

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

**YETERSİZ PERİSİNAPTİK ASTROSİT GLİKOJENİ
KULLANIMININ NÖROİNFLAMATUVAR VE
DAVRANIŞSAL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Erknaz Ecehan ERK

Temel Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2023

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

**YETERSİZ PERİSİNAPTİK ASTROSİT GLİKOJENİ
KULLANIMININ NÖROİNFLAMATUVAR VE
DAVRANIŞSAL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Erknaz Ecehan ERK

**Temel Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Turgay DALKARA**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine EREN KOÇAK**

ANKARA

2023

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Yetersiz Perisinaptik Astrosit Glikojeni Kullanımının Nöroinflamatuvar ve Davranışsal Etkilerinin İncelenmesi

Erknaz Ecehan ERK

Danışman: Prof. Dr. Turgay DALKARA

İkinci Danışman: Prof. Dr. Emine EREN-KOÇAK

Bu tez çalışması 3.3.23 tarihinde jürimiz tarafından “Temel Nörolojik Bilimler Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent ELİBOL
Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Alp CAN
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Aygün ERTUĞRUL
Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Münire KILINÇ
Başkent Üniversitesi

Doç. Dr. Gül YALÇIN ÇAKMAKLI
Hacettepe Üniversitesi

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

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

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.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)

X Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. (2)

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

3 / 3 / 2023

Erknaz Ecehan ERK

I “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 danışmanının 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 metotların 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 danışmanının 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 danışmanının 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 zgn olduğunu, Prof. Dr.Turgay Dalkara ile Prof. Dr. Emine Eren KOÇAK (ikinci danışman) danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Erknaz Ecehan ERK

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenim sürecim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden faydalanma şansı bulduğum, çalışkan bilim insanı kimliğiyle ufkumu genişleten tez danışmanım Prof. Dr. Turgay Dalkara'ya teşekkürlerimi sunarım. İyimser ve motive edici kişiliğiyle tezime değerli yönlendirmelerde ve vazgeçilmez katkılarda bulunan ikinci danışmanım Prof. Dr. Emine Eren-Koçak'a teşekkür ederim. Tezimle ilgili kıymetli görüşleriyle bana yol gösteren Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü müdürü Prof. Dr. Bülent Elibol'a; doktora sürecim boyunca arkamda içten desteklerini hissettiğim Sağlık Bilimleri Enstitüsü müdürü Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan'a ve Prof. Dr. Hülya Karataş Kurşun'a; tez izleme komitemde nazik ve yapıcı tutumuyla bana yol gösteren Prof. Dr. Şaban Remzi Erdem'e; sorunlara pratik çözüm önerileriyle katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Şefik Evren Erdener'e teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük keyif duyduğum, becerilerimi geliştirmemde önemli katkıları bulunan, varlığıyla zor anları güzelleştiren Dr. Buket Nebiye Demir'e; bilgilerini ve samimi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Canan Çakır Aktaş, Dr. Melike Sever Bahçekapılı, Dr. Nevin Belder ve Dr. Canan Bağcı'ya, becerisi ve özverisiyle hayatı kolaylaştıran Mesut Fırat'a; davranış testlerinde deneyimlerini esirgemeyen Aslıhan Bahadır Varol'a; yardımsever kişiliğiyle bilgilerini cömertçe paylaşan Dr. Taha Solakoğlu'na ve aynı yolda yürüdüğü arkadaşlarını içtenlikle desteklemeyi bilen tüm doktora öğrencilerine; güleryüzlü Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü idari personeline; tıp fakültesi ile beraber yürüttüğüm zorlu MD-PhD sürecinde üzerimde emeği olan tüm hocalarım ile beni sınırsız bir anlayışla destekleyen tüm dostlarıma gönülden teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje ID: 18059) teşekkür ederim.

Koşulsuz sevgi ve destekleriyle beni kuşatan, zor koşullar altında onurlu ve vicdanlı durabilmeyi öğreten, bilime olan tutkularıyla bana ilham veren, hayattaki en büyük şansım değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Erk, E. E. Yetersiz Perisinaptik Astrosit Glikojeni Kullanımının Nöroinflamatuvar ve Davranışsal Etkilerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, Ankara, 2023. Birçok çalışma beynin enerji ihtiyacının büyük ölçüde sinapslarda lokalize olduğuna işaret etmekte, sinaptik enerji arz ve talebini eşleştiren temel aktör olarak perisinaptik astrosit son ayaklarındaki glikojen öne çıkmaktadır. Bu çalışmada, glikojenden enerji eldesindeki aksamının sinapsta metabolik stres oluşturacağı, bu stresin nöroinflamasyonu tetikleyerek davranış fenotipinde değişikliklere yol açabileceği hipotez edilmiştir. Bu amaçla dorsal hipokampus bölgesi içerisine bilateral glikojenoliz inhibitörü DAB enjeksiyonları yapılarak seçilen beyin bölgeleri mikrogliyal aktivasyon bulguları açısından değerlendirilmiş, DAB grubunda kontrol grubundan farklı olarak enjeksiyon bölgesinden uzak yerleşimli ventral hipokampus, amigdalar bölge ve entorinal kortikal alanda da yaygın mikrogliyal aktivasyon saptanmıştır. Bu nöroinflamatuvar fenotipin davranışa yansımalarının gözlenebilmesi için enjeksiyonları takiben birinci, üçüncü ve beşinci günlerde fareler depresyon-benzeri ve anksiyete-benzeri davranışı değerlendiren bir grup teste tabi tutulmuş, hipotezimizin aksine DAB'ın belirgin depresojenik veya anksiyojenik bir etkisi gözlenmemiştir. Buna karşın, anhedoni-benzeri davranış gözlemeyi beklediğimiz DAB grubunda sükröz tercihinin ve sosyal etkileşim indeksinin kontrol grubundan yüksek olması dikkat çekicidir. Tüm bu bulgular, hipokampal glikojenoliz inhibisyonunun beyinde yaygın mikrogliyal aktivasyonu tetikleyebileceği ve bu etkinin davranış fenotipinde hedoni lehine değişikliklere yol açabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: depresyon, anksiyete, mikrogliya, glikojen, hedoni

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 18059 numaralı “doktora tez projesi” olarak desteklenmiştir.

ABSTRACT

Erk, E. E. Neuroinflammatory and Behavioral Effects of Inadequate Perisynaptic Astrocyte Glycogen Utilization, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Basic Neurological Sciences Program Doctoral Thesis, Ankara, 2023. Several findings suggest that the brain energy demand is mostly localized at the synapses, and glycogen in the perisynaptic astrocytic endfeet serves as the main actor that matches the synaptic energy supply and demand. In this study, we hypothesized that disruption of synaptic energy delivery from glycogen would cause metabolic stress in the synapse, which could trigger neuroinflammation and lead to changes in the behavioral phenotype. For this purpose, glycogenolysis inhibitor “DAB” was bilaterally injected into the dorsal hippocampus region and selected brain regions were evaluated in terms of microglial activation findings. Unlike the control group, DAB group showed widespread microglial activation in the ventral hippocampus, amygdalar region and entorhinal cortical area, which are located far from the injection site. In order to observe the behavioral output of this neuroinflammatory phenotype, mice were subjected to a group of tests evaluating depression-like and anxiety-like behavior on the first, third and fifth days after the injections. Contrary to our hypothesis, no significant depressogenic or anxiogenic effect of DAB was observed. On the other hand, it is noteworthy that the sucrose preference and social interaction index were higher in the DAB group, where we expected to observe anhedonia-like behavior. All these findings indicate that inhibition of hippocampal glycogenolysis may trigger widespread microglial activation in the brain and this effect may lead to changes in the behavioral phenotype in favor of hedonia.

Keywords: depression, anxiety, microglia, glycogen, hedonia

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit as a "doctoral thesis project" (18059).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nöron-glia metabolik kenetlenmesi	4
2.1.1. Astrosit-Nöron Laktat Mekiği	4
2.1.2. Astrosit glikojenolizi	5
2.2. Astrosit glikojen metabolizması ve biyolojik etkileri	6
2.2.1. Perisinaptik astrosit glikojen metabolizmasının nöroinflamasyondaki rolü	8
2.2.2. Perisinaptik astrosit glikojen metabolizmasının majör	

	x
depresyon ile ilişkisi	8
2.2.3. Perisinaptik astrosit glikojeni ile ilişkilendirilen diğer fizyolojik ve patolojik durumlar	9
2.2.4. Glikojenoliz inhibisyonu	10
2.3. Majör Depresif Bozukluk ve Nöroinflamasyon	12
2.3.1. Majör Depresif Bozukluk	12
2.3.2. Majör Depresif Bozukluk Patofizyolojisi	13
2.3.3. Nöroinflamasyon	14
2.4. Doku Şeffaflaştırma ve <i>Light Sheet Fluorescence Microscopy</i> (Işık Tabakası Floresan Mikroskopisi)	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Barındırma Koşulları	26
3.2. İntrahipokampal DAB ve Serum Fizyolojik Enjeksiyon Prosedürü	27
3.2.1. Kanül Takılmadan Gerçekleştirilen İntrahipokampal DAB ve Serum Fizyolojik Enjeksiyonları	27
3.2.2. Kanül Takılarak Gerçekleştirilen İntrahipokampal DAB ve Serum Fizyolojik Enjeksiyonları	27
3.3. Sıçana Maruz Bırakma Akut Stres Prosedürü	28
3.4. Davranış Testleri	28
3.4.1. Lökomotor Aktivite Testi ile Açık Alan Testi	28

	xi
3.4.2. Aydınlık -Karanlık Kutu Testi	28
3.4.3. Kuyruktan Asma Testi	29
3.4.4. Sükroz tercihi testi	29
3.4.5. Sosyal Etkileşim Testi	29
3.5. İntrakardiyak Perfüzyon ve Ötenazi	30
3.6. Doku İşlemleri	31
3.7. İmmünohistokimyasal İşaretlemeler ve Görüntüleme	31
3.7.1. Iba-1 boyama protokolü	31
3.8. Veri Analizi	32
3.9. Doku Şeffaflaştırma ve Işık Tabakası Floresan Mikroskopi Görüntülemesi	33
3.9.1. Dokunun Şeffaflaştırılarak Görüntüleme İçin Hazırlanması	33
3.9.2. Şeffaflaştırılmış Örneklerin Işık Tabakası Floresan Mikroskopisi İle Görüntülenmesi	34
3.9.3. Işık Tabakası Floresan Mikroskopi Görüntülerinin Analizi	34
4. BULGULAR	35
4.1. Kanül Takılmadan İntrahipokampal Enjeksiyon Yapılan Hayvanların Davranış Testleri	35
4.1.1. Anksiyete-benzeri Davranış	35
4.1.2. Depresyon-benzeri Davranış	39
4.2. Kanül Takılarak İntrahipokampal Enjeksiyon Yapılan Hayvanlardaki	

	xii
Davranış Testleri	41
4.2.1. Anksiyete-Benzeri Davranış Testleri	41
4.2.2. Depresyon-Benzeri Davranış Testleri	45
4.3. Kanül Takılmadan İntrahipokampal Enjeksiyon Yapılan Hayvanlarda	
Iba-1 İşaretlemeleleri	50
4.3.1. Dorsal hipokampal bölge	50
4.3.2. Ventral hipokampal bölge	52
4.3.3. Amigdalar bölge	54
4.3.4. Entorinal kortikal bölge	56
4.3.5. Korteks enjeksiyon trasesi	58
4.4. Kanül Takılarak İntrahipokampal Enjeksiyon Yapılan Hayvanlarda	
Iba-1 İşaretlemeleleri	59
5. TARTIŞMA	63
5.1. DAB'ın Davranışsal Etkileri	63
5.1.1. DAB'ın depresyon-benzeri davranış üzerine etkileri	63
5.1.2. DAB'ın lökomotor aktivite ve anksiyete-benzeri davranış üzerine etkileri	65
5.2. DAB enjeksiyonu ve takip eden akut stresin davranışsal etkileri	67
5.2.1. DAB enjeksiyonu ve takip eden akut stresin depresyon-benzeri davranış üzerine etkileri	67

	xiii
5.2.2. DAB enjeksiyonu ve takip eden akut stresin anksiyete-benzeri davranış üzerine etkileri	69
5.3. DAB'ın Nöroinflamatuvar Etkileri	69
5.3.1. Dorsal hipokampus	69
5.3.2. Ventral hipokampus	70
5.3.3. Entorinal korteks	71
5.3.4. Amigdala	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
7. KAYNAKLAR	78
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

5HT	5-hidroksitriptamin (serotonin)
ANLM	Astrosit-nöron laktat mekiği
BGP	Beyin glikojen fosforilazı
BSA	Bovine Serum Albumin
CP-316,819	5-kloro-N-[(1S,2R)-2-hidroksi-3-(metoksimetilamino)-3-okso-1-(fenilmetil)propil]-1H-indol-2-karboksamid
DAB	1,4-dideoksi-1,4-imino-D-arabinitol
DMSO	Dimetil Sülfoksit
fMRI	Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
GS	Glikojen Sentaz
HMGB-1	High Mobility Group Box-1
Iba-1	İyonize kalsiyuma bağlanan adaptör molekül-1
IL-1β	İnterlökin-1 Beta
LGP	Karaciğer glikojen fosforilazı
LGS	Karaciğere özgü glikojen sentaz
LSFM	Işık Tabakası Floresans Mikroskopisi
MGP	Kas glikojen fosforilazı
MGS	Kas glikojen sentezi

NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NGS	Normal Keçi Serumumu
NLRP3	NOD-, LRR- ve Pirin Alanı İçeren Protein 3
PBS	Fosfat Tamponlu Saline
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PFA	Paraformaldehit
PTG	Glikojen hedefli protein
ROI	Region of Interest (İlgilenilen bölge)
SF	Serum Fizyolojik
TBS	Tris Tamponlu Salin
THF	Tetrahidrofur
TMEM119	Transmembran protein 119
TSPO	Translokator Protein
VIP	Vazoaktif İntestinal Peptit

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Astrosit-nöron laktat mekiği.	5
2.2. Mikroglia morfolojik formları.	17
2.3. Mikroglia belirteçleri ile işaretlenmiş farklı mikroglia fenotipleri.	20
3.1. Birinci set deneylerde takip edilen akış şeması.	24
3.2. Kanül takılarak yapılan deneylerde takip edilen akış şeması.	25
4.1. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanların üçüncü ve beşinci günlerde açık alanda geçirdikleri süre (s).	35
4.2. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanların üçüncü ve beşinci günlerdeki lökomotor aktiviteleri (cm).	36
4.3. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlarda üçüncü gün aydınlık-karanlık kutu testi.	38
4.4. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlarda beşinci gün aydınlık-karanlık kutu testi.	38
4.5. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlarda üçüncü ve beşinci gün kuyruktan asma testi.	39
4.6. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlarda sükröz tercih testi.	41
4.7. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda DAB ve SF gruplarının aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alanda geçirdikleri süre (s).	42
4.8. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda birinci gün aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alana geçme latansı (s).	43
4.9. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda üçüncü gün aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alana geçme latansı (s).	44
4.10. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda beşinci gün aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alana geçme latansı (s).	44
4.11. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda DAB ve SF gruplarının sosyal etkileşim testinde sosyal etkileşimde bulunma oranları.	46
4.12. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda DAB ve SF gruplarının	

kuyruktan asma testinde hareketsiz kaldıkları süre (s).	47
4.13. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda birinci gün kuyruktan asma testinde hareketsiz kalma latansı (s).	48
4.14. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda üçüncü gün kuyruktan asma testinde hareketsiz kalma latansı (s).	49
4.15. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda beşinci gün kuyruktan asma testinde hareketsiz kalma latansı (s).	49
4.16. Dorsal hipokampal bölgenin temsili görüntüsü.	50
4.17. Naif farenin dorsal hipokampus görseli.	50
4.18. Sham (yalancı uygulama/kontrol/SF) grubu farenin dorsal hipokampus görseli.	51
4.19. DAB (deney) grubu farenin dorsal hipokampus görseli.	51
4.20. Ventral hipokampal bölgenin temsili görüntüsü.	52
4.21. Naif farenin ventral hipokampus görseli.	52
4.22. Sham (yalancı uygulama/kontrol/SF) grubu farenin ventral hipokampus görseli.	53
4.23. DAB (deney) grubu farenin ventral hipokampus görseli.	53
4.24. Amigdalar bölgenin temsili görüntüsü.	54
4.25. Naif farenin amigdalar bölge görseli.	54
4.26. Sham (yalancı uygulama/kontrol/SF) grubu farenin amigdalar bölge görseli.	55
4.27. DAB (deney) grubu farenin amigdalar bölge görseli.	55
4.28. Entorinal bölgenin temsili görüntüsü.	56
4.29. Naif farenin entorinal bölge görseli.	56
4.30. Sham (yalancı uygulama/kontrol/SF) grubu farenin entorinal bölge görseli.	57
4.31. DAB (deney) grubu farenin entorinal bölge görseli.	57
4.32. Sham (yalancı uygulama/kontrol) grubu farenin korteksinde enjeksiyon trasesi civarı görseli.	58
4.33. DAB (deney) grubu farenin korteksinde enjeksiyon trasesi civarı görseli.	59
4.34. Kanül takılarak intrahipokampal enjeksiyon yapılan 3 erkek DAB, 3 dişi DAB, 1 erkek kontrol, 1 dişi kontrol hayvan yarım beyninin koronal görüntüleri.	60

- 4.35.** Kanül takılarak intrahipokampal enjeksiyon yapılan 3 erkek DAB, 3 dişi DAB, 1 erkek kontrol, 1 dişi kontrol hayvan yarım beyninin Iba-1 ile işaretlendiği koronal görüntüleri. 60
- 4.36.** DAB ve kontrol grubu farelerde şeffaştırılarak işık tabakası floresan mikroskopisi ile görüntülenen beyinlerde prelimbik, infralimbik ve anterior singulat alanlardaki mikroglia sayıları. 61
- 4.37.** Işık tabakası floresan mikroskopisi ile görüntülenen bir DAB grubu fare hemisferinin üç boyutlu rekonstrükte edilmiş görüntüsü. 62

1.GİRİŞ

Vücutun toplam enerji harcamasında büyük bir paya sahip olan beyinde bu ihtiyacın özellikle sinaptik aralıkta yoğunlaştığı bilinmekte, sinaptik enerji arzının taleple eşleştirilmesinde perisinaptik astrosit son ayaklarındaki glikojenin rolü öne çıkmaktadır. Sinaptik nörotransmisyonun devamlılığında astrosit glikojenolizinin merkezi bir rolü olduğu ve majör depresyon patofizyolojisinde önemli bir yeri olan stresin sinaptik enerji ihtiyacını artırarak astrositlerde glikojen yıkımını uyardığı önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur. Buna ek olarak, literatürdeki bulgular kemirgenlerde kronik stresin astrosit glikojen içeriğini azalttığına ve beyin glikojeninin birçok antidepresanın etki mekanizmasında kendine yer bulduğuna işaret etmektedir. Tüm bu çalışmalar, perisinaptik astrosit glikojeni ile depresyon-benzeri ve anksiyete-benzeri davranış arasında olası bir ilişkiyi düşündürmektedir.

Bunun yanında, literatürde majör depresyon patogenezinde nöroinflamasyonun rolüne kanıt oluşturan birçok araştırma mevcuttur. Majör depresyon hastalarında periferik inflamasyonun varlığına ve tedavi yaklaşımlarının proinflamatuvar belirteç seviyelerini geriletğine dair klinik gözlemler de prelinik çalışmaları doğrulamaktadır. Ayrıca depresyon literatüründeki birçok araştırma nöroinflamasyonun önemli bir komponenti olan mikroglial aktivasyonun patolojiye eşlik ettiğine dair veriler ortaya koymaktadır. Buna karşın, bir dizi değişikliği tetikleyerek depresyon fenotipini ortaya çıkaracak olan nöroinflamasyonun ne sebeple başladığı tam bilinmemektedir. Depresyona sebep olan temel faktörlerden akut stresin enerji ihtiyacını artırması ve bu ihtiyacın büyük ölçüde glikojenden karşılanıyor olması, astrosit glikojenoliz inhibisyonunun nöroinflamasyona yol açabileceğine dair bulgularla birlikte değerlendirildiğinde, sinaptik enerji tedarikinin aksamasının nöroinflamatuvar değişiklikleri tetikleyerek davranışsal etkilerle sonuçlanabileceği düşünülebilir. Literatürde astrosit glikojeni, mikroglial aktivasyon ve depresyon arasında köprü kuran çalışmaların eksikliği sebebiyle bu tezde aradaki

olası ilişkilerin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu sebeple çalışmada

- 1) Glikojenoliz inhibitörü 1,4-dideoksi-1,4-imino-D-arabinitolun (DAB) bilateral intrahipokampal enjeksiyonunun dişi ve erkek farelerde depresyon-benzeri davranış kapsamında değerlendirilen davranışsal umutsuzluğa sebep olacağı hipotez edildi. Bu amaçla yapılan kuyruktan asma testinde gruplar arası farklılık gözlenmedi, ancak davranışsal umutsuzluğun deney grubundan bağımsız olarak zamana bağlı artış gösterdiği kaydedildi. Deney paradigmasına akut avcı stresi eklendiğinde ise, enjeksiyon sonrası birinci ve beşinci günlerde dişilerde DAB grubunda davranışsal umutsuzluk fenotipinin ortaya çıktığı gözlemlendi.
- 2) DAB enjeksiyonunun dişi ve erkek farelerde bir başka depresyon-benzeri davranış olan anhedoniye yol açacağı hipotez edildi. Bu hipotezi test etmek için yapılan sükröz tercih testinde, öngörülenin aksine DAB grubu dişilerde hedonik davranışta artış gözlemlendi. DAB enjeksiyonunu takiben akut stres uygulanan deney grubunda, bu bulgularla örtüşecek şekilde enjeksiyon sonrası beşinci gün her iki cinsiyet için de DAB grubunda sosyal etkileşim düzeyleri kontrol grubundan yüksek bulundu.
- 3) DAB'ın lökomotor aktivitede bir değişikliğe yol açmayacağı ve anksiyete-benzeri davranışı artıracığı hipotez edildi. Buna karşın, DAB'ın erkek farelerde beşinci gün lökomotor aktiviteyi arttırdığı görüldü. Lökomotor aktivitenin etkisi kontrol edilerek anksiyete-benzeri davranış düzeyleri kıyaslandığında gruplar arası anlamlı bir fark görülmedi.
- 4) Bilateral DAB enjeksiyonunun beyinde yaygın mikrogliyal aktivasyonu tetikleyeceği hipotez edildi. Konfokal mikroskopi ve ışık tabakası floresan mikroskopi görüntülemelerinde hem kontrol hem deney grubunda enjeksiyon bölgesi ve enjeksiyon trasesi çevresinde aktive fenotipte mikrogliyal gözlemlendi ancak aktivasyonun DAB grubunda daha yoğun olduğu kaydedildi. Bunun

yanında, DAB grubunda kontrol grubundan farklı olarak enjeksiyon bölgesinden uzak yerleşimli ventral hipokampus, amigdala ve entorinal kortekste de mikroglial aktivasyon lehine bulgular gözlemlendi.

Sonuç olarak, bilateral intrahipokampal DAB enjeksiyonlarının enjeksiyon sonrası birinci, üçüncü ve beşinci günlerde yapılan deneylerde depresyon-benzeri ve anksiyete-benzeri davranış düzeylerinde anlamlı bir artışa yol açmadığı, buna karşın hedonik davranışı artırdığı ve yaygın mikroglial aktivasyonu tetiklediği gözlemlendi.

2. GENEL BİLGİLER

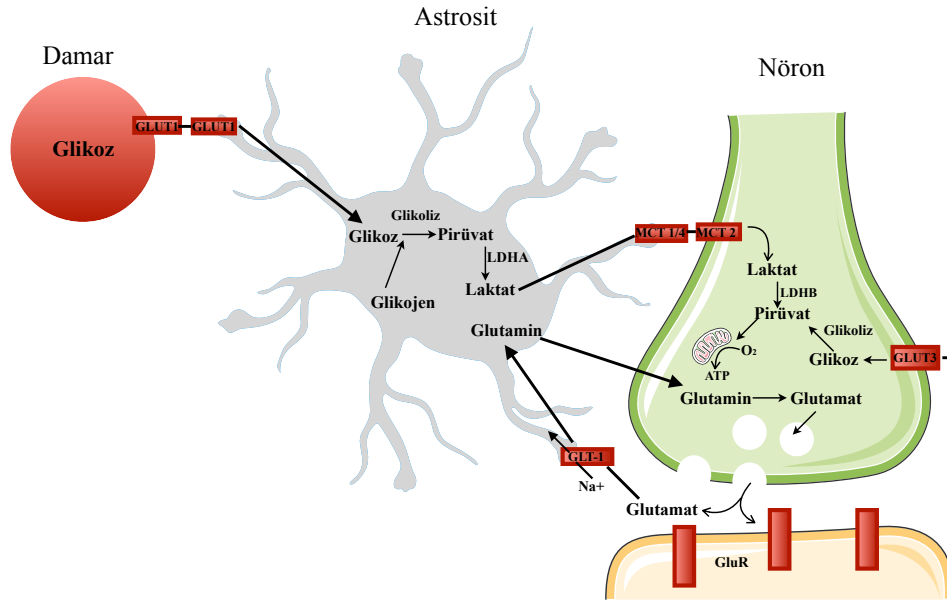
2.1. Nöron-glia metabolik kenetlenmesi

Beyin, vücut ağırlığının sadece %2'sini oluşturmasına rağmen toplam oksijen tüketiminin %20'sinden, glikoz kullanımının ise %25'inden sorumludur (1). İn vivo ve in vitro biyokimyasal çalışmalar ile görüntüleme çalışmaları, sinir sisteminin bu enerji ihtiyacının ağırlıklı olarak sinapslarda lokalize olduğunu ve sinaptik aktivitenin yerel enerji tedariki ile eşleştirilmesi gerektiğini doğrulamaktadır (2). Özellikle son otuz yıldaki çalışmalar, astrositlerin sinaptik aktivite ile enerji metabolizmasını eşleştiren aktörler olarak önemini ortaya koymakta, bu eşleşmenin astrosit-nöron laktat mekiği (ANLM-*astrocyte-neuron lactate shuttle*) ve glikojenolizin tetiklenmesi üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir.

2.1.1. Astrosit-Nöron Laktat Mekiği

Eksitator sinaptik iletimle artan enerji ihtiyacının karşılanması için astrositler ve nöronlar arasındaki metabolik kenetlenme ANLM modeli ile de açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu modele göre, glutamaterjik nörotransmisyon sırasında hücre dışı aralıkta konsantrasyonu artan glutamat, astrosit uzantılarındaki spesifik glutamat taşıyıcıları tarafından sodyum iyonu (Na^+) -bağımlı bir mekanizmayla geri alınır. Astrosit uzantılarında intraselüler Na^+ konsantrasyonunda görülen artış ise Na^+/K^+ ATPaz'ı aktive ederek ATP tüketimine neden olur. Ayrıca astrositlerde glutamat, geri dönüşümünü sağlamak amacıyla glutamin sentaz tarafından glutamine dönüştürülüp nöronlara geri kazandırılır ve bu döngüde de ATP harcanır. Eksitatuvar sinaptik aktivitenin neden olduğu bu enerji harcayan süreçler, astrosit damar son ayaklarındaki GLUT1 adlı glikoz taşıyıcı ile kandan glikoz alımını uyarır ve astrosit içine alınan glikozun sinapslara gönderilmek üzere glikolitik yolla laktata çevrilmesini sağlar. Presinaptik terminal ve dendritler tarafından hücre içine alınan laktat, pirüvata çevrilip trikarboksilik asit döngüsüne girerek enerji üretimi için

kullanılır (3) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Astrosit-nöron laktat mekiği (Şekil, Servier Medical Art'ta yer alan görseller kullanılarak hazırlanmıştır. Servier Medical Art, Creative Commons Atıf 3.0 Yerelleştirilmemiş Lisansı altında lisanslanmıştır.).

2.1.2. Astrosit glikojenolizi

Artmış sinaptik aktivitenin astrositler tarafından enerji tedarikini desteklemesinde rolü olduğu öne sürülen bir diğer mekanizma da perisinaptik astrosit uzantılarında glikojenolizin tetiklenmesidir. Astrositlerin özellikle de artmış enerji ihtiyacına cevap olarak dış ortama verdiği laktatın önemli bir kısmının kaynağının glikojen olduğu belirtilmektedir (4). Beyindeki glikojenin büyük ölçüde enerji ihtiyacının en fazla olduğu perisinaptik astrosit son ayaklarında lokalize olması, bu bölgenin mitokondriden fakir oluşu ve dolaşımdan gelen glikozun yüksek afiniteleri nedeniyle öncelikle glikojen sentezi yapan enzimler tarafından kullanılması, bölgede temel enerji ihtiyacının glikojen yıkımı aracılığıyla elde edilen glikozdan sağlandığını düşündürmektedir. Bir başka deyişle, dolaşımdan gelen glikoz önce glikojen olarak depolanmakta ve ihtiyaç olduğunda glikojenden serbestleştirilen glikozdan non-oksidatif olarak enerji üretilmektedir. Bu bulgu PET ve fMRI

çalışmalarında görülen aktiviteyle oksijenden daha fazla glikoz kullanımını açıklamaktadır (aerobik glikoliz, Warburg etkisi) (5).

Astrosit glikojenolizinin başta vazoaktif intestinal peptit (VIP) ve noradrenalin olmak üzere birtakım nörotransmitterler tarafından uyarıldığı bilinmektedir (6). VIP ve noradrenalin hücre içerisinde adenilat-siklaz yoluyla kullanarak glikojenolizi tetikler. Buna ek olarak adenozin ve ATP gibi belli nöromodülatörlerin (7, 8) ve hücre dışı K^+ iyon konsantrasyonunda aktivite bağımlı artışın (9) da astrositlerde glikojenolize yol açtığı ortaya konmuştur. Sonuç olarak, nöronal aktivitenin çeşitli nörotransmitterler ve nöromodülatörler aracılığıyla astrosit glikojen mobilizasyonunu uyardığı ve bu rezervlerin laktata çevrilerek nöronlara enerji substratı olarak sunulduğu düşünülmektedir (10).

Beyinde glikojen metabolizması üzerine yapılan araştırmalar, nöral aktivite sırasında hücre dışı boşlukta biriken potasyum iyonlarının (K^+) astrosit içerisine girişinin astrositte gerçekleşen glikojen yıkımına bağlı bir hadise olduğunu, glikojenoliz yoluyla enerji eldesi engellendiğinde astrositlerin hücre dışı potasyumu hücre içerisine alımının azaldığını göstermiştir (11). Benzer bir şekilde, astrosit hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar hücre dışı glutamatın astrositler tarafından alınmasının glikoz varlığına rağmen astrosit glikojenine bağımlı olarak gerçekleştiğini ortaya koymuştur (12). Tüm bu bulgular, astrosit uzantılarındaki glikojenolizin sinaptik aktivite sonucu artan hücre dışı K^+ iyonu ve glutamat konsantrasyonunu tamponlayarak sinaptik aktivitenin devamlılığını sağlamada önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir.

2.2. Astrosit glikojen metabolizması ve biyolojik etkileri

İnsan vücudunda glikoz, “glikojen” adlı dallanmış bir polimer şeklinde depo edilmekte, yapı ve işlevlerini glikoz oksidasyonuna bağlı olarak sürdüren hücrelerin enerji ve karbon ihtiyacı bu moleküler form sayesinde kolayca karşılanabilmektedir. Kasta depo edilen glikojen, fiziksel aktivite için gerekli enerjiyi sağlarken karaciğer glikojeni kan şekerini dengelemek için kullanılmaktadır. Glikojenin yapım ve

yıkımında temel rolü “glikojen sentaz” ve “glikojen fosforilaz” enzimleri üstlenir.

Memelilerde glikoz polimerlerinin sentezini katalizleyebilen tek enzim olan glikojen sentaz (GS)'ın kas izoformu (MGS-*muscular glycogen synthase*) ve karaciğere özgü izoform (LGS-*liver-specific glycogen synthase*) olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Bunlardan kas izoformu, GYS1 geni tarafından kodlanır ve birçok dokuda yer alır. Glikojen sentaz, glikojen molekülüne α -(1,4)-glikozidik bağlarla glikoz monomerlerinin eklenmesini katalize ederken, glikozil-(4,6) transferaz enzimi α -(1,6)-glikozidik bağlarla dallanmalar oluşturur. Bu şekilde sentezlenen glikojen molekülü, glikojen fosforilaz ve glikojen dallanmalarını kırıcı enzim tarafından parçalanarak enerji substratı olarak glikoz elde etmede kullanılabilir.

Glikojen yıkımından sorumlu glikojen fosforilaz enziminin memelilerde üç adet izoformu mevcuttur, bunlar kas glikojen fosforilazı (MGP-*muscle glycogen phosphorylase*), karaciğer glikojen fosforilazı (LGP- *liver glycogen phosphorylase*) ve beyin glikojen fosforilazı (BGP-*brain glycogen phosphorylase*) dir. Bunlar içerisinde beyin glikojen fosforilazının yanında kas glikojen fosforilazı da beyinde ifade edilmektedir (13).

Beyin enerji metabolizmasında kritik bir role sahip olan glikojenin sentezi ve yıkımı çeşitli yollarla sıkı bir denetim altındadır. Glikojen sentaz enzim aktivitesi fosforilasyon ve glikoz-1-fosfat tarafından allosterik aktivasyon gibi birçok mekanizma tarafından kontrol edilir. Bunun yanında glikojen hedefli protein (PTG-*protein targeting to glycogen*) adı verilen bir protein fosfataz enzim alt ünitesinin de defosforilasyon yoluyla glikojen sentazın aktivasyonunda kilit bir rol oynadığı bilinmektedir (14). Glikojen fosforilaz enzim aktivitesi de benzer şekilde fosforilasyon ve allosterik aktivasyon yollarıyla düzenlenir. Kas glikojen fosforilazı temel olarak fosforilasyon yoluyla aktive olduğundan hücre dışı sinyallere cevap vermekte görev alırken, beyin glikojen fosforilazı AMP seviyelerindeki artışlara oldukça hassas olduğundan hücre içi enerji ihtiyacına cevap vermeye daha uygundur (15).

2.2.1. Perisinaptik astrosit glikojen metabolizmasının nöroinflamasyondaki rolü

Astrositlerde glikojenolizin engellenmesi veya glikojen sentezi ile yıkımı arasındaki dengenin sentez yönüne kayması, perisinaptik enerji ihtiyacı ile tedariki arasında bir dengesizliğe sebep olur. Bu durumun ise transmembran glutamat, K⁺ ve Ca⁺ konsantrasyon farkının fizyolojik koşullara geri döndürülmesine engel olduğu, bunların da nöronal Panx-1 kanallarının açılmasına ve buna bağlı inflamatuvar yolakların aktivasyonuna (prokaspaz-1'den kaspaz-1'e geçiş, nöronlardan HMGB-1 salınımı) sebep olduğu gösterilmiştir (16).

2.2.2. Perisinaptik astrosit glikojen metabolizmasının majör depresyon ile ilişkisi

Son yıllardaki birçok çalışma, astrosit işlev kaybının majör depresyon patofizyolojisinde önemli bir yere sahip olduğunu düşündürmektedir. Majör depresyon hastalarının beyinlerinde yapılan ölümardı incelemelerde subgenual prefrontal korteks, orbitofrontal korteks, dorsolateral prefrontal korteks, anterior singulat korteks ve amigdalada glial hücre yoğunluğunun azaldığı ortaya konmuştur (17, 18, 19, 20).

Diğer bir yandan, depresyon patogenezinde stresin kilit bir role sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar hem akut hem de kronik strese maruz kalmanın glikojen metabolizması üzerinde etkileri olduğunu göstermektedir. Stres, kortekste hücre dışı glutamat konsantrasyonunu artırarak astrositlerde glikojenolizi ve sinapslarda kullanılmak üzere laktat üretim ve salınımı tetiklemektedir (21, 22, 23, 24, 25). Bu çalışmalarla uyumlu bir şekilde, akut psikolojik stresörlerin ("hareketsiz bırakma ve ayağa elektrik şoku verme) hipokampus, bazolateral amigdala ve medial prefrontal kortekste hücre dışı laktat konsantrasyonunu arttırdığı (26, 27, 28, 29, 30), kronik strese veya kronik kortikosterona maruz kalmanın ise hipokampal glikojen seviyesinde azalmaya sebep olduğu (31) ortaya konmuştur. Ayrıca hipokampusta glikojen sentaz aktivitesinin azaltılmasının (*knockdown*) sıçanlarda astrosit soma

hacminin azalmasına ve depresif-benzeri davranışa neden olduğu da gösterilmiştir (32).

Perisinaptik astrosit glikojen metabolizmasının majör depresyon patogeneğinde bir role sahip olabileceğini düşündürten nedenlerden bir tanesi de stres cevabında ve antidepresanların etki mekanizmalarında rol alan noradrenalin, glukokortikoidler, serotonin (5HT) ve adenozin gibi nöromodülatör moleküllerin glikojen döngüsündeki düzenleyici etkileridir. Noradrenalin nöronal aktivitenin durgun olduğu dönemlerde α 2-adrenerjik reseptörlere bağlanarak glikojen sentezini uyarmakta, artmış nörotransmisyon durumunda ise β 1-adrenerjik reseptörleri aracılığıyla glikojen yıkımını uyarmaktadır (33, 34). Glukokortikoidler ise astrositlerde glikojen yıkımını uyarmakta (35) ve tip 2 glukokortikoid reseptörleri aracılığıyla noradrenalinin glikojen sentezini tetikleyici etkisini inhibe etmektedir (36). Birçok antidepresanın etki mekanizması içinde rolü olan serotonin ise, 5HT-2A ve 5HT-2B reseptörleri aracılığıyla glikojen yıkımını uyarmaktadır (37, 38). Astrosit-nöron metabolik kenetlenmesinde enerji kaynağı olarak kullanılan glikojen sinaplara, daha önce bahsedildiği üzere laktat şeklinde ulaştırılmaktadır. Laktatın antidepresan özellik gösterebileceği ve strese dayanıklılığı arttırdığı yönünde çeşitli çalışmalar mevcuttur. Akut intraperitoneal laktat uygulamasının, kemirgenlerde davranışsal umutsuzluk göstergesi olan zorla yüzdürme testinde hareketsiz geçirilen süreyi bir trisiklik antidepresan olan desipramin ile benzer ölçüde azalttığı gösterilmiştir (39). Ayrıca, sosyal yenilgi stresi uygulanan hayvanlara stresten dört saat önce intraperitoneal laktat verilmesinin sosyal yenilgi stresine dayanıklılık yarattığı ve anksiyete seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir (40).

2.2.3. Perisinaptik astrosit glikojeni ile ilişkilendirilen diğer fizyolojik ve patolojik durumlar

Beyinde sinaptik bölgenin artmış enerji ihtiyacının önemli bir kısmının astrositlerde glikojenoliz ile karşılandığı, bu nedenle bölgede glikojen stoklarının azalması veya glikojenin metabolize edilememesinin birtakım patolojileri

beraberinde getirebileceği düşünülmektedir. Beyin glikojeninin duyuşsal uyarım (41, 42, 43), uyku-uyanıklık döngüsü (44, 45, 46, 47, 48) gibi spesifik nöral aktivite­lerin yerel enerji ihtiyacını desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca glikojenin stres ve hipoglisemi gibi patolojik koşullar (41, 49, 50), yorucu egzersiz (51), iskemi (52) ve nöbet (53, 54) durumlarında da koruyucu olduğu ortaya konmuştur.

Astrosit glikojeninin yerel enerji desteği sağladığı bir diğ­er spesifik nöral aktivite de bellek oluşumudur. Sinir sistemine özgü olmak üzere glikojen sentaz enzimini ifade etmesi engellenen transgenik farelerde yapılan çalışmalarda, beyin glikojeninin ilişki­sel öğrenme ve buna bağılı olarak hipokampal sinaptik bağılantı gücü üzerinde önemli bir görev üstlendiği gözlenmiştir. Ayrıca glikojen üretiminin gerçekleşmemesinin hipokampal sinapslarda öğrenmeyle ilişkilendirilen uzun süreli güçlendirme (*LTP-long-term potentiation*) ile doğrudan bağılantılı olduğu, sonuç olarak öğrenme kapasitesi ile hipokampal sinaps bağılantı gücünde görülen aktivite bağımlı değışikliklerde yadsınamaz bir rolü olduğu ortaya konmuştur (55). Buna ek olarak, öğrenmenin sıçan hipokampusundaki hücre dışı laktat seviyelerinde önemli bir artışa sebep olduğu ve bu laktatın kaynağının astrosit glikojeni olduğu rapor edilmiştir. Glikojenin yıkımını katalizleyen glikojen fosforilaz enziminin, 1,4-dideoksi-1,4-imino-D-arabinitolün (DAB) hipokampusa iki taraflı enjeksiyonuyla inhibe edildiği sıçanlarda *in vivo* uzun süreli güçlendirme ve uzun-süreli bellek oluşumunun bozulduğu; bu etkilerin L-laktat enjeksiyonu ile geri döndürülebildiği görülmüştür. Bunun yanı sıra astrosit glikojen yıkımı ve laktat salınımının uzun-süreli bellek oluşumu üzerindeki etkilerinin fosfo-CREB, Arc ve fosfokofilin gibi transkripsiyon faktörleri ve proteinlerin üretiminin tetiklenmesi üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (56).

2.2.4. Glikojenoliz inhibisyonu

Astrosit uzantılarında enerji tedarikini engellemenin en etkili yollarından biri, glikojen yıkımını sağlayan “glikojen fosforilaz” enzimini inhibe etmektir. Glikojen fosforilazın farmakolojik inhibisyonu için izofagomin, DAB ve CP-316,819

kullanılabilir .

Bu ajanlardan izofagominin fare serebral korteks astrosit kültür homojenatlarında 3,3 µM civarında bir IC50 değeriyle potent bir enzim inhibisyonu yaptığı tespit edilmiştir (57). Buna rağmen, astrosit hücre zarından geçiş kısıtlılığından dolayı, intakt astrositlerde glikojen yıkımını tamamıyla inhibe etmek için çok daha yüksek konsantrasyonda izofagomin kullanılması gerektiği saptanmıştır (57). Bu nedenle astrositlerde glikojen fosforilaz inhibisyonu için bir alternatif olarak 1,4-dideoksi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB) tercih edilmeye başlanmıştır (58). DAB'ın kullanımının da zardan geçiş kısıtlılığı nedeniyle zor olduğunun görülmesine rağmen 1 saat civarı bir preinkübasyon periyodu uygulandığında 300 ile 1000 µM arasındaki konsantrasyonlarda glikojen fosforilaz aktivitesinin neredeyse tamamen inhibe olduğu ortaya konmuş, glikojen metabolizmasını değerlendirmek için DAB'ın daha kullanışlı bir seçenek olduğu sonucuna varılmıştır (58). Buna karşın, DAB'ın sistemik olarak verildiği hayvanlarda glukagonla uyarılan glikojenolizi inhibe etmek suretiyle yol açtığı anti-hiperglisemik etkileri (59) ve sıçan hepatosit kültürlerinde etkin glikojen fosforilaz inhibisyonu yaptığı için kan şekeri düzenlenmesini bozabileceği yönündeki bulgular (60) sebebiyle, hipoglisemik yan etkileri görmemek adına sistemik değil lokal yolla verilmesi tercih edilmiştir.

İzofagomin ve DAB'ın yanında, beyinde glikojenin işlevlerini değerlendirmek için kullanılan bir diğer fosforilaz inhibitörü de 5-kloro-N-[(1S,2R)-2-hidroksi-3-(metoksimetilamino)-3-okso-1-(fenilmetil)propil]-1H-indol-2-karboksamid dir(CP-316,819) (61, 62, 63, 64, 65). CP-316,819'un izofagomin ve DAB'dan farkı, glikojen fosforilaz üzerindeki inhibitör etkisinin sadece glikoz varlığında söz konusu olmasıdır (62). Başka bir deyişle, CP-316,819 hayvanlara veya astrosit kültürlerine normoglisemik koşullarda verildiğinde glikojen stoklarının artmasına sebep olurken, hipoglisemik koşullarda glikojen fosforilaz üzerinde inhibitör etkisi gözlenmeyeceğinden glikojen yıkımı gerçekleşecektir (62).

2.3. Majör Depresif Bozukluk ve Nöroinflamasyon

2.3.1. Majör Depresif Bozukluk

Majör depresyon, çeşitli duygusal (çökkünlük, hayattan zevk almama, suçluluk hissi ve değersizlik düşünceleri), bedensel (iştah ve uyku düzeninde değişiklikler, artmış ya da azalmış aktivite) ve zihinsel değişikliklerin (dikkat sorunları ve odaklanma güçlüğü) eşlik ettiği, umutsuz ruh hali ve ölüm düşünceleriyle seyreden yaygın bir ruhsal hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya genelinde 264 milyondan fazla insan depresyonla yaşamaktadır (66). Depresyon, hem farklı gelir düzeyindeki ülkelerde ve kültürlerde (67) hem de çocukluktan yaşlılığa neredeyse her yaş grubunda görülmektedir (68).

Hastalıkların toplum üzerindeki etkisini değerlendirmede en temel kıstaslardan bir tanesi, hastalığa bağlı yeti yitimi ile yaşanan yıllardır (YYY-*years lived with disability*). Psikiyatrik bozukluklar ve madde bağımlılıkları % 22,9 ile dünya çapında en yüksek YYY oranına sahiptir. Bu grup içinde en büyük pay ise %42,5 ile depresif bozukluklara aittir (68). Özellikle uzun süren ağır majör depresyon vakalarında ciddi bir hastalık yükü oluşmakta, hastanın günlük yaşamı, iş performansı, aile ve arkadaş ilişkileri önemli ölçüde etkilenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü 2020 verilerine göre, her yıl 800.000 kişi intiharla hayatını kaybetmektedir. İntihar, 15-29 yaş arası popülasyonun ikinci en sık ölüm nedenidir (66).

Üretime katılan yaş grubunda oldukça yaygın görülen depresyon (68), hasta ve hasta yakınları üzerindeki yıkıcı etkisinin yanında topluma da büyük bir ekonomik yük getirmektedir. 2010 yılında depresyonun Amerika Birleşik Devletleri'ne maliyeti; doğrudan depresyonla ilgili yapılan harcamalar, intihar düşünceleriyle ilişkili ve işe gidememe kaynaklı işgücü kaybı bir arada değerlendirildiğinde 210,5 milyar dolar civarı olmuştur (69).

Günümüzde depresyon tedavisinde en sık başvurulan yöntemler ilaçlar, psikoterapi ve seçilmiş vakalarda elektrokonvülf terapi (EKT). Majör depresif

bozukluk, hastaların yaklaşık %15'inde süregelen seyretmekte, %35'inde ise tedaviden sonra tekrarlamaktadır. İlk depresyon atağından sonra hastaların sadece yarısı tamamen iyileşmektedir (70). Buna ek olarak, çoğu tedavi yönteminin etkilerinin ancak zamanla ortaya çıktığı ve belli bir yan etki profili ile kontraendikasyonlara sahip olduğu da göz önünde bulundurulursa, depresyon tedavisinde alınacak uzun bir yol olduğu fark edilecektir. Bu nedenle, depresyon patofizyolojisini aydınlatmak, tanı ve tedavide elimizi güçlendirecektir.

2.3.2. Majör Depresif Bozukluk Patofizyolojisi

Majör depresyon patogenezinde esas rol, özellikle erken dönemlerde serotonin ve noradrenalin gibi monoamin nörotransmisyonuna atfedilmiştir (71, 72). Bunun sebebi, tipik antidepresanların serotonin ve noradrenalin gibi monoaminlerin geri alımı ve metabolizması üzerine kanıtlanmış etkileridir (73). Hem hayvan depresyon modellerinde hem de majör depresif bozukluk hastalarının beyinde glutamat ve GABA'erjik transmisyonunda bildirilen değişiklikler depresyon patogenezinde bu nörotransmitterlerin ve eksitasyon/inhibisyon dengesinin olası rolüne dikkat çekmiştir (74, 75, 76). Bir grup çalışmada ise strese yanıt olarak aktive olan "hipotalamo-pitüiter-adrenal aks"ın (HPA) ve bu aksa bağlı olarak kanda glukokortikoid seviyesinin artmasının majör depresyon patogenezinde rol oynayabileceği savunulmuştur (77, 78).

Nörogörüntüleme çalışmaları majör depresyon hastalarının prefrontal korteks ve hipokampuslarında hacim azalmasına işaret etmekte, bu durum bahsedilen bölgelerdeki nöronal/dendritik atrofisinin de patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir (79, 80, 81). Psikolojik ve çevresel stres paradigmaları içeren hayvan modelleri, stresin kemirgen prefrontal korteks ve hipokampusunda dendritik karmaşıklık ve diken yoğunluğunun azalmasına sebep olduğunu göstermiştir (82, 83). Bu modellerdeki sinaptik diken kaybı majör depresyon hastalarının prefrontal korteks ve hipokampuslarında sinaps ile alakalı genlerde görülen ifade azalması ile uyumludur (84, 85). Prefrontal korteks piramidal nöronlarında görülen bu atrofiye

karşın, strese maruz kalmanın amigdalaadaki bir grup nöronda dendritik dallanmayı arttırdığı ortaya konmuştur (86).

Tüm bu çalışmalar, stres ile tetiklenen nöroendokrin ve nörotransmitter sistemlerdeki değişikliklerin moleküler, hücresel ve sinaptik mekanizmalar üstünden yatkın bireylerde majör depresyon gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Günümüzde ise bunların yanında, nöroinflamasyonun da majör depresyon etiolojisinde önemli bir yeri olduğu görüşü gittikçe önem kazanmaktadır.

2.3.3. Nöroinflamasyon

Beyin ve spinal korddaki inflamatuvar cevaplara nöroinflamasyon denir. Nöroinflamasyon genellikle negatif ve maladaptif süreçlerle ilişkilendirilse de nöroinflamasyonun belirli seviyelerinin öğrenme ve bellek işlevleri gibi fizyolojik işlevler için hayati olduğu ve merkezi sinir sistemi hasarının iyileşmesine işlevsel destek sağladığı gösterilmiştir (87, 88).

Nöroinflamasyon sitokin, kemokin, reaktif oksijen türleri ve ikincil mesajcıların üretimi vasıtasıyla meydana gelir. Bu medyatörler merkezi sinir sisteminde yerleşik glialar (astrozit ve mikroglialar), endotel hücreleri ve periferik immün sistem hücreleri tarafından üretilir; gösterilen yanıt ise fizyolojik, biyokimyasal ve psikolojik sonuçlar doğurur. Nöroinflamasyonun seviyesi uyarıcının özelliklerine, inflamasyonun beyin üzerindeki etkileri ise şiddetine bağlıdır. Bazı koşullarda inflamasyon merkezi sinir sistemine periferik immün sistem hücrelerinin çağırılmasına, ödem, doku hasarı ve hatta hücre ölümüne sebep olabilir (88).

Günümüzde nöroinflamasyonun travmatik beyin hasarı (88); Alzheimer, Parkinson, ALS gibi nörodejeneratif hastalıklar (89); epilepsi (90); migren (16) ve depresyon gibi birçok nöropsikiyatrik bozukluğun patogenezinde rol oynadığı kabul edilmektedir. Nöroinflamasyonun en önemli yerel aktörleri ise merkezi sinir sisteminde konumlanmış immün hücreleri olan mikroglialardır.

- Mikroglial hücreler ve işlevleri

Mikroglialar, nöral gelişimin erken dönemlerindeki yolk-kesesi myeloid hücre projenitörlerinden köken alan beyine-yerleşik makrofaj hücreleridir (91). Mikrogliaların temel fizyolojik işlevleri nöral gelişim sırasında nöronlar ve öncül hücrelerinin kaderinin belirlenmesi ile apoptotik hücrelerin fagositozu (92, 93), erişkin dönemde ise yenidoğan öncül nöral hücrelerin (94) ve normal sinaptik gelişim sırasında sinapsların fagositozu (95, 96), dallanmış hücre uzantılarının dinamik bir şekilde uzaması ve çekilmesi yoluyla sinapsların monitorizasyonudur (97, 98). Bu fonksiyonların yerine getirilememesi, nöronal işlev bozukluğu ile seyreden birçok gelişimsel hastalığa sebep olabilmektedir (99).

In vivo görüntüleme çalışmaları mikrogliaların kendine özgü bir morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir. Mikroglialar ince uzantıları ile nöronal mikroçevreyi birçok moleküler sinyal açısından (ATP gibi) dinamik olarak tararlar (100). Aktive olduklarında ise hipertrofik bir hücre gövdesi ile geri çekilmiş, yoğunlaşmış hücre uzantılarından oluşan bir morfolojiye bürünürler. Buna ek olarak, aktive mikroglialar sitokinler ve prostaglandinler gibi diğer ikincil mesajcıların işlenmesi ve salınımı ile sonuçlanan birtakım transkripsiyonel değişiklikler gösterirler (101, 102). Mikrogliaların bu özellikleri sayesinde hem homeostatik hem de stres durumlarında nöronların sağlığı ile fonksiyonlarını takip eden ve şekillendiren immün sistem alıcıları (*sensor*) olarak işlev gördüğü düşünülmektedir.

Beyinde fizyolojik ve patolojik birçok koşulla bağlantısı olduğu düşünülen mikroglialar üzerine yapılan araştırmalar, farklı beyin bölgelerinde mikroglial işlevlerin heterojen bir doğaya sahip olduğunu ve bölgeye özgül cevaplar gösterdiğini ortaya koymuştur. Mikroglialardan salınan sitokin veya nörotrofik faktör miktarları ve reseptör seviyeleri beyin bölgeleri arasında farklılık göstermekte, bu durum çeşitli beyin bölgelerindeki nöronlar üzerinde birbirinden farklı etkilerin görülmesine sebep olmaktadır (103).

- Mikroglia formları

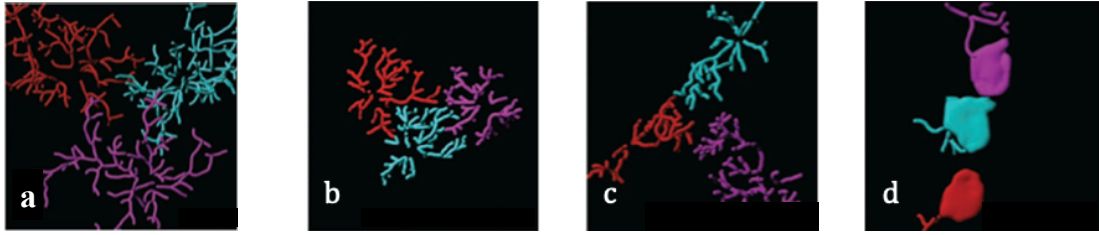
Son yıllarda yapılan görüntüleme çalışmaları, mikrogliaların oldukça dinamik, çevre koşulları ve algılanan kimyasallara göre değişik fenotipler gösterebilen hücreler olduğunu ortaya koymuştur (100, 104, 105).

Naif merkezi sinir sisteminde mikroglialar, küçük bir hücre gövdesi ve uzun dallanmış uzantılar ile karakterize “ramifiye” fenotipte bulunur. Bu mikrogliaların hücre gövdesi sabit olup uzantıları sürekli hareket halinde etrafı tarar (106, 107) (Şekil 2.2.a). Mikroglia dinamiğini inceleyen *in vitro* çalışmalarda, akut kortikal beyin dilimlerinde floresan işaretli mikrogliaların dilimin kesildiği tarafa hareket ettiği ve uzantılarını bu yöne uzatarak hasara cevap verdiği gözlenmiştir (108). Ayrıca, beyin dokusunun hasarlı kısmında ölü hücreleri fagosite eden mikroglialar saptanmıştır. Bu bulgular, hipokampal dilim kültürlerinde de doğrulanmış; doku hasarına yanıt olarak mikrogliaların önce uzantılarını çektiği sonra da dinamik bir süreçle oluşturduğu yeni uzantı vasıtasıyla hasar yönüne hareket ettiği ortaya konmuştur. Başka bir deyişle, klasik hasar yanıtı kapsamında mikroglialar hasar yönünde birçok uzantı oluşturup diğer tüm yönlerdeki uzantılarını hücre gövdesine çekerek ramifiye formdan ameboid görünümlü bir morfolojiye geçiş yapar. (109, 110) (Şekil 2.2.c).

Steril hasara verilen yanıtın aksine, merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına çok daha farklı bir mikroglia morfolojik dönüşümü eşlik eder. Merkezi sinir sisteminin sitopatik olmayan lenfositik koryomenenjit virüsü (LCMV) ile enfekte edilmesinin, mikrogliaların yerel değil yaygın aktivasyonuna neden olduğu görülmüştür. Bu kapsamda mikroglia uzantıları kısalır ve daha az karmaşık bir hale bürünür ancak dallanmış yapısını korur. Bu morfolojik dönüşümün interferon-1 sinyal yolağıyla bağlantılı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir (111) (Şekil 2.2.b).

Astrosit ve diğer hücrelerin nekrotik hücre ölümüne cevaben ise mikroglialar, hasarlı hücreye doğru uzantı oluşturup diğer tüm uzantılarını hücre gövdesine çeker ve fagositik özellik kazanır. Fagositik uzantılara sahip olan bu mikroglialar, hücresel

artıkları temizlerken sabit kalabildiği gibi süreci hızlandırmak için hareket de edebilir (112) (Şekil 2.2.d).



Şekil 2.2. Mikroglia morfolojik formları. a) Naif mikroglialar b) Yaygın aktivasyon durumunda mikroglialar c) Yerel aktivasyon halinde mikroglialar d) Fagositik mikroglialar (112)

Bunların yanında, Alzheimer patolojisinde gözlemlenen işlevlerini kaybetmiş “distrofik” mikroglialardan da söz etmek mümkündür. Bu morfolojik fenotipte mikrogliaların şiştiği, uzantılarının inceldiği ve dallanmalarının azaldığı görülmüştür (113).

- Mikrogliaların nöron koruyucu işlevleri

Mikroglialar oldukça hareketli uzantıları ile merkezi sinir sistemi parankimasını her an teftiş eder ve dokuda görülen bozukluklara cevap veren hasar algılayıcıları gibi davranırlar (114). Mikrogliaların bu yapısal ve işlevsel esnekliklerini kontrol eden hücresel ve moleküler mekanizmalar ise henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir (115, 116). Bu konuda çalışmalar ağırlıklı olarak mikroglia uzantıları ve nöronal sinapslar arasındaki etkileşime odaklanmış, aktiviteye bağlı sinaptik plastisite ve sinaps eliminasyonundaki etkileriyle mikrogliaların hem sağlık hem de nörodejeneratif hastalık durumlarındaki rolüne değinilmiştir (117). Buna ek olarak, mikroglial uzantıların nöronal soma ile ilişkisi fare ve insan beyinde varlığı gösterilmiş belirgin özelliklerinden bir tanesidir. Bu özelleşmiş ilişkinin hasar sonrası nöronların korunmasında etkin olduğu, bu koruyucu cevabın engellenmesinin hücre kaybını arttırdığı gösterilmiştir (118).

Merkezi sinir sisteminin rejeneratif özelliklerinin sınırlı olduğu göz önünde bulundurulursa, nöronların ölmeleri durumunda yerlerinin doldurulamayacağı düşünülebilir (119). Beyindeki iç veya dış kaynaklı zararlı etmenlere, kan-beyin

engelinin bozulmasıyla parankime kandan çeşitli istenmeyen moleküllerin sızması veya viral infeksiyon gibi birçok tehdite karşı nöronları korumakta temel görev mikroglialara düşmektedir. Eğer söz konusu tehdit engellenemiyorsa ve bir nöron ciddi anlamda hasar görmüş veya işlevini yitirmişse, nöronu kurtarmanın mı yoksa hasarın komşu nöronları da etkilemesini engellemek amacıyla nöronu ortadan kaldırmanın mı daha doğru olacağına karar vermek yine mikroglialara düşmektedir (114).

Bu durumda hasar görmüş nöronal hücrelerin kaderine karar verirken mikroglialar, çözünebilir veya membrana-bağlı birtakım sinyallerden faydalanır (120). Bu habercilerin en önemlilerinden bir tanesi adenosin trifosfat (ATP) ve onun adenosin difosfat (ADP) gibi metabolitleridir. Hasar görmüş veya strese girmiş hücrelerin sebep olduğu yüksek hücre dışı ATP ve ADP konsantrasyonu, mikroglialarda bulunan P2Y pürinoseptör 12 (P2Y12 reseptörü) gibi pürinerjik reseptörler tarafından algılanır. Dolayısıyla yüksek hücre dışı ATP ve ADP konsantrasyonu, mikrogliaların hasarın yerini belirlemesi için gerekli sinyali oluşturur. Fizyolojik koşullarda ise genellikle düşük konsantrasyonlarda ATP salınmaktadır, buna sinapslarda kotransmitter olarak ATP salınımı örnek gösterilebilir (115, 116). Yapılan çalışmalar, nöron gövdelerinden aktiviteye bağlı olarak ATP salınımının hem kortekste hem de derin beyin bölgelerinde yaygın olarak rastlanan bir durum olduğunu, nöronların çevrelerindeki mikroglialarla bu şekilde iletişim kurduğunu ortaya koymuştur (118).

- Mikrogliaların nöroinflamatuvar yanıtı

Hem nöral gelişim hem de erişkin nörojenezi esnasında programlı hücre ölümünün kararlaştırılması; sinaps gelişimi, olgunlaşması, eliminasyonu ve homeostazi (95, 121) gibi önemli fizyolojik görevleri yerine getiren mikroglialar, stres durumunda nöroinflamatuvar süreçlere yönelir. Mikroglialarda gerçekleşen nöroinflamatuvar süreçlerin genel olarak “NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3 (NLRP3)” inflamazomu oluşumunda birleştiği söylenebilir. NLRP3 inflamazomu,

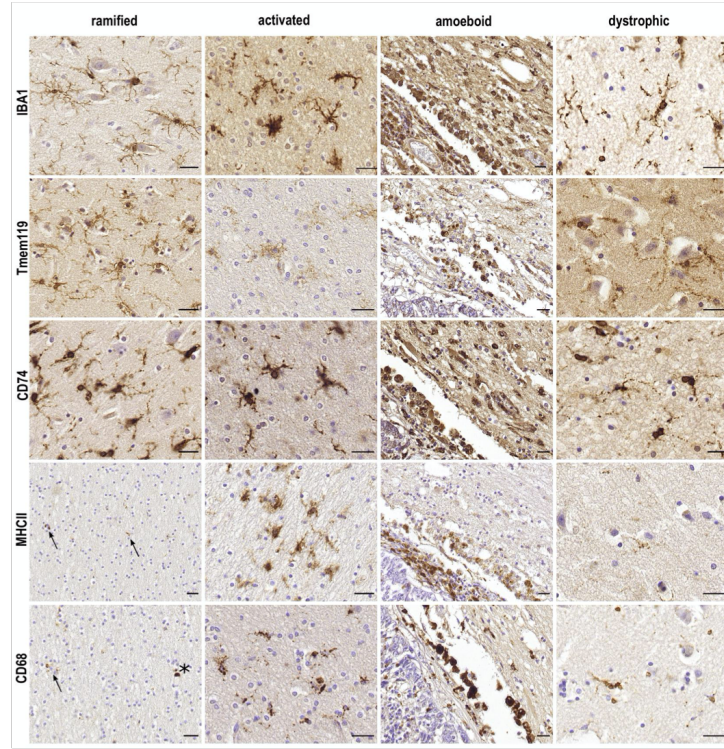
enfeksiyöz ajanlar ve hastalıklarla ilişkili süreçler tarafından olduğu kadar (122), psikososyal veya çevresel stresörler gibi endojen (steril) hasar sinyalleri tarafından da aktifleştirilebilir. Bu şekilde tetiklenen inflamazom, kaspaz-1'in aktivasyonunu düzenler ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin aktif formlarına dönüştürülerek salınımına sebep olur.

Stres tarafından NRLP3 inflamazomunun aktivasyonu vasıtasıyla tetiklenen IL-1 β sinyal yollarının nöronlarda NF- κ B aktivitesini arttırdığı ortaya konmuştur (123). Ayrıca stresle ilintili nöroinflamatuvar medyatörlerin, özellikle de IL-1 β 'nın hipokampal nörogenezi azalttığı ve farelerde depresif-benzeri davranışsal ve bilişsel değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (124, 125, 126).

- Mikroglia belirteçleri

Merkezi sinir sistemi patolojilerinde önemli bir role sahip olan mikrogliaları işaretlemek için günümüzde birçok belirteç kullanılmaktadır. Mikrogliaların immunohistokimyasal analizleri için en yaygın kullanılan belirteç iyonize kalsiyuma bağlanan adaptör molekül 1'dir (*Iba1-ionized calcium-binding adapter molecule 1*). Mikrogliaların dört işlevsel fenotipini (ramifiye, aktive, ameboid ve distrofik) de güvenilir şekilde işaretleyen Iba-1'in, ayrıca periferik makrofajları da işaretlediği bilinmektedir. Allograft inflamatuvar faktör 1 (AIF1- *allograft inflammatory factor*) geni tarafından kodlanan AIF1 sitoplazmik proteinini işaretleyen Iba-1'in ifadesinin aktive mikroglialarda arttığı görülmüştür (127). Diğer bir mikroglia belirteci ise bir hücre yüzeyi proteini olan ve mikroglialara spesifik olup makrofajları işaretlemeyen TMEM119'dur. Ayrıca G-proteini kenetli pürinerjik bir reseptör olan P2RY12, endoplazmik retikulumdan hücre yüzeyine taşınırken majör histokompatibilite kompleksi II (MHCII- major histocompatibility complex II) moleküllerinin peptitlere bağlanan kısmını bloke etmek için gerekli bir zincir olan CD74, T lenfositlere antijen sunan mikrogliaların ifade ettiği MHCII ve bir lizozomal belirteç olan CD68 de mikrogliaları işaretlemek için kullanılabilen başlıca belirteçler arasında yer almaktadır (127). Bahsedilen belirteçler ile işaretlenen farklı mikroglia fenotiplerinin

örnek görselleri aşağıdaki gibidir.



Şekil 2.3. Mikroglia belirteçleri ile işaretlenmiş farklı mikroglia fenotipleri. Iba-1, TMEM119, CD74, MHCII ve CD68 belirteçleri, mikrogliaları işaretlemek ve fenotiplerini birbirinden ayırtmak için kullanılabilir (127).

- Nöroinflamasyonun Majör Depresyon Patogenezindeki Rolü

Son yıllardaki klinik gözlemler, majör depresyon etiolojisinde immün disregülasyonun olası rolünü düşündürmektedir. Majör depresif bozukluğun sıklıkla diyabet, kanser, romatoid artrit, sistemik lupus eritematosus ve multipl skleroz gibi sistemik inflamatuvar hastalıklarla komorbid olarak görülmesi, depresyon hastalarının kanlarında granüosit ve monositlerin sayıları ve akut faz proteinlerinin seviyesinin kontrollerden daha yüksek saptanması depresyonun inflamasyonla bağlantısı olduğunu düşündürmektedir (128, 129, 130, 131). Ayrıca, psikolojik stresin insanda periferik inflamasyonu arttırdığı (132, 133) ve majör depresyon hastalarının kanlarında IL-1 β seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (134). Antidepresan veya elektrokonvülfif şok ile tedavi edilen majör depresyon hastalarında ise, bazı proinflamatuvar belirteçlerin normal seviyelerine gerilediği gözlenmiştir (135, 136, 137, 138). Birçok çalışma majör depresyonun periferik

inflamasyonla ilişkisi üzerine kurulu olsa da, inflamatuvar belirteçlerin beyin-omurilik sıvısındaki seviyelerini değerlendirerek yapılan çalışmalar depresyonu santral inflamasyonla da ilişkilendirmiştir (139, 140).

Mikrogliaların majör depresyon patofizyolojisi üzerindeki olası rolü üzerine kanıtların bir kısmı ise, aktive olmuş mikroglialar ve reaktif astrositler tarafından yüksek miktarda ifade edilen ve PET (positron emisyon tomografisi) yardımıyla miktarı tayin edilebilen *translocator protein* (TSPO) ile yapılan çalışmalardan gelmektedir (141). Majör depresyon hastalarında TSPO yoğunluğunun sağlıklı kontrollerden yüksek olduğu görülmüş, TSPO bağlanması ile depresyonun şiddeti arasında bir pozitif korelasyonun varlığı savunulmuştur (142). TSPO'nun dolaylı bir nöroinflamatuvar belirteç olarak kullanıldığı bir diğer çalışmada ise, TSPO'ya PET radyoligand bağlanmasının tedavi edilmeyen depresyon hastalarında en yüksek seviyede olduğu, ilaç tedavisi alan depresyon hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TSPO bağlanmasının daha düşük olduğu ve kendi içinde anlamlı bir fark göstermediği ortaya konmuştur (143).

Tüm bu klinik ve prelinik çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, majör depresyon patofizyolojisini açıklamada ve olası tedavi hedeflerini belirlemede nöroinflamatuvar süreçlerin oldukça umut vadeci olduğu görülmektedir.

2.4. Doku Şeffaflaştırma ve *Light Sheet Fluorescence Microscopy* (Işık Tabakası Floresan Mikroskopisi)

Dokular üzerinde çalışabilmek amacıyla uzun süredir kullanılan klasik histoloji teknikleri ile tüm organın incelenmesi mümkün olmadığından, araştırmacının gözlemleri dokunun örneklenen kısımlarıyla kısıtlı kalmakta; bu durum ciddi miktarda veri kaybına yol açarak hatalara sebebiyet verebilmektedir. Bu nedenle, organizmaların işleyişleri ile patolojilerinin tarafsız ve kapsamlı bir şekilde araştırılabilmesi için günümüzde doku şeffaflaştırma teknikleri yardımıyla tüm organ görüntülemeleri önem kazanmıştır. Geliştirilen şeffaflaştırma teknikleri, ışık tabakası floresan mikroskopisi ve otomatize görüntü analizi yaklaşımları ile

birleştirildiğinde, geleneksel histoloji tekniklerine kıyasla çok daha fazla veri oldukça hızlı ve düşük maliyetli bir şekilde üretilebilmektedir. Bunun yanında, doku şeffaflaştırma yöntemleri tüm organın seçilen antikorlarla işaretlenmesine izin verdiği için hücre altı seviyede sistemli bir şekilde kapsamlı veri elde edilmesini mümkün kılmaktadır (144).

Günümüzde doku şeffaflaştırmakta kullanılan yaklaşımlar hidrofobik, hidrofilik ve hidrojene dayalı yöntemler olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadır. Bahsedilen yöntemler lipidlerin, pigmentlerin ve kalsiyum fosfatın dokudan uzaklaştırılması (delipidasyon, dekolorizasyon ve dekalsifikasyon) yoluyla örneklerin neredeyse tamamen şeffaf bir forma ulaşması prensibine dayanmaktadır (144). Çözücüye dayalı yöntemler olarak da adlandırılabilen hidrofobik yaklaşımlar suyun uzaklaştırılması, yağın uzaklaştırılması ve kırıcılık indisi eşleştirilmesi olmak üzere üç ana basamak içermektedir. Bunlardan suyun uzaklaştırılması basamağı hidrofobik şeffaflaştırma yöntemleri için ayırt edici basamaktır, yağın da uzaklaştırılmasıyla birlikte biyolojik dokularda en fazla bulunan iki kimyasal bileşen olan su ve yağ dokudan uzaklaştırılmış olmaktadır (145). Suyun kırıcılık indisi (1.33) (146) dokunun kalan kısmının kırıcılık indisinden (~ 1.55) oldukça farklı olduğundan suyun yerine, kırıcılık indisi kalan dokunun kırıcılık indisine daha yakın olan bir sıvının geçirilmesi, ışığın saçılımını azaltmaktadır (147).

Hidrofobik şeffaflaştırma yöntemlerinden iDISCO (*immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs*, çözücüyle şeffaflaştırılan organların immün işaretlemeye izin veren üç boyutlu görüntülenmesi), nörobilim araştırmalarında ilgilenilen proteinin tüm dokuda çalışılmasını mümkün kılmaktadır. Fare beyin ve spinal kordunun kesit alınmadan şeffaflaştırılması ve görüntülenmesi için Ali Ertürk ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3DISCO (*3D imaging of solvent-cleared organs*, çözücüyle şeffaflaştırılan organların 3 boyutlu görüntülenmesi) yöntemini (148, 149) takiben Reiner ve arkadaşları tarafından otofloresans azaltılıp sinyal-gürültü oranı artırılarak örneğin immün işaretlenme koşullarının iyileştirildiği iDISCO prosedürü geliştirilmiştir (150). Bu protokol dahilinde metanol, hidrojen

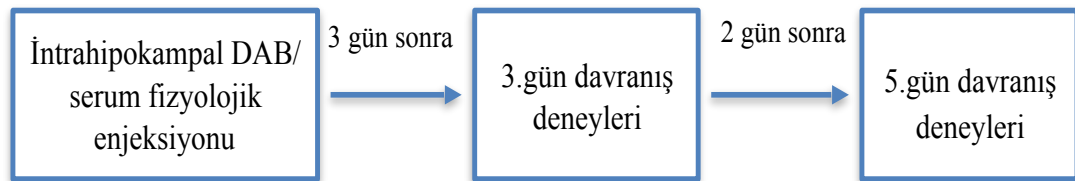
peroksit, deterjanlar ve dimetil sülfoksit (DMSO) ile ön muamele basamağı eklenerek antikorların dokuda daha derinlere penetre edebilmesi sağlanmıştır. Bunu takiben ise 3DISCO yöntemiyle antikorla işaretleme ve doku şeffaflaştırma yapılarak örnek görüntülemeye hazırlanmaktadır. Daha sonra geliştirilen iDISCO+ protokolünde ise diklorometan (DCM) ile ek bir delipidasyon basamağı eklenmiştir (151).

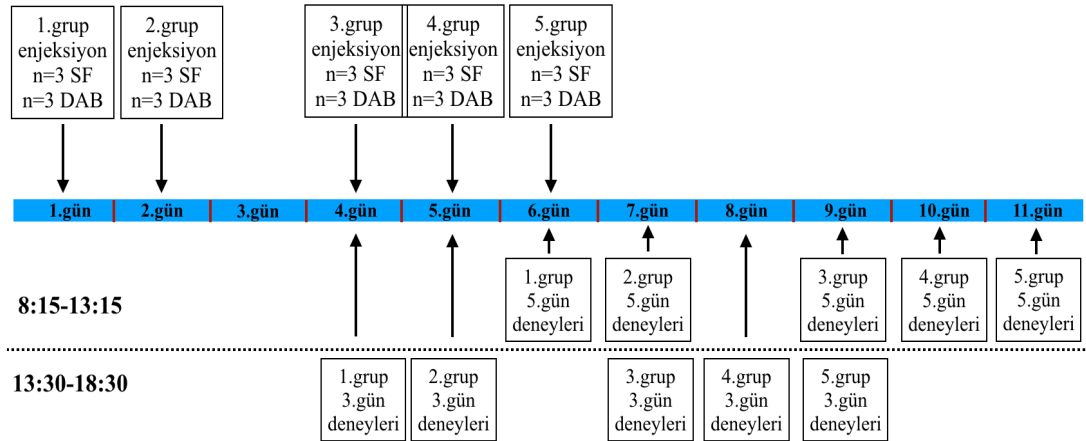
iDISCO protokolünü takip ederek şeffaflaştırılan beyinler, Işık Tabakası Floresans Mikroskopisi (LSFM- *Light Sheet Fluorescence Microscopy*) ile görüntülenebilmektedir. LSFM, volümetrik görüntüleme yaparken yüksek uzaysal çözünürlüğü koruyabilen bir optik dilimleme tekniğidir (152). Tek nokta tarama tekniklerinin aksine, LSFM dokuyu bir noktaya odaklı şekilde değil yerel olarak ince bir ışık tabakası ile uyarılmaktadır. Bu şekilde, volümetrik görüntülerin alınma hızı oldukça artmakta (153, 154, 155), solma (*photobleaching*) ve fototoksisite en aza inmektedir (156, 157, 158). İğne deliği (*pinhole*) optiği yardımıyla z düzleminde yüksek çözünürlük vadeden konfokal mikroskopide, görüntüleme hızı ve uyarılma etkinliği (*excitation efficiency*) kısıtlayıcı bir faktör olarak ortaya çıkarken, LSFM ile görüntüleme hızı ve uyarılma etkinliği bozulmadan hücre altı çözünürlük ve optik dilimleme sağlanabilmektedir (159). Tüm bu sebeplerle, şeffaflaştırılmış tüm beyin görüntülemesi için LSFM oldukça elverişli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması dahilinde glikojenoliz inhibisyonunun davranışsal ve moleküler etkilerini gözlemleyebilmek amacıyla intrahipokampal DAB/serum fizyolojik enjeksiyonları yapılmış ve ardından davranış deneyleri gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması için deneyler iki set şeklinde gerçekleştirilmiş, ilk sette hayvanlara kanül takılmadan enjeksiyon yapılmış ve enjeksiyondan 3 ile 5 gün sonra davranış testleri yapılmıştır. Bu deneylerden elde edilen bulgular ışığında ikinci set deneyler planlanmıştır. İkinci set deneylerde farelere hipokampusa yapılacak enjeksiyonlar için kılavuz kanül yerleştirilmiş, işlem bölgesindeki dokunun iyileşebilmesi için 5 gün beklenmiş ve ardından kanüllerin içerisinden uyanık farelere (anestezi kullanılmadan) DAB veya serum fizyolojik enjeksiyonları yapılmıştır. Enjeksiyonlardan 15 dakika sonra hayvanlar 1 saat boyunca sıçana maruz bırakma stresine tabii tutulmuş, enjeksiyonları takiben 1., 3. ve 5. günlerde ise davranış testleri uygulanmıştır. Her iki deney setinde de enjeksiyon sonrası 6.gün hayvanlar perfüzyonla tespit edilerek beyinleri çıkarılmıştır.

Kanül takılmadan yapılan birinci set deney şeması, Şekil 3.1.'de özetlenmiştir.



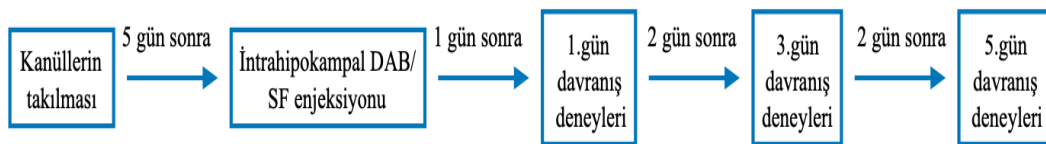


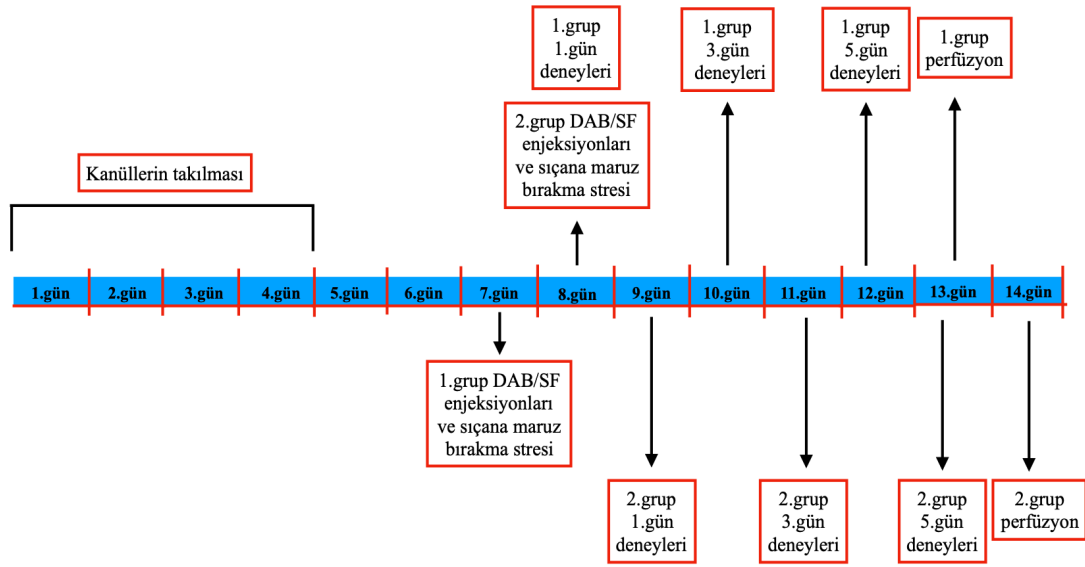
Şekil 3.1. Birinci set deneylerde takip edilen akış şeması.

Görseldeki n sayıları deneye katılan dişi hayvan sayısını yansıtmakta olup erkek farelerde ise toplamda 14 adet hayvana DAB, 12 adet hayvana SF enjekte edilmiştir. İntrahipokampal DAB/serum fizyolojik enjeksiyonundan sonraki 3. ve 5. günlerde davranış deneyleri yapılmış, hayvanlar 6.gün kurban edilmiştir.

Kanül takılmadan yapılan enjeksiyonlardan üç gün sonra, DAB ve SF'in daha kısa vadedeki etkilerini gözlemleyebilmek amacıyla sırasıyla lökomotor aktivite/açık alan testi, aydınlık-karanlık kutu testi, kuyruktan asma testi ile sükröz tercihi testi yapılmıştır. Üçüncü gün davranış testlerinden 2 gün sonra ise enjeksiyonun beşinci gündeki davranışa olan etkilerini gözlemlemek amacıyla testler aynı sırayla uygulanmış, sükröz tercihi testi tekrarlanırsa sükrözün ödül değerinin azalabileceği düşünülerek bu test tekrar edilmemiştir. Davranış testlerinin tamamlanmasını takiben enjeksiyondan altı gün sonra hayvanlar kurban edilmiş, intrakardiyak perfüzyon yapılmış ve beyinleri immünfloresan incelemeler için alınmıştır.

Kanül takılarak yapılan ikinci set deneyler Şekil 3.2.'de özetlenmiştir.





Şekil 3.2. Kanül takılarak yapılan deneylerde takip edilen akış şeması.

15 dişi ve 12 erkek hayvana DAB, 11 dişi ve 10 erkek hayvana SF enjeksiyonu yapılmış; dişi ve erkek hayvanların deneyleri bir ay aralıklarla gerçekleştirilmiştir. DAB ve SF verilecek olan hayvanlar enjeksiyon günlerine dengeli bir şekilde dağıtılmıştır. İntrahipokampal DAB/SF enjeksiyonundan sonraki 1., 3. ve 5. günlerde davranış deneyleri yapılmış, hayvanlar 6.gün sakrifiye edilmiştir.

Kanüllü hayvanlara yapılan enjeksiyonları takiben 1., 3. ve 5. günlerde sırasıyla sosyal etkileşim testi, aydınlık-karanlık kutu testi ve kuyruktan asma testi yapılmış; testlerin son bulmasıyla enjeksiyondan altı gün sonra hayvanlar sakrifiye edilmiş, intrakardiyak perfüzyon yapılmış ve beyinleri immünfloresan incelemeler için alınmıştır.

3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Barındırma Koşulları

Çalışmada ağırlıkları 25-40 gr arasında değişen 56 adet dişi, 48 adet erkek Swiss albino fare kullanılmış, deney hayvanları Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Hayvanlar Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü'ne getirilmelerinden itibaren sıcaklığı $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de, nem oranı %50-60 arasında tutulan özel odada, saydam pleksiglas kafeslerde, 12'şer saatlik karanlık-aydınlık döngüsü altında barındırılmış olup su ve yem ad libitum olarak sağlanmıştır.

Çalışmadaki hayvan deneyleri Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 2018/42 ve 2022/38 dosya kayıt numaraları ile onaylanmıştır.

3.2. İntrahipokampal DAB ve Serum Fizyolojik Enjeksiyon Prosedürü

3.2.1. Kanül Takılmadan Gerçekleştirilen İntrahipokampal DAB ve Serum Fizyolojik Enjeksiyonları

Prosedür için deney hayvanlarının anestezisi izofluran ile sağlanmış, başlangıç dozu olarak %4, idame dozu olarak %1,5-3 tercih edilmiştir. İşlem süresince 2 L/dakika oksijen desteği sağlanmış, hayvanın vücut sıcaklığı rektal prob ile takip edilip homeotermik battaniye ile $37.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmuş, doku oksijen satürasyonu ve nabız ise *pulse* oksimetre ile monitorize edilmiştir. Hayvanlar derin anestezisi sağlandıktan sonra stereotaktik pencereye yerleştirilmiş, enjeksiyon için kafatasına iki taraflı delik (*Burr hole*) açılmıştır. Her iki hemisfere de 1,5 mM 1,5 µl DAB (serum fizyolojik içerisinde), 26G kalınlıkta iğne ucundan mikroenjeksiyon pompası yardımıyla enjekte edilmiştir. Enjeksiyonlarda bregmaya göre 2,5 mm posterior, 2 mm lateral ve 3,6 mm derinlik koordinatları kullanılmış, enjeksiyon bölgesine mikromanipülatör yardımıyla 8-10 dakikada ulaşıp 1,5 µl sıvı 0,15µl/dakika hızla on dakika içinde hipokampusa enjekte edilmiştir. Enjeksiyon tamamlandıktan sonra 1 dakika beklenmiş, enjeksiyon bölgesinden mikromanipülatörle 5 dakikada çıkılmıştır. Yalancı uygulama grubunda ise aynı protokol uygulanmış ancak DAB yerine aynı hacimde serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmıştır.

3.2.2. Kanül Takılarak Gerçekleştirilen İntrahipokampal DAB ve Serum Fizyolojik Enjeksiyonları

Prosedür için deney hayvanlarının anestezisi izofluran ile sağlanmış, başlangıç dozu olarak %4, idame dozu olarak %1,5-3 tercih edilmiştir. İşlem süresince 2 L/dakika oksijen desteği sağlanmış, hayvanın vücut sıcaklığı rektal prob ile takip edilip homeotermik battaniye ile $37.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmuş, doku oksijen

satürasyonu ve nabız pulse oksimetre ile monitorize edilmiştir. Hayvanlar, derin anestezi sağlandıktan sonra stereotaktik pencereye yerleştirilmiş, depresyonla sıklıkla ilişkilendirilen hipokampus bölgesine daha sonra yapılacak enjeksiyonlarda kılavuz oluşturması amacıyla kanüller yerleştirilmiştir. Kanüller yerleştirildikten beş gün sonra fareler uyanırken kılavuz kanülün içerisinde deney grubuna DAB, kontrol grubuna ise SF enjekte edilmiştir.

3.3. Sıçana Maruz Bırakma Akut Stres Prosedürü

Kanül takılarak intrahipokampal enjeksiyonları gerçekleştirilen deney hayvanları, DAB/SF enjeksiyonu tamamlandıktan 15 dakika sonra bir saat süreyle sıçan stresine maruz bırakılmıştır. Strese maruz bırakma sıçanın kafesinde gerçekleştirilmiş, sıçan ile fare arasında teması engelleyen pleksiglas bir ayıraç kullanılmıştır. Bu ayıraç vasıtasıyla hayvanlar birbirlerini görebilmiş, seslerini duyabilmiş ve kokularını alabilmiştir. Stres prosedürü tamamlanan fareler ise tekrar kendi kafeslerine yerleştirilmiştir.

3.4. Davranış Testleri

3.4.1. Lökomotor Aktivite Testi ile Açık Alan Testi: Farelerin kare şeklinde, boyutları 22.5×22.5×30 cm olan kutuda, 10 dakika boyunca toplam kat ettikleri mesafe Ethovision XT-8 ile izlenmiş ve lökomotor aktivite olarak kaydedilmiştir. Ayrıca programda kutunun merkezinde 11x11 cm ebatlarında bir kare daha tanımlanarak aynı süre içerisinde farenin bu merkezi alanda kat ettiği mesafe açık alan testi olarak değerlendirilmiştir. Açık alanda (merkezde) geçirilen süre, anksiyetenin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (160, 161).

3.4.2. Aydınlık -Karanlık Kutu Testi: Bu test için hayvanlar aydınlık ve karanlık bölmeleri olan kutuya karanlık taraftan bırakılarak aydınlık alana girme frekansları, latansları ve her iki alanda geçirdikleri süre değerlendirilmiştir. Bu test, kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlara on dakika süreyle uygulanmış; bu sebeple alıştırma (*training*) fazı uygulanmasına gerek kalmamıştır.

Kanüllü hayvanlarda ise testten önceki 12 saat içerisinde hayvanlara aralıklı olarak ikişer kez onar dakika süreyle alıştırmaya fazı uygulanmış, test ise 5 dakika sürmüştür. Aydınlık-karanlık kutu testinden elde edilen veriler anksiyete düzeyinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (162, 163).

3.4.3. Kuyruktan Asma Testi: Hayvanlar kuyruklarının ucunun 2-3 mm proksimalinden dikey asılı kalacak şekilde bir masanın yüzeyine bantlanmış, kurtulmak için gösterdikleri hareketlilik kantifiye edilerek değerlendirilmiştir. Hareketsiz geçirilen süreler kıyaslanarak hayvanların depresyonda görülen umutsuzluğu modellediği düşünülen davranışsal umutsuzluklarının karşılaştırılması hedeflenmiştir (164, 165). Kuyruktan asma testi kanül takılmayan ve kanüllü hayvanlarda aynı şekilde uygulanmıştır.

3.4.4. Sükroz tercihi testi: DAB ve serum fizyolojik enjeksiyonlarından bir gün önce fare kafeslerine, sükroza alıştırmaya amacıyla ikisinde de %1'lik sükroz çözeltisi olan ikişer suluk yerleştirilmiştir. Deney günü sabahı ise suluklar kafeslerden alınarak deney hayvanları sükroz tercihi testine kadar susuz bırakılmıştır. Ardından sükroz tercih testi için tüm kafeslere biri çeşme suyu, biri %1 sükroz solüsyonu içeren ikişer suluk yerleştirilmiş, sükrozlu sular kafeslerin yarısında sağ tarafa yarısında ise sol tarafa konulmuştur. Sükroz tercihi testinin sonlanmasının ardından tüketilen toplam su ve sükrozlu su miktarı kaydedilmiştir. Fareler sükrozlu suyu tercih etmeye meyilli olduklarından, tüketilen sükrozlu su kütle ve hacminin tüketilen toplam su ve sükrozlu su kütlesi ile hacmine oranı depresyon belirtisi olan anhedoni-benzeri davranışı (keyif almama) değerlendirmek için kullanılmıştır (166, 167). Sükroz tercihi testi sadece kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlarda yapılmıştır.

3.4.5. Sosyal Etkileşim Testi: Kanüllerinden DAB/SF enjeksiyonu yapılan hayvanların anhedoni eğilimleri sosyal etkileşim testi ile değerlendirilmiştir. Test için boyutları 40.5 cm×60 cm olup aradaki kapılardan birbirine geçilebilen 3 bölmesi olan bir kutu kullanılmıştır. Testten önce deney hayvanları kutuya alıştırmak

amacıyla, 15 dakikalık sürelerle iki kez orta bölmeden kutuya bırakılmış, alıştırma süresince bölmeler arası kapılar açık olduğundan hayvanlar kutu içinde serbestçe hareket edebilmiştir. Bu safhada, orta bölme boş bırakılarak kutunun iki ucundaki bölmelere içleri boş birer silindirik demir kafes yerleştirilmiştir. Test safhasında ise, demir kafeslerden bir tanesine deney hayvanı ile aynı cinsiyette bir Swiss albino fare, bir tanesine ise deney hayvanının daha önce karşılaşmadığı bir oyuncak konulmuştur. Toplamda 6 dakika süren testin ilk 1 dakikasında, orta bölmeden diğer iki bölmeye geçişi sağlayan kapılar kapatılmış, orta bölmeye bırakılan deney faresi bu bölme içinde serbestçe gezinebilmiştir. Bir dakikalık süre tamamlandıktan sonra ise bölmeler arası kapılar açılmış, bu aşamada deney hayvanı bölmeler arasında geçiş yapabilmiştir. Testin tamamı kayıt altına alınmış, deney hayvanının kutunun her iki tarafındaki demir kafeslerle etkileşim süresi kaydedilmiş ve bu süreler birbiri ile kıyaslanarak sosyal etkileşim indeksi hesaplanmıştır. Sosyal etkileşimin ödül değeri olduğundan deney hayvanlarının içinde başka bir Swiss albino fare olan demir kafesin yakınlarında daha fazla süre geçirmesi beklenmektedir. Bu sebeple sosyal hedefle sosyal olamayan hedefleri içeren kafesler etrafında geçirilen süre farkı, bir depresif-benzeri davranış bulgusu olan anhedoni-benzeri davranışı değerlendirmek için kullanılmıştır (168).

3.5. İtrakardiyak Perfüzyon ve Ötenazi

Davranış testlerinin tamamlamasının ardından deney hayvanlarının intrakardiyak perfüzyon ve ötenazisi yapılmıştır. Önce letal dozda (1g/kg) kloral hidrat ile anestezi ve sedasyon sağlanmış, ardından ağrılı uyarana cevap alınamadığında cerrahi işleme başlanmıştır. Göğüs kafesi açılarak kalp ortaya çıkarıldıktan sonra sol ventrikülden intraventriküler %0.4 salin-heparin perfüzyonuna başlanıp dolaşımın tamamlanması için sağ atriuma kesi atılmıştır. Salin-heparin perfüzyonu 2-3 dakika boyunca uygulanmış, karaciğerin beyazlamaya başladığı görüldükten sonra %4 paraformaldehit ile perfüzyon fiksasyonu aşamasına geçilmiştir. Bu işlem, dokularda belirgin sertleşme gerçekleşene kadar devam ettirilmiş, perfüzyon tamamlandığında ise dekapitasyon uygulanarak beyin

çıkartılmıştır.

3.6. Doku İşlemleri

Kardiyak perfüzyon sonrası çıkarılmış beyin dokusu %4 paraformaldehit içinde 24 saat boyunca post-fiksasyon işlemine tabi tutulduktan sonra, kriyoproteksiyon amacıyla %30 derişiminde sükröz çözeltisi içinde dibe çökene kadar bekletilmiştir. Kriyotom yardımıyla poli-L-lizin kaplı lamlara 12 mikron kalınlığında alınan kesitler, -20 °C'de saklanmış ve immünohistokimyasal işaretlemeleri yapılmıştır.

3.7. İmmünohistokimyasal İşaretlemeler ve Görüntüleme

Kesitlerde mikroglial aktivasyon belirteci olarak Iba-1 kullanılmış; yapılan floresan boyamaları görüntüleme amaçlı Nikon epifloresan mikroskop ve Leica konfokal lazer taramalı mikroskoplar kullanılmıştır. Görüntüler Image-J programı ile değerlendirilmiş; mikrogliaların uzantılarının kısalıp kalınlaşması, gövdeden çıkan dallanmaların artması, hücre gövdelerinin büyümesi ve Iba-1 sinyalinde artış mikroglial aktivasyon olarak değerlendirilmiştir.

3.7.1. Iba-1 boyama protokolü

Anti-Iba1 antikoru ile işaretlemeler için solüsyonlar TBS (Tris-buffered saline) içerisinde hazırlanmıştır. %0.025 Triton X-100 çözeltisi ile yıkanan kesitler, önce %0.2 Triton X-100 çözeltisi ile membran geçirgenliği artırılmış ardından da normal keçi serumu (NGS) (%10, %1 BSA) ile blokaj yapılmıştır. Blokaj solüsyonu içerisinde hazırlanan anti-Iba1 antikoruyla (1:250) gece boyunca +4 °C'de inkübe edilen kesitler, ertesi gün %0.025 Triton X-100 çözeltisi ile üç kez beşer dakika yıkanarak blokaj solüsyonu içerisinde 1:200 oranında Cy2 goat anti rabbit sekonder antikoruyla oda sıcaklığında bir saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra tekrar yıkanan kesitler Hoechst ile kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.8. Veri Analizi

Görüntü analizinde Nikon marka epifloresan, Leica marka konfokal lazer taramalı mikroskopların kendi yazılımlarına ek olarak Image-J yazılımından faydalanılmıştır.

Davranış deneyleri Ethovision XT-8 ile kaydedilerek değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizlerde IBM SPSS 20 yazılımı kullanılmış, verilerin normal dağılımı Kolmogorov Smirnov analizi ile değerlendirilmiş, istatistiksel analiz yöntemleri verilerin parametrik varsayımları sağlayıp sağlamamasına göre seçilmiştir. Kanül takılmayan hayvanlardaki lökomotor aktivite, aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alanda geçirilen süre, açık alan testinde açık alanda geçirilen süre, kuyruktan asma testinde hareketsiz geçirilen süre ve sükröz tercih testinde tüketilen sükrözlü su miktarının tüketilen toplam sıvı miktarına oranı student t-testi ile; aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alana geçme latansı Kaplan-Meier sağkalım analizi ile değerlendirilmiştir. Lökomotor aktivitedeki değişimin açık alanda geçirilen toplam süre üzerine etkisi kovaryans analizi ANCOVA ile; 3. ve 5. günlerdeki lökomotor aktivitelerinde, açık alanda geçirdikleri sürede ve kuyruktan asma testinde hareketsiz kaldıkları süredeki değişim tekrarlı ölçümler için ANOVA ile değerlendirilmiştir. Grafiklerdeki veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Kanüllü hayvanların sosyal etkileşim indeksi, aydınlık alanda geçirdikleri süre ve kuyruktan asma testinde hareketsiz geçirdikleri süre MANOVA ile, aydınlık alana geçme latansı ve kuyruktan asma testinde hareketsiz kalma latansı ise Kaplan-Meier sağkalım analizi ile değerlendirilmiştir. ANCOVA analizlerinde, test sonuçları üzerinde zamanın etkisinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediği zaman x grup etkisi ifadesiyle, deney grupları arasında gözlenen farklılıkların cinsiyete bağlı değişkenlik gösterip göstermediği grup x cinsiyet etkileşimi ifadesiyle izah edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık eşiği $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

3.9. Doku Şeffaflaştırma ve Işık Tabakası Floresan Mikroskopi Görüntülemesi

Çalışmanın doku şeffaflaştırılması ve ışık tabakası floresan mikroskopi ile görüntülerin oluşturularak analiz edilmesi kısmı Münih'te İnme ve Demans Araştırmaları Merkezi'nde Dr.Ali Ertürk ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.9.1. Dokunun Şeffaflaştırılarak Görüntüleme İçin Hazırlanması

Kardiyak perfüzyon sonrası %4 PFA'da tutulmakta olan sekiz adet beyin örneğinin tek hemisferi iDISCO protokolüne göre hazırlanmıştır (169). Örnekler bir saat PBS ile yıkanmış, ardından sırasıyla her biri birer saat süren %40, %60, %80, %100, %100 metanol/su serisinde dehidrate edilmiştir. Bu aşamayı takiben örnekler DCM (diklorometan)/metanol çözeltisinde (metanol/DCM hacim oranı 1:2) üç saat inkübe edilmiş, %5 hidrojen peroksit çözeltisinde (%30 hidrojen peroksit/metanol hacim oranı 1:5) 4°C'de gece boyunca ağartılmıştır. Ardından örnekler sırasıyla her biri bir saat süren %80, %60, %40 metanol/su serisi ve PBS ile rehidrate edilmiş, PBS/%0.2 Triton X-100 çözeltisinde birer saat süreyle iki kez yıkanmıştır. Sonraki adımda örnekler PBS/%0.2 Triton X-100/%20 DMSO/%2.3 glisin çözeltisinde 37°C'de gece boyunca inkübe edilmiş, PBS/%0.2 Triton X-100/%10 DMSO/%6 keçi serumunda 37°C'de gece boyunca bloke edilmiştir. Bu adımı takiben örnekler PBS/%0.2 Tween-20/10 µg/ml heparin/%5 DMSO/%3 keçi serumu çözeltisinde 1:1000 oranında propidiyum iyodür ve Iba-1 antikorlarıyla 37°C'de beş gün boyunca boyanmış, PBS/%0.2 Tween-20/10 µg/ml heparin çözeltisinde 37°C'de birer gün olmak üzere iki kez yıkanmış, ardından PBS/%0.2 Tween-20/10 µg/ml heparin/%3 keçi serumu içerisindeki goat anti-rabbit Alexa Fluor 647 antikoruyla 37°C'de beş gün inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS/%0.2 Tween-20/10 µg/ml heparin çözeltisinde 37°C'de birer gün süreyle iki kez yıkanan beyinler sırasıyla her biri bir saat süren %50, %70, %90, %100, %100 oranında THF/su serisinde dehidrate edilmiştir. Ardından %100 DCM'de 30 dakika inkübe edilen beyinler son olarak kırıcılık indisini eşlemek amacıyla benzil alkol/benzil benzoat'a konulmuştur.

3.9.2. Şeffaflaştırılmış Örneklerin Işık Tabakası Floresan Mikroskopisi İle Görüntülenmesi

Görüntüleme için bir beyaz ışık lazer modülüne (NKT SuperK Extreme EXW-12) bağlı bir LaVision UltraII mikroskobu üzerine monte edilmiş bir imersiyon düzeltmeli daldırma başlığı ile donatılmış 4× objektif lens (Olympus XLFLUOR 340) kullanılmıştır. Görüntüler 16 bit derinlikte ve 1.625 µm/voksel nominal çözünürlükte XY eksenlerinde tüm örneği sığdıracak şekilde 1x3 döşeme kullanılarak alınmıştır. Beyin yapıları propidyum iyodür (545/25 uyarma ve 605/70 emisyon filtresi kullanılarak) ve Alexa Fluor 647 floresan boyalarla (640/40 uyarma ve 690/50 emisyon filtresi kullanılarak) sırayla görselleştirilmiştir.

Z düzleminde kesitsel görüntüler, sol ve sağ taraflı aydınlatma kullanarak 3 µm'lik adımlarla alınmıştır. Demetin Gauss şeklinden kaynaklanan bulanıklığı azaltmak için, ışık levhasının odak konumunun düzlem ve taraf başına 6 adımlı sıralı kaydırması kullanılmıştır. Işık tabakasının en ince noktası 5 µm olmuştur.

3.9.3. Işık Tabakası Floresan Mikroskopi Görüntülerinin Analizi

Görüntüsü edinilen hacimler TeraStitcher'in otomatik global optimizasyon işlevi (v1.10.3) kullanılarak birleştirilmiş ve her kanal ayrı değerlendirilerek yarım beyinlerin hacimsel yoğunluk görüntüleri üretilmiştir. Ardından, Imaris'in (v9.3.1) yerleşik noktalar işlevi (arka plan çıkarma: açık, ROI hacmi 150x150x75 µm, filtre kalitesi: 150) kullanılarak belirlenen ilgi bölgelerindeki (prelimbik, infralimbik ve anterior singulat korteks) mikroglialar tespit edilerek sayıları belirlenmiştir.

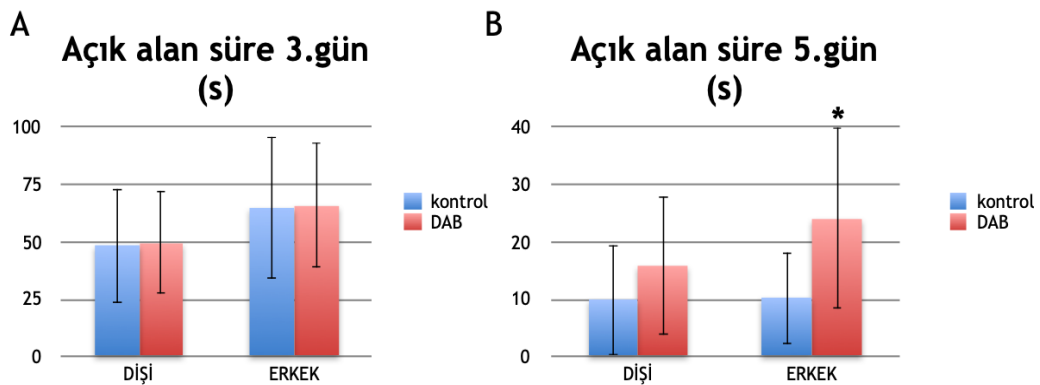
4. BULGULAR

4.1. Kanül Takılmadan İntrahipokampal Enjeksiyon Yapılan Hayvanların Davranış Testleri

4.1.1. Anksiyete-benzeri Davranış

- Açık Alan Testi

Enjeksiyon sonrası üçüncü günde gerçekleştirilen açık alan testinde, açık alanda geçirilen süre açısından dişi ve erkek kontrol ve deney grupları arasında bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla $t(26)=0,16$, $p=0,873$; $t(24)=0,10$, $p=0,920$) (Şekil 4.1. A). Buna karşın, enjeksiyon sonrası beşinci günde yapılan açık alan testinde deney grubu erkek farelerde, açık alanda geçirilen sürede artış kaydedilirken ($t(20,094)=2,86$, $p=0,01$), dişilerde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($t(26)=1,47$, $p=0,155$) (Şekil 4.1.B).

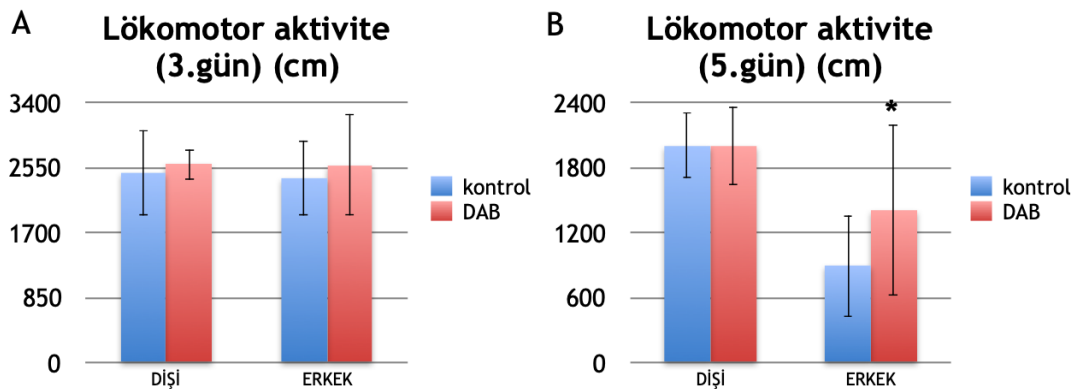


Şekil 4.1. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanların üçüncü ve beşinci günlerde açık alanda geçirdikleri süre (s).

Enjeksiyon sonrası beşinci günde yapılan açık alan testinde, erkek farelerde açık alanda geçirilen sürede artış gözlenmiştir ($p=0,01$). Grafiklerdeki veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Enjeksiyon sonrası üçüncü günde, lökomotor aktivite düzeyinde ne dişi ne de erkek farelerde kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir fark

gözlenmiştir (sırasıyla $t(16,322)=0,71$, $p=0,486$; $t(23)=0,73$, $p=0,472$) (Şekil 4.2.A). Enjeksiyon sonrası beşinci günde lökomotor aktivite testinde ise erkeklerde DAB grubunda kontrol grubuna kıyasla lökomotor aktivitede artış gözlenmiş olup ($t(21,456)=2,08$, $p=0,05$), dişilerde gruplar arası bir fark saptanmamıştır ($t(27)=-0,003$, $p=0,997$) (Şekil 4.2.B). Bu fark, deney grubu erkek farelerde enjeksiyon sonrası beşinci günde açık alanda geçirilen sürede gözlenen artış ile birlikte değerlendirildiğinde, açık alanda geçirilen süre artışının anksiyete-benzeri davranış ile değil lökomotor aktivitede artışla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu olasılığı değerlendirmek için yapılan ANCOVA (kovaryans) analizinde, lökomotor aktivitenin etkisi kontrol edildiğinde hem dişi hem de erkeklerin açık alanda geçirdikleri süre gruplar arasında benzer bulunmuştur (dişiler için $F(1,24)=1,907$, $p=0,180$; erkekler için $F(1,22)=2,828$, $p=0,107$).



Şekil 4.2. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanların üçüncü ve beşinci günlerdeki lökomotor aktiviteleri (cm).

Enjeksiyon sonrası beşinci günde yapılan lökomotor aktivite testinde erkeklerde DAB grubunda kontrol grubuna kıyasla lökomotor aktivitede artış gözlenmiştir ($p=0,05$).

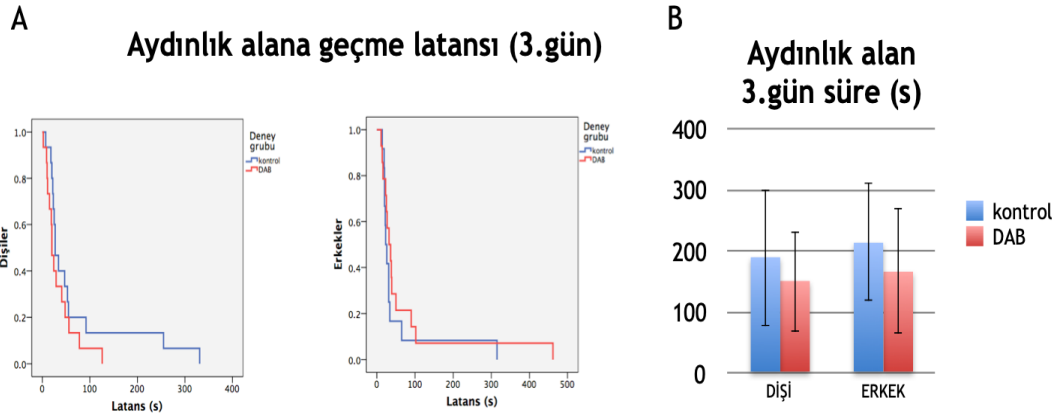
Tekrarlayan ölçümlerin etkisini değerlendirmek için yapılan tekrarlı ölçümler için ANOVA'da hem erkek hem de dişi farelerde açık alanda geçirilen sürede zaman etkisi izlenmiştir (sırasıyla $F(1,23)=75,366$, $p<0,0001$; $F(1,25)=60,004$, $p<0,0001$). Beşinci günde gruptan bağımsız olarak hem erkeklerde hem de dişilerde açık alanda geçirilen ortalama süre üçüncü günden düşük bulunmuştur. Ancak her iki cinsiyette de zaman x grup etkisi saptanmamıştır (sırasıyla erkek ve dişi fareler için

$F(1,23)=0,570$, $p=0,458$; $F(1,25)=0,059$, $p=0,810$). Benzer şekilde, hem erkek hem dişi farelerde lökomotor aktivitede zaman etkisi izlenmiştir (sırasıyla $F(1,23)=87.522$, $p<0,0001$; $F(1,24)=44,973$, $p<0,0001$). Beşinci günde gruptan bağımsız olarak tüm erkek ve dişilerde lökomotor aktivite üçüncü günden düşük bulunmuştur. Ancak zaman x grup etkisi saptanmamıştır (sırasıyla erkek ve dişi fareler için $F(1,23)=0,903$, $p=0,352$; $F(1,24)=0,779$, $p=0,386$). Bu bulgular, açık alanda geçirilen sürenin ve lökomotor aktivitenin her iki cinsiyette de zamanla azaldığını ancak bu etkinin DAB'ın etkileriyle ilişkili olmadığını ortaya koymaktadır. Bunun olası nedeni farelerin testin yapıldığı kutuya alışmış olmaları, dolayısıyla da ikinci karşılaşmada kutuyu araştırma davranışlarının azalması olabilir.

Lökomotor aktivite ve açık alan testlerinde denek sayısını artırarak DAB'ın etkisini gözlemleyebilmek için DAB enjeksiyonu yapılan dişi ve erkek fareler bir grup, serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan fareler bir grup kabul edilerek yapılan analizlerde 3.gün lökomotor aktivite, 5.gün lökomotor aktivite ve 3.gün açık alanda geçirilen süreler açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,320$, $p=0,216$, $p=0,794$). DAB grubunun 5.gün açık alanda geçirdiği süre ise yukarıdaki bulgularımıza paralel şekilde, kontrol grubundan anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,003$).

- Aydınlik-Karanlık Kutu Testi

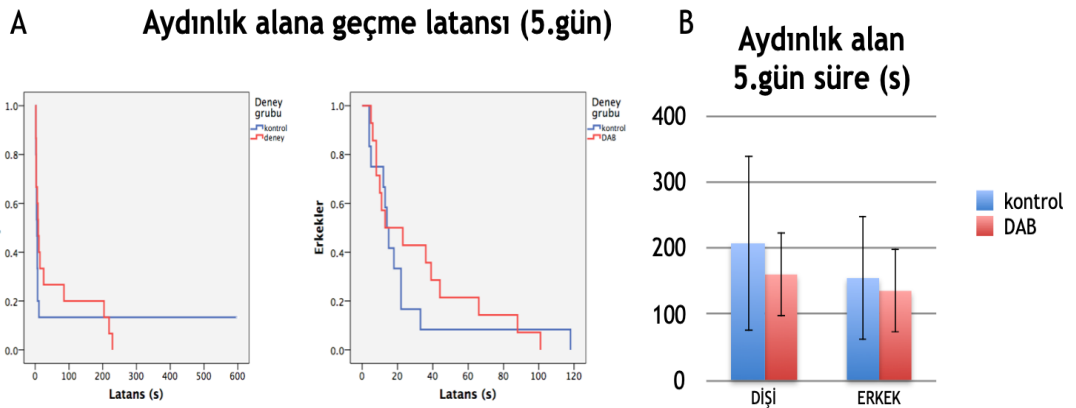
Aydınlık-karanlık kutu testinde, enjeksiyon sonrası üçüncü gün aydınlık alana geçme latansı açısından dişilerde ve erkeklerde kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Kaplan Meier sağkalım analizi; sırasıyla $p=0,197$; $p=0,297$) (Şekil 4.3.A). Benzer şekilde, aydınlık alanda geçirilen süreler açısından da dişilerde ve erkeklerde gruplar arası anlamlı bir fark göze çarpmamaktadır ($t(26)=-1,07$, $p=0,295$; $t(23)=-1,17$, $p=0,254$) (Şekil 4.3.B).



Şekil 4.3. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlarda üçüncü gün aydınlık-karanlık kutu testi.

Enjeksiyon sonrası üçüncü gün aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alana geçme latansı ve aydınlık alanda geçirilen süre açısından ne dişilerde ne erkeklerde anlamlı bir fark gözlenmiştir.

Enjeksiyon sonrası beşinci günde de, aydınlık alana geçme latansı açısından dişilerde ve erkeklerde kontrol ve deney grupları arasında bir fark gözlenmemiştir ($p=0,342$; $p=0,457$) (Şekil 4.4.A). Aydınlık alanda geçirilen süreler de dişi ile erkek kontrol ve deney grupları arasında benzer bulunmuştur ($t(20,418)=-1,24$, $p=0,230$; $t(24)=-0,64$, $p=0,528$) (Şekil 4.4.B).



Şekil 4.4. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlarda beşinci gün aydınlık-karanlık kutu testi.

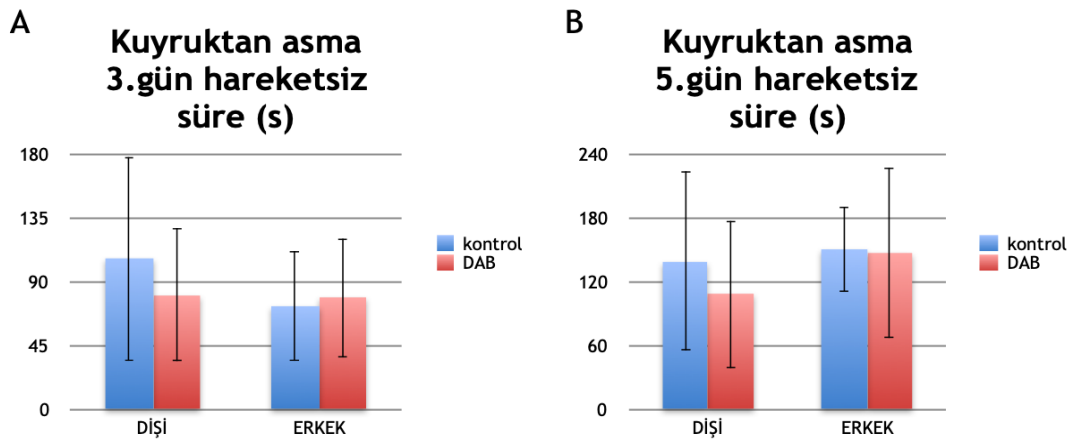
Enjeksiyon sonrası beşinci gün aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alana geçme latansı ve aydınlık alanda geçirilen süre açısından ne dişilerde ne erkeklerde anlamlı bir fark gözlenmiştir.

Aydınlık-karanlık kutu testinde DAB'ın etkilerini gözlemleyebilmek adına denek sayısını artırmak için DAB grubu dişi ve erkek fareler bir grup, kontrol grubu dişi ve erkek fareler bir grup kabul edilerek yapılan analizlerde 3.gün ve 5.gün aydınlık alanda geçirilen sürelerde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,119$, $p=0,163$).

4.1.2. Depresyon-benzeri Davranış

- Kuyruktan Asma Testi

Enjeksiyon sonrası üçüncü gün kuyruktan asma testinde, dişilerde ve erkeklerde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla $t(24,076)=-1,25$, $p=0,223$; $t(24)=0,37$, $p=0,713$) (Şekil 4.5. A). Benzer şekilde, enjeksiyon sonrası beşinci gün yapılan kuyruktan asma testinde de dişilerde ve erkeklerde gruplar arası fark saptanmamıştır (sırasıyla $t(28)=-1,22$, $p=0,234$; $t(23)=-0,514$, $p=0,612$) (Şekil 4.5.B).



Şekil 4.5. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlarda üçüncü ve beşinci gün kuyruktan asma testi.

Enjeksiyon sonrası üçüncü ve beşinci gün kuyruktan asma testlerinde ne dişilerde ne erkeklerde hareketsiz geçirilen süreler arasında anlamlı bir fark görülmüştür.

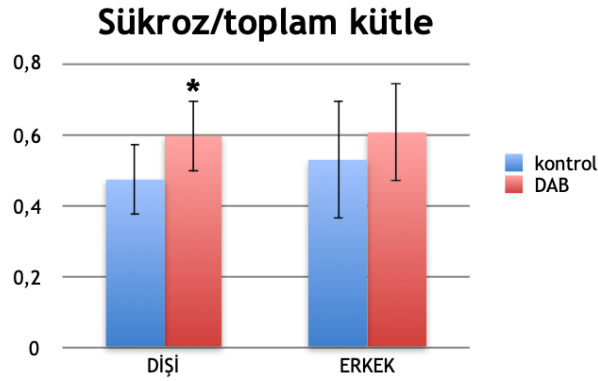
Tekrarlayan ölçümlerin etkisini değerlendirmek için yapılan tekrarlı ölçümler için ANOVA'da hem erkek hem de dişi farelerde kuyruktan asma testinde hareketsiz geçirilen sürede zaman etkisi izlenmiştir (sırasıyla $F(1,23)=45,600$, $p<0,0001$); $F(1,28)=5,433$, $p=0,027$). Beşinci günde gruptan bağımsız olarak hem erkeklerde

hem de dişilerde hareketsiz geçirilen sürede nc güne göre artış gözlenmiştir. Ancak her iki cinsiyette de zaman x grup etkisi saptanmamıştır (sırasıyla erkek ve dişi fareler için ($F(1,23)=0,486$, $p=0,493$; $F(1,28)=0,089$, $p=0,767$). Bu bulgu, kuyruktan asma testinde hareketsiz kalınan sürenin erkeklerde daha belirgin olmakla birlikte her iki cinsiyette de zamanla artış gösterdiğine işaret etmektedir (erkeklerde ortalama 63 saniye, dişilerde ortalama 25 saniye artış). Bu bulgu, nc gün yapılan kuyruktan asma testi esnasında kaçış olmadığının öğrenilmesine, dolayısıyla davranışsal umutsuzluğun artmasına bağlı olabilir.

Kuyruktan asma testinde denek sayısını artırarak DAB'ın etkilerini gözlemleyebilmek amacıyla DAB grubu dişi ve erkekler bir grup, kontrol grubu dişi ve erkekler ise bir grup kabul edilerek yapılan analizlerde 3. ve 5. gün hareketsiz geçirilen sürelerde gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,382$, $p=0,264$).

- Sükroz Tercih Testi

Enjeksiyon sonrası nc gün yapılan sükroz tercih testinde, deney grubu dişi farelerde tüketilen sükrozlu su kütlesinin toplam sıvı tüketime oranı kontrol grubu farelerden daha yüksek bulunmuş olup erkeklerde ise gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla $t(28)=3,28$, $p=0,003$; $t(24)=1,30$, $p=0,206$) (şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Kanül takılmadan intrahipokampal enjeksiyon yapılan hayvanlarda sükroz tercih testi.

Sükroz tercih testinde, deney grubu dişi farelerde tüketilen sükrozlu su kütlelerinin toplam sıvı tüketimine oranı kontrol grubu farelerden daha yüksek bulunmuştur ($p=0.003$).

Sükroz tercih testinde DAB grubu dişi ve erkek fareler bir grup, kontrol grubu dişi ve erkekler bir grup kabul edilerek yapılan analizlerde, DAB grubunun tükettiği sükrozlu su kütlelerinin toplam sıvı kütlelerine oranı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,004$).

4.2. Kanül Takılarak İnterahipokampal Enjeksiyon Yapılan Hayvanlardaki Davranış Testleri

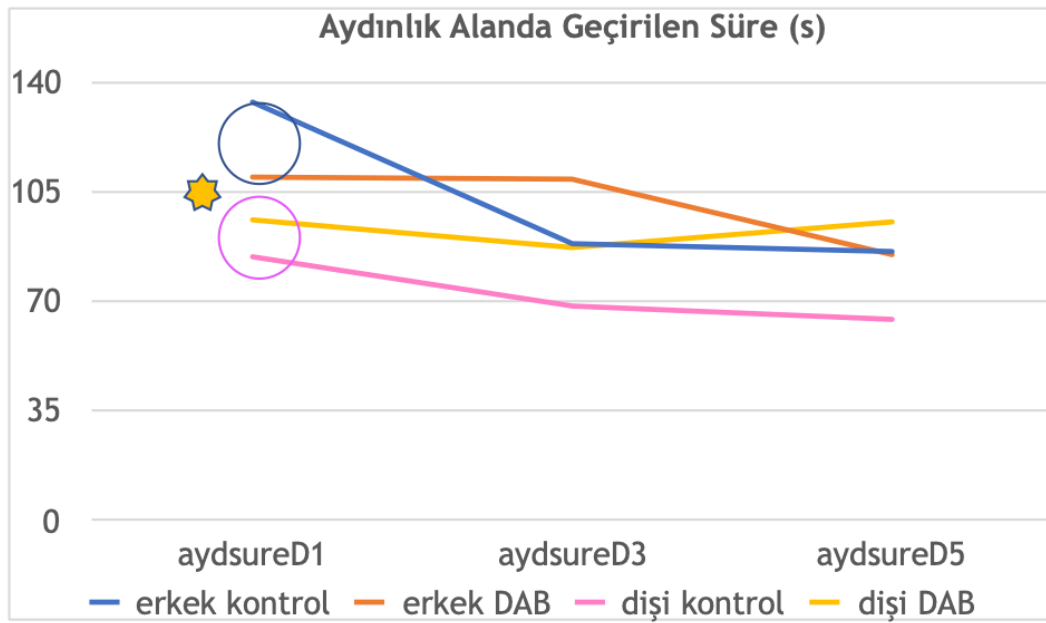
4.2.1. Anksiyete-Benzeri Davranış Testleri

- Aydınlık-karanlık Kutu Testi

Dişi ve erkek DAB ve kontrol gruplarının aydınlık alanda geçirdikleri süre her üç zaman noktasında aydınlık kutuda geçirilen sürenin bağımlı değişken olarak analizlere eklendiği çok değişkenli varyans analizi ile değerlendirildiğinde yalnızca cinsiyet etkisi anlamlılığa yakın bulunmuştur ($F(3,35)=2,59$, $p=0,068$). Birinci günde erkekler dişilere göre daha uzun süre aydınlık bölmede kalırken ($F(3,35)=5,74$, $p=0,022$), bu fark üçüncü ve beşinci günlerde erkeklerin aydınlık bölmede geçirdiği sürenin azalmasıyla ortadan kalkmıştır (Şekil 4.7.). Erkek hayvanların üçüncü ve

beşinci gündeki değerlendirmelerinde anksiyete düzeylerinde dişilere kıyasla artış bulunmuştur. Ancak bu sonuçlara DAB'ın etkisi gözlenmemiştir.

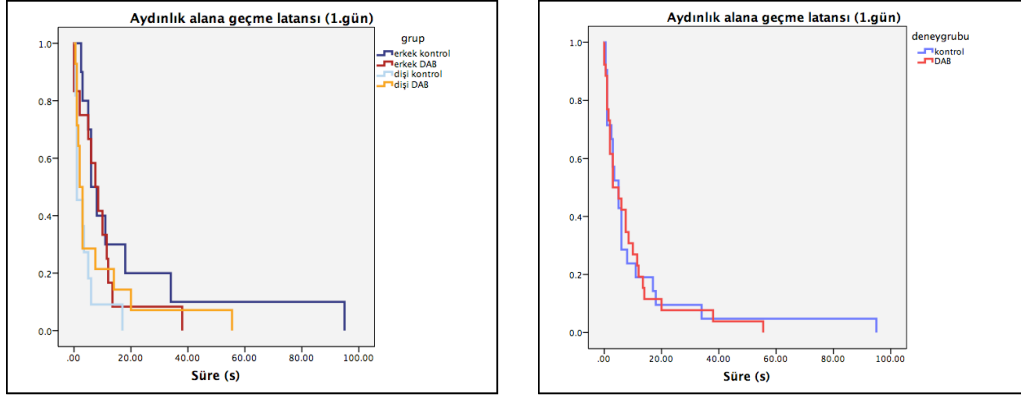
Testte, grup etkisi ($F(3,35)=1,15$, $p=0,34$) ve grup x cinsiyet etkileşimi ($F(3,35)=0,93$, $p=0,44$) ise görülmemiştir. Zamanla test performansında değişimin gruplar ve cinsiyetler arasında farklılık gösterip göstermediğinin incelendiği tekrarlı ölçümler için varyans analizinde ise zaman etkisi anlamlı bulunmuştur ($F(2,36)=5,912$, $p=0,006$). Üçüncü ve beşinci günlerde aydınlık alanda geçirilen süre birinci günden daha düşük bulunmuştur. Ancak zamana bağlı değişimin ne cinsiyet ($F(2,36)=1,91$, $p=0,163$) ne de gruplarla ($F(2,36)=1,65$, $p=0,207$) ilişkisi gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda DAB ve SF gruplarının aydınlık-karanlık kutu testinde aydınlık alanda geçirdikleri süre (s).

Birinci günde erkeklerin dişilerden daha uzun süre aydınlık bölgede kaldığı ancak bu farkın üçüncü ve beşinci günlerde ortadan kalktığı saptanmıştır ($p=0,022$). Şekildeki yıldız, birinci günde aydınlık alanda geçirilen süre üzerindeki cinsiyet etkisine işaret etmektedir.

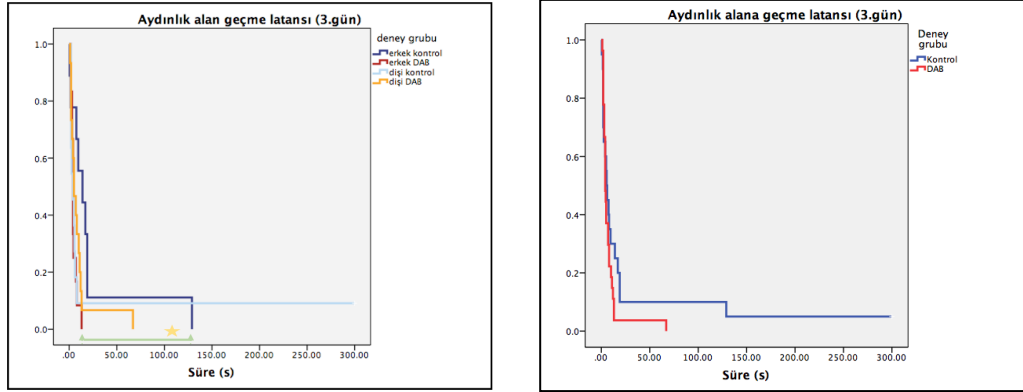
Dişi ve erkek hayvanların aydınlık alana geçme latansları kıyaslandığında ise birinci gün ne erkeklerde ne dişilerde anlamlı bir fark görülmüştür (sırasıyla $p=0,518$, $p=0,334$) (Şekil 4.8.). Dişi ve erkek DAB hayvanları bir grup, dişi ve erkek kontrol hayvanları bir grup kabul edilerek kıyaslandığında da birinci gün aydınlık alana geçme latansları arasında bir fark bulunmamıştır ($p=0,908$) (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda birinci gün aydınlık-karanlık kutu testinde a) tüm deney gruplarının, b) DAB (dişi ve erkek) ile kontrol (dişi ve erkek) gruplarının aydınlık alana geçme latansı (s).

(a) Erkek ve dişi hayvanların DAB ve kontrol gruplarının aydınlık alana geçme latansları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (b) Aynı şekilde, DAB (dişi ve erkek) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının aydınlık alana geçme latansları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

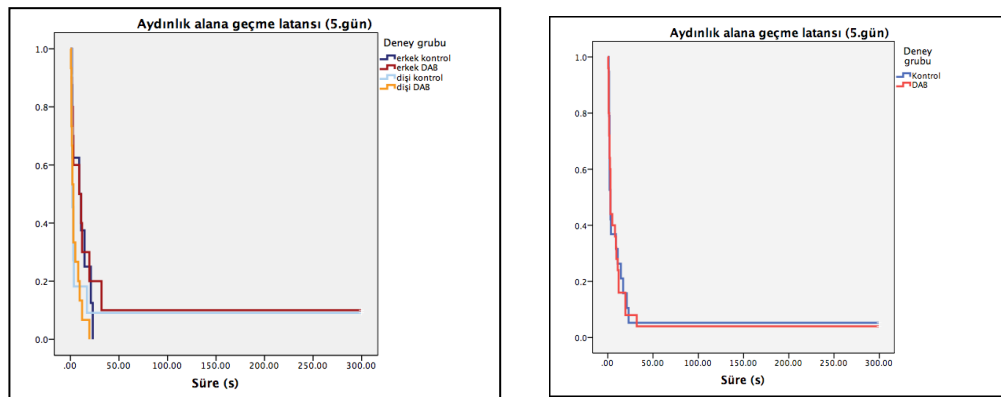
Üçüncü gün aydınlık alana geçme latansında dişi hayvanlarda DAB ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken ($p=0,621$), erkeklerde kontrol grubunun aydınlık alana geçme latansı DAB grubunun aydınlık alana geçme latansından anlamlı bir şekilde fazla bulunmuştur ($p=0,007$) (Şekil 4.9.). DAB (dişi ve erkek) ile kontrol (dişi ve erkek) grupları karşılaştırıldığında ise aydınlık alana geçme latansları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,148$) (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda üçüncü gün aydınlık-karanlık kutu testinde a) tüm deney gruplarının, b) DAB (dişi ve erkek) ile kontrol (dişi ve erkek) gruplarının aydınlık alana geçme latansı (s).

(a) Erkek hayvanlarda kontrol grubunun aydınlık alana geçme latansının DAB grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,007$). (b) DAB (dişi ve erkek) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının aydınlık alana geçme latansları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Beşinci gün aydınlık-karanlık kutu testinde ise dişi ve erkek hayvanların DAB ve kontrol gruplarının aydınlık alana geçme latansları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,634$, $p=0,718$) (Şekil 4.10.). DAB (dişi ve erkek) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının aydınlık alana geçme latansları arasında da anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,823$) (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda beşinci gün aydınlık-karanlık kutu testinde a) tüm deney gruplarının, b) DAB (dişi ve erkek) ile kontrol (dişi ve erkek) gruplarının aydınlık alana geçme latansı (s).

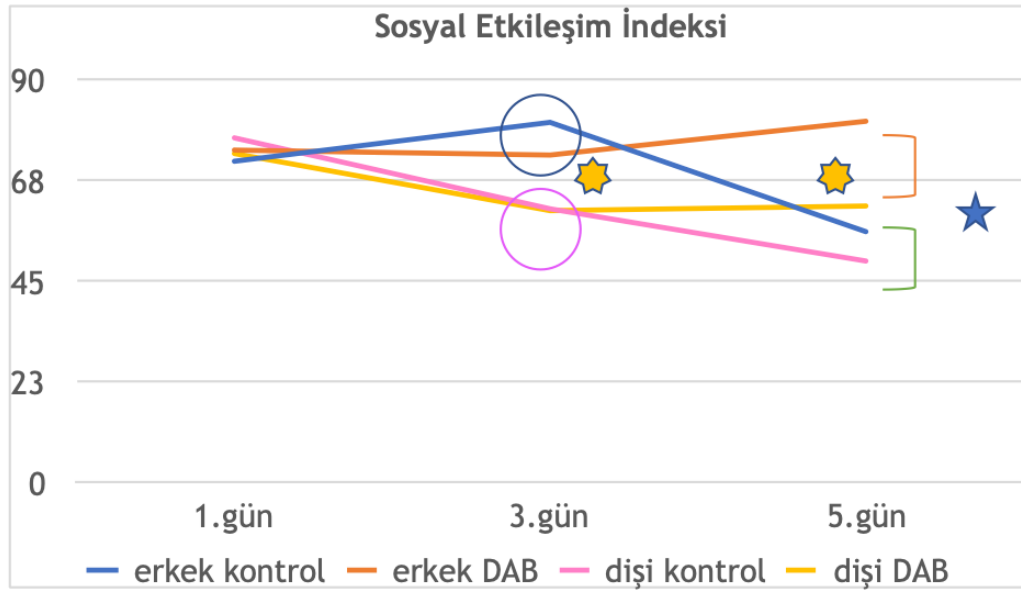
(a) Dişi ve erkek hayvanların DAB ve kontrol gruplarının beşinci gün aydınlık alana geçme latansları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (b) DAB (dişi ve erkek) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının aydınlık alana geçme latansları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4.2.2. Depresyon-Benzeri Davranış Testleri

- Sosyal Etkileşim İndeksi

Sosyal etkileşim süresi, gruplar arasında cinsiyetin bir faktör olarak analizlere eklendiği tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde, sosyal etkileşim düzeylerinde gruplardan bağımsız olarak anlamlılığa yakın cinsiyet etkisi saptanmıştır ($F(3,27)=2,87$, $p=0,055$). Birinci gün her iki cinsiyet de benzer oranda sosyal etkileşime girmişken, erkeklerden farklı olarak dişilerin sosyal etkileşimi üçüncü ve beşinci günlerde azalmıştır (sırasıyla $F(3,27)=5,08$, $p=0,032$; $F(3,27)=4,14$, $p=0,051$) (Şekil 4.11.).

Grup etkisi de anlamlılığa yakın bulunmuştur ($F(3,27)=2,80$, $p=0,059$). Gruplar arası sosyal etkileşim süresi farkı yalnızca beşinci günde görülmüş olup DAB grubunun SF grubundan daha uzun süre sosyal etkileşime girdiği tespit edilmiştir ($F(3,27)=8,70$, $p=0,006$) (Şekil 4.11.). Cinsiyet-grup etkileşimi ise anlamlı bulunmamış olup DAB'ın etkisinin cinsiyetler arasında fark göstermediği sonucuna varılmıştır ($F(3,27)=0,42$, $p=0,74$).



Şekil 4.11. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda DAB ve SF gruplarının sosyal etkileşim testinde sosyal etkileşimde bulunma oranları.

Dişilerin üçüncü ve beşinci günlerde erkeklerden daha az sosyal etkileşime girdiği görülmüş olup bu fark şekilde sarı yıldızlarla ifade edilmiştir (sırasıyla $p=0,032$, $p=0,051$). Bunun yanında, beşinci gün yapılan ölçümlerde DAB grubunun SF grubundan daha uzun süre sosyal etkileşimde bulunduğu gözlenmiş, bu farklılık ise şekilde mavi yıldız ile gösterilmiştir ($p=0,006$). Zamanın etkisini değerlendirmek için yapılan tekrarlı ölçümler için varyans analizinde ise zaman x grup etkisi anlamlılığa yakın bulunmuştur ($p=0,052$). SF grubunun sosyal etkileşimi zamanla azalırken, DAB grubunda üçüncü günde gözlenen azalma, beşinci günde görülmemiştir ($F(2,28)=3,30$, $p=0,052$).

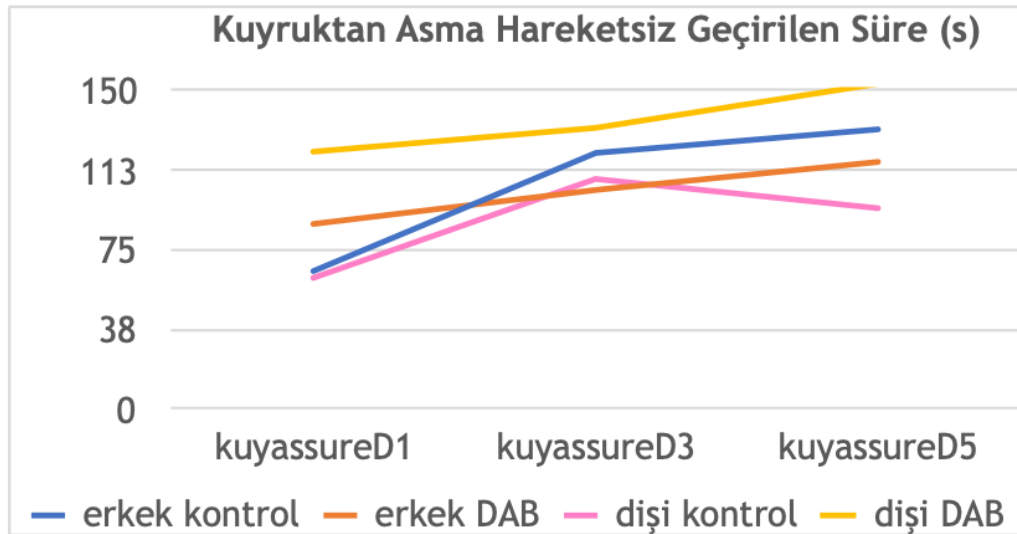
- Kuyruktan Asma Testi

Dişi ile erkek DAB ve kontrol grubu hayvanların kuyruktan asma testinde hareketsiz geçirdikleri süre, her üç zaman noktasında hareketsiz geçirilen sürenin bağımlı değişken olarak analizlere eklendiği çok değişkenli varyans analizi ile değerlendirildiğinde cinsiyet etkisi ($F(3,21)=0,40$, $p=0,75$), grup etkisi ($F(3,21)=1,79$, $p=0,18$) ve grup x cinsiyet etkileşimi ($F(3,21)=0,70$, $p=0,56$) görülmemiştir (Şekil 4.12.).

Erkekler ve dişiler ayrı ayrı değerlendirildiğinde, erkek kontrol ve DAB grupları arasında hiçbir günde hareketsiz kalınan sürelerde fark saptanmazken (birinci gün için $t(14,753)=-1,33$, $p=0,21$; üçüncü gün için $t(15)=0,67$, $p=0,51$;

beşinci gün için $t(12)=0,84$, $p=0,42$), dişilerde birinci gün DAB grubu daha uzun süre hareketsiz kalmıştır ($t(15)=-2,32$, $p=0,035$). Bu fark üçüncü gün yapılan değerlendirmelerde ortadan kalkarken ($t(14)=-0,41$, $p=0,69$) beşinci gün DAB grubunun hareketsizlik süresi anlamlılığa yakın biçimde kontrollerden fazla bulunmuştur ($t(13)=-1,68$, $p=0,116$).

Test performansında zamanla gözlenen değişimde, gruplar ve cinsiyetler arasında farklılık olup olmadığının incelendiği tekrarlı ölçümler için varyans analizinde ise zaman etkisi anlamlı bulunmuş ($F(2,22)=9,225$, $p=0,001$); birinci günde hareketsiz kalınan sürenin diğer iki güne göre daha düşük olduğu saptanmıştır (birinci gün için ortalama 83,81, %95 güven aralığı (64,64; 102,98); üçüncü gün için ortalama 116,17, %95 güven aralığı (92,98; 139,36); beşinci gün için ortalama 123,99, %95 güven aralığı 98,71; 149,28).

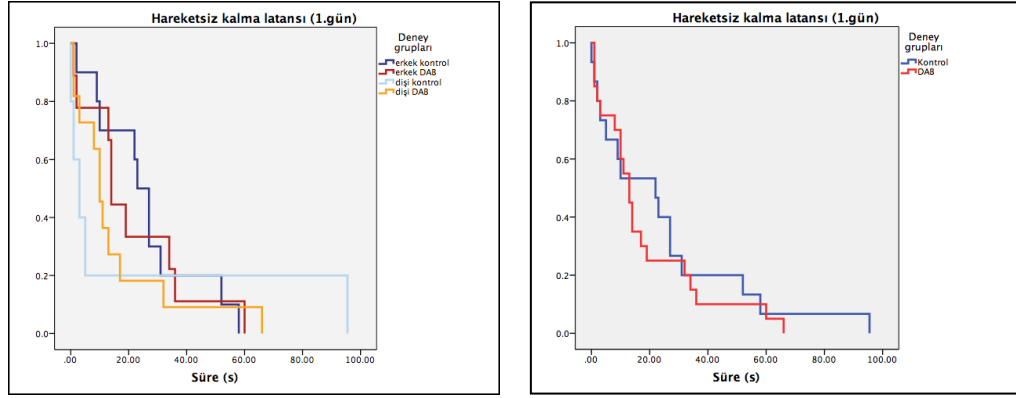


Şekil 4.12. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda DAB ve SF gruplarının kuyruktan asma testinde hareketsiz kaldıkları süre (s).

Birinci, üçüncü ve beşinci günlerde yapılan kuyruktan asma testinde cinsiyetler ve gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Birinci gün kuyruktan asma testinde erkek ve dişi hayvanların DAB ve kontrol gruplarının hareketsiz kalma latansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (sırasıyla $p=0,596$, $p=0,222$) (Şekil 4.13.). DAB

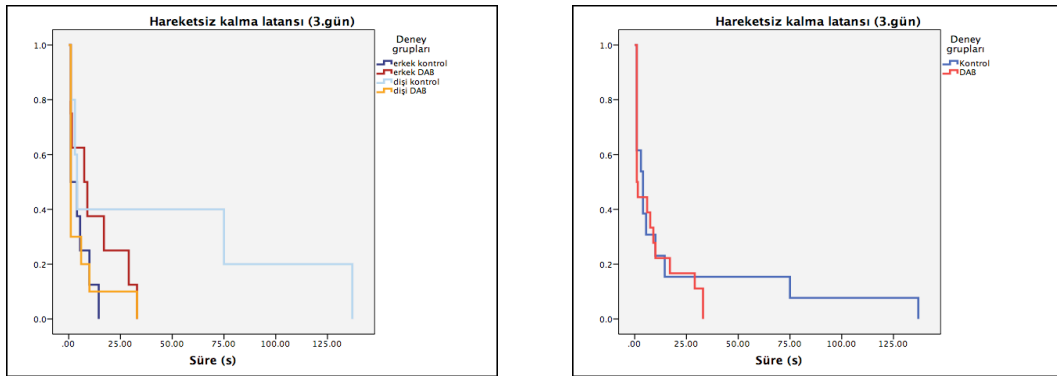
(erkek ve dişiler) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının hareketsiz kalma latansları arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,602$) (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda birinci gün kuyruktan asma testinde a) tüm deney gruplarının, b) DAB (dişi ve erkek) ile kontrol (dişi ve erkek) gruplarının hareketsiz kalma latansı (s).

(a) Dişi ve erkek hayvanların DAB ve kontrol gruplarının birinci gün hareketsiz kalma latansları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (b) DAB (dişi ve erkek) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının hareketsiz kalma latansları arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır.

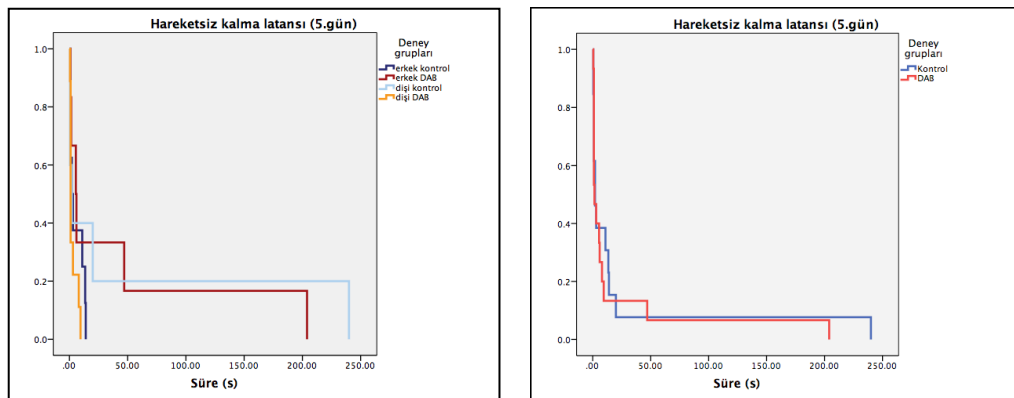
Üçüncü gün kuyruktan asma testinde erkek ve dişi hayvanların DAB ve kontrol gruplarının hareketsiz kalma latansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (sırasıyla $p=0,118$, $p=0,101$) (Şekil 4.14.). DAB (erkek ve dişiler) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının hareketsiz kalma latansları arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,570$) (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda üçüncü gün kuyruktan asma testinde a) tüm deney gruplarının, b) DAB (dişi ve erkek) ile kontrol (dişi ve erkek) gruplarının hareketsiz kalma latansı (s).

(a) Dişi ve erkek hayvanların DAB ve kontrol gruplarının üçüncü gün hareketsiz kalma latansları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (b) DAB (dişi ve erkek) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının hareketsiz kalma latansları arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Beşinci gün kuyruktan asma testinde erkek ve dişi hayvanların DAB ve kontrol gruplarının hareketsiz kalma latansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (sırasıyla $p=0,275$, $p=0,305$) (Şekil 4.15.). DAB (erkek ve dişiler) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının hareketsiz kalma latansları arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,589$) (Şekil 4.15.).

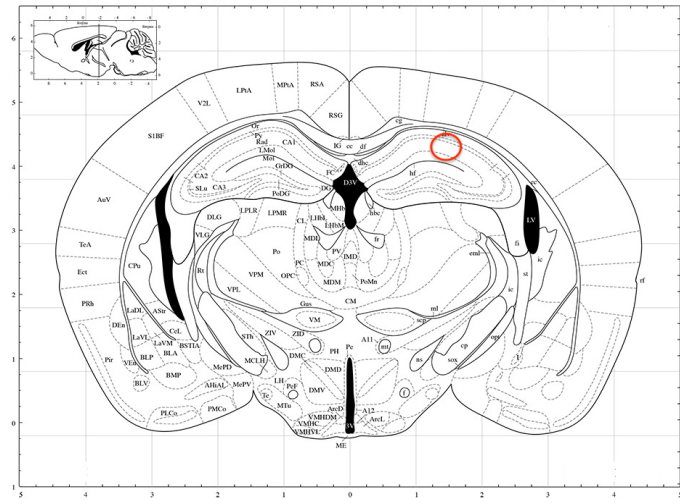


Şekil 4.15. Kanül takılan dişi ve erkek hayvanlarda beşinci gün kuyruktan asma testinde a) tüm deney gruplarının, b) DAB (dişi ve erkek) ile kontrol (dişi ve erkek) gruplarının hareketsiz kalma latansı (s).

(a) Dişi ve erkek hayvanların DAB ve kontrol gruplarının beşinci gün hareketsiz kalma latansları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (b) DAB (dişi ve erkek) ve kontrol (dişi ve erkek) gruplarının hareketsiz kalma latansları arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır.

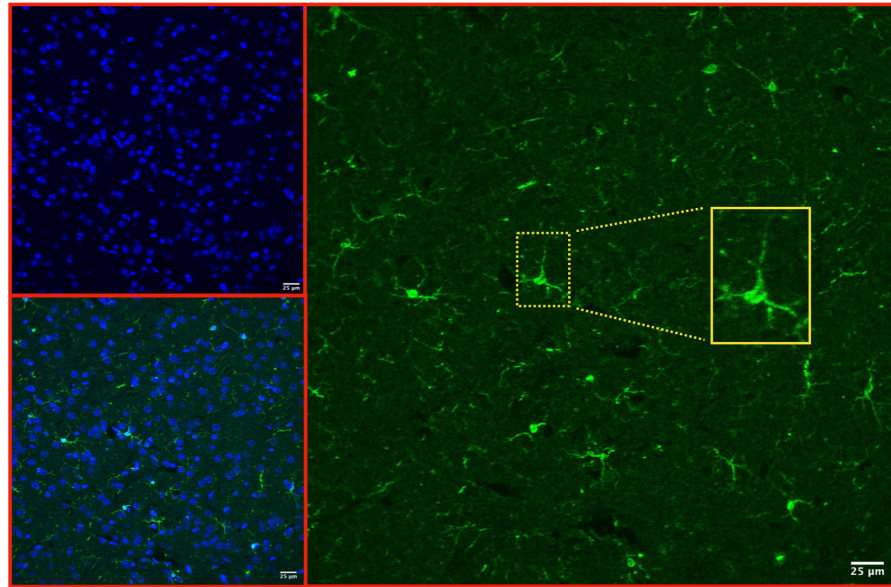
4.3. Kanül Takılmadan İntrahipokampal Enjeksiyon Yapılan Hayvanlarda Iba-1 İşaretlemeleri

4.3.1. Dorsal hipokampal bölge



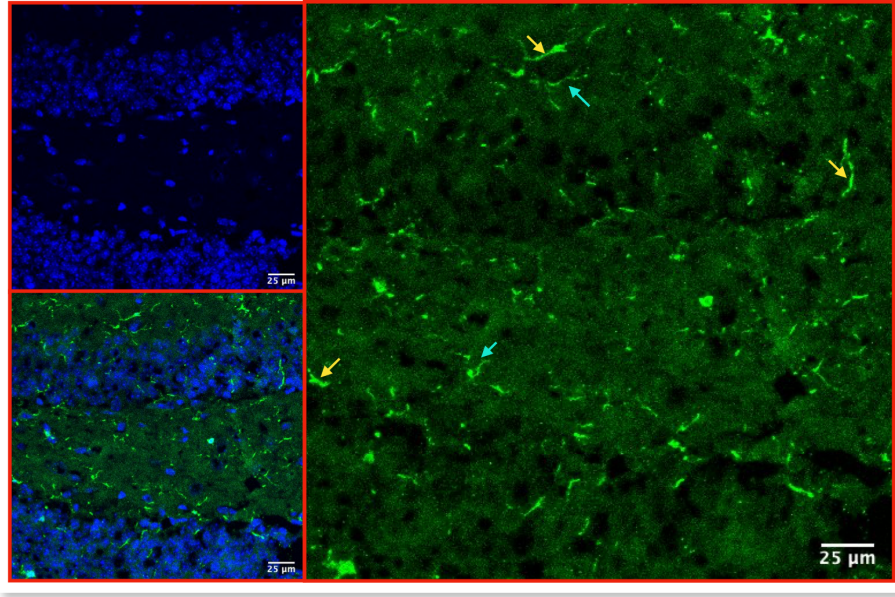
Şekil 4.16. Dorsal hipokampal bölgenin temsili görüntüsü.

Naif, kontrol ve DAB grubu farelerde dorsal hipokampal bölgeyi temsilen incelenen alan kırmızı çemberle işaretlenmiştir. Görsel, Allen fare beyin atlasından değiştirilerek alınmıştır.



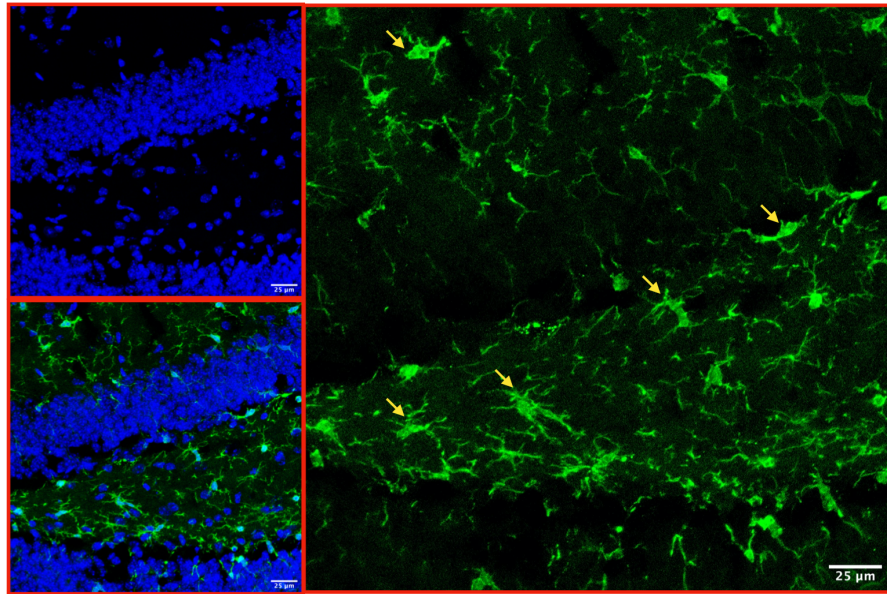
Şekil 4.17. Naif farenin dorsal hipokampus görseli.

İntrahipokampal enjeksiyon yapılmamış naif farenin dorsal hipokampusünde naif fenotipte mikrogliyal hücreler gözlenmektedir. Şekilde mikrogliyal hücre gövdelerinin küçük ve yuvarlak, uzantılarının ise ince ve uzun olduğu ve fenotiplerinde mikrogliyal aktivasyona özgü değişikliklerin gerçekleşmediği görülmektedir.



Şekil 4.18. Sham (yalancı uygulama/kontrol/SF) grubu farenin dorsal hipokampus görseli.

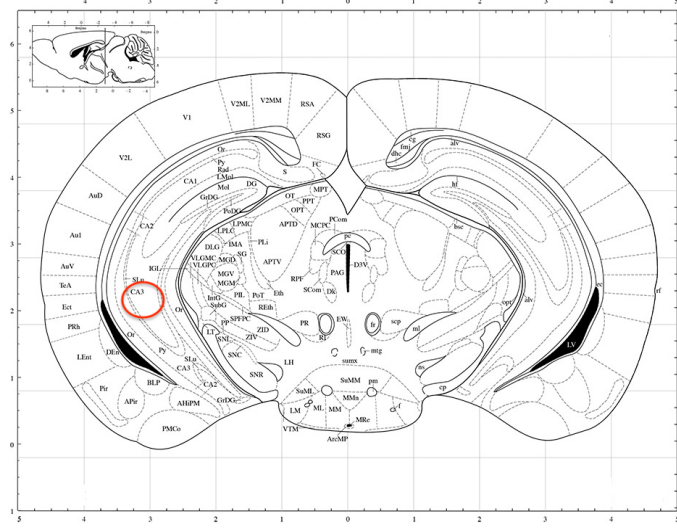
İntrahipokampal SF enjeksiyonu yapılmış olan farenin dorsal hipokampusünde naif ve aktive fenotipte mikroglialar gözlenmektedir. Hücre gövdesi küçük ve yuvarlak, uzantıları ince ve az sayıda olan naif mikroglialara örnekler şekilde mavi oklarla gösterilmiştir. Şekildeki aktive fenotiple benzerlik gösterecek şekilde nispeten daha kalın uzantılara sahip mikroglialara örnekler ise sarı renkli oklarla işaretlenmiştir.



Şekil 4.19. DAB (deney) grubu farenin dorsal hipokampus görseli.

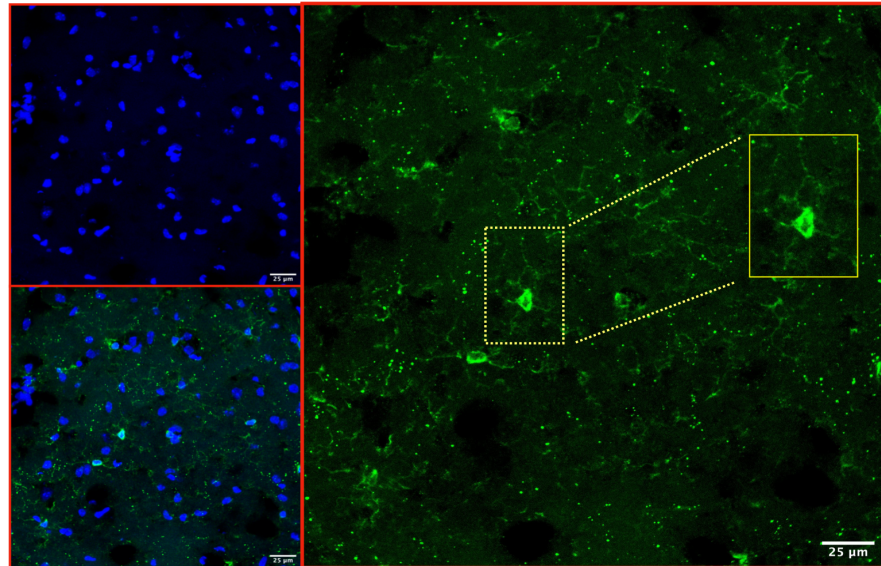
İntrahipokampal DAB enjeksiyonu yapılan farenin dorsal hipokampusünde aktive fenotipte mikroglialar gözlenmektedir. Hücre gövdesi büyümüş ve uzantıları kalınlaşmış mikroglialara örnekler şekilde sarı oklarla işaretlenmiştir. Görselde, Iba-1 sinyal intansitesindeki artış da dikkat çekmektedir.

4.3.2. Ventral hipokampal bölge



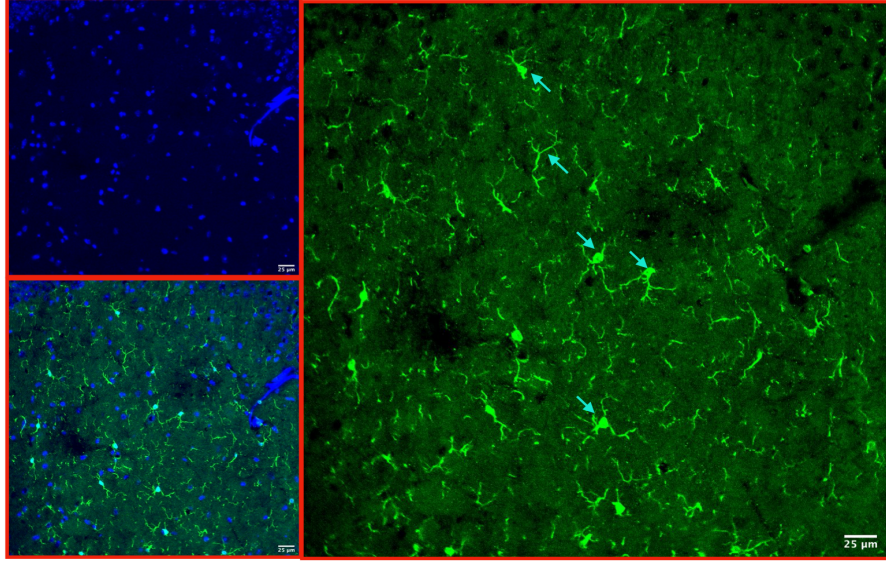
Şekil 4.20. Ventral hipokampal bölgenin temsili görüntüsü.

Naif, kontrol ve DAB grubu farelerde ventral hipokampal bölgeyi temsilen incelenen alan kırmızı çemberle işaretlenmiştir. Görsel, Allen fare beyin atlasından değiştirilerek alınmıştır.



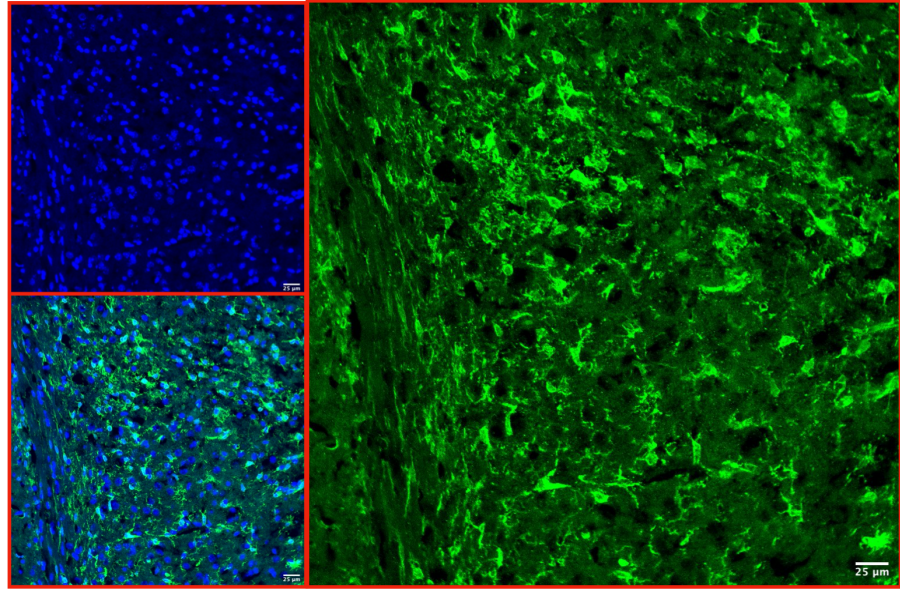
Şekil 4.21. Naif farenin ventral hipokampus görseli.

İntrahipokampal enjeksiyon yapılmamış farenin ventral hipokampusünde naif fenotipte mikrogliyal hücre gövdelerinin küçük ve yuvarlak, uzantılarının ise ince ve uzun olduğu ve fenotiplerinde mikrogliyal aktivasyona özgü değişikliklerin gerçekleşmediği görülmektedir.



Şekil 4.22. Sham (yalancı uygulama/kontrol/SF) grubu farenin ventral hipokampus görseli.

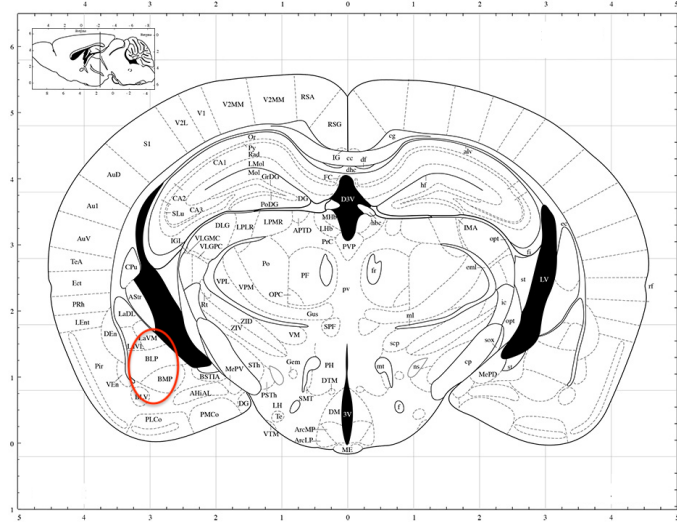
İntrahipokampal SF enjeksiyonu yapılmış olan farenin ventral hipokampusünde yaygın olarak naif fenotipte mikroglialar gözlenmektedir. Hücre gövdesi küçük ve yuvarlak, uzantıları ince ve az sayıda olan naif mikroglialara örnekler şekilde mavi oklarla gösterilmiştir.



Şekil 4.23. DAB (deney) grubu farenin ventral hipokampus görseli.

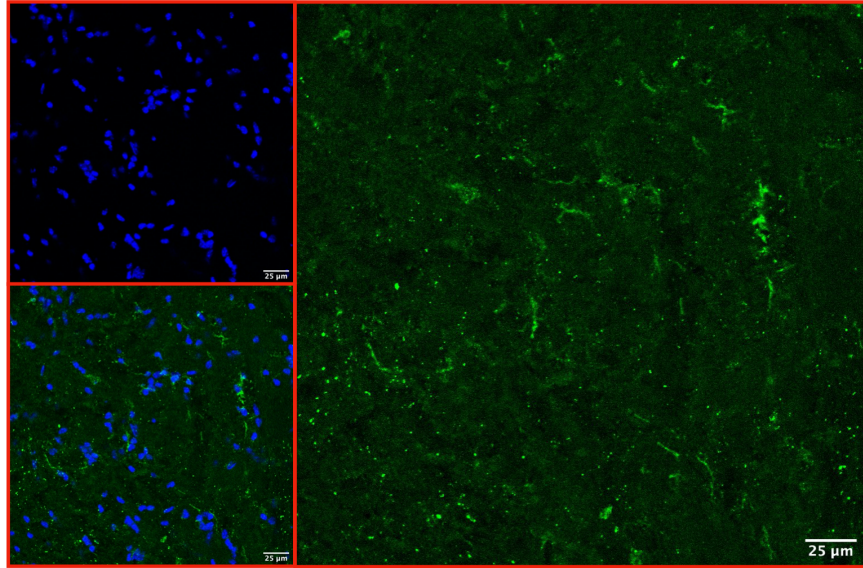
İntrahipokampal DAB enjeksiyonu yapılan farenin ventral hipokampusünde aktive fenotipte mikroglialar gözlenmektedir. Görselde, mikrogliaların hücre gövdelerinin büyüdüğü, uzantılarının kalınlaştığı ve Iba-1 sinyal intansitesinin arttığı görülmektedir.

4.3.3. Amigdalar bölge



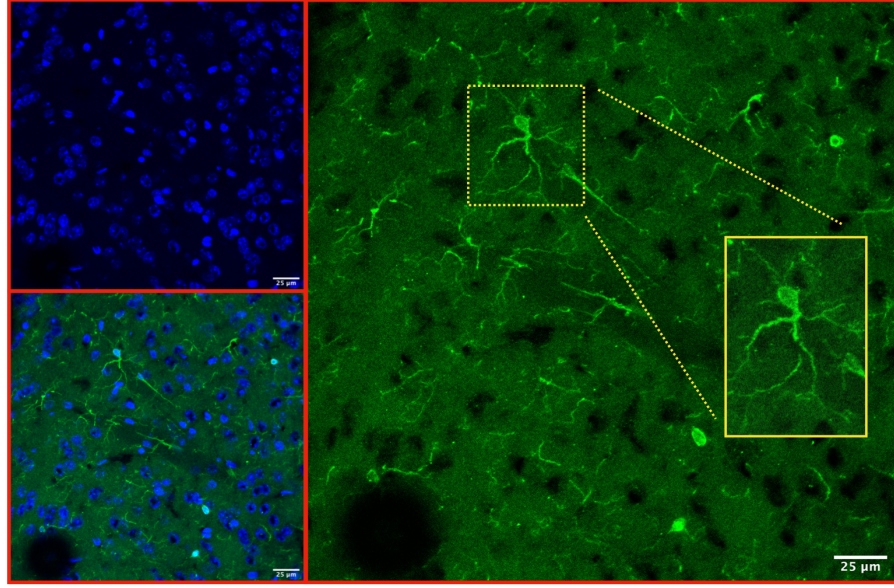
Şekil 4.24. Amigdalar bölgenin temsili görüntüsü.

Naif, kontrol ve DAB grubu farelerde amigdalar bölgeyi temsilen incelenen alan kırmızı çemberle işaretlenmiştir. Görsel, Allen fare beyin atlasından değiştirilerek alınmıştır.



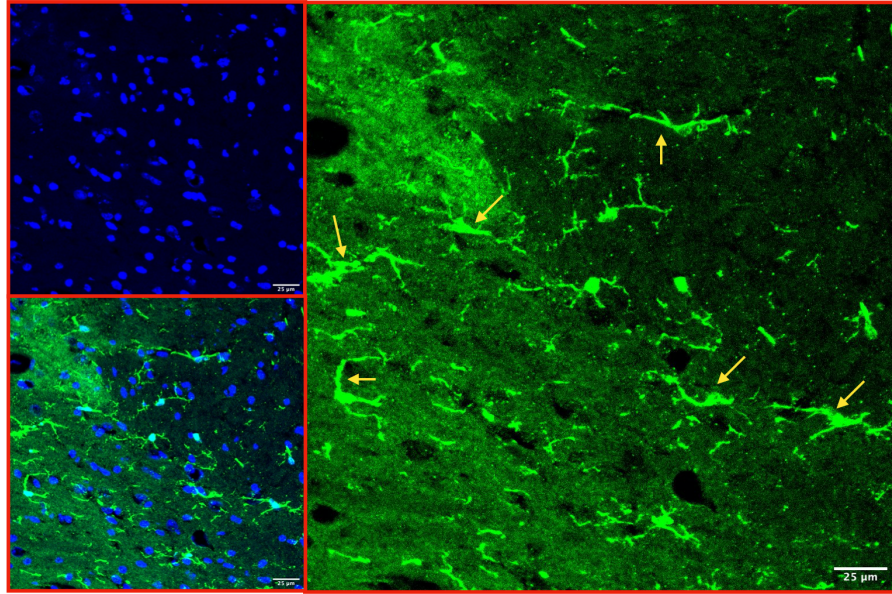
Şekil 4.25. Naif farenin amigdalar bölge görseli.

İntrahipokampal enjeksiyon yapılmamış naif farenin amigdalar bölgesinde naif fenotipte mikrogliyal hücre gövdeleri gözlenmektedir. Şekilde mikrogliyal hücre gövdelerinin küçük ve yuvarlak, uzantılarının ise ince ve uzun olduğu ve fenotiplerinde mikrogliyal aktivasyona özgü değişikliklerin gerçekleşmediği görülmektedir.



Şekil 4.26. Sham (yalancı uygulama/kontrol/SF) grubu farenin amigdalar bölge görseli.

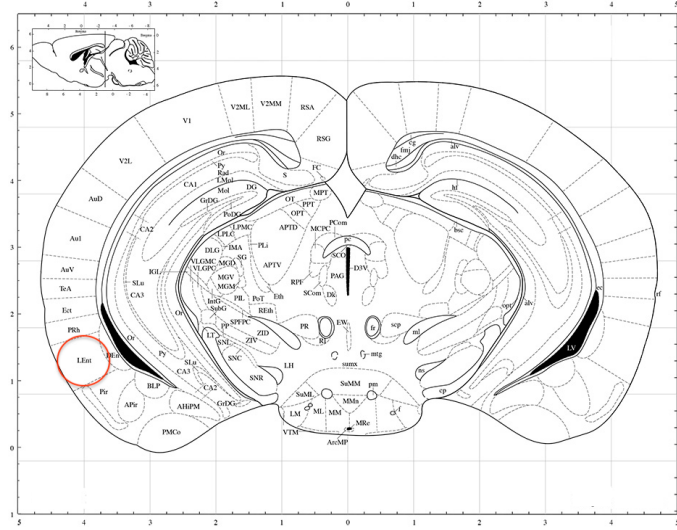
İntrahipokampal SF enjeksiyonu yapılmış olan farenin amigdalar bölgesinde naif fenotipte mikroglialar gözlenmektedir. Hücre gövdesi küçük ve yuvarlak, uzantıları ince, uzun ve az sayıda olan naif mikroglialarda sayıca artış veya intansite artışı da görülmemektedir.



Şekil 4.27. DAB (deney) grubu farenin amigdalar bölge görseli.

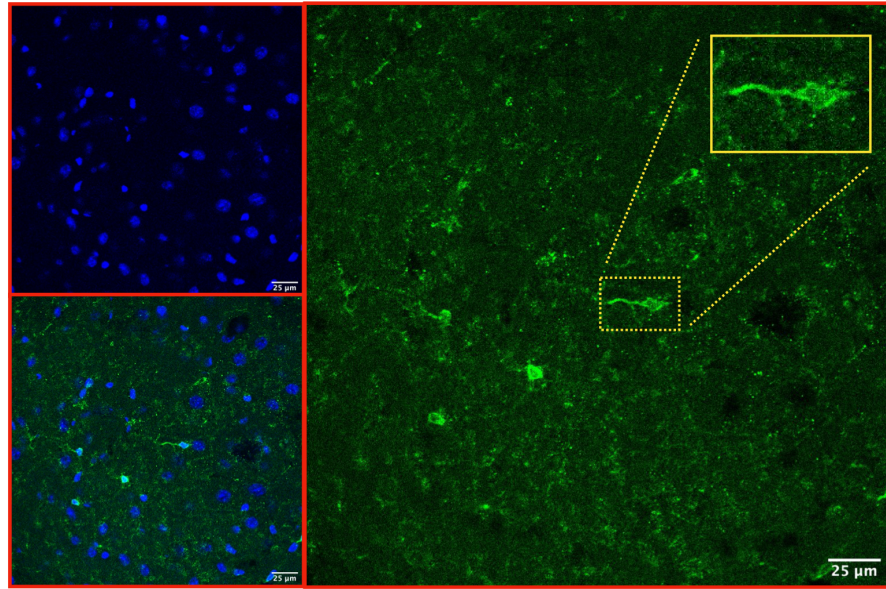
İntrahipokampal DAB enjeksiyonu yapılan farenin amigdalar bölgesinde aktive fenotipte mikroglialar ve Iba-1 sinyal intansitesinde artış gözlenmektedir. Şekilde aktive fenotipteki mikrogliaların hücre gövdelerinin büyüdüğü, uzantılarının kalınlaştığı ve uzantı boyunca birçok küçük yeni dallar verdiği görülmektedir, görselde bu fenotipe örnek oluşturan uzantılar sarı oklarla işaretlenmiştir.

4.3.4. Entorinal kortikal bölge



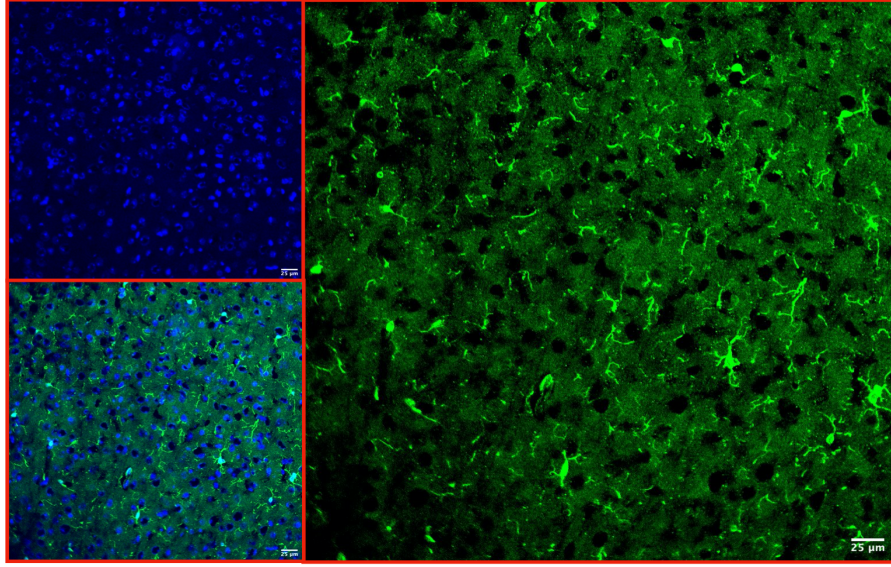
Şekil 4.28. Entorinal kortikal bölgenin temsili görüntüsü.

Naif, kontrol ve DAB grubu farelerde entorinal kortikal bölgeyi temsilen incelenen alan kırmızı çemberle işaretlenmiştir. Görsel, Allen fare beyin atlasından değiştirilerek alınmıştır.



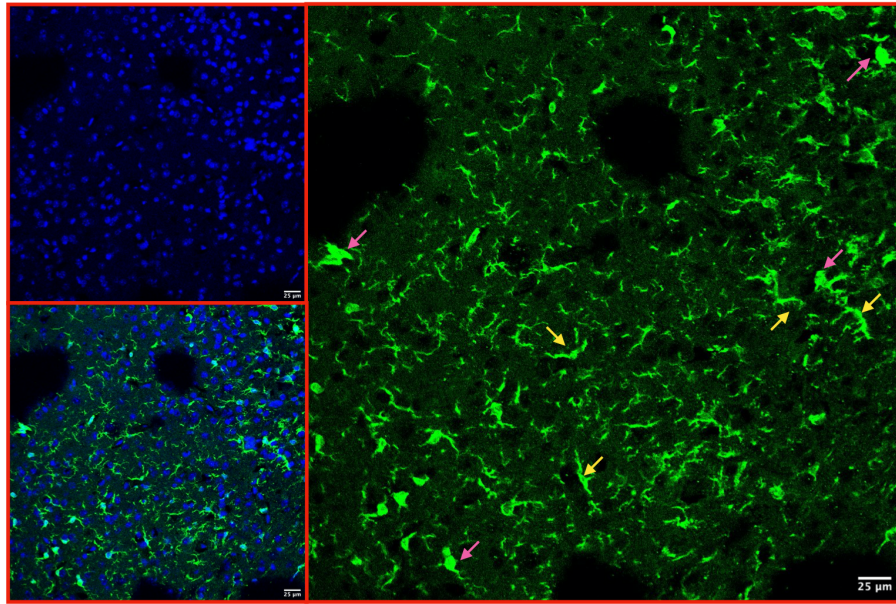
Şekil 4.29. Naif farenin entorinal bölge görseli.

İntrahipokampal enjeksiyon yapılmamış naif farenin entorinal bölgesinde naif fenotipte mikoglyalar gözlenmektedir. Şekilde mikroglyaların hücre gövdelerinin küçük ve yuvarlak, uzantılarının ise ince ve uzun olduğu ve fenotiplerinde mikroglyal aktivasyona özgü değişikliklerin gerçekleşmediği görülmektedir.



Şekil 4.30. Sham (yalancı uygulama/kontrol/SF) grubu farenin entorinal bölge görseli.

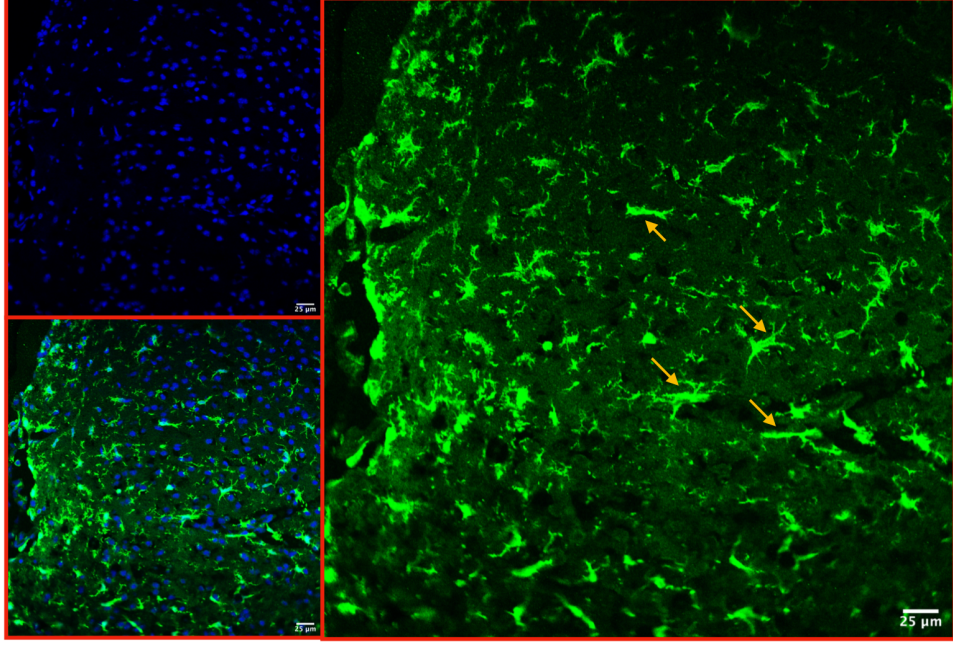
İntrahipokampal SF enjeksiyonu yapılmış olan farenin entorinal bölgesinde naif fenotipte mikroglialar gözlenmektedir. Hücre gövdesi küçük ve yuvarlak, uzantıları ince ve az sayıda olan naif mikroglialarda sayıca artış, intansite artışı ve mikroglial aktivasyona özgü fenotipal değişiklikler de görülmemektedir.



Şekil 4.31. DAB (deney) grubu farenin entorinal bölge görseli.

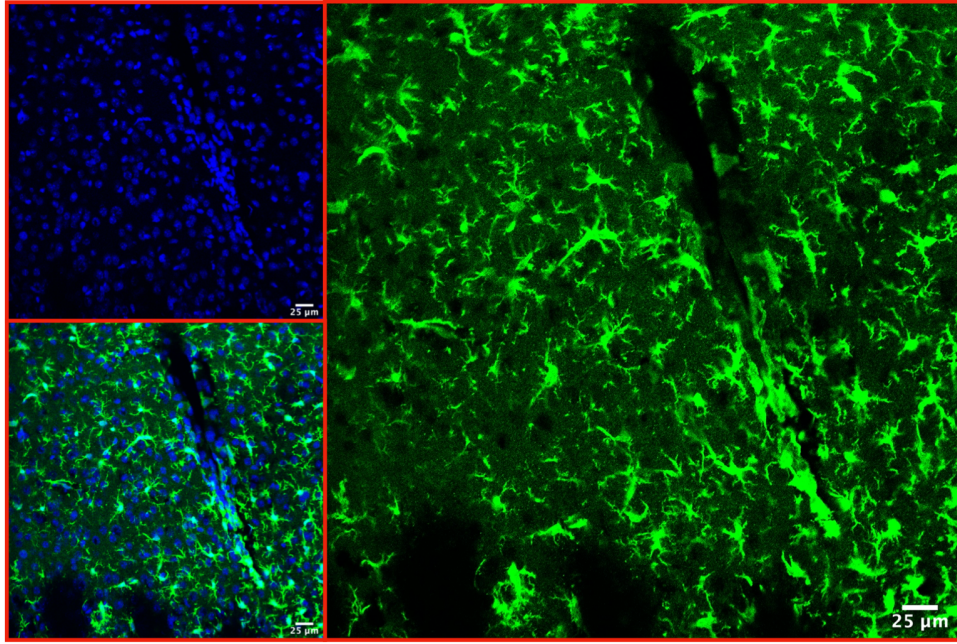
İntrahipokampal DAB enjeksiyonu yapılan farenin entorinal bölgesinde aktive fenotipte mikroglialar ve Iba-1 sinyal intansitesinde artış gözlenmektedir. Şekilde aktive fenotipe uygun şekilde hücre gövdeleri büyüyen mikroglialara örnekler pembe oklarla, mikrogliaların kalınlaşan ve küçük yeni dallar veren uzantıları ise sarı oklarla işaretlenmiştir.

4.3.5. Korteks enjeksiyon trasesi



Şekil 4.32. Sham (yalancı uygulama/kontrol/SF) grubu farenin korteksinde enjeksiyon trasesi civarı görseli.

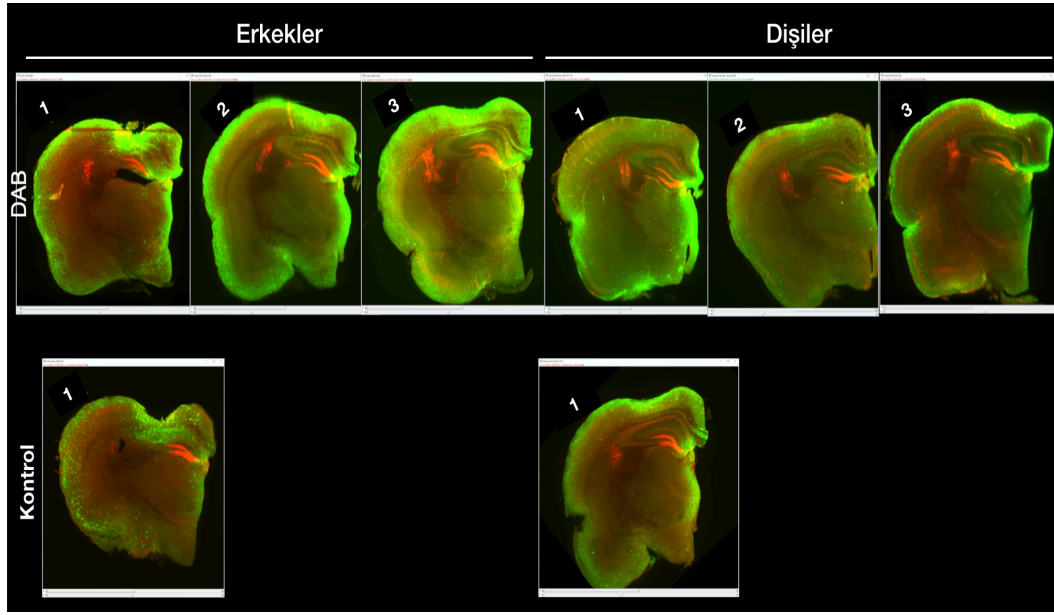
İntrahipokampal SF enjeksiyonu yapılan farenin korteksinde enjeksiyon trasesi civarında mikroglial aktivasyon gözlenmektedir. Hücre gövdeleri büyümüş, uzantıları kalınlaşmış ve yeni küçük dallar vermiş olan aktif fenotipteki mikroglialara örnekler şekilde sarı oklarla işaretlenmiştir. Ayrıca, görselde Iba-1 sinyal intansitesindeki artış da dikkati çekmektedir.



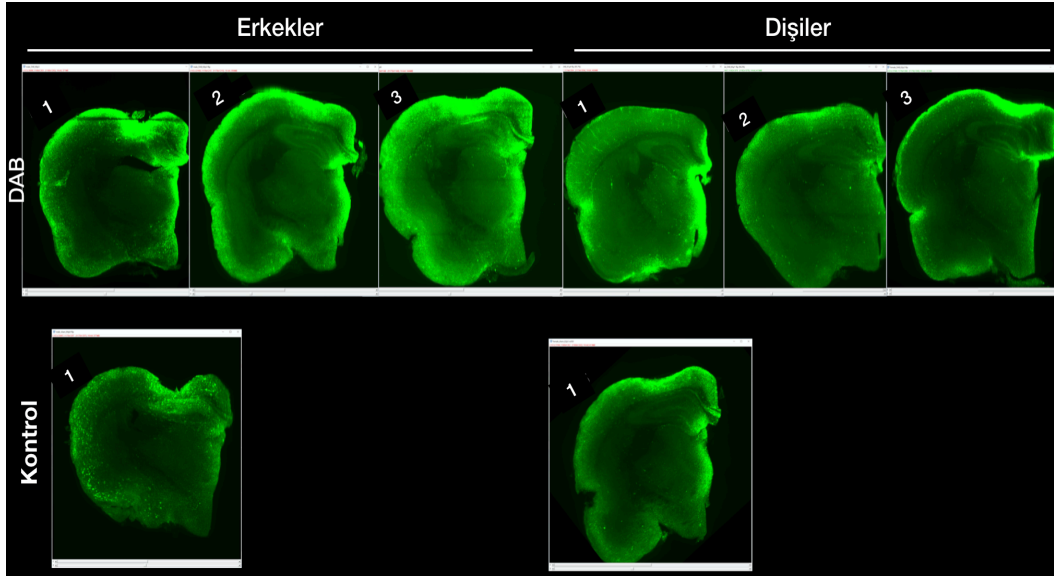
Şekil 4.33. DAB (deney) grubu farenin korteksinde enjeksiyon trasesi civarı görseli. İntrahipokampal DAB enjeksiyonu yapılan farenin korteksinde enjeksiyon trasesi civarında mikroglial aktivasyon gözlenmektedir. Şekilde mikrogliaların hücre gövdelerinin büyüdüğü, uzantılarının kalınlaştığı ve yeni küçük dallar verdiği, Iba-1 sinyal intansitesinin arttığı görülmektedir.

4.4. Kanül Takılarak İntrahipokampal Enjeksiyon Yapılan Hayvanlarda Iba-1 İşaretlemeleri

Kanül takılarak intrahipokampal DAB enjeksiyonu yapılan hayvanların beyinleri, şeffaflaştırılarak ışık tabakası floresan mikroskopisi ile görüntülenmiştir. Görüntülerde, DAB grubu hayvanlarda kontrol grubundan farklı olarak hem enjeksiyon bölgesinde hem de enjeksiyon alanından uzak beyin bölgelerinde yaygın mikroglial aktivasyona işaret eder şekilde Iba-1 sinyal intansitesi artışı gözlenmiştir.



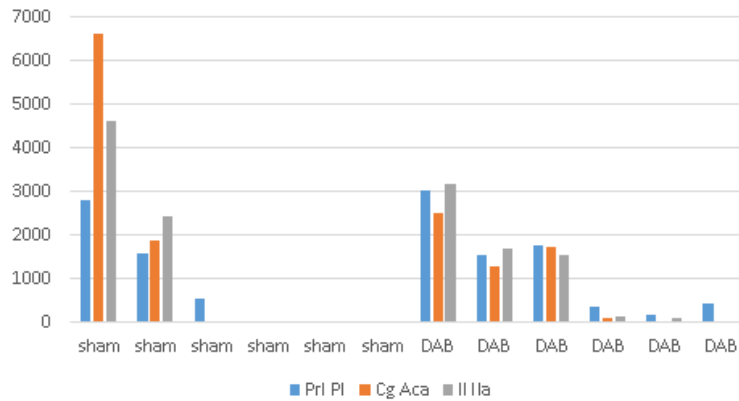
Şekil 4.34. Kanül takılarak intrahipokampal enjeksiyon yapılan 3 erkek DAB, 3 dişi DAB, 1 erkek kontrol, 1 dişi kontrol hayvan yarım beyninin koronal görüntüleri. Şekilde yeşil işaretlemeler Iba-1, kırmızı işaretlemeler ise çekirdek işaretlemeleri için kullanılan propidiyum iyodür boyamasını göstermektedir. Şekilde hem dişi hem erkeklerde DAB grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yaygın ve daha belirgin Iba-1 boyamasının olduğu görülmektedir.



Şekil 4.35. Kanül takılarak intrahipokampal enjeksiyon yapılan 3 erkek DAB, 3 dişi DAB, 1 erkek kontrol, 1 dişi kontrol hayvan yarım beyninin Iba-1 ile işaretlendiği koronal görüntüleri.

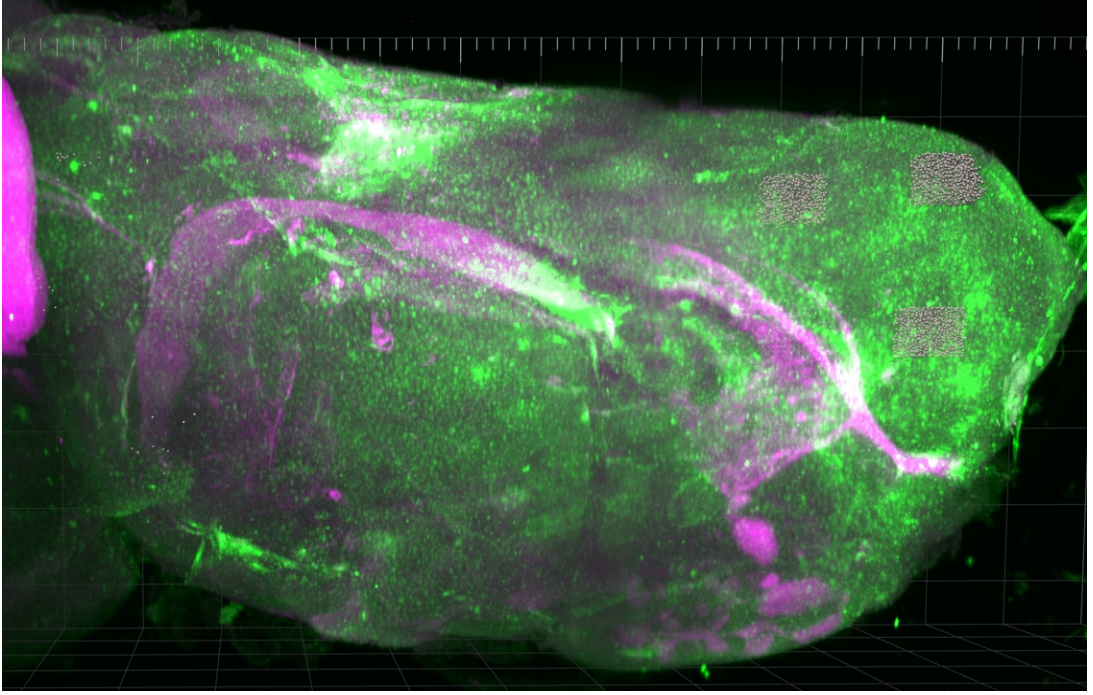
Şekilde hem dişi hem erkeklerde DAB grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yaygın ve daha belirgin Iba-1 boyamasının olduğu görülmektedir.

Bu bulguların sayısallaştırılarak desteklenmesi amacıyla, davranış testlerinin sonuçlarıyla ilişkilendirilebilecek olan medial prefrontal korteks bölgelerinin (prelimbik, infralimbik ve anterior singulat alan) koordinatları içinden, 150x150x75 µm hacminde küp şeklinde birer alan seçilerek mikroglia sayıları IMARIS programı otomatik yazılımı ile tespit edilmiştir (Şekil 4.37.). Antikorların şeffaflaştırılmış kalın doku bloklarının derinlerine geçememesi sebebiyle subkortikal yapılarda (dorsal-ventral hipokampus, amigdala, ventral tegmental alan, entorinal korteks) ise etkili bir mikroglial işaretleme gerçekleştirilememiş; dolayısıyla bu bölgelerdeki olası sinyal değişiklikleri analiz edilememiştir. Bu yöntemle yapılan ön ölçüm denemlerinde, tek bir küp yerleştirilmesiyle yapılan analizin enjeksiyon bölgesinden uzak alanlarda güvenilir sonuçlar vermediği saptanmıştır. Kapsamlı bir analiz ise verinin heterojen ve çok yüksek boyutta olması nedeniyle, basit analiz yaklaşımları ile yapılamamaktadır. Tek küp yaklaşımının grup içi yüksek varyasyona yol açtığı ve gruplar arası farklılıkları değerlendirmeyi mümkün kılamadığı gözlenmiştir. Kapsamlı bir analiz ise uzun bir zaman gerektirecektir. Dolayısıyla ancak yaklaşık bir terabyte büyüklüğündeki verinin Münih'ten transferinden sonra gerçekleştirilebilecektir.



Şekil 4.36. DAB ve kontrol grubu (sham) farelerde şeffaflaştırılarak ışık tabaka sı floresan mikroskopisi ile görüntülenen beyinlerde, prelibmik (mavi), infralimbik (gri) ve anterior singulat alanlardaki (turuncu) mikroglia sayıları.

Kontrol grubu farelerden (sham) dört tanesinin hemisferleri yurtdışına diğer örneklerden farklı olarak agaroz içerisine gömülü olarak gönderilmiş, bu beyinlerde Iba-1 işaretlemeleri başarılı olmamıştır. Bu sebeple, bu dört hemisferde mikroglia sayıları ihmal edilecek düzeyde bulunmuştur.



Şekil 4.37. Işık tabakası floresan mikroskopisi ile görüntülenen bir DAB grubu fare hemisferinin üç boyutlu rekonstrükte edilmiş görüntüsü.

Şekilde yeşil işaretlemeler Iba-1, pembe işaretlemeler ise propidiyum iyodür sinyalini göstermektedir. Görseldeki üç adet gri renkli küp şeklinde alan ise mikroglia sayımı için seçilen prelimbik, infralimbik ve anterior singulat korteks bölgelerine işaret etmektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada glikojen fosforilaz inhibitörü DAB'ın intrahipokampal enjeksiyonunun akut stres tarafından takip edildiği ve edilmediği durumlarda, davranış ve nöroinflamasyon üzerindeki etkileri, cinsiyetler arasında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

5.1. DAB'ın Davranışsal Etkileri

5.1.1. DAB'ın depresyon-benzeri davranış üzerine etkileri

- DAB'ın kuyruktan asma testiyle değerlendirilen davranışsal umutsuzluk üzerine etkileri

Çalışmamızın intrahipokampal DAB/SF enjeksiyonunun etkilerini gözlemlediğimiz kısımda, depresyon-benzeri davranış göstergelerinden davranışsal umutsuzluğu test eden kuyruktan asma testinde dişilerde ve erkeklerde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark kaydedilmemiştir. Bu bulgu glikojenin ve laktatin depresyon-benzeri davranışlar için önemini ortaya koyan daha önceki çalışmaların bulgularıyla uyumlu değildir (32, 39, 40). Bu çalışmalarda depresyonu modellemek amacıyla kemirgenlerde kronik kortikosteron veya kronik stres uygulamalarının hipokampusta astrosit glikojen seviyelerini düşürdüğü ve depresyon-benzeri davranışa yol açtığı; buna paralel olarak hipokampusta glikojeni azaltmak amacıyla glikojen sentezini sağlayan glikojen sentaz 1 enziminin RNA interferans yöntemiyle baskılanmasının depresyon-benzeri davranışı artırdığı gösterilmiştir (31, 32). Akut laktat uygulamasının stres direncini artırıcı ve/veya antidepresan etkileri olduğuna işaret eden çalışmalar, glikojenin yıkılması sonucu ortaya çıkan laktatin depresyon patofizyolojisindeki rolünü desteklemektedir (39, 40).

Bizim bulgularımızla literatür arasındaki uyumsuzluk birçok nedenle ortaya

çıkmiş olabilir: Çalışmamızda davranış testleri anksiyete-benzeri ve depresyon-benzeri davranışların test edilebildiği geniş bir yelpaze oluşturacak şekilde seçilmiştir, bu amaçla ve akut enjeksiyon ile uygulanabilecek testlerin sayısının deney desenine bağlı sınırlılığı nedeniyle literatürde en çok kullanılan testler seçilmiştir. Bu nedenle sinapsa gerekli enerjinin glikojen kullanımı üzerinden kısıtlanmasının, bu çalışmada değerlendirilmemiş bir depresyon-benzeri davranışı etkilemesi olasılığı dışlanamaz. Nitekim, yukarıda bahsedilen çalışmalarda depresyon-benzeri davranışlar bizim çalışmamızdakinden farklı olarak zorla yüzdürme testindeki hareketsizlik süresi, kronik sosyal yenilgi stresini takiben sosyal etkileşim süresi, yükseltilmiş artı labirentinde açık kollarda geçirilen süre ile değerlendirilmiştir (39, 40). Bunun yanısıra, bizim deney desenimiz bahsedilen çalışmalardakinden farklı olarak cerrahi müdahale içerdiğinden, her ne kadar davranış testleri enjeksiyondan sonraki 3-5 gün içinde gerçekleştirilmiş olsa da doku iyileşmesinin tam sağlanamamış olması ve/veya buna bağlı ağrı vb. nedenler kontrol grubunda da anksiyete-benzeri ve depresyon-benzeri davranışı artırarak deneye bağlı farkların görülmesini engellemiş olabilir. Benzer şekilde, enjeksiyon için kullanılan izofluran anestezisi DAB'ın depresyon-benzeri davranışlar üzerine etkilerini maskeleyebilir ya da davranış deneyleri esnasında yakın zamanda anestezi alınmış olmasına bağlı öngörülemeyen etkiler ortaya çıkmış olabilir. Tüm bu ihtimalleri göz önünde bulundurarak takip eden çalışmalarımızda, davranış deneylerinin cerrahinin travmatik etkileri ve anesteziden mümkün olduğunca uzak bir dönemde yapılabileceği bir deney paradigması oluşturduk.

Bunun yanında, literatürde akut stres uygulamasının çeşitli beyin bölgelerinde laktat konsantrasyonunu arttırdığına işaret eden çalışmalar artan enerji talebine cevap verebilmek amacıyla laktat arzının da arttığına işaret etmektedir (26, 27, 28, 29, 30). Bu sebeple, bu deney serisinde uygulanan tek doz glikojen fosforilaz inhibitörü DAB'ın, bazal sinaptik aktivitede değişiklik olmadığı için sinaptik enerji arzında soruna yol açmamış olması da olasıdır. Akut olarak uygulanan DAB'ın sinapstaki etkileri, telafi edici mekanizmalar tarafından dengelenmiş ve bu sebeple davranışa yansımamış olabilir. Bu sebeple takip eden çalışmalarımızda, DAB'ın maskelenmiş

olması muhtemel davranışsal etkilerinin gözlemlenebilir kılınması için sinaptik aktivitenin, dolayısıyla sinaptik enerji ihtiyacının (talebin) DAB enjeksiyonu sonrasında akut stres uygulaması ile artırıldığı (başka bir deyişle arz tarafından karşılanamayacak kadar talep oluşturulmasının hedeflendiği) bir deney akışı tercih ettik.

- DAB'ın sükroz tercihi testiyle değerlendirilen anhedoni üzerine etkileri

Intrahipokampal DAB/SF enjeksiyonu ile anhedoni arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için kullanılan sükroz tercih testinde, DAB uygulanan dişi farelerin kontrol grubuna kıyasla sükrozlu suyu daha çok tercih ettiğini gözlemledik. Bu bulgu, hipotezimizin aksine glikojen kullanımının engellenmesinin hedonik davranışta artışa yol açmış olabileceğine işaret etmektedir. Ancak testte gözlenen bu farkın, interstisyumda kolayca dağılabilen DAB'ın (170) hipotalamusa sızması sonucu homeostatik mekanizmaların şeker alımını uyarması sebebiyle gözlenmiş olabileceğini düşündük. Bu nedenle hedonik davranışların, sükroz tercihi gibi glikojen metabolizmasıyla ilişkili olabilecek bir test yerine, sosyal etkileşim gibi bir testle değerlendirilmesinin daha güvenilir sonuçlar verebileceğini düşünerek bir sonraki deney serimize sosyal etkileşim testini ekledik.

5.1.2. DAB'ın lökomotor aktivite ve anksiyete-benzeri davranış üzerine etkileri

Çalışmamızda intrahipokampal DAB enjeksiyonu yapılan farelerde anksiyete-benzeri davranışı değerlendirmek için kullanılan açık alan testinde DAB enjeksiyonundan sonraki 3. gün her iki cinsiyette de anlamlı fark gözlenmezken, 5. gün açık alan testinde erkeklerde deney grubunun açık alanda geçirdiği süreyi kontrol grubundan daha uzun olarak saptadık. Ancak bu grupta 5.gün lökomotor aktivite testinde katedilen toplam mesafenin kontrol grubuna kıyasla artmış olması, açık alanda geçirilen süredeki artışın artmış lökomotor aktiviteyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Nitekim, bu ihtimali test etmek için yaptığımız ANCOVA (kovaryans) analizinde, lökomotor aktivitenin etkisi kontrol edildiğinde dişilerin ve

erkeklerin açık alanda geçirdikleri süreyi gruplar arasında benzer bulduk. Anksiyete-benzeri davranış düzeyini değerlendirmek için kullanılan bir diğer test olan aydınlık-karanlık kutu testinde de dişi ve erkeklerde kontrol ile deney grupları arasında her iki zaman noktasında da anlamlı bir fark gözlenmemesi yaptığımız bu yorumu destekler niteliktedir.

Buna ek olarak, tekrarlayan ölçümlerin etkisinin değerlendirildiği tekrarlı ölçümler için ANOVA analizinde açık alanda geçirilen sürenin ve lökomotor aktivitenin her iki cinsiyette de zamanla azaldığını ancak zaman x grup etkisi gözlenmediğinden bu azalmanın DAB'ın etkileriyle ilişkili olmadığını ortaya koyduk. Bunun olası nedeninin farelerin testin yapıldığı kutuya alışmış olmaları, dolayısıyla da ikinci karşılaşmada kutuyu araştırma davranışlarının azalması olabileceğini düşündük.

Çalışmamızda intrahipokampal DAB enjeksiyonunun anksiyete-benzeri davranış üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişikliğe yol açmaması, yukarıda da anlatıldığı üzere literatürde glikojen metabolizmasının davranışsal etkilerinin incelendiği çalışmalarla uyumlu değildir. Bu uyumsuzluğun sebebi, depresyon-benzeri davranış verilerimizde de tartıştığımız gibi deney desenimizin cerrahi müdahale içermesi, davranış testleri yapıldığı esnada doku iyileşmesinin tam sağlanamamış olması ve/veya cerrahiye bağlı ağrı, vb. nedenlerin kontrol grubunda da anksiyete-benzeri davranışı artırarak deneye bağlı farkların görülmesini engellemesi, cerrahi sırasında uygulanan anestezinin test esnasında öngörülemeyen etkileri olabilir. Bunun yanında, erkeklerde DAB grubunda lökomotor aktivitenin kontrol grubundan fazla olması açık alanda geçirilen süre, aydınlık alana girme latansı ve aydınlık alanda geçirilen süre verilerinde karıştırıcı bir faktör olarak yer almış ve DAB'ın anksiyete-benzeri davranış üzerindeki olası etkilerini maskeleyebilir.

5.2. DAB enjeksiyonu ve takip eden akut stresin davranışsal etkileri

İntrahipokampal DAB/SF enjeksiyonunu takiben 3. ve 5. günlerde davranış testlerinin yapıldığı deney setinde, cerrahi ve anestezi alımının davranış testleri üzerindeki olası etkileri sebebiyle hayvanlara kanül yerleştirilerek cerrahinin ve anestezinin etkilerinin azalacağı bir süre beklediğimiz, DAB/SF enjeksiyonlarını kılavuz kanül aracılığıyla anestezi kullanmadan yaptığımız bir deney paradigması takip ettik. Ayrıca, önceki deney setinde enjeksiyonun davranışsal etkilerine yol açacağını düşündüğümüz sinaptik enerji arz-talep dengesizliğinin davranışta gözlemlenebilir değişiklikler ortaya çıkaracak ölçüye ulaşmadığını düşünerek, deney planımıza DAB'ın sebep olacağı enerji arzı kısıtlılığına ek olarak enerji talebini artıracak bir manipülasyon eklemek istedik. Akut stresin sinaptik aralıkta glutamat seviyelerinde artışa yol açtığı (171) yönündeki mevcut çalışmalardan yola çıkarak, deney hayvanlarını DAB/SF enjeksiyonlarını takiben 1 saat süreyle avcı stresine maruz bıraktık. Ayrıca bu yeni deney setinde, davranış testlerini 1., 3. ve 5. günlerde yaparak davranışta zamana bağlı olası değişiklikleri de gözlemeyi hedefledik.

5.2.1. DAB enjeksiyonu ve takip eden akut stresin depresyon-benzeri davranış üzerine etkileri

İntrahipokampal DAB enjeksiyonu ve takip eden akut stresin depresyon-benzeri davranış üzerindeki etkilerini, anhedoniyi test edebileceğimiz sosyal etkileşim testi ve davranışsal umutsuzluk ölçütü olarak kullanılan kuyruktan asma testi ile değerlendirdik. Sosyal etkileşim testinde, 1.gün her iki cinsiyette de benzer sosyal etkileşim düzeyleri gözlemlenmesine karşın, 3. ve 5. günlerde sosyal etkileşim düzeylerinin DAB uygulamasından bağımsız olarak tüm dişi farelerde azaldığı ancak erkek farelerde bu değişikliğin ortaya çıkmadığını saptadık. Daha önce sosyal yenilgi stresinin sosyal etkileşim üzerine etkilerinin cinsiyete bağlı farklılık gösterdiği ve strese maruz bırakılmanın sadece dişilerde sosyal etkileşim düzeylerinin azalmasına sebep olduğu yönündeki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda (172), dişilerin akut sığana maruz kalma stresine erkelerden daha duyarlı olmasının bu farka yol

açmış olabileceği düşünülebilir.

Buna ek olarak, 5.gün her iki cinsiyette de DAB grubunun sosyal etkileşim indeksinin kontrol grubundan fazla olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, DAB'ın sinaptik stres oluşturarak depresyon-benzeri davranışa sebep olacağı yönündeki hipotezimiz ile örtüşmemektedir. Bu bulgunun önceki deney setindeki sükröz tercih testi sonuçlarıyla paralellik göstermesi ilgi çekici olup ileri çalışmalarda kapsamlı ele alınması gerekmektedir. Sosyal etkileşimin zamanla değişimi analiz edildiğinde ise kontrol grubunda etkileşim düzeylerinin zamanla azalmasına karşılık DAB grubunda 3.günde görülen azalmanın 5.günde görülmediği tespit edilmiştir. Sosyal etkileşim testinde görülen bu zamanla azalma trendi, testin tekrarlanması sebebiyle test düzeneğinin yeni olma özelliğini yitirmesi ve bu nedenle de farelerin keşfetme davranışının azalmasıyla ilişkili olabilir. Ayrıca, davranış testleri arasında yer alan kuyruktan asma testinin de farelerde stres oluşturduğu göz önünde bulundurulduğunda, 3. gün gerçekleştirilen kuyruktan asma testinin 5 .günde sosyal etkileşimi etkileyebileceği düşünülebilir. Ayrıca, yukarıda bahsedildiği üzere DAB grubunun lökomotor aktivitesinde görülmesi olası bir artış, sosyal etkileşimin zamanla azalma yönündeki eğilimini bu grupta maskeleyebilir.

DAB enjeksiyonu ile takip eden akut stresin depresyon-benzeri davranış üzerine etkilerini değerlendirmede kullanılan bir diğer test ise davranışsal umutsuzluk ölçütü kuyruktan asma testidir. 1., 3. ve 5. günlerde yapılan testte erkeklerde hareketsiz kalma süreleri açısından gruplar arasında bir farklılık görülmezken, dişilerde birinci ve beşinci günlerde DAB grubunun hareketsizlik süresinin kontrol grubundan fazla olduğu gözlenmiştir. DAB grubunda dişilerde depresyon-benzeri davranış geliştiği lehine olan bu bulgular, kuyruktan asma testinin davranışsal umutsuzluğu dişilerde daha etkili bir şekilde test edebildiğine işaret ediyor olabilir. Psikiyatrik hastalıkların cinsiyete bağlı dimorfizm gösterdiği ve depresyon/anksiyetenin kadınlarda daha sık görüldüğü düşünüldüğünde, üçüncü ve beşinci gün sosyal etkileşim testi bulgularına benzer bir şekilde kuyruktan asma testinde de depresyon-benzeri davranış dişilerde daha belirgin olarak ortaya çıkmış

olabilir. Buna ek olarak, zamanla hem dişilerde hem erkeklerde hareketsizlik süresinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu sonucun sebebi, testin tekrarlanması nedeniyle kaçışın olmadığının öğrenilmesi olabilir.

5.2.2. DAB enjeksiyonu ve takip eden akut stresin anksiyete-benzeri davranış üzerine etkileri

DAB enjeksiyonu ve takip eden akut stresin anksiyete-benzeri davranış üzerine etkisinin değerlendirilmesi için yapılan aydınlık-karanlık kutu testinde, aydınlık alanda geçirilen sürede sadece cinsiyet etkisi anlamlı bulunmuştur. Birinci günde erkekler aydınlık bölmede daha fazla süre geçirirken, ilerleyen günlerde erkeklerin aydınlık bölmede geçirdiği sürenin azalmasıyla bu farkın ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bu bulgular, erkeklerin üçüncü ve beşinci gündeki anksiyete düzeylerinde gruptan bağımsız bir artış olabileceğine işaret etmektedir. Aydınlık alanda geçirilen sürenin azalmasının bir diğer sebebi ise deneyin üçüncü ve beşinci günlerde aynı düzenekte tekrarlanması sebebiyle aydınlık bölmenin yeni olma özelliğini yitirmesi ve keşfetme davranışının azalması olabilir. Nitekim, hem dişilerde hem erkeklerde üçüncü ve beşinci günlerde gruptan bağımsız olarak aydınlık alanda geçirilen süre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır.

5.3. DAB'ın Nöroinflamatuvar Etkileri

5.3.1. Dorsal hipokampus

Primatlardaki posterior hipokampusun eşleniği olan dorsal hipokampus, temel olarak bilişsel fonksiyonlarla ilişkili bir beyin bölgesi olup bu bölgedeki gen ekspresyonu da bilgi işlemlenmesiyle ilintili kortikal bölgelerle koreledir (173). Çalışmamızda DAB enjeksiyonunu gerçekteştirdiğimiz dorsal hipokampus bölgesinde yaygın mikroglial aktivasyon lehine yorumlanabilecek şekilde mikroglia hücre gövdelerinin büyüdüğünü, uzantılarının kalınlaştığını ve Iba-1 sinyal yoğunluğunun arttığını gözlemledik. Benzer şekilde, dorsal hipokampusuna SF enjekte edilen kontrol grubu hayvanlarda da DAB grubuna nazaran daha az yoğun

olmakla birlikte mikroglial aktivasyon gözlemledik. Her iki grupta da gözlemlenen mikroglial aktivasyonun bölgeye enjeksiyon yapılmasının yarattığı travmaya bir yanıt niteliğinde olduğunu, DAB grubunda kontrol grubuna kıyasla daha şiddetli mikroglial aktivasyona işaret edecek şekilde Iba-1 sinyal intansitesi artışı ve fenotip değişiklikleri gözlemlememizin ise glikojen fosforilaz inhibisyonu ile tetiklemeyle hedeflediğimiz “*sinaptik stres*” kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Klinik ve prelinik birçok çalışmada anksiyete patofizyolojisinde serotoninin rolü vurgulanmakta olup bu bulgular birçok anksiyolitik ajanın etki mekanizmasında serotoninin varlığı ile de desteklenmektedir (174). Median raphe çekirdeğinin anksiyojenik etkilerinin dorsal hipokampusa olan serotonerjik bağlantıları üzerinden sağlanabileceği üzerine bulgular (175), gözlemlediğimiz hipokampal mikroglial aktivasyon paterninin anksiyete-benzeri davranışa sebep olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, çalışmamızda anksiyete-benzeri davranışı değerlendirdiğimiz açık alan ve aydınlık-karanlık kutu testlerinde anksiyete seviyesinde bir değişiklik saptamamız, DAB’ın lökomotor aktiviteyi arttırmasıyla ilişkili olabilir. Bu sebeple, dorsal hipokampustaki nöroinflamatuvar değişikliklerin davranışsal sonuçlarını lökomotor aktivitenin karıştırıcı etkisini ekarte edecek bir deney paradigmasıyla değerlendirmek daha doğru bir fikir verecektir.

Buna ek olarak, dorsal hipokampusun VTA (ventral tegmental alan)’dan aldığı dopaminerjik afferentleri ve nükleus akumbense olan glutamaterjik efferentleri ile beyin haz devrelerinde de etkin bir rolü olduğu bilinmektedir (176). İki deney setinde de DAB enjeksiyonu yapılan hayvanlarda hedonik davranışta görülen artışın bu devrelerle ilgili olabileceği düşünülebilir, ancak bu ilişkinin karmaşık olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

5.3.2. Ventral hipokampus

Primatlardaki anterior hipokampus bölgesine denk gelen ventral hipokampus, hipokampusun sıklıkla stres ve duygu ile ilişkilendirilen kısmı olup bu bölgedeki gen ekspresyonu da beyindeki duygu ve stresle alakalı bölgelerle (amigdala ve

hipotalamus) benzerlik göstermektedir (173). Çalışmamızda, DAB enjeksiyonu yapılan hayvanların ventral hipokampusunda mikroglial aktivasyon gözlemledik. Buna karşın, SF enjeksiyonu yapılan kontrol grubu hayvanlarda ise mikroglial aktivasyon fenotipi saptamadık. Anksiyete-benzeri davranışı düzenleyici etkileri bilinen ventral hipokampusta eksitotoksik lezyon oluşturulduğunda anksiyolitik etkilerin gözlemlendiği ve bu etkilerin cinsiyet bağımlı olduğu (sadece erkeklerde anksiyete seviyesini düşürdüğü) (177) üzerine bulgular mevcuttur. Çalışmamızda kontrol ve deney gruplarının anksiyete-benzeri davranışları arasında fark görmememiz, lökomotor aktivitedeki değişikliklerin karıştırıcı etkisi sebebiyle anksiyete düzeylerinin sağlıklı bir şekilde değerlendirilememesinden kaynaklanıyor olabilir. Bunun yanında, seçilen zaman diliminde nöroinflamatuvar değişikliklerin davranışsal etkilerinin gözlemlenebilir seviyeye henüz ulaşmamış veya silikleşerek tespit edilemeyecek seviyelere inmiş olması da olasıdır. Ayrıca, yukarıda bahsedilen çalışmada anksiyolitik etkinin sadece erkeklerde görülmesi, 5.gün lökomotor aktivite ve açık alan testinde deney grubunda sadece erkeklerde görülen lökomotor aktivite ve açık alanda geçirilen süre artışı ile benzerlik göstermektedir.

Buna ek olarak, enjeksiyon bölgesinden uzakta olup stres cevabı ve dayanıklılığında oldukça önemli bir role sahip olan ventral hipokampusta mikroglial aktivasyon fenotipi gözlemlenmesi çarpıcı bir bulgudur. Bazolateral amigdalanın ventral hipokampusa uzanan bağlantılarının sosyal etkileşimi düzenleyici etkileri üzerine çalışmalar mevcuttur (178). Nitekim, bu bulguyu takiben deney paradigmasına eklenen sosyal etkileşim testinde de DAB grubunda beşinci gün sosyal etkileşim düzeylerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

5.3.3. Entorinal korteks

Medial temporal lobda yer alan ve bellek işlevleri üzerinde önemli bir role sahip olan entorinal korteksin majör depresyon patofizyolojisinde de sıklıkla adı geçen hipokampus ve medial prefrontal korteks/anterior singulat korteks ile yaygın

bağlantıları olduğu bilinmektedir (179). Bunun yanında, majör depresyonun erişkin nörogenezindeki aksaklıklar neticesinde hipokampal işlevlerin azalması ile ilişkili olabileceği; erişkin nörogenezinin aktiviteye-bağlı işlemesi sebebiyle depresyonda gözlemlenen hipokampal nörogenez aksaklığının aslında bir nöral devre bozukluğunun sonucu olduğu düşünülmektedir. Entorinal korteksin hipokampus işlevselliği ve erişkin nörogenezi ile ilişkili nöral devreler üzerindeki düzenleyici rolü, depresyonla ilişkili bilişsel ve duygusal fenotiplerin entorinal korteksin hipokampus nörogenezi üzerine etkileri ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir (180). Bunun yanında depresyonun kronik kısıtlama stresi (“chronic restraint stress”) ile modellendiği farelerde, sükröz tercih testi ve zorlu yüzdürme testinde gözlenen depresyon-benzeri davranışa entorinal kortekste metabolit seviyeleri ve gen ifadesi düzeylerinde değişikliklerin eşlik ettiği görülmüş, entorinal korteksin hipokampusa glutamaterik uzantıları da göz önünde bulundurulduğunda bu metabolik değişikliklerin majör depresyon patogenezinde entorinal korteksin rolüne işaret edebileceği düşünülmüştür (181). Ayrıca, sıçanlarda anterior singulat korteks ile bağlantıları olan lateral entorinal kortekste H1 histamin reseptörleri bloke edildiğinde sükröz tercihinin azaldığı saptanmış, bu iki bölgeyi kapsayan H1 reseptörlerine bağlı bir devre mekanizmasının anhedoni-benzeri davranıştan sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır (182).

Bu sebeplerle intrahipokampal enjeksiyon yapılan farelerin entorinal alanlarını incelediğimizde, DAB grubunda mikrogliyal aktivasyon gözlemlememize karşın kontrol grubu hayvanlarda aktive fenotipte mikrogliyalarla karşılaşmadık. Deneysel grupta enjeksiyon bölgesinden uzak bir bölge olan entorinal kortekste mikrogliyal aktivasyon gözlememiz, bize intrahipokampal DAB enjeksiyonunun davranış üzerindeki olası etkilerini sadece yerel değil uzak bölgelerde sebep olduğu değişiklikler vasıtasıyla da gösterebileceğini düşündürdü. Buna karşın, kuyruktan asma testi ve sükröz tercih testinde deney grubunda depresif-benzeri davranış lehine bulgular gözlemedik. Bu bulgularımız, deney grubunda artan lökomotor aktivitenin kuyruktan asma testinde görmeyi beklediğimiz davranışsal umutsuzluğu maskeleyesi ve sükröz tercih testinin deney paradigmamızda şeker metabolizmasını

manipüle etmemiz sebebiyle anhedoni davranışını karıştırıcı faktörler olmadan gözlemeye fırsat veren bir test olmamasından kaynaklanabilir. Diğer bir yandan, intrahipokampal DAB enjeksiyonlarını akut stresin takip ettiği deney paradigmamızda DAB grubunda görülen hedonik davranıştaki artış ise, önceki sükröz tercih testi bulgularımızla örtüşmekte olup mikroglial aktivasyonun davranış üzerindeki etkilerinin karmaşık olabileceğine işaret etmektedir.

5.3.4. Amigdala

Limbik sistemin önemli bir parçası olan amigdaladaki işlevsel değişikliklerin psikiyatrik hastalık patofizyolojisindeki rolü bilinmektedir (183). Bazolateral amigdala, kortikal ve subkortikal yapılardan gelen duyuşsal bilgiyi glutamaterjik efferentlerinde birleştirerek bu verilere duyuşsal bir değer atar (184). Bazolateral amigdalanın glutamaterjik efferentleri bu bilgiyi, duyuşların ve duyuşdurumun oluşturularak ifade edildiğı daha alt beyin yapılarına taşıdığından depresyon-benzeri ve anksiyete-benzeri davranışta da önemli işleve sahiptir (185, 186, 187).

Biz de çalışmamızda enjeksiyon bölgesinden uzak bir merkez olan amigdalar alanda DAB grubu farelerde mikroglial aktivasyon gözlemledik, kontrol grubunda ise aktivasyon lehine bulgular saptamadık. Bu nöroinflamatuvar değişikliklere karşın, deney grubunda davranışsal etkilerin gözlemlenmeme sebebi davranış testlerindeki yukarıda da bahsedilen karıştırıcı faktörlerle ve/veya test zamanlaması ile ilgili olabilir. Mikroglial aktivasyonla depresyon arasında “ters U” biçiminde bir ilişkinin olduğunu, bir başka deyişle hafif aktive mikrogliaların stres direnci sağlamasına karşın aktivasyon düzeyi arttığında depresyonun gözlemlenmeye başladığını ortaya koyan çalışmalar (188) göz önünde bulundurulduğunda, mikroglial inflamatuvar değişikliklerin depresyon-benzeri davranış için gerekli eşiğı aşmamış olması mümkündür. Depresyon-benzeri ve anksiyete-benzeri davranışta bu kadar etkin bir role sahip olan ve enjeksiyonlardan uzak yerleşimli amigdalar bölgede mikroglial aktivasyon bulgusunun çarpıcı olduğunu düşünmekte, bu bulguların farklı testlerle ve farklı zaman dilimlerinde davranış verileriyle de desteklenmesi

gerektiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, çalışmamızda DAB enjeksiyonunun hipotezimize uygun şekilde hem enjeksiyon çevresinde hem de enjeksiyon yerine uzak beyin bölgelerinde mikroglial aktivasyonu tetiklediğini gözlemledik. Buna karşın, söz konusu nöroinflamasyonun davranış üzerine etkilerinin karmaşık olduğu sonucuna vardık. Yukarıda da tartışıldığı üzere, bunun birçok sebebi olabilir. Öncelikle, mikroglial inflamatuvar fenotipin sinaptik aktivite üzerindeki etkilerinin biyolojisinin ve mekanistik temellerinin henüz tam olarak açıklanamadığı göz önünde bulundurulmalıdır. Mikroglial aktivasyonun sinaptik aktiviteyi değiştirmek için ulaşması gereken eşik ve bu eşiğin ulaşıldığı zaman noktası, mikroglial proinflamatuvar değişikliklerin sinaptik aktiviteye olan etkilerinin gözlemlenmesine engel olmuş olabilir. Bunun yanında, sinaptik aktivite değişikliklerinin davranışa yansımalarının olasılıksal niteliği de göz ardı edilmemelidir. Deney modelimizde sinapsta etkin bir şekilde metabolik stres tetiklenmesine karşın, fareler depresyon-benzeri/anksiyete-benzeri davranışa meyilli bir kohort oluşturulacak şekilde seçilmediğinden sinaptik aktivite değişiklikleri bir davranış fenotipi ortaya çıkaramamış olabilir. Bunun yanında, çalışmamızda oluşturduğumuz sinaptik stresin beynin koruyucu antidepresan kompensatuvar mekanizmaları ile maskelenmesi de mümkündür. Ayrıca beyinde pek çok bölge aynı anda etkilendiği için bunların davranış üzerindeki inhibitör/eksitatör etkilerinin birleşik sonucu karmaşık olabilir. Sinaptik enerji arzının daha şiddetli/daha uzun süreli/tekrarlı düşürülmesi, enerji talebinin benzer şekilde daha şiddetli/daha uzun süreli/tekrarlı arttırıldığı müdahalelerin yapılması ve/veya depresyon-benzeri/anksiyete-benzeri davranış fenotipi oluşturmaya daha yatkın bir kohortun test edilmesi, hipotez ettiğimiz değişikliklerin gözlemlenebilmesine imkan verebilir.

Buna ek olarak, dorsal hipokampusa yerel olarak verilen DAB'ın yaygın nöroinflamatuvar değişikliklere yol açtığını ancak bu etkinin kantifiye edilmesi için daha kapsamlı ve rafine analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulduğunu gözlemledik. Enjeksiyon bölgesinden uzak alanlarda, örnekleme hatasına bağlı sinyal

intansitesindeki değişiklik ve yüksek grup içi varyasyonun, gruplar arası mikroglial aktivasyon farklılıklarını maskeleyebileceği sonucuna vardık. Bunun yanında, davranışın birçok devrenin aktivasyon ve inhibisyonundan etkilenen karmaşık bir fenomen olması sebebiyle bir beyin bölgesinde mikroglial aktivasyonun davranışa direkt etkilerini izole olarak gözlemlemenin mümkün olmayabileceğini tespit ettik. Bu sebeple, gelecekteki deneylerde davranışta değişikliğe sebep olabileceğini düşündüğümüz bölgelere yerel olarak çok düşük dozda DAB enjeksiyonu yapıp bu bölgelerdeki aktivasyon değişikliklerinin kontrol grubuyla mukayese edilmesinin veya DAB'ın TAT (transactivator of transcription- transkripsiyon transaktivatörü) gibi bir taşıyıcı protein vasıtasıyla kan-beyin bariyerinden geçişi artırılarak sistemik olarak verilmesinin (enjeksiyon travmasını ortadan kaldırarak) mikroglial aktivasyonun gruplar arasında daha objektif olarak karşılaştırılabilmesine ve davranışa olan etkilerinin değerlendirebilmesine müsaade edeceği öngörülebilir. Tüm bunlar bir arada değerlendirildiğinde, geliştirdiğimiz bu yöntemin inflamasyonun davranışsal sonuçlarını incelemek açısından iyi bir farmakolojik model olarak ümit verici olduğunu ve daha da mükemmelleştirilebileceğini düşünüyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. DAB'ın erkeklerde enjeksiyon sonrası beşinci gün lökomotor aktiviteyi arttırdığı, dişilerde ise lökomotor aktivitede anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Ayrıca, DAB grubu erkek farelerin üçüncü gün aydınlık alana geçme latansı kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Bu bulguların, mani fenotipiyle ilişkili olması ihtimali değerlendirilmeli ve cinsiyetler arası farklılığın sebebi araştırılmalıdır.
2. DAB'ın dişilerde sükröz tercih testiyle değerlendirilen hedonik davranışı artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, enjeksiyon sonrası beşinci gün her iki cinsiyette DAB grubunda sosyal etkileşimin arttığı gözlenmiştir. Bu bulguların sebebinin açıklanabilmesi için, gelecekteki çalışmalarda ödül devrelerindeki nöroinflamatuvar ve transkripsiyonel değişiklikler incelenmelidir.
3. Kanül takılmadan yapılan tek doz bilateral intrahipokampal DAB enjeksiyonu ile istatistiksel açıdan anlamlı bir davranışsal umutsuzluk fenotipi oluşmamasına karşın, deney paradigmasına akut avcı stresi eklendiğinde DAB grubu dişi farelerde kuyruktan asma testinde anlamlı bir fark gözlenmiştir. Akut stresin DAB'ın depresyon-benzeri davranış üzerindeki olası etkilerini ortaya çıkarabileceği düşünülmüştür. İlerideki çalışmalarda, akut stresin etkilerinin ve kuyruktan asma testinin cinsiyetler arasında gösterdiği farklılıklar araştırılmalıdır.
4. DAB'ın dorsal hipokampusta yaygın mikroglial aktivasyona sebep olduğu görülmüştür. Ödül devreleriyle yaygın bağlantıları olan bu bölgedeki mikroglial aktivasyonun hedonik davranış üzerinde karmaşık bir etkisi olabileceği düşünülmüştür. Bu ilişkinin daha kapsamlı incelenmesi, ayrıca dorsal hipokampustaki nöroinflamatuvar değişikliklerin öğrenme ve bellek üzerindeki etkilerinin araştırılması önerilir.

5. DAB'ın ventral hipokampusta yaygın mikroglial aktivasyona sebep olduğu görülmüştür. Bu aktivasyonun anksiyete-benzeri davranış üzerindeki etkileri, lökomotor aktivitenin karıştırıcı etkisinin ekarte edildiği bir deney paradigmasıyla araştırılmalıdır.
6. DAB'ın entorinal ve amigdalar alanlarda yaygın mikroglial aktivasyonu tetiklediği görülmüştür. Depresyon-benzeri davranış ve anhedoni-benzeri davranışla ilişkilendirilen bu beyin bölgelerindeki nöroinflamatuvar değişikliklerin davranış üzerindeki etkilerinin karmaşık olduğu sonucuna varılmıştır. Bu ilişkinin daha kapsamlı incelenebilmesi için farklı dozlar ve deney paradigmaları tercih edilerek daha düşük ve daha yüksek düzeyde mikroglial aktivasyon tetiklenmeli, farklı mikroglia fenotiplerinin davranış üzerindeki etkileri araştırılmalıdır.
7. Davranışın birçok devrenin aktivasyon ve inhibisyonuyla ilişkili olarak ortaya çıkan karmaşık bir fenomen olması sebebiyle, spesifik bölgelerin davranış üzerindeki etkilerini gözlemleyebilmek için ilgili bölgelere çok düşük dozda DAB verilerek davranış testlerine tabi tutulması önerilir.
8. Konfokal ve ışık tabakası floresan mikroskopisi görüntülemelerinde intrahipokampal DAB uygulanmasının uzak beyin bölgelerinde de mikroglial aktivasyonu tetiklediğinin gözlenmesine karşın; DAB'ın ventriküler sistem ve beynin konveksitesiyle uyumlu olmayan, dorsal hipokampus konektomuyla ilişkili olması muhtemel bir şekilde topoğrafik heterojenite gösteren dağılımı sebebiyle verinin değerlendirilmesinin karmaşıklaştığı görülmüştür. Daha rafine gözlem ve analizlerin yapılabilmesi için DAB'ın kan-beyin bariyerinden geçişkenliğinin taşıyıcı bir protein vasıtasıyla artırılarak sistemik olarak verilmesi önerilir.

7. KAYNAKLAR

1. Cruz NF, Dienel GA. High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(12):1476-89.
2. Magistretti PJ, Allaman I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron.* 2015;86(4):883-901.
3. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(22):10625-9.
4. Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia.* 2007;55(12):1251-62.
5. Vaishnavi SN, Vlassenko AG, Rundle MM, Snyder AZ, Mintun MA, Raichle ME. Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(41):17757-62.
6. Magistretti PJ, Morrison JH, Shoemaker WJ, Sapin V, Bloom FE. Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1981;78(10):6535-9.
7. Sorg O, Magistretti PJ. Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain research.* 1991;563(1-2):227-33.
8. Sorg O, Pellerin L, Stolz M, Beggah S, Magistretti PJ. Adenosine triphosphate and arachidonic acid stimulate glycogenolysis in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Neuroscience letters.* 1995;188(2):109-12.
9. Hof PR, Pascale E, Magistretti PJ. K⁺ at concentrations reached in the extracellular space during neuronal activity promotes a Ca²⁺-dependent glycogen hydrolysis in mouse cerebral cortex. *J Neurosci.* 1988;8(6):1922-8.
10. Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell metabolism.* 2011;14(6):724-38.
11. Xu J, Song D, Xue Z, Gu L, Hertz L, Peng L. Requirement of glycogenolysis for uptake of increased extracellular K⁺ in astrocytes: potential implications for K⁺ homeostasis and glycogen usage in brain. *Neurochemical research.* 2013;38(3):472-85.
12. Sickmann HM, Walls AB, Schousboe A, Bouman SD, Waagepetersen HS. Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. *Journal of neurochemistry.* 2009;109 Suppl 1:80-6.
13. Duran J, Guinovart JJ. Brain glycogen in health and disease. *Molecular aspects of medicine.* 2015;46:70-7.
14. Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *The Biochemical journal.* 2012;441(3):763-87.
15. Crerar MM, Karlsson O, Fletterick RJ, Hwang PK. Chimeric muscle and brain glycogen phosphorylases define protein domains governing isozyme-specific responses to allosteric activation. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(23):13748-56.
16. Kilic K, Karatas H, Donmez-Demir B, Eren-Kocak E, Gursoy-Ozdemir Y, Can A, et al. Inadequate brain glycogen or sleep increases spreading depression susceptibility. *Ann Neurol.* 2018;83(1):61-73.
17. Ongur D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*

- 1998;95(22):13290-5.
18. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA (1999) Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry* 45:1085–1098
 19. Bowley MP, Drevets WC, Ongur D, Price JL. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biological psychiatry*. 2002;52(5):404-12.
 20. Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Archives of general psychiatry*. 2001;58(6):545-53.
 21. Hascup ER, Hascup KN, Stephens M, Pomerleau F, Huettl P, Gratton A, et al. Rapid microelectrode measurements and the origin and regulation of extracellular glutamate in rat prefrontal cortex. *Journal of neurochemistry*. 2010;115(6):1608-20.
 22. Moghaddam B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *Journal of neurochemistry*. 1993;60(5):1650-7.
 23. Musazzi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, Barbiero VS, et al. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One*. 2010;5(1):e8566.
 24. Satoh E, Shimaki S. Acute restraint stress enhances calcium mobilization and glutamate exocytosis in cerebrocortical synaptosomes from mice. *Neurochemical research*. 2010;35(5):693-701.
 25. Iwata M, Ota KT, Li XY, Sakaue F, Li N, Duthiel S, et al. Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X7 Receptor. *Biological psychiatry*. 2016;80(1):12-22.
 26. Elekes O, Venema K, Postema F, Dringen R, Hamprecht B, Korf J. Evidence that stress activates glial lactate formation in vivo assessed with rat hippocampus lactography. *Neuroscience letters*. 1996;208(1):69-72.
 27. Uehara T, Kurata K, Sumiyoshi T, Kurachi M. Immobilization stress-induced increment of lactate metabolism in the basolateral amygdaloid nucleus is attenuated by diazepam in the rat. *European journal of pharmacology*. 2003;459(2-3):211-5.
 28. Uehara T, Sumiyoshi T, Matsuoka T, Tanaka K, Tsunoda M, Itoh H, et al. Enhancement of lactate metabolism in the basolateral amygdala by physical and psychological stress: role of benzodiazepine receptors. *Brain research*. 2005;1065(1-2):86-91.
 29. Uehara T, Sumiyoshi T, Itoh H, Kurachi M. Role of glutamate transporters in the modulation of stress-induced lactate metabolism in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;195(2):297-302.
 30. Uehara T, Matsuoka T, Itoh H, Sumiyoshi T. Chronic treatment with tandospirone, a 5-HT(1A) receptor partial agonist, suppresses footshock stress-induced lactate production in the prefrontal cortex of rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 Nov 15;113:1-6.
 31. Zhang HY, Zhao YN, Wang ZL, Huang YF. Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal glycogen level and induces depression-like behavior in mice. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2015;16(1):62-9.
 32. Zhao Y, Zhang Q, Shao X, Ouyang L, Wang X, Zhu K, et al. Decreased Glycogen Content Might Contribute to Chronic Stress-Induced Atrophy of Hippocampal Astrocyte volume and Depression-like Behavior in Rats. *Scientific reports*. 2017;7:43192.
 33. Hertz L, Peng L, Dienel GA. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007;27(2):219-49.
 34. O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance.

- Neurochemical research. 2012;37(11):2496-512.
35. Tombaugh GC, Yang SH, Swanson RA, Sapolsky RM. Glucocorticoids exacerbate hypoxic and hypoglycemic hippocampal injury in vitro: biochemical correlates and a role for astrocytes. *Journal of neurochemistry*. 1992;59(1):137-46.
 36. Allaman I, Pellerin L, Magistretti PJ. Glucocorticoids modulate neurotransmitter-induced glycogen metabolism in cultured cortical astrocytes. *Journal of neurochemistry*. 2004;88(4):900-8.
 37. Quach TT, Rose C, Duchemin AM, Schwartz JC. Glycogenolysis induced by serotonin in brain: identification of a new class of receptor. *Nature*. 1982;298(5872):373-5.
 38. Darvesh AS, Gudelsky GA. Activation of 5-HT₂ receptors induces glycogenolysis in the rat brain. *European journal of pharmacology*. 2003;464(2-3):135-40.
 39. Carrard A, Elsayed M, Margineanu M, Boury-Jamot B, Fragniere L, Meylan EM, et al. Peripheral administration of lactate produces antidepressant-like effects. *Molecular psychiatry*. 2018;23(2):488.
 40. Karnib N, El-Ghandour R, El Hayek L, Nasrallah P, Khalifeh M, Barmo N, et al. Lactate is an antidepressant that mediates resilience to stress by modulating the hippocampal levels and activity of histone deacetylases. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44(6):1152-62.
 41. Brown AM, Tekkok SB, Ransom BR. Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *The Journal of physiology*. 2003;549(Pt 2):501-12.
 42. Cruz NF, Dienel GA. High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2002;22(12):1476-89.
 43. Swanson RA, Morton MM, Sagar SM, Sharp FR. Sensory stimulation induces local cerebral glycogenolysis: demonstration by autoradiography. *Neuroscience*. 1992;51(2):451-61.
 44. Franken P, Gip P, Hagiwara G, Ruby NF, Heller HC. Changes in brain glycogen after sleep deprivation vary with genotype. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;285(2):R413-9.
 45. Gip P, Hagiwara G, Ruby NF, Heller HC. Sleep deprivation decreases glycogen in the cerebellum but not in the cortex of young rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2002;283(1):R54-9.
 46. Kong J, Shepel PN, Holden CP, Mackiewicz M, Pack AI, Geiger JD. Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J Neurosci*. 2002;22(13):5581-7.
 47. Petit JM, Tobler I, Allaman I, Borbely AA, Magistretti PJ. Sleep deprivation modulates brain mRNAs encoding genes of glycogen metabolism. *The European journal of neuroscience*. 2002;16(6):1163-7.
 48. Scharf MT, Naidoo N, Zimmerman JE, Pack AI. The energy hypothesis of sleep revisited. *Progress in neurobiology*. 2008;86(3):264-80.
 49. Herzog RI, Chan O, Yu S, Dziura J, McNay EC, Sherwin RS. Effect of acute and recurrent hypoglycemia on changes in brain glycogen concentration. *Endocrinology*. 2008;149(4):1499-504.
 50. 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. *J Neurosci*. 2000;20(18):6804-10.
 51. Matsui T, Ishikawa T, Ito H, Okamoto M, Inoue K, Lee MC, et al. Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise. *The Journal of physiology*. 2012;590(3):607-16.
 52. Brown AM. Brain glycogen re-awakened. *Journal of neurochemistry*. 2004;89(3):537-52.

53. Bernard-Helary K, Lapouble E, Ardourel M, Hevor T, Cloix JF. Correlation between brain glycogen and convulsive state in mice submitted to methionine sulfoximine. *Life sciences*. 2000;67(14):1773-81.
54. Cloix JF, Tahi Z, Boissonnet A, Hevor T. Brain glycogen and neurotransmitter levels in fast and slow methionine sulfoximine-selected mice. *Experimental neurology*. 2010;225(2):274-83.
55. Duran J, Saez I, Gruart A, Guinovart JJ, Delgado-Garcia JM. Impairment in long-term memory formation and learning-dependent synaptic plasticity in mice lacking glycogen synthase in the brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013;33(4):550-6.
56. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*. 2011;144(5):810-23.
57. Waagepetersen HS, Westergaard N, Schousboe A. The effects of isofagomine, a potent glycogen phosphorylase inhibitor, on glycogen metabolism in cultured mouse cortical astrocytes. *Neurochemistry international*. 2000;36(4-5):435-40.
58. Walls AB, Sickmann HM, Brown A, Bouman SD, Ransom B, Schousboe A, et al. Characterization of 1,4-dideoxy-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) as an inhibitor of brain glycogen shunt activity. *Journal of neurochemistry*. 2008;105(4):1462-70.
59. Fosgerau K, Westergaard N, Quistorff B, Grunnet N, Kristiansen M, Lundgren K. Kinetic and functional characterization of 1,4-dideoxy-1, 4-imino-d-arabinitol: a potent inhibitor of glycogen phosphorylase with anti-hyperglycemic effect in ob/ob mice. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Aug 15;380(2):274-84.
60. Andersen B, Westergaard N. The effect of glucose on the potency of two distinct glycogen phosphorylase inhibitors. *Biochem J*. 2002 Oct 15;367(Pt 2):443-50.
61. Dienel GA, Ball KK, Cruz NF. A glycogen phosphorylase inhibitor selectively enhances local rates of glucose utilization in brain during sensory stimulation of conscious rats: implications for glycogen turnover. *Journal of neurochemistry*. 2007;102(2):466-78.
62. Suh SW, Bergher JP, Anderson CM, Treadway JL, Fosgerau K, Swanson RA. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;321(1):45-50.
63. Sickmann HM, Waagepetersen HS, Schousboe A, Benie AJ, Bouman SD. Obesity and type 2 diabetes in rats are associated with altered brain glycogen and amino-acid homeostasis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(8):1527-37.
64. Sickmann HM, Waagepetersen HS, Schousboe A, Benie AJ, Bouman SD. Brain glycogen and its role in supporting glutamate and GABA homeostasis in a type 2 diabetes rat model. *Neurochemistry international*. 2012;60(3):267-75.
65. Sickmann HM, Walls AB, Schousboe A, Bouman SD, Waagepetersen HS. Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. *Journal of neurochemistry*. 2009;109 Suppl 1:80-6.
66. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
67. Kessler RC, Bromet EJ. The Epidemiology of Depression Across Cultures. *Annu Rev Public Health*. 2013;34(1):119-38.
68. Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, Baxter AJ, Ferrari AJ, Erskine HE, vd. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2013;382(9904):1575-86.
69. Greenberg PE, Fournier A-A, Sisitsky T, Pike CT, Kessler RC. The Economic Burden of Adults With Major Depressive Disorder in the United States (2005 and 2010). *J Clin*

Psychiatry. 2015;2010(February):155–62.

70. Eaton WW, Shao H, Nestadt G, Lee HB, Bienvenu OJ, Zandi P. Population-based study of first onset and chronicity in major depressive disorder. *Archives of general psychiatry*. 2008;65(5):513-20.
71. Heninger GR, Delgado PL, Charney DS. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry*. 1996;29(1):2-11.
72. Maas JW. Biogenic amines and depression. Biochemical and pharmacological separation of two types of depression. *Archives of general psychiatry*. 1975;32(11):1357-61.
73. Goodman WK, Charney DS. Therapeutic applications and mechanisms of action of monoamine oxidase inhibitor and heterocyclic antidepressant drugs. *The Journal of clinical psychiatry*. 1985;46(10 Pt 2):6-24.
74. Kendell SF, Krystal JH, Sanacora G. GABA and glutamate systems as therapeutic targets in depression and mood disorders. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2005;9(1):153-68.
75. Northoff G, Sibille E. Why are cortical GABA neurons relevant to internal focus in depression? A cross-level model linking cellular, biochemical and neural network findings. *Molecular psychiatry*. 2014;19(9):966-77.
76. Sanacora G, Saricicek A. GABAergic contributions to the pathophysiology of depression and the mechanism of antidepressant action. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2007;6(2):127-40.
77. Butler PW, Besser GM. Pituitary-adrenal function in severe depressive illness. *Lancet (London, England)*. 1968;1(7554):1234-6.
78. Dinan TG. Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 1994;164(3):365-71.
79. Price JL, Drevets WC. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. *Trends in cognitive sciences*. 2012;16(1):61-71.
80. Ressler KJ, Mayberg HS. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nature neuroscience*. 2007;10(9):1116-24.
81. Shin LM, Liberzon I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):169-91.
82. Magarinos AM, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*. 1996;16(10):3534-40.
83. Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, et al. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2004;125(1):1-6.
84. Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, Rajkowska G, Stockmeier CA, Licznernski P, et al. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nature medicine*. 2012;18(9):1413-7.
85. Duric V, Banasr M, Stockmeier CA, Simen AA, Newton SS, Overholser JC, et al. Altered expression of synapse and glutamate related genes in post-mortem hippocampus of depressed subjects. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2013;16(1):69-82.
86. Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. 2002;22(15):6810-8.
87. Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol*. 2012 Nov 1;189(9):4213-9.
88. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*. 2016;139 Suppl 2:136-53.

89. Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular medicine reports*. 2016;13(4):3391-6.
90. Rana A, Musto AE. The role of inflammation in the development of epilepsy. *Journal of neuroinflammation*. 2018;15(1):144.
91. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, NY)*. 2010;330(6005):841-5.
92. Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*. 2004;41(4):535-47.
93. Marin-Teva JL, Cuadros MA, Martin-Oliva D, Navascues J. Microglia and neuronal cell death. *Neuron glia biology*. 2011;7(1):25-40.
94. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell*. 2010;7(4):483-95.
95. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, NY)*. 2011;333(6048):1456-8.
96. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 2012;74(4):691-705.
97. Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS biology*. 2010;8(11):e1000527.
98. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*. 2009;29(13):3974-80.
99. Maezawa I, Jin LW. Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. *J Neurosci*. 2010;30(15):5346-56.
100. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*. 2005;8(6):752-8.
101. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. 2011;91(2):461-553.
102. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology*. 2009;27:119-45.
103. Lai AY, Dhama KS, Dibal CD, Todd KG. Neonatal rat microglia derived from different brain regions have distinct activation responses. *Neuron glia biology*. 2011;7(1):5-16.
104. Nayak D, Zinselmeyer BH, Corps K, McGavern DB. In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS. *IntraVital*. 2012; 1:95-106.
105. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005; 308:1314-1318.
106. Thomas WE. Characterization of the dynamic nature of microglial cells. *Brain Res. Bull*. 1990; 25:351-354.
107. Booth PL, Thomas WE. Evidence for motility and pinocytosis in ramified microglia in tissue culture. *Brain Res*. 1991; 548:163-171.
108. Brockhaus J, Moller T, Kettenmann H. Phagocytosing ameboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia*. 1996; 16:81-90.
109. Dailey ME, Waite M. Confocal imaging of microglial cell dynamics in hippocampal slice cultures. *Methods*. 1999; 18:222-230. 177.
110. Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 2001; 33:256-266.

111. Nayak D, Johnson KR, Heydari S, Roth TL, Zinselmeyer BH, McGavern DB. Type I interferon programs innate myeloid dynamics and gene expression in the virally infected nervous system. *PLoS Pathog.* 2013; 9:e1003395.
112. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annual review of immunology.* 2014;32:367-402.
113. Lier J, Streit WJ, Bechmann I. Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells.* 2021 Aug 28;10(9):2236.
114. Nimmerjahn A. Monitoring neuronal health. *Science (New York, NY).* 2020;367(6477):510-1.
115. Izquierdo P, Attwell D, Madry C. Ion Channels and Receptors as Determinants of Microglial Function. *Trends in neurosciences.* 2019;42(4):278-92.
116. York EM, Bernier LP, MacVicar BA. Microglial modulation of neuronal activity in the healthy brain. *Developmental neurobiology.* 2018;78(6):593-603.
117. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature medicine.* 2017;23(9):1018-27.
118. Cserep C, Posfai B, Lenart N, Fekete R, Laszlo ZI, Lele Z, et al. Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science (New York, NY).* 2020;367(6477):528-37.
119. Grade S, Gotz M. Neuronal replacement therapy: previous achievements and challenges ahead. *NPJ Regenerative medicine.* 2017;2:29.
120. Lemke G. How macrophages deal with death. *Nature reviews Immunology.* 2019;19(9):539-49.
121. Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron glia biology.* 2011;7(1):47-53.
122. Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS. *Nature reviews Neuroscience.* 2014;15(2):84-97.
123. Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(6):2669-74.
124. Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Molecular psychiatry.* 2008;13(7):717-28.
125. Goshen I, Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Frontiers in neuroendocrinology.* 2009;30(1):30-45.
126. Koo JW, Duman RS. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(2):751-6.
127. Lier J, Streit WJ, Bechmann I. Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells.* 2021 Aug 28;10(9):2236.
128. Evans DL, Charney DS, Lewis L, Golden RN, Gorman JM, Krishnan KR, et al. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biological psychiatry.* 2005;58(3):175-89.
129. Kohler CA, Freitas TH, Stubbs B, Maes M, Solmi M, Veronese N, et al. Peripheral Alterations in Cytokine and Chemokine Levels After Antidepressant Drug Treatment for Major Depressive Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecular neurobiology.* 2018;55(5):4195-206.
130. Morris G, Berk M, Puri BK. A Comparison of Neuroimaging Abnormalities in Multiple Sclerosis, Major Depression and Chronic Fatigue Syndrome (Myalgic Encephalomyelitis): is There a Common Cause? *Molecular neurobiology.* 2018;55(4):3592-609.


131. Maes M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 1995;19(1):11-38.
132. Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(4):1920-5.
133. Pace TW, Mletzko TC, Alagbe O, Musselman DL, Nemeroff CB, Miller AH, et al. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *The American journal of psychiatry*. 2006;163(9):1630-3.
134. Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosomatic medicine*. 2009;71(2):171-86.
135. Dahl J, Ormstad H, Aass HC, Malt UF, Bendz LT, Sandvik L, et al. The plasma levels of various cytokines are increased during ongoing depression and are reduced to normal levels after recovery. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;45:77-86.
136. Freire TFV, Rocha NSD, Fleck MPA. The association of electroconvulsive therapy to pharmacological treatment and its influence on cytokines. *Journal of psychiatric research*. 2017;92:205-11.
137. Kim YK, Suh IB, Kim H, Han CS, Lim CS, Choi SH, et al. The plasma levels of interleukin-12 in schizophrenia, major depression, and bipolar mania: effects of psychotropic drugs. *Molecular psychiatry*. 2002;7(10):1107-14.
138. Wiedlocha M, Marcinowicz P, Krupa R, Janoska-Jazdzik M, Janus M, Debowska W, et al. Effect of antidepressant treatment on peripheral inflammation markers - A meta-analysis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2018;80(Pt C):217-26.
139. Hattori K, Ota M, Sasayama D, Yoshida S, Matsumura R, Miyakawa T, et al. Increased cerebrospinal fluid fibrinogen in major depressive disorder. *Scientific reports*. 2015;5:11412.
140. Lindqvist D, Janelidze S, Hagell P, Erhardt S, Samuelsson M, Minthon L, et al. Interleukin-6 is elevated in the cerebrospinal fluid of suicide attempters and related to symptom severity. *Biological psychiatry*. 2009;66(3):287-92.
141. Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacology & therapeutics*. 2008;118(1):1-17.
142. Hannestad J, DellaGioia N, Gallezot JD, Lim K, Nabulsi N, Esterlis I, et al. The neuroinflammation marker translocator protein is not elevated in individuals with mild-to-moderate depression: a [(1)(1)C]PBR28 PET study. *Brain, behavior, and immunity*. 2013;33:131-8.
143. Richards EM, Zanotti-Fregonara P, Fujita M, Newman L, Farmer C, Ballard ED, et al. PET radioligand binding to translocator protein (TSPO) is increased in unmedicated depressed subjects. *EJNMMI research*. 2018;8(1):57.
144. Ueda HR, Ertürk A, Chung K, Gradinaru V, Chédotal A, Tomancak P, Keller PJ. Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2020 Feb;21(2):61-79. doi: 10.1038/s41583-019-0250-1.
145. Molbay M, Kolabas ZI, Todorov MI, Ohn TL, Ertürk A. A guidebook for DISCO tissue clearing. *Mol Syst Biol*. 2021 Mar;17(3):e9807.
146. Hale GM, Querry MR. Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-microm Wavelength Region. *Appl Opt*. 1973 Mar 1;12(3):555-63.
147. Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell*. 2015 Jul 16;162(2):246-257.
148. Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, Hellal F, Bradke F, Sheng M, Dodt HU. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*. 2012 Nov;7(11):1983-95.
149. Ertürk A, Mauch CP, Hellal F, Förstner F, Keck T, Becker K, Jährling N, Steffens H, Richter M, Hübener M, Kramer E, Kirchhoff F, Dodt HU, Bradke F. Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nat Med*. 2011 Dec 25;18(1):166-71.

150. Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):896-910.
151. Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, Autry AE, Kadiri L, Umadevi Venkataraju K, Zhou Y, Wang VX, Tang CY, Olsen O, Dulac C, Osten P, Tessier-Lavigne M. Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell*. 2016 Jun 16;165(7):1789-1802.
152. Corsetti S, Gunn-Moore F, Dholakia K. Light sheet fluorescence microscopy for neuroscience. *J Neurosci Methods*. 2019 May 1;319:16-27.
153. Panier T, Romano SA, Olive R, Pietri T, Sumbre G, Candelier R, Debrégeas G. Fast functional imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using selective plane illumination microscopy. *Front Neural Circuits*. 2013 Apr 9;7:65.
154. Ahrens MB, Orger MB, Robson DN, Li JM, Keller PJ. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Methods*. 2013 May;10(5):413-20.
155. Holekamp TF, Turaga D, Holy TE. Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy. *Neuron*. 2008 Mar 13;57(5):661-72.
156. Laissue PP, Alghamdi RA, Tomancak P, Reynaud EG, Shroff H. Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nat Methods*. 2017 Jun 29;14(7):657-661.
157. Jemielita M, Taormina MJ, Delaurier A, Kimmel CB, Parthasarathy R. Comparing phototoxicity during the development of a zebrafish craniofacial bone using confocal and light sheet fluorescence microscopy techniques. *J Biophotonics*. 2013 Dec;6(11-12):920-8.
158. Icha J, Weber M, Waters JC, Norden C. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *Bioessays*. 2017 Aug;39(8).
159. Adams MW, Loftus AF, Dunn SE, Joens MS, Fitzpatrick JAJ. Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM). *Curr Protoc Cytom*. 2015 Jan 5;71:12.37.1-12.37.15.
160. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*. 2015 Feb 6;(96):e52434.
161. Royce JR. On the construct validity of open-field measures. *Psychol Bull*. 1977 84:1098-1106.
162. Takao K, Miyakawa T. Light/dark transition test for mice. *J Vis Exp*. 2006 Nov 13;(1):104.
163. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*. 1980 Aug;13(2):167-70.
164. Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The tail suspension test. *J Vis Exp*. 2012 Jan 28;(59):e3769.
165. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367-70.
166. Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, Chen H, Zhu DY, Zhou QG. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat Protoc*. 2018 Jul;13(7):1686-1698.
167. Brown TS, Murphy HM. Factors affecting sucrose preference behavior in rats with hippocampal lesions. *Physiol Behav*. 1973 Dec;11(6):833-44.
168. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp*. 2011 Feb 25;(48):2473
169. Kohl J, Autry AE, Kadiri L, Umadevi Venkataraju K, Zhou Y, Wang VX, Tang CY, Olsen O, Dulac C, Osten P, Tessier-Lavigne M. Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell*. 2016 Jun 16;165(7):1789-1802.
170. Kılıç K. Glikojen Döngüsünün Bozulmasının Kortikal Yayılan Depolarizasyon Oluşumu ve Panneksin 1 Kanalları Üzerine Etkisinin Araştırılması [Doktora Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2013.

171. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Nov 30;13(1):22-37.
172. Trainor BC, Pride MC, Villalon Landeros R, Knoblauch NW, Takahashi EY, Silva AL, Crean KK. Sex differences in social interaction behavior following social defeat stress in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). *PLoS One*. 2011 Feb 25;6(2):e17405.
173. Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*. 2010 Jan 14;65(1):7-19.
174. Bacqué-Cazenave J, Bharatiya R, Barrière G, Delbecq JP, Bouguiyoud N, Di Giovanni G, Cattaert D, De Deurwaerdère P. Serotonin in Animal Cognition and Behavior. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 28;21(5):1649.
175. Abela AR, Browne CJ, Sargin D, Prevot TD, Ji XD, Li Z, Lambe EK, Fletcher PJ. Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. *Neuropharmacology*. 2020 May 15;168:107985.
176. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Sep;14(9):609-25.
177. Wang C, Zhang Y, Shao S, Cui S, Wan Y, Yi M. Ventral Hippocampus Modulates Anxiety-Like Behavior in Male But Not Female C57BL/6 J Mice. *Neuroscience*. 2019 Oct 15;418:50-58.
178. Felix-Ortiz AC, Tye KM. Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. *J Neurosci*. 2014 Jan 8;34(2):586-95.
179. Takehara-Nishiuchi K. Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neurosci Res*. 2014 Jul;84:27-33.
180. Kim IB, Park SC. The Entorhinal Cortex and Adult Neurogenesis in Major Depression. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 29;22(21):11725.
181. Chen X, Lan T, Wang Y, He Y, Wu Z, Tian Y, Li Y, Bai M, Zhou W, Zhang H, Cheng K, Xie P. Entorhinal cortex-based metabolic profiling of chronic restraint stress mice model of depression. *Aging (Albany NY)*. 2020 Feb 12;12(3):3042-3052.
182. Ionov ID, Pushinskaya II, Gorev NP, Shpilevaya LA, Frenkel DD, Severtsev NN. Histamine H1 receptors regulate anhedonic-like behavior in rats: Involvement of the anterior cingulate and lateral entorhinal cortices. *Behav Brain Res*. 2021 Aug 27;412:113445.
183. Zheng ZH, Tu JL, Li XH, Hua Q, Liu WZ, Liu Y, Pan BX, Hu P, Zhang WH. Neuroinflammation induces anxiety- and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala. *Brain Behav Immun*. 2021 Jan;91:505-518.
184. Janak PH, Tye KM. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*. 2015 Jan 15;517(7534):284-92.
185. Heshmati M, Russo SJ. Anhedonia and the brain reward circuitry in depression. *Curr Behav Neurosci Rep*. 2015 Sep;2(3):146-153.
186. Lalumiere RT. Optogenetic dissection of amygdala functioning. *Front Behav Neurosci*. 2014 Mar 26;8:107.
187. Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*. 2011 Mar 17;471(7338):358-62.
188. Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci*. 2015 Oct;38(10):637-658.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzinleri


T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu


Sayı : 52338575-125

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 27.09.2022 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2022/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2018/42 (ONAY TARİHİ: 04.09.2018)
KARAR NUMARASI	: 2022/08- 14
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 04.09.2023
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Turgay DALKARA
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Erknaz Ecehan Erk (Doktora Tezi), Dr. Buket
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Nebiye DEMİR
DİĞER YARDIMCI	: Prof. Dr. Emine Eren KOÇAK, Prof. Dr. Müge
ARAŞTIRMACILAR	: Yemişçi ÖZKAN, Prof. Dr. Hülya Karataş
	KURŞUN
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 132 Adet Swiss Albino Fare (25-40 gr)

Kurulumuzun 04.09.2018 tarihli toplantısında 2018/42 dosya kayıt numarası ile onaylanmış olan Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Turgay DALKARA'nın araştırma yürütücüsü olduğu "*Yetersiz Perisinaptik Astrosit Glikojeni Kullanımının Elektrofizyolojik, Nöroinflamatuvar ve Davranışsal Etkilerinin İncelenmesi*" başlıklı proje için verilen 02.06.2022 tarihli protokol revizyonu ve araştırma ekibi revizyonu konulu dilekçe Kurulumuzun 27.09.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş ve **uygun bulunmuştur**. Proje ekibinden Dr. Sinem ÖZCAN çıkarılmış ve proje için onaylanan **Hayvan Türü ve Sayısı "132 Adet Swiss Albino Fare (25-40 gr)"** olarak güncellenmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06100 Sıhhiye-Ankara Ayrıntılı Bilgi için:
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ VE SAATİ : 27.09.2022 (SALI)
TOPLANTI SAATİ : 14.00
TOPLANTI SAYISI : 2022/08
PROJE NUMARASI : 2018/42 (ONAY TARİHİ: 04.09.2018)
KARAR NUMARASI : 2022/08-14

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Başkan Vekili)	Prof. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)
(İZİNLİ) Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	Prof. Dr. Abdullah C. AKMAN (Üye)	Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR (Üye)
Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)	Doç. Dr. Güray SOYDAN (Üye)	Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)
(İZİNLİ) Doç. Dr. Ahmet Bülent DOĞRUL (Üye)	Doç. Dr. Banu Cahide TEL (Üye)	(İZİNLİ) Dr. Öğr. Üyesi Esin ÇETİN (Üye)
Avukat Mehmet YALÇIN (Üye)	H. Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-92

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 23.08.2022 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2022/07
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2022/38
KARAR NUMARASI	: 2022/07-02
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 23.08.2027
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Turgay DALKARA
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Erknaz Ecehan ERK (Doktora Tezi), Buket Nebiye
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: DEMİR
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Emine Eren KOÇAK
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 72 Adet Swiss Albino Fare (25-40 gr.)

Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Turgay DALKARA'nın araştırma yürütücüsü olduğu 2022/38 kayıt numaralı "*Perisinaptik Astrosit Glikojeni Kullanımının Engellenmesinin Nöroinflamatuvar ve Davranışsal Etkilerinin İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ VE SAATİ : 23.08.2022 (SALI)
TOPLANTI SAATİ : 14.00
TOPLANTI SAYISI : 2022/07
PROJE NUMARASI : 2022/38
KARAR NUMARASI : 2022/07-02

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Başkan Vekili)	Prof. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)
Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	Prof. Dr. Abdullah C. AKMAN (Üye)	Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR (Üye)
Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)	Doç. Dr. Güray SOYDAN (Üye)	(İZİNLİ) Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)
Doç. Dr. Ahmet Bülent DOĞRUL (Üye)	Doç. Dr. Banu Cahide TEL (Üye)	(İZİNLİ) Dr. Öğr. Üyesi Esin ÇETİN (Üye)
(İZİNLİ) Avukat Mehmet YALÇIN (Üye)	H. Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu**Dijital Makbuz**

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Erknaz Ecehan Erk
Ödev başlığı: doktora tez
Gönderi Başlığı: YETERSİZ PERİSİNAPTİK ASTROSİT GLİKOJENİ KULLANIMININ ...
Dosya adı: ErknazEcehanErk-Tez.docx
Dosya boyutu: 135.01K
Sayfa sayısı: 51
Kelime sayısı: 14,491
Karakter sayısı: 108,802
Gönderim Tarihi: 16-Mar-2023 04:23ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2038537020

T.C.
HACETTEPE ENİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YETERSİZ PERİSİNAPTİK ASTROSİT GLİKOJENİ
KULLANIMININ NÖROİNFLAMATUVAR VE DAVRANISSAL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Erknaz Ecehan ERK

Temel Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2023

YETERSİZ PERİSİNAPTİK ASTROSİT GLİKOJENİ KULLANIMININ NÖROİNFLAMATUVAR VE DAVRANIŞSAL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%4	%4	%1	%0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	link.springer.com İnternet Kaynağı	<%1
5	www.tod.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
7	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	insight.jci.org İnternet Kaynağı	<%1

- | | | |
|----|--|------|
| 9 | Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN, Nurettin HEYBELİ, Alkin ÇOLAK, Cavidan ARAR et al.
"Comparison of Different Anesthetic Techniques on Postoperative Outcomes in Elderly Patients with Hip Fracture", <i>Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences</i> , 2012
Yayın | <% 1 |
| 10 | docplayer.biz.tr
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 11 | www.turkiyeklinikleri.com
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 12 | toad.halileksi.net
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 13 | Submitted to Istanbul University
Öğrenci Ödevi | <% 1 |
| 14 | burkonturizm.com
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 15 | hastaneciyiz.blogspot.com.tr
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 16 | Lingjuan Hong, Na Li, Victor Gasque, Sameet Mehta et al. "Prdm6 controls heart development by regulating neural crest cell differentiation and migration", <i>JCI Insight</i> , 2022
Yayın | <% 1 |

Alıntılarını çıkart üzerinde
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde

Eşleşmeleri çıkar < 5 words