, Khayrullina G, Burnett BG, Ebert AD. Viral mediated knockdown of GATA6 in SMA iPSC-derived astrocytes prevents motor neuron loss and microglial activation. *Glia*. 2022;70(5):989-1004.
69. Rodríguez-Giraldo M, González-Reyes RE, Ramírez-Guerrero S, Bonilla-Trilleras CE, Guardo-Maya S, Nava-Mesa MO. Astrocytes as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease—Comprehensive Review and Recent Developments. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13630.
70. Gao L, Zhang Y, Sterling K, Song W. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Translational Neurodegeneration*. 2022;11(1):4.
71. Albini M, Krawczun-Rygmaczewska A, Cesca F. Astrocytes and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Neuroscience Research*. 2023;197:42-51.
72. Neo SH, Tang BL. Collagen 1 signaling at the central nervous system injury site and astrogliosis. *Neural Regen Res*. 2017;12(10):1600-1.
73. Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(8):E1896-E905.
74. Fan YY, Huo J. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochem Int*. 2021;148:105080.
75. Zudaire E, Cuesta N, Murty V, Woodson K, Adams L, Gonzalez N, et al. The aryl hydrocarbon receptor repressor is a putative tumor suppressor gene in multiple human cancers. *J Clin Invest*. 2008;118(2):640-50.
76. Smits JPH, Qu J, Pardow F, van den Brink NJM, Rodijk-Olthuis D, van Vlijmen-Willems I, et al. The aryl hydrocarbon receptor regulates epidermal differentiation through transient activation of TFAP2A. *bioRxiv*. 2023.
77. Stevens EA, Mezrich JD, Bradfield CA. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*. 2009;127(3):299-311.

78. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology*. 2001;64(4):365-91.
79. Chiang FF, Chao TH, Huang SC, Cheng CH, Tseng YY, Huang YC. Cysteine Regulates Oxidative Stress and Glutathione-Related Antioxidative Capacity before and after Colorectal Tumor Resection. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17).
80. Yu Q, Yang Y, Xu T, Cai Y, Yang Z, Yuan F. Palmitoleic acid protects microglia from palmitate-induced neurotoxicity in vitro. *PLoS One*. 2024;19(1):e0297031.
81. Hussain G, Anwar H, Rasul A, Imran A, Qasim M, Zafar S, et al. Lipids as biomarkers of brain disorders. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020;60(3):351-74.



8. EKLER

EK 1. Orijinallik Raporu

NECATİ ALP COŞKUN YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 4	% 3	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
3	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	mpace.lib.umanitoba.ca İnternet Kaynağı	<% 1
6	Xinying Zhou, Linmiao Lie, Yao Liang, Hui Xu et al. "GSK-3α/β Activity Negatively Regulates MMP-1/9 Expression to Suppress Mycobacterium tuberculosis Infection", Frontiers in Immunology, 2022 Yayın	<% 1
7	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	patents.google.com İnternet Kaynağı	

EK 2. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Necati Alp COŞKUN
 Ödev başlığı: NECATİ ALP COŞKUN YÜKSEK LİSANS TEZİ
 Gönderi Başlığı: NECATİ ALP COŞKUN YÜKSEK LİSANS TEZİ
 Dosya adı: ALP_Tez_Son_Hali_.docx
 Dosya boyutu: 8.4M
 Sayfa sayısı: 112
 Kelime sayısı: 15,985
 Karakter sayısı: 113,092
 Gönderim Tarihi: 09-Eyl-2024 10:16ÖS (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2449369560



9. ÖZGEÇMİŞ

