



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

Alzheimer Hastalığında GLUT12 Ekspresyonunun
Değişimi ve Ketojenik Diyetle İlişkisi

Yüksek Lisans Tezi

Fatma Nur Çiçekli

Ocak 2024



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

Alzheimer Hastalığında GLUT12 Ekspresyonunun
Değişimi ve Ketojenik Diyetle İlişkisi

Yüksek Lisans Tezi

Fatma Nur Çiçekli

Danışman

Doç. Dr. Birsen Elibol

Ocak 2024

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Fatma Nur Çiçekli tarafından hazırlanan "Alzheimer Hastalığında GLUT12 Ekspresyonunun Değişimi ve Ketojenik Diyetle İlişkisi" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Birsen ELİBOL

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Prof. Dr. Berna DEMİRCAN TAN

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 29/ 01 / 2024

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin APA yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun APA kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

Doç. Dr. Birsen ELİBOL

Etik İlkeler Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Fatma Nur Çiçekli

ÖZET

Alzheimer Hastalığında Glut12 Ekspresyonunun Değişimi ve Ketojenik Diyetle İlişkisi

Çiçekli, Fatma Nur

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Birsen Elibol

Ocak 2024

Hafıza kaybı ve demans gibi önemli bilişsel fonksiyonlara sebep olan en yaygın nörodejeneratif bozukluk Alzheimer hastalığı olarak belirlenmiştir. Alzheimer hastalığında beynin enerji kaynağı olan glikoz kullanım kapasitesinde bozukluk meydana geldiği de bilinmektedir. Bu nedenle, Alzheimer hastalığında bir glikoz taşıyıcısı olan GLUT ifadesi hakkında birçok araştırma yapılmış, ancak GLUT ailesi üyesi olan GLUT12 üzerine yapılan çalışmaların oldukça kısıtlı sayıda olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada, GLUT12 ve GLUT12 ilişkili P13K-AKT sinyal yolağında bulunan proteinler ile insülin reseptörünün Alzheimer hastalığı ile birlikte prefrontal korteks ve hipokampüsteki değişimini ve bu değişim üzerinde ketojenik beslenmenin önemini araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için GLUT12 lokalizasyonu ve ekspresyonel değişiminin yanı sıra GLUT12 ilişkili proteinlerdeki ekspresyonel değişimler immunohistokimyasal ve western blot tekniği ile belirlenmiştir. Bu çalışmada, sıçanlar 4 gruba ayrılmıştır. Sham kontrol grubuna sadece intraserebroventriküler (i.c.v) olarak yapay BOS uygulanırken diğer 3 gruba i.c.v. olarak streptozotosin (STZ) uygulanarak sporadik Alzheimer hastalığı modeli oluşturulmuştur. Model oluşturulan hayvanlardan bir grubu normal diyetle beslenirken (Alzheimer hastalığı grubu), bir grubuna 2 ay boyunca ketojenik diyet (Terapötik grup) uygulanmıştır. Son hastalık modeli geliştirilen grup (Proflaktik grup) ise model geliştirilmeden iki ay önce ketojenik diyetle beslenmeye başlamış ve model geliştirilmesinden sonra da 2 ay boyunca ketojenik diyet almaya devam etmiştir. Davranış testleri ile fonksiyonel değişimler belirlendikten sonra sıçanlar kurban edilmek üzere hipokampus ve prefrontal korteks dokuları disekte edilmiştir. Sonuç olarak, STZ ile indüklenen Alzheimer hastalığında bozulan bellek fonksiyonlarına karşı profilaktik olarak tüketilen ketojenik diyetin koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir. Tedavi amacıyla kullanılan terapötik ketojenik diyetin ise bellek fonksiyonları üzerinde düzelme sağlamadığı gözlemlenmiştir. Moleküler incelemelerde bellekte oluşan düzeltilmelerin profilaktik diyetle görülen DG

bölgesindeki hücre artışı ile ilişkili olabileceği ve böylelikle ketojenik diyetin nöroenez ve nöroplastisiteyi arttırabileceği belirlenmiştir. GLUT12 ekspresyonunun özellikle prefrontal kortekste literatürle paralel olarak STZ verilen grupta hem immunofloresan işaretlemeye hem de western blot yönteminde ekspresyonunda artışların olduğu gözlemlenmiştir. Bu artışın yine profilaktik ketojenik diyet kullanımı ile azaldığı tespit edilmiştir. GLUT12 ile ilişkili proteinlerin analizlerine bakıldığında IR'nin paralel bir etki gösterdiği PI3K ekspresyonunda değişimin görülmediği gözlenmiştir. Ayrıca, AKT proteinin aktif formunun Alzheimer hastalığı ile arttığını hem profilaktik hem de terapötik ketojenik diyet kullanımının prefrontal kortekste AKT aktiveştirmesini azalttığı hipokampüste tersine arttırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Alzheimer hastalığı riski taşıyan kişilerde uzun süreli ketojenik beslenmenin hastalık belirtilerini geciktirebileceği ve nöroprotektif bir etki gösterebileceğine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Hipokampus, GLUT12, Ketojenik diyet, Sıçan.

ABSTRACT

The Alterations in GLUT12 Expression in Alzheimer's Disease and Its Relationship with Ketogenic Diet Consumption

Çiçekli, Fatma Nur

Master's Thesis, Department of Molecular Medicine

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Birsen Elibol

January 2024

The most common neurodegenerative disorder that causes important cognitive functions such as memory loss and dementia has been determined as Alzheimer's disease. It is also known that the brain's ability to use glucose as the energy source is impaired in Alzheimer's disease. In addition, several studies have been conducted on the expressions of GLUT, a glucose carrier, in Alzheimer's disease. However, there are limited studies on GLUT12 which is a member of GLUT family. Therefore, the aim of this study is to investigate the changes in GLUT12 expression in addition to the proteins in GLUT12-related P13K-AKT signaling pathway and insulin receptor in the prefrontal cortex and hippocampus of rats with Alzheimer's disease. In addition, the role of ketogenic diet on these parameters was also evaluated. For that reason, the expression of GLUT12 and related proteins were determined by western blotting and the localization of GLUT12 was evaluated by immunohistochemical techniques. The rats were divided into 4 groups. While the sham control group was administered artificial cerebrospinal fluid (CSF) by intracerebroventricularly (i.c.v), the three sporadic Alzheimer's disease model groups were administered i.c.v injections of streptozotocin (STZ). While one group of disease group was fed with a normal diet (Alzheimer's disease group), the rats in the therapeutic group had a ketogenic diet for 2 months. The last disease (Prophylactic) group was fed a ketogenic diet for two months before the disease model development and continued ketogenic diet for 2 months after the model development. After functional changes were determined by behavioral tests, the rats were sacrificed and the hippocampus and prefrontal cortex tissues were dissected. As a result, it has been determined that the ketogenic diet consumed prophylactically has a protective effect against impaired memory functions in STZ-induced Alzheimer's disease. It has been observed that the therapeutic ketogenic diet used for treatment purposes is not effective enough to improve memory functions. Molecular studies have

determined that the improvements in memory may be related to the increase in DG granular cell seen in the prophylactic group suggesting that ketogenic diet can increase neurogenesis and neuroplasticity. It was observed that GLUT12 expression increased, especially in the prefrontal cortex, in both immunofluorescence labeling and western blotting in the STZ group, in line with the literature. It has been determined that the use of prophylactic ketogenic diet decreased the GLUT12 expression. In addition, it has been determined that IR has a parallel effect with GLUT12 expression while there is no change in PI3K expression. The active form of the AKT protein increased in the Alzheimer's disease, and both prophylactic and therapeutic ketogenic diet reduced the AKT activation in the prefrontal cortex and, on the contrary, increases it in the hippocampus. These results indicate that long-term ketogenic diet consumption may delay disease symptoms and have a neuroprotective effect in people who have a risk of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, Hippocampus, GLUT12, Ketogenic diet, Rat.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler

İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	2
2.2 Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi	3
2.2.1. Alzheimer Hastalığında Moleküler Mekanizmalar	5
2.2.2. Alzheimer Hastalığının Genetik Temeli	7
2.2.3 Alzheimer Hastalığının Tedavisi	9
2.3 GLUT Proteininin Özellikleri	10
2.3.1. GLUT Proteini Çeşitleri	11
2.4. Ketojenik Diyet	17
2.4.1. Ketojenik Diyet ve Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişki	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. Cihazlar	21
3.1.2. Sarf Malzemeler	21
3.2. Yöntem	22
3.2.1 Hayvan Çalışmaları	22
3.2.2. Davranış Deneyleri	23
3.2.3. Western Blot Tekniği.....	24
3.2.4. İmmunohistokimya Çalışmaları	28
4. SONUÇLAR	31
4.1. Davranış Deneyleri.....	31
4.2. Western Blot Sonuçları.....	32
4.3. Creyl Violet Boyama	34
4.4. GLUT12 Immunfloresan Boyama	36
5.TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

GLUT: Glukoz taşıyıcı

AH: Alzheimer Hastalığı

BT: Bilgisayarlı tomografi

PET: Pozitron emisyon tomografi

MRI: Manyetik rezonans görüntüleme

SPECT: Tek foton emisyon tomografi

NFY: Nörofibriler yumak

APP: Amiloid prekürsör protein

APOE: Apolipoprotein E

PS1: Presenilin 1

PS2: Presenilin 2

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

ATP: Adenozin trifosfat

ELISA: Enzim bağlı immünosorbent assay

PI-3 kinaz: Fosfoinozitol 3 Kinaz

RIPA: Radioimmünopresipitasyon assay

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

BCA: Bikinkoninik asit tahlili

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez

MWM: Morris su labirenti

ANOVA: Varyans analizi

HPC: Hipokampus

PFC: Prefrontal korteks

DG: Dentat girus

IR: İnsülin reseptörü

µl: Mikrolitre

ml: Mililitre

mg: Miligram

µg: Mikrogram

°C : Santigrat derece

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Alzheimer hastalığı ile yaş dağılı arasındaki prevalans değerleri [4].....	2
Tablo 2. Alzheimer hastalığı ile ilişkili olan genler ve özellikleri.....	9
Tablo 3. GLUT taşıyıcılarının grupları ve temel özellikleri.....	12
Tablo 4. Antikor muamelesinde kullanılan primer ve sekonder antikor örnekleri, dilüsyon miktarları ve elde edildikleri organizma.....	26



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Alzheimer hastalığına sahip birey ve Sağlıklı bireylerin beyin dokuları	4
Şekil 2. Alzheimer hastalığının patolojisini oluşturan etkenler	5
Şekil 3. Tau proteini ve mikrotübül arasındaki bağlantı	6
Şekil 4. Bozulmuş mikrotübül yapını ve Amiloid plak oluşumu arasındaki ilişki.....	7
Şekil 5. ApoE geninin polimorfizim ile oluşan alleleri ve bağlanma bölgeleri	9
Şekil 6. GLUT ailesi proteinlerin şematik gösterimi.....	11
Şekil 7. GLUT4 taşıyıcısının Alzheimer hastalığına sahip bireyin beyinde etkisi	15
Şekil 8. GLUT12 translokasyonu ve glukoz taşınımını düzenleyen sinyal yolu.....	16
Şekil 9. Ketojenik diyetin Alzheimer hastalığı gelişimini etkilediği varsayılan mekanizmalar	19
Şekil 10. Deney şeması.....	23
Şekil 11. Multiscan go ölçüm cihazı ve BCA Assay sonucunda elde edilen proteinlerin ölçüm sonuçları	24
Şekil 12. Örneklerin jel elektroforezinde yürütülmesi	25
Şekil 13. Örneklerin aktarıldığı membranlara primer ve sekonder antikor işleminin gerçekleştirilmesi.....	27
Şekil 14. Fusion FX7 Görüntüleme.....	27
Şekil 15. Sıçanlardan çıkarılan yarım beyin ve bu beyinlerden elde edilen hipokampus kesit örneği	28
Şekil 16. Cresyl Violet işlemi ile boyanmış hipokampus kesitleri.....	29
Şekil 17. İmmünofloresans boyaması gerçekleştirilen GLUT12 hücrelerinin görüntülenmesi için kullanılan konfokal mikroskop.....	30
Şekil 18. Sıçanların Morris su tankında 5 gün boyunca platforma ulaşmaya kadar yüzdükleri mesafe. * $p < 0.05$	31
Şekil 19. Morris su labirenti deneyinde platformun olduğu çeyrekte geçirdikleri süreye bağlı bellek değerlendirmesi * $p < 0.05$	32
Şekil 20. GLUT12 proteinin prefrontal kortekste ve hipokampüsteki ekspresyonel değişimi. * $p < 0.05$ kontrole göre, # $p < 0.05$ STZ grubuna göre.	33
Şekil 21. IR proteinin prefrontal kortekste ve hipokampüsteki ekspresyonel değişimi.	33
Şekil 22. PI3K proteinin prefrontal kortekste ve hipokampüsteki ekspresyonel değişimi. * $p < 0.05$ kontrole göre, # $p < 0.05$ STZ grubuna göre.	34
Şekil 23. pAKT proteinin prefrontal kortekste ve hipokampüsteki ekspresyonel değişimi. * $p < 0.05$ kontrole göre, # $p < 0.05$ STZ grubuna göre.	34
Şekil 24. Nissl boyaması sonucu hipokampusun CA1 ve DG bölgeleri ile prefrontal korteksten (PFC) alınmış her gruba ait örnekler.	35
Şekil 25. Nissl boyama sonucu hipokampus CA1 ve DG bölgeleri ve prefrontal korteksten (PFC) alınan kesitlerdeki toplam hücre sayısı. * $p < 0.05$ kontrole göre.	36
Şekil 26. Hipokampus ve prefrontal kortekte GLUT12 ekspresyonunun immunofloresan olarak görüntülenmesi. GLUT12 yeşil floresan boya ile boyanmıştır. Mavi DAPI boyası ise çekirdek boyasıdır.....	36
Şekil 27. GLUT12 immunofloresan boyama sonucu hipokampus ve prefrontal kortekte bulunan pozitif hücrelerin sayısı. * $p < 0.05$ kontrole göre.	37

1. GİRİŞ

En yaygın nörodejeneratif hastalıklardan birisi olan Alzheimer hastalığının birçok nedeni bulunmaktadır. Ancak, Alzheimer hastalığının temel nedenini beyinde anormal protein birikimi oluşturmaktadır. Amiloid beta proteini ve tau proteini olarak adlandırılan bu proteinlerin anormal birikimi beyin hücrelerinin ölümüne sebep olmaktadır. Amiloid beta proteinindeki birikme beyinde plak olarak adlandırılan yapıyı oluşturmaktadır. Ayrıca tau isimli proteinler ise hiperfosforile olması nedeniyle yumaklara dönüşmektedir. Bu iki yapı, plaklar ve yumaklar, beyin temel işlevi olan sinyal iletimini engelleyerek işlemlerin sürekliliğini ve gerçekleşmesini bloke etmektedir. Sinir hücrelerinde meydana gelen bu bozukluk özellikle hafıza ile ilişkilendirilmiş beyin bölgesi olan hipokampüste meydana gelmekte ve doğrudan Alzheimer hastalığının belirtilerine sebep olmaktadır.

Beynin temel enerji kaynağı glikozdur. Nörodejeneratif hastalıklarda beyin glikoz kullanımında bozukluk olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. GLUT proteinleri beyin glikoz taşınmasından sorumlu bir yapıdır. GLUT proteinlerinden bir olan GLUT12 proteininin ekspresyonu ile amiloid beta birikimi arasında doğrudan bir ilişkinin olduğu geçmişteki çalışmalarda gösterilmiştir. Dolayısıyla GLUT12 ekspresyonundaki değişimlerin pek çok yönden Alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Beynin glikozu yakıt olarak kullanmaması amacıyla uygulanan diyet modellerinden birisi ketojenik diyettir. Bu diyet modelinde vücut yakıt olarak glikoz yerine keton cisimlerini kullanmaktadır. Böylelikle glikoz metabolizmasındaki bozukluklar nedeniyle amiloid beta yapısını etkilemeden alternatif bir substrat sağlayan ketonlar sayesinde bozulmuş glikoz metabolizmasının etkisinin azaltılmış olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda aşırı eksprese edilmiş GLUT12'nin plazma zarına ve hücre içi bölmelere lokalize olduğu ve buradan insüline PI3-kinaza bağımlı bir şekilde yanıt sağladığı gösterilmiştir. Dolayısıyla ketojenik diyet bu yanıtı glikoz üzerinden dolaylı bir şekilde etkilemektedir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, ketojenik diyet ve Alzheimer ile GLUT12 proteininin lokalizasyonu ve ekspresyonunun doğrudan bir bağlantısının olup olmadığının sıçanların prefrontal korteks ve hipokampus dokularından elde edilen örnekler üzerinden gösterilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığının 1907 yılında Alois Alzheimer tarafından tanımı gerçekleştirilmiştir. Alois Alzheimer, Auguste D. isimli hastasının otopsisinden aldığı beyin örneğini gümüş boyama tekniği kullanarak incelemiştir. Elde ettiği sonuçlar ise Alzheimer hastalığında temel olarak gözlemlenen nörofibriler yumaklar, nöritik plaklar ve amiloid yapılar olmuştur [1]. Alzheimer hastalığının görülme riski yaş ile doğru orantılı olup 60-65 yaş arasında sıklıkla gözlemlenmektedir. Alzheimer hastalığında en yaygın belirtiler; gündelik hayatta kullanılan fonksiyonlarda azalma, bellekte kayıplar ve özellikle görsel algılamada meydana gelen bozukluklardır. Başlangıcında depresyon, halüsinasyon gibi durumlarla sıklıkla karşılaşmaktadır. Progresif bir nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer hastalığında merkezi sinir sisteminin birçok farklı noktasında nöron ve sinaps kayıplarından dolayı davranışsal bozukluklar, nöropsikiyatrik bozukluklar ve bilişsel işlevlerde azalma görülmektedir [2].

Bilişsel bozukluğun başlangıcında telefon numaraları, adres, randevular veya eşya isimleri gibi durumlar karıştırılmaktadır. Alzheimer hastalığı ile her ne kadar 60 yaş üstünde sıklıkla karşılaşılrsa da kırklı yaşlarda da başlangıcı gözlemlenebilmektedir. Alzheimer hastalığının prevalansı yaş ilerledikçe artış göstermektedir [Tablo 1]. Tanısı konulan Alzheimer hastasının yaşam süresi tanının ardından yaklaşık 7-10 yıl arasında değişmektedir [3].

Tablo 1. Alzheimer hastalığı ile yaş dağılımı arasındaki prevalans değerleri [4].

Yaş Dağılımı	%
60-69	0.3
70-79	3
80-89	20

Yaşlanmanın Alzheimer hastalığı için önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Ancak yaşlanma kadar Alzheimer hastalığının gelişimini etkileyen bir diğer önemli faktör ise

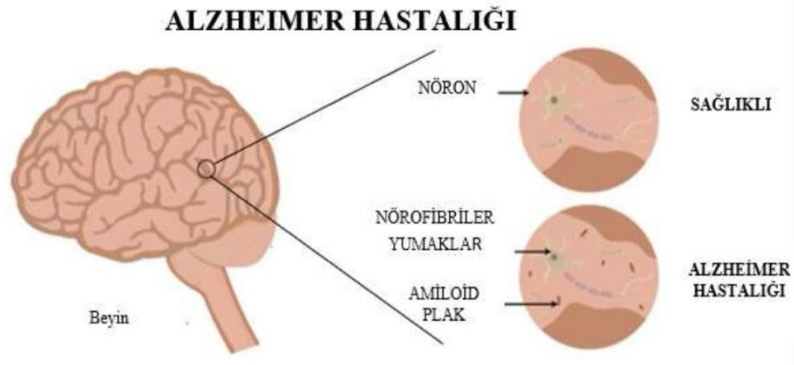
genetik yatkınlıktır. Birinci derece yakınlarında Alzheimer hastalığı bulunan kişilerde hastalık riski artmaktadır.

Alzheimer hastalığının tanısında kullanılan iki ölçüt bulunmaktadır: Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği, diğer bir ölçüt ise Tanısal ve Sayısal El Kitabı ölçütüdür. Alzheimer tanısı konulabilmesi için bu ölçütlere göre hastada bilişsel bozukluklar değerlendirilmektedir. Ayrıca bilgisayarlı tomografi (BT), pozitron emisyon tomografi (PET), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve tek foton emisyon tomografisi (SPECT), Alzheimer hastalığını diğer demans tiplerinden ayırmak için kullanılmaktadır.

Alzheimer hastalığı temel 7 evre şeklinde seyretmektedir. Bilişsel zayıflıkla belirti gösteren birinci evre başlangıç evresi olarak görülmektedir. Hafif bilişsel zayıflıklar görülmeye başladığı ikinci evrede hastalar kumanda, cüzdan gibi basit objelerin yerlerini unuturlar. Üçüncü evrede hastalar konuşurken kullanacakları kelimeleri zor seçmeye başlarlar. Organizasyona dair becerilerini kaybeden hastalar bu evrede tanıdıklarının isimlerini de hatırlamakta zorlanırlar. Dördüncü evrede bellek zayıflığı ileri derecede artmaktadır. Kişisel geçmişe dair bilgilerde eksilmeler görülmektedir. Beşinci evrede hastalar adres, telefon numarası gibi temel bilgilerde keskin bir karışıklık yaşamaktadır. Bu evrede artık hasta günlük ihtiyaçlarını karşılayamamaktadır ve yardım almaktadır. Altıncı evrede hasta bireyler konuşma, idrar ve dışkı tutmada zorluk yaşarlar. Son evre olan yedinci evrede hastalar konuşma yeteneğini tama yakın kaybetmiştir ayrıca yutmada sorun yaşarlar. Bu evredeki hasta tamamen bakıma ihtiyaç duymaktadır [2].

2.2 Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi

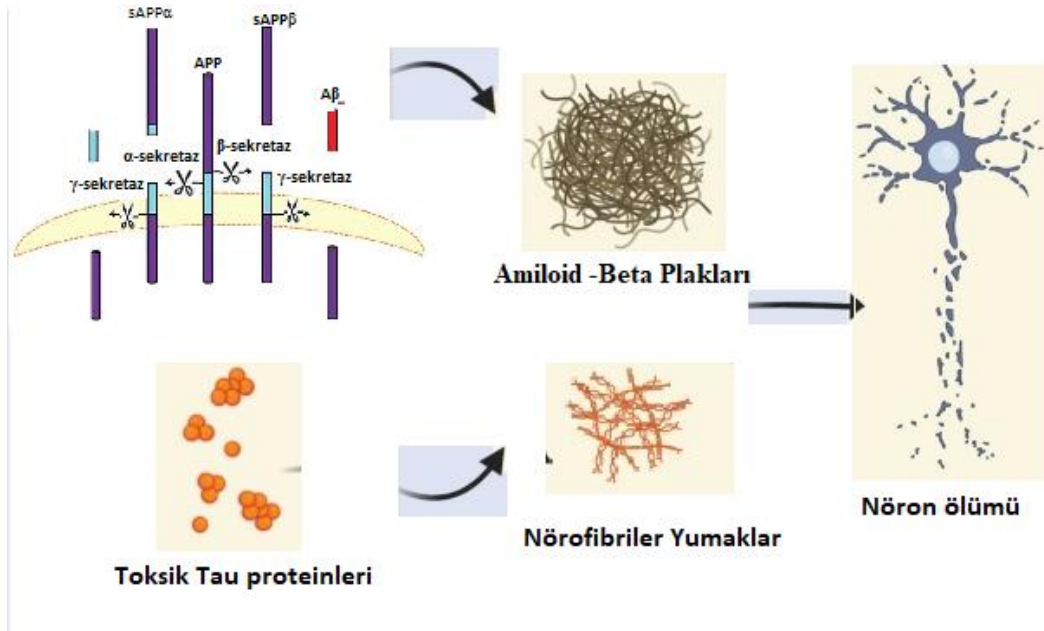
Kronik nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı demansın en sık sebebidir. Nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, senil amiloid plaklar (SP), beyinde meydana gelen atrofi ve sinaps-nöron kaybı temel olarak Alzheimer hastalığının beyindeki histopatolojisini göstermektedir [Şekil 1]. Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi incelendiğinde beyinde atrofi, giruslarda daralma ve ventrikülerde genişleme görülmektedir [2].



Şekil 1 Alzheimer hastalığına sahip birey ve Sağlıklı bireylerin beyin dokuları

Hiperfosforile tau proteinleri nörofibriler yumakların temel yapısını oluşturur. Hipoaktif fosfatazlar ve hiperaktif kinazlar Alzheimer hastalığının patogenezinde tau proteinini hiperfosforile ederek mikrotübüllere bağlanmayı bozarlar. Çözölemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olan fosforile tau zamanla intranöronal nörofibriler yumak halini almakta ve bu yapı aksonal transport ile hücre iskeletinin bütünlüğünü bozarak hücre ölümüne neden olmaktadır.

Alzheimer hastalığında öne çıkan bir diğer değişiklik ise amiloid beta proteininde meydana gelen değişimdir (Şekil 2). Alzheimer hastalığında amiloid beta agrege olmaktadır. Amiloid beta amiloid prekürsör proteininin (APP) metabolizma ürünlerinden birisi olup buradan proteolitik yolla oluşmaktadır. Amiloid beta 40-42 aminoasitten oluşmaktadır. Agrege olan amiloid beta plakları nöritik plaklara dönüşmektedir. Meningeal kan damarlarında bulunan Amiloid beta erken demans olgusunda tespit edilmiştir. [3].



Şekil 2. Alzheimer hastalığının patolojisini oluşturan etkenler

2.2.1. Alzheimer Hastalığında Moleküler Mekanizmalar

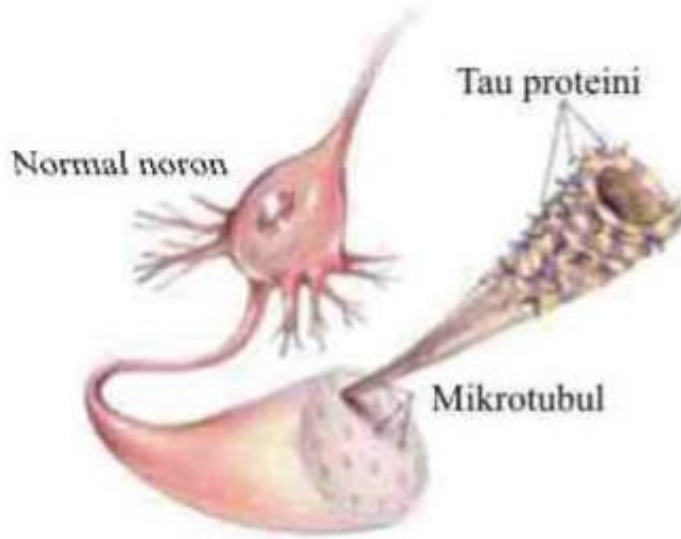
Beyindeki nöronların zarar görmesiyle ortaya çıkan Alzheimer hastalığı beyin entorinal korteksinde başlar ve hipokampüse ilerler. En son olarak konuşma ve fikir yürütmekle ilişkili olan serebral kortekse ilerlemektedir. Buradaki nöronlarda meydana gelen dejenerasyon sonucunda sinapslarda iletişim bozulmaktadır.

Asetilkolin nörotransmitter bir maddedir. Bu kimyasal madde hafıza ve öğrenme için nöronlar tarafından kullanılmaktadır. Özellikle bu kimyasalı kullanan nöronlar ise hipokampus ve serebral kortekste nöronlardır. Bu nöronlar asetilkolinesteraz ile parçalanmaktadır. Nöronlar arası doğru mesaj iletiminden sorumlu yapı fosfolipitlerdir, dolayısıyla asetilkolin hücre membranlarında bulunan fosfolipidlere kimyasal bağlarla bağlandığı için Alzheimer hastalığının araştırılmasında önemli bir hedeftir.

Ayrıca serotonin, nöroadrenalin ve somatostatinde Alzheimer hastalığı için önemli moleküllerdir. Bu maddeler hastalık ilerledikçe saldırganlık gibi davranışlarda etkili olurlar. Akut bozulmalar sinir sisteminde meydana gelen beyin kanamaları, travmaları gibi durumlarla karakterize edilmektedir. Bu durumlarda nekroz yani hücre ölümü gerçekleşmektedir. Demansın her türünde görülen bu mental bozulmalar özellikle Alzheimer hastalığında ağırlıklıdır.

Alzheimer hastalığında başlıca dikkat çeken yapı beta amiloid yapısıdır (Şekil 2). Alzheimer hastalığı ile doğrudan ilişkilendirilen bu kimyasal toksik bir beyin kimyasalı haline getiren birçok sebep vardır. Bunlardan ilk öne çıkanı proteinlerle ilişkili olan ribozomlarda meydana gelecek bozukluklardır. Ribozomlarda meydana gelen bozulmalar sonucunda protein sentezinin kapasitesinde azalma görülürken ayrıca tRNA ve rRNA seviyelerinde de azalmalar görülmektedir. Dolayısıyla bu durum, araştırmacılar tarafından Alzheimer hastalığında görülen primer nörokimyasal değişimler olarak düşünülmektedir.

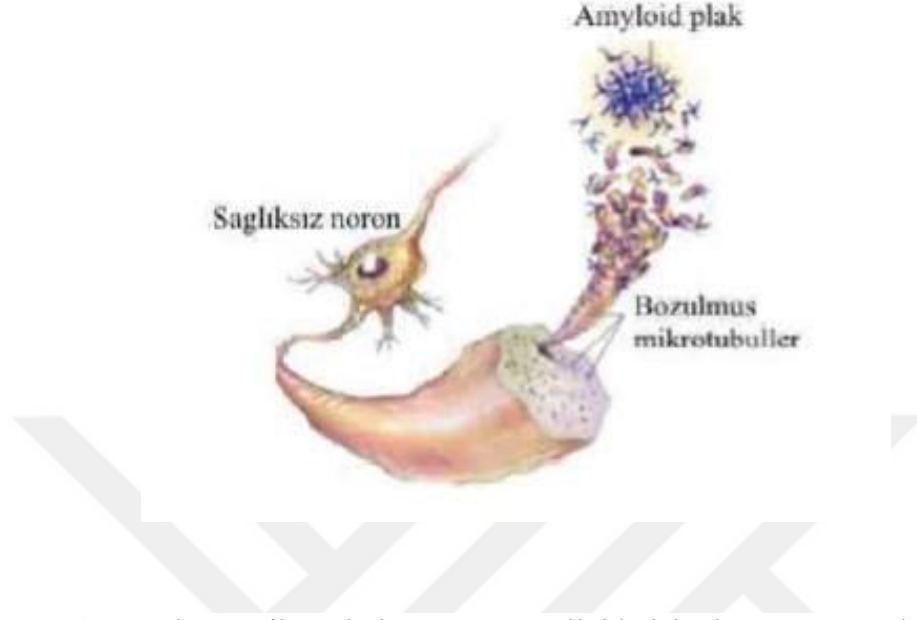
Alzheimer hastalığına sebep olduğu düşünülen bir diğer yapı ise glikoz metabolizmasıdır. Nöronlar enerji için glikoza ihtiyaç duymaktadırlar. Glikoz metabolizmasında meydana gelen bir bozukluk sonucunda nöronlar asetilkolin nörotransmitteri üretemeyebilir veya yanlış bir cevap üretimine sebep olabilmektedir. Alzheimer hastalığının biyokimyasına bakılacak olursa en önemli durum proteinin akümüle olmasıdır. İki şekilde akümülyasyon gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi, hücre içinde bulunan nörofibriler yumakların nöron perikaryonunda birikimidir (Şekil 2). Mikrotübül şekillenmesinden sorumlu protein faktörü taudur. Tau tubulin proteinine bağlanmaktadır. Böylece hücreye destek sağlarken aynı zamanda hücreyi koruyan mikrotübüller için önemli bir proteindir (Şekil 3).



Şekil 3. Tau proteini ve mikrotübül arasındaki bağlantı

Tauda meydana gelecek en ufak bozukluk mikrotübüllerin görevini yapmasını doğrudan etkilemektedir. Dolayısıyla nöronda sinyallerin, besinlerin ve diğer uzaklaştırılması gerekli maddelerin hücreden uzaklaştırılmasında problemler oluşmaktadır. En sonunda ise bozulmuş mikrotübüller aynı zamanda amiloid beta birikimine neden olmaktadır. Bu

birikme ise ikinci tip birikme olarak adlandırılmaktadır. Bu birikmeler nörofibriler yumaklara benzemezler burada birikim sinir hücrelerinin aralarında toplanmışlardır (Şekil 4).



Şekil 4. Bozulmuş mikrotübül yapısını ve Amiloid plak oluşumu arasındaki ilişki

Genel olarak Alzheimer hastalığına bakıldığında amiloid prekürsör protein (APP) olarak adlandırılan yapı önemli bir hedef olarak görülmektedir. Bu yapının geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda beta amiloidin miktarında veya toksik uzamış versiyonunun üretiminde artış olmaktadır.

2.2.2. Alzheimer Hastalığının Genetik Temeli

Alzheimer hastalığıyla ilişkili başlıca genler *APP*, apolipoprotein E (*ApoE*), presenilin 1 (*PS1*) ve presenilin 2 (*PS2*) genleridir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı oluşumuna neden olmaktadır. APP, 21. kromozomda yer alırken, PS2, 1. kromozomda yer almaktadır. Bu bölgelerde meydana gelen herhangi bir mutasyon sonucunda amiloid beta peptid seviyeleri artmaktadır. PS1 geni ise 14. kromozomda yer almaktadır. Burada meydana gelen bir mutasyon sonucunda ise APP'nin hatalı bölünmesinden dolayı toksik amiloid beta peptid üretimi görülmektedir. PS1 geninde meydana gelen mutasyonun bir başka etkisi ise tau proteinlerinin hiperfosforilasyonudur. Bu durum ise nörofibriler yumak oluşumunu tetiklemektedir. APP geninde meydana gelen mutasyonlar erken başlangıçlı Alzheimer hastalığının %2-3'ünü, PS1 geninde meydana gelen mutasyonlar %70-80'ini, PS2 genindeki mutasyonlar ise %20'sini oluşturmaktadır. 19. kromozomda bulunan ApoE geni ise geç başlangıçlı

Alzheimer hastalığının %50-80'ini oluşturmaktadır. Genetik faktörlerin haricinde down sendromu, alkol kullanımı ve depresyon Alzheimer hastalığı için risk faktörleridir.

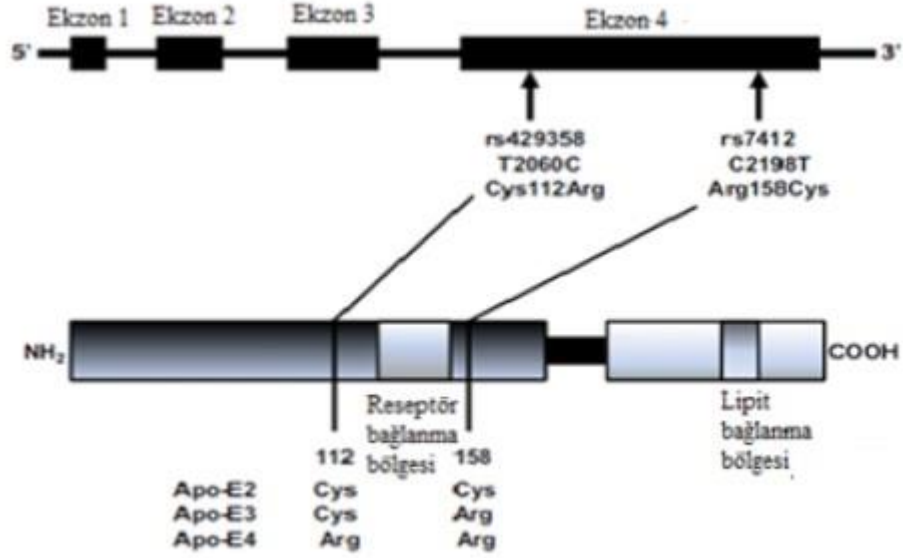
APP geninde meydana gelen mutasyonlar toplam amiloid beta üretimini arttırmaktadır. Gevşek plaklarda biriken amiloid beta sonucunda serbest radikaller ve oksidatif gerilim oluşmakta böylece plakların fiziksel değişimi meydana gelmektedir. Dolayısıyla Alzheimer hastalığının tedavisinde anti-inflammatuarlar ve serbest radikal giderici ajanlar denenmiştir. Demans olmayan beyinlerde nöritik olmayan katı plaklar görülebilmektedir. Apoptoza ve nöritik dejenerasyona neden olan katı plakların nörotoksitesi bu duruma sebep olmaktadır. Nöritik plaklar ise dejenere nöritler içeren katı plaklardır ve bu plaklar ise nöritik olmayan katı plakların tersine yalnızca demanslı beyinlerde tespit edilmektedir. Nöritik plaklarda bulunan merkezi bölgede amiloid beta, ApoE4 ve diğer proteinler bulunur. Tau plaklarda ise nörofibriler yumak içeren nöronların kalıntıları bulunmaktadır. Amiloid beta proteininin birikimi apoptoz başlatıcıları olan sistein aspartil proteazlarının aktivasyonlarını tetikler ve böylece erken başlangıçlı Alzheimer hastalığında tau proteininin kaspaz tarafından indüklenen bölünmesine neden olduğu düşünülmektedir. Bu durumda ise tau proteininin bölünmesi nörofibriler yumak oluşmasını doğrudan etkilemektedir. Tau proteininde meydana gelen mutasyonlar amiloid beta depozisyonuna neden olmaz ancak nörofibriler yumak oluşumuna, nörodejenerasyona ve demansa yol açmaktadır [4,5].

ApoE özellikle geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı için tanımlıdır. Yapılan çalışmalarda ApoEnin *in vitro* olarak amiloid betaya yüksek etkiyle bağlanmasının kontrollerle kıyaslandığında fazla olduğu görülmüştür [6,7].

On iki ekzondan oluşan 467 aminoasitlik bir yapıya sahip olan *PS1* ile ilgili 185 farklı mutasyon bulunmuştur. *PS1* mutasyonu direkt olarak Notch sinyal yolağı düzenlenmesinde ve amiloid beta oluşumunda etkilidir. *PS2*'de bulunan missense mutasyonları özellikle erken başlangıçlı Alzheimer hastalığına sebep olmaktadır. Mutasyona uğramış *PS2* ekstraselüler sinyalleri düzenleyen kinazlara bağlanarak reaktif oksijen türleri ile beta sekretaz aktivitesini arttırarak amiloid beta üretiminde artışa sebep olmaktadır.

Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığından daha kompleks olan geç başlangıçlı Alzheimer hastalığına sebep olan birincil genetik faktör *ApoE* genidir. Karaciğer ve makrofajlarda üretilen *ApoE*'nin üç farklı alleli bulunmaktadır. Bunlar E2, E3 ve E4'tür. Bunlar arasında

en yaygın bulunan APOE3'tür. APOE2 yalnızca sistein içerir. APOE4 arjiinin içerir. APOE3 ise 112. ve 158. pozisyonlarında sistein ve ariinini birlikte içerir (Şekil 5).



Şekil 5. ApoE geninin polimorfizm ile oluşan alleleri ve bağlanma bölgeleri

APOE3 alleli geç başlangıçlı Alzheimer hastalarının %50-90'ında görülmektedir. Toplamda 4 önemli gen Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Tablo 2) [8].

Tablo 2. Alzheimer hastalığı ile ilişkili olan genler ve özellikleri

Gen Sembolü	Kromozom Lokusu	Protein	Kalıtım tipi	Başlangıç Yaşı	Kalıtım ile Aktarılma Oranı
APP	21q21.2	Amiloid beta A4	Otoz. Dom.	40-60	≤ %5
PSEN1	14q24.3	Presenilin-1	Otoz. Dom.	30-58	≥ %50-75
PSEN2	1q31-q42	Presenilin-2	Otoz. Dom.	45-88	≤ %1
APOE	19q13.2	Apolipoprotein E	Risk Faktörü	40-90	Risk Faktörü

2.2.3 Alzheimer Hastalığının Tedavisi

Günümüzde Alzheimer hastalığının bilinen net bir tedavisi bulunmamaktadır, ancak hastaların duygusal ve psikotik değişimlerini kontrol altına almak amacıyla tedavi yöntemleri belirlenmektedir. Alzheimer hastalığına sebep olan genler üzerinden bilişsel bozukluğu tedavi amaçlı asetilkolinesteraz inhibitörleri, kolinerjik sinapslardaki

asetilkolin miktarını yükselten ilaçlar kullanılmaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış kolinesteraz inhibitörleri olan takrin, rivastigmin, galantamin ve donepezil Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca Alzheimer hastalığında meydana gelen bellek kaybını azaltmak amacıyla lorazepam, buspiron ve oksazepam gibi anksiyolitik veya sertralin, paroksetin gibi antidepresan ve olanzapin, haloperidol, risperidon gibi antipsikotik ilaçlar kullanılmaktadır. Yeni yapılan ilaç araştırmalarında ise kolinerjik reseptörler üzerinde durulmaktadır [9]. Ayrıca, omega-3 yağ asidi takviyesi, fiziksel aktivite ve bilişsel katılım orta düzeyde bir potansiyel göstermektedir.

Asetilkolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığının tedavisinde birinci basamak ilaçlardır ve bilişsel işlevlerde, davranışlarda ve günlük yaşam aktivitelerinde hafif iyileşmelerle ilişkilidir, ancak bu etkilerin klinik önemi belirsizdir. Asetilkolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığı olan hastalarda biliş, davranış ve günlük yaşam aktivitelerinin ölçümlerini orta derecede iyileştirebilmektedir. Memantin ayrıca asetilkolinesteraz inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanılabilir. N-metil-D-aspartat reseptör antagonistleri ve asetilkolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığının ilerlemesini yavaşlatabilse de hiçbir farmakolojik ajan bu ilerlemeyi tersine çevirememektedir. Antipsikotikler bazı davranışsal semptomları iyileştirebilir ancak demanslı yaşlı hastalarda artan ölüm oranlarıyla ilişkilendirilmiştir [9].

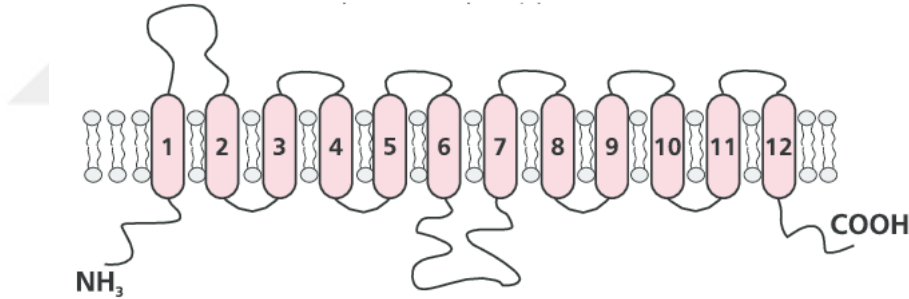
2.3 GLUT Proteininin Özellikleri

Glikozun plazma zarı boyunca taşınmasını kolaylaştıran protein grubuna glikoz taşıyıcıları (GLUT) denir. *SLC2A* ailesi olarak bilinen GLUT taşıyıcıları kolaylaştırılmış difüzyon ile bu işlemi gerçekleştirmektedir. İnsülinin kas ve yağ dokusuna glikoz alımını uyurma yeteneği tüm vücut glikoz homeostazisinin korunması için önemlidir. Memeli hücrelerinde glikoz alımına, kolaylaştırıcı GLUT ailesi aracılık eder. GLUT ailesinin üyeleri, enerji gereksinimlerini ve metabolizmayı yansıtan farklı glikoz taşıma kinetik yetenekleri ve dokuya özgü ifade modelleri sergiler [10]. Glikozun taşınmasında ve enerji metabolizmasında oldukça öneme sahip olan GLUT taşıyıcıları kan şekeri konsantrasyonunun korunmasında ve glikozun depolanması, kullanılması ve periferik dokulara verilmesinde görevlidir. Ayrıca glikozun hücre zarları boyunca taşınması bunların düzenlenmesinde ve kontrolünde önemli rol oynar.

Hücre zarları glikoza karşı geçimsizdir bu nedenle glikozun hücrelerin içine ve dışına hareketine GLUT taşıyıcıları aracılık etmektedir. Bu aracılı glikoz taşınması her biri farklı bir glikoz taşıyıcı sınıfı içeren ikincil aktif taşıma ve kolaylaştırılmış taşıma olmak üzere iki forma ayrılır. İkincil aktif taşıma mekanizması glikozun bağırsak mukozasına alınmasından ve glikozun böbrek tarafından tutulmasından sorumludur. Çoğu hücre, bir dizi farklı glikoz taşıyıcısını eksprese eder ve farklı dokulardaki ekspresyon şekli, spesifik metabolik gereksinimlerle ilişkilidir.

2.3.1. GLUT Proteini Çeşitleri

Glikozun ikincil aktif taşınması bağırsaktaki mukozal hücrelerde ve böbreğin proksimal tübüler hücrelerinde gerçekleşir. GLUT bu hücrelerde glikozun bir konsantrasyon gradyanına karşı taşınmasını sağlar. Kolaylaştırıcı glikoz taşıyıcıları ortak bir moleküler mimariye sahiptir ve yakından ilişkili proteinlerden oluşur. Hem iç hem de dış ligand bağlanma bölgelerini oluşturan 12 tane membrana yayılan alan, C ve N terminal sitoplazmik alanlar ve hücre dışı halkalardan birinde tek bir glikolizasyon bölgesi içeren bölümden oluşur (Şekil 6).



Şekil 6. GLUT ailesi proteinlerin şematik gösterimi

Bu ailede GLUT1-4 olarak adlandırılan dört glikoz taşıyıcısı vardır. GLUT5 proteini aslında bir fruktoz taşıyıcısıdır. Glukoz taşıyıcısıyla ilişkili diğer iki gen olan GLUT6 ve GLUT7'dir, ancak GLUT6 bir psödogenidir. GLUT7 ise endoplazmik retikulumun glikoz taşıyıcısıdır. GLUT taşıyıcılarının birçok özelliği *Xenopus* oositlerinin hücre zarında bulunan taşıyıcıların ekspresyonu ve metabolize edilemeyen glikozun kullanılmasıyla belirlenmiştir. GLUT1 ve GLUT3 birlikte incelenmektedir; çünkü her ikisi de özellikle glikozun beyne iletilmesinde rol oynamaktadır. Glikoz serebral metabolizma için zorunlu substrattır. Dolayısıyla bu organda glikoz taşınması temel öneme sahiptir.

En kapsamlı şekilde incelenen glikoz taşıyıcıları GLUT1-5'tir. Üç sınıfa ayrılan 14 GLUT proteini 500 amino asitten oluştuğu için birbirleri arasında benzerlik gösterirler. Sınıf 1 (GLUT1, GLUT2, GLUT14); sınıf 2 (GLUT5, GLUT7, GLUT9 ve GLUT11) ve sınıf 3 (GLUT6, GLUT7, GLUT8, GLUT10 ve GLUT12) olmak üzere temelde 3 sınıfa ayrılmıştır [Tablo 3] [12].

Tablo 3. GLUT taşıyıcılarının grupları ve temel özellikleri

Transporter	Type	Tissue distribution	Kinetic properties	Biological role	Disorder
SGLT1	Na ⁺ -linked secondary active transport	Intestinal mucosa, pars recta of renal proximal tubule	$K_m \sim 0.2$ mmol/L $V_{max} \sim 4$ nmol/min per mg protein	Intestinal glucose absorption, renal reabsorption	Glucose/galactose malabsorption
SGLT2	Na ⁺ -linked secondary active transport	First part of renal proximal tubule	$K_m \sim 10$ mmol/L $V_{max} \sim 10$ nmol/min per mg protein	Major fraction of renal glucose reabsorption	Renal glycosuria
GLUT1	Facilitated transport	Widespread, highest levels in erythrocytes, vascular endothelium	$K_m \sim 20$ mmol/L	General basal glucose transport, transport across blood-brain barrier	Infantile seizures, developmental delay and hypoglycorrhachia
GLUT2	Facilitated transport	Hepatocytes, pancreatic β -cells, basal membranes of intestinal mucosal and renal proximal tubular cells	$K_m \sim 40$ mmol/L	Intestinal absorption, renal reabsorption, pancreatic and hepatic control of glucose homeostasis	Fanconi-Bickel syndrome — hepatic and renal glycogen storage, renal proximal tubular defect
GLUT3	Facilitated transport	Neurons	$K_m \sim 10$ mmol/L	Glucose transport into neurons in brain	Not defined
GLUT4	Facilitated transport	Skeletal muscle, cardiac muscle, adipose tissue	$K_m \sim 3$ mmol/L	Insulin-dependent glucose transport	? Role in insulin resistance
GLUT5	Facilitated transport	Intestinal mucosa		Fructose absorption	None defined — deficiency does not appear to be cause of isolated fructose malabsorption

2.3.1.1. GLUT1

GLUT1, *SLC2A1* geni tarafından kodlanmaktadır. GLUT1 eritrositlerin plazma zarında çok bol miktarda bulunması nedeniyle tanımlanan ilk glukoz taşıyıcısıdır. İlk membran taşıyıcısı olduğu için 1950'lerin başından beri sıklıkla araştırılmaktadır. Fetal dokularda yaygın olarak bulunmaktadır, ancak eritrosit dışında esas olarak vasküler endotelial hücrelerde bulunan erişkinlerde ekspresyonu daha kısıtlıdır. GLUT1, glikozilasyon bölgesindeki karbonhidratların bileşiminde farklılık gösteren birçok farklı izoformda bulunur. Beyne glikoz taşınması, küçük kan damarlarının endotel hücrelerini, glial hücrelerini, özellikle astrositleri, ve nöronların kendilerini içeren karmaşık süreçlerde yer alır. GLUT1, beyin mikro damar sisteminin endotel hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edilir ve glikozun kan-beyin bariyeri boyunca transferinden sorumludur. Bu hücrelerde GLUT1 ağırlıklı olarak 45kDa glikoform şeklinde mevcuttur. Glikozun nöronlara verilmesine astrositlerin aracılık ettiği ve bu hücrelerinde GLUT1'i eksprese ettiği, ancak bu durumda esas olarak 55 kDa glikoform olduğu araştırmalardan ortaya çıkmaktadır. GLUT1 eksikliği erken bebeklik döneminde nöbetler ve gelişimsel

gecikmeyle ortaya çıkar ve hastalarda ilerleyen dönemlerde mikrosefali gelişir. En karakteristik biyokimyasal anormallikler beyin omurilik sıvısında düşük glikoz konsantrasyonu ve azalmış şeker oranıdır. Genellikle beyin görüntülemelerde herhangi bir değişiklik tespit edilmez. Nöbetler ketojenik diyet uygulamasına iyi yanıt verir ancak hastalar paroksizmal ataksi atakları ve nörodavranışsal bozukluklar göstermeye devam edebilir.

2.3.1.2. GLUT2

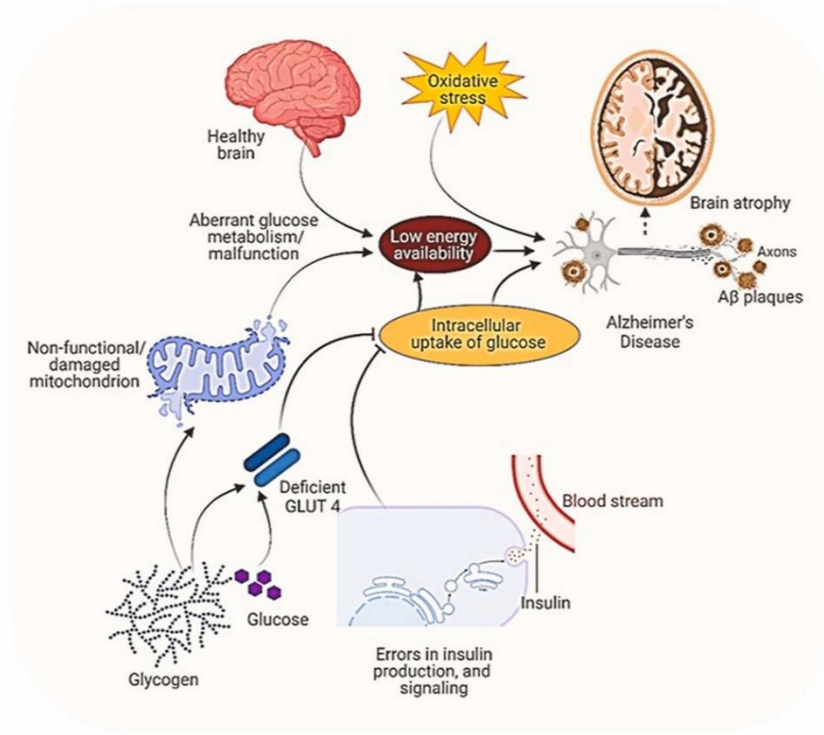
GLUT2 *SLC2A2* geni tarafından ilk olarak sıçan ve insan karaciğer komplementer DNA kütüphanelerinden karakterize edilmiştir. Glukozamin için yüksek afinite göstermektedir [13]. GLUT2, GLUT taşıyıcıları arasında en yüksek glikoz oranına sahiptir ve ağırlıklı olarak karaciğerde, böbrekte, pankreasın beta hücrelerinde ve bağırsak mukozal hücrelerinde eksprese edilmektedir. Kullanım için hücrelere glikoz verme işlevi gören diğer glikoz taşıyıcılarından farklı olarak GLUT2 bağırsaktan glikoz alımı, böbrek tarafından yeniden emilmesi, pankreatik beta hücrelerinde algılama ve hücreler tarafından alınıp salınmadaki rolü aracılığıyla öncelikle glikoz homeostazisinde rol oynar. Bağırsaktan alınan ve proksimal tübülde Na-glikoz taşıyıcıları tarafından yeniden emilen glikoz, epitel hücrelerinin bazal zarındaki GLUT2 aracılığıyla dolaşıma salınır. GLUT2'nin glikoz oranının yüksek olması, pankreas beta hücreleri ve hepatositler tarafından glikoz taşınmasının kan glikoz konsantrasyonu ile orantılı olduğunu göstermektedir. Bu hücrelerin glukokinaz aktivitesi yoluyla mevcut glikoz konsantrasyonunu algılamasına izin verilir ve bu da pankreas tarafından insülin salgılanmasının kontrol edilmesine ve kan şekerini düzenlemek için gerektiği şekilde hepatositler tarafından glikozun alınmasına veya salınmasına yol açmaktadır. GLUT2 tamamen glikoza özgü değildir ve galaktoz taşınmasında da rol oynamaktadır. GLUT2'nin değişen ekspresyonu özellikle diyabetin patogeneziyle ilişkilendirilmiştir. Azalmış GLUT2 ekspresyonu, kusurlu glikozla uyarılmış insülin salınımıyla bağlantılı olarak bulunmuştur. Karaciğerdeki GLUT2 ekspresyonunun hiperglisemiye tepki olarak arttığı görülmektedir. Yüksek karbonhidratlı bir diyetin uygulanmasının ardından bağırsak mukozal hücrelerinde GLUT2 ekspresyonunun arttığı araştırmalarda görülmektedir. GLUT2'deki genetik kusurlar, bebeklik döneminde gelişme geriliği, raşitizm ve glikojen birikimine bağlı karaciğer ve böbrek büyümesiyle ortaya çıkan nadir otozomal resesif bir durum olan Fanconi sendromundan sorumludur [Tablo 3] [11].

2.3.1.3. GLUT3

GLUT3 ise *SLC2A3* geni tarafından kodlanmıştır. Nöronlara glikoz alımında birinci sırada yer almaktadır [14]. GLUT3 özellikle nöronların glikoz alımına aracılık eder. Sıçan beyinde hem GLUT1 hem de GLUT3 seviyeleri doğumda çok düşüktür ve hızlı gelişme ve olgunlaşmaya karşılık gelen bir dönem olan sütten kesme zamanında hızla yetişkin seviyelerine yükselir. GLUT1'in ekspresyonu, besin maddelerinin temini ve beyin genel büyümesi ile ilişkiliyken, GLUT3'ün olgunlaşma ve serebral fonksiyonla daha fazla ilişkili olduğu görülmektedir. GLUT1 ekspresyonu hipoglisemi koşulları altında artar. Nöronal hücre ölümü etkilenen bölgede GLUT3 seviyesinde bir azalmaya yol açar ve buna çevredeki damarlarda ve astrositlerdeki GLUT1 ekspresyonunun artması eşlik eder. Alzheimer hastalığı olan hastalarda parietal ve temporal loblarda glikozun bölgesel metabolizma hızında tutarlı bir azalma görülmektedir. GLUT1 ve GLUT3 glikoformlarında önemli bir azalma bu hastalıkla ilişkilendirilmiştir.

2.3.1.4. GLUT4

İnsülinle düzenlenen glikoz taşıyıcısı GLUT4, esas olarak insüline duyarlı dokularda, yani beyaz ve kahverengi yağ dokusunda ve akut insülin stimülasyonuna yanıt olarak glikoz alımına aracılık ettiği kalp ve iskelet kaslarında eksprese edilir. GLUT4'ün hücre içi membranlar ile plazma membranı arasındaki dağılımındaki ve GLUT4'ün insülinle uyarılan plazma membranına translokasyonundaki değişiklikler, bozulmuş glukoz taşınmasıyla sonuçlanır [Şekil 7] [15].



Şekil 7. GLUT4 taşıyıcısının Alzheimer hastalığına sahip bireyin beyinde etkisi

2.3.1.5. GLUT8-9

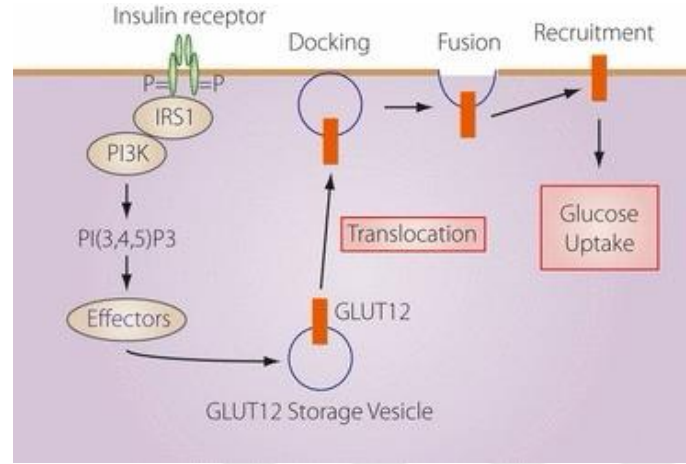
GLUT 8 *SLC2A8* geni tarafından kodlanmaktadır. GLUT8 sadece hücre içi bir bölgede ifade edilir. GLUT9 540 aminoasit uzunluğundadır ve *SLC2A9* geni tarafından kodlanmaktadır. Hem farelerde hem de insanlarda GLUT9b sadece böbrekte ve karaciğerde eksprese edilirken GLUT9a sadece karaciğerde bulunur [16].

2.3.1.6. GLUT12

GLUT12 proteini insüline duyarlı dokularda eksprese edilir. Fonksiyonel analiz GLUT12'nin şekerleri konsantrasyon gradyanına doğru taşıdığını ancak aynı zamanda bir protein olarak da çalışabileceğini göstermiştir [17]. Son zamanlarda yapılan bir araştırmaya göre beta-aktin promoteri altında GLUT12'yi aşırı eksprese eden transgenik bir fare modelinde artan GLUT12 ekspresyonunun, insüline duyarlı dokularda artan glikoz temizleme oranı yoluyla tüm vücut insülin duyarlılığını arttırdığını gösterilmiştir. GLUT12, diğer heksozlara göre tercihen D-glikoz ve 2-deoksi-D-glikozu taşıyan sınıf III glukoz taşıyıcılarının bir üyesidir.

En son keşfedilen glukoz taşıyıcılarından birisi olan GLUT12 şeker taşınması için gerekli yapısal özelliklere sahip olan 617 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. GLUT12

iskelet kasında, yağ dokusunda ve ince bağırsakta yoğun ekspresyon gösterirken beyinde düşük mRNA seviyeleriyle tespit edilmiştir (Şekil 8) [17].



Şekil 8. GLUT12 translokasyonu ve glukoz taşınımını düzenleyen sinyal yolu

2.3.1.6.1 GLUT12 ve Alzheimer Hastalığı Arasındaki Bağlantı

Alzheimer hastalığının beyinde amiloid beta ve fosforile tau birikimi ile ilişkili anormal glikoz metabolizmasının sistematik olarak değerlendirilmesi sonucunda, insülin sinyalleme ile Alzheimer hastalığı arasındaki bağlantının IRS/PI3K/Akt/AMPK sinyallemesinin ve GLUT'ların hastalığın ilerlemesine dahil olduğu varsayılmıştır. Arızalı glikoz metabolizmasının mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu gösterilmiştir [18]. GLUT1 ve GLUT3'ün ekspresyonunun Alzheimerlı beyinde azaldığı ve tau proteininin hiperfosforilasyonu ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yine yapılan aynı çalışmada GLUT'ların kaybını telafi etmek için Alzheimer hastalığında GLUT12'nin yukarı doğru düzenlenebildiği gösterilmektedir. Bu da GLUT12'nin Alzheimer hastalığının tedavisi için bir biyobelirteç veya potansiyel bir hedef olma özelliği taşıdığına işaret etmektedir.

GLUT12 ekspresyonundaki artış Alzheimer hastalığı olan beyinlerde gelişen insülin direncinin bozulmuş insülin tepkisi özelliğini dengelemek için bir mekanizmadır. Daha önce yapılan çalışmalarda obez farelerde insüline GLUT12 yanıtının kaybolmasından yola çıkılarak, GLUT12'nin ince bağırsakta ve yağ dokusunda insülin direnciyle ilişkili olarak aşağı regüle edildiği bulunmuştur. Ayrıca, GLUT12'nin Alzheimer hastalığı fare modellerinin ön korteksinde de yukarı doğru düzenlendiği görülmüştür. Bu, beyindeki ana GLUT'ların azalmasını dengelemek için GLUT12'nin telafi edici bir mekanizmasına

işaret etmektedir. Yaşlanma ince bağırsakta yağ dokusunda ve böbrekte GLUT12 ekspresyonunu artırır. Kanseri ve yaşlanma ortak bir kökene sahiptir. Hücre hasarına zamana bağlı birikimi ile GLUT12, insan kolon adenokarsinomunda hepatoselüler karsinomda ve tümör baskılayıcı p53'ün azaldığı rahim tümörlerinde yukarı doğru düzenlenmektedir. Sonuç olarak GLUT12, hücre içi olarak eksprese edilir. Glikoz ve insülin gibi uyarılar, GLUT12'nin membrana translokasyonunu tetikler. Bu GLUT12'nin postprandiyal dönemlerde glikoz kemoostazisine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. GLUT12 yaşlanma, Alzheimer hastalığı ve kanserde yukarı doğru düzenlenirken, obezitede aşağı doğru düzenlenmektedir. Bunlar GLUT12'nin terapötik bir hedef olarak araştırılmaya aday olabilecek bir yedek glikoz taşıyıcısı olarak hareket ettiğini göstermektedir [19].

2.4. Ketojenik Diyet

Ketojenik diyet 1920'lerin başından bu yana epilepsi hastalarının tedavisinde kullanılmıştır. Diyet, yağ açısından yüksek, karbonhidrat ve protein açısından düşük olup büyüme için yeterli protein sağlamaktadır; ancak vücudun tüm metabolik ihtiyaçları için yetersiz miktarda karbonhidrat içermektedir. Enerji büyük ölçüde mitokondrideki yağ asidi oksidasyonundan elde edilir. Yüksek oranlarda yağ asidi oksidasyonu sırasında, büyük miktarda asetil-CoA üretilir ve bu da öncelikle karaciğerde üç keton gövdesi olan beta hidroksibutirat, asetoasetat ve asetonun sentezine yol açar. Keton cisimleri dolaşıma karışarak serum seviyelerinin birkaç kat artmasına neden olur ve daha sonra beyin de dahil olmak üzere karaciğer dışı dokularda enerji kaynağı olarak kullanılır.

Glikoz, normalde insan beyni için tek yakıttır. Yağ asitleri kan-beyin bariyerini geçemedikleri için kullanılmazlar. Keton cisimleri beyne ketozis derecesi ile orantılı olarak girer. Normalde ketonların beyin tarafından kullanımı minimum düzeydedir. Ancak ketojenik diyet sırasında keton cisimleri beyin için yakıt olarak kısmen glikozun yerini alır. Ketojenik diyetin mekanizmalarına ilişkin birçok farmakolojik etkiler tanımlanmıştır [20]. Ketojenik diyet tedavisinin ayırt edici özellikleri karaciğerde yağ asidi oksidasyonunun ürünleri olan keton cisimlerinin üretilmesi ve kan şekeri seviyelerinin azalmasıdır. Keton cisimleri enerji kullanımı için glikoza alternatif bir substrat sağlar ve gelişmekte olan beyinde hücre zarlarının ve lipidlerin biyosentezi için gerekli yapı taşlarını da oluşturur. Ketojenik diyet tedavisi sırasında glikoz seviyelerinin belirlenmesi ve bu nedenle düşük glisemik indeksli gıdalara temel bağlılığa dayanmaktadır. Glisemik indeks,

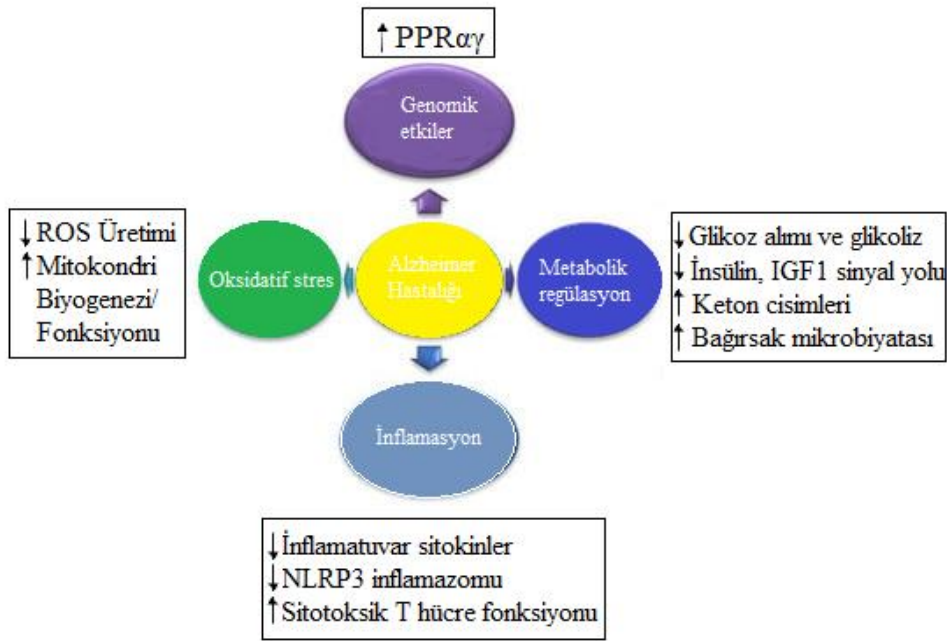
bir karbonhidratın ne kadar emildiğini ve kan şekerinin ne kadar yükselttiğini tanımlayan bir değerdir ve daha düşük indeksler, glikoza kıyasla daha yavaş insülin tepkileriyle ilişkilidir. Ketojenik diyetin nöronal uyarılabilirliği azaltması araştırmacılar tarafından beklenilmektedir. Ketojenik diyetin mekanik temellerine ilişkin en belirgin ve potansiyel olarak önemli klinik gözlem, hastalarda görülen belirgin ketonemidir. Ketoneminin derecesi ile nöbet kontrolü arasında ilişki vardır. Serum keton seviyeleri istikrarlı bir şekilde arttıkça ketojenik diyet başladıktan sonraki birkaç hafta içinde nöbet kontrolünün giderek arttığı bilinmektedir. Ketozis bozulduğunda genellikle karbonhidratların tüketilmesiyle epilepsi nöbet kontrolü aniden kaybolmaktadır [21].

2.4.1. Ketojenik Diyet ve Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişki

Ketozisin aktivasyonu ile gerçekleşen bir diyet modeli olan ketojenik diyet yağ miktarı yüksek ve karbonhidrat miktarı düşük seviyede bulunur. Karaciğerde keton cisimciklerinin oluşmasını sağlayan bu diyet türünde vücuda gerekli karbonhidratın alınmaması sonucunda glikojen deposu tükenir, dolayısıyla yağlar karaciğerde β -oksidasyon ile keton cisimciklerini oluştururlar. Asetoasetat, aseton ve β -hidroksibütirat bu ketozlardır. Beyin bu keton cisimciklerini glikoz yokluğunda enerji kaynağı olarak kullanır. Dolayısıyla bu yapılar hücre membranlarında, lipid biyosentezinde ve özellikle beyin gelişimde rol alırlar.

Ketojenik diyet doğrudan glikoz metabolizmasını etkilemektedir, dolayısıyla Alzheimer hastalığında da profilaktik veya terapötik bir etkisinin olduğu düşünülmektedir [22]. Çünkü, Alzheimer hastalığında meydana gelen bilişsel bozukluklar beyinde bulunan glikoz metabolizmasıyla bağlantılanmıştır. Yapılan araştırmalara göre Alzheimer hastalığına sahip bireylerin serebral glikoz kullanımında azalma gözlenirken insülin seviyelerinde değişiklikler tespit edilmiştir [15]. Araştırmalar ketonların glikoza kıyasla daha verimli bir enerji kaynağı sağladığını ortaya çıkarmaktadır. Glikozdan daha hızlı metabolize edilirler ve doğrudan Krebs döngüsüne girerek glikolitik yolu atlayabilirler, oysa glikozun glikolize uğraması gerekmektedir. Apoptoz ve nekroz nedeniyle nöron kaybına karşı korumaya katkıda bulunan ketozis daha yüksek serum yağ seviyeleri ve daha düşük glikoz seviyeleri içerir. Ketojenik diyetin mitokondriyal ve enerji metabolizması enzimlerin kodlayan hipokampal genleri yukarı regüle ettiği araştırmacılar tarafından bulunmuştur. Terapötik ketoz alternatif enerji substratları sağlayarak bir metabolik potansiyel tedavi şekli olarak görülmektedir. Bu metabolik değişiklikler

sayesinde beyin metabolizması iyileşir ve mitokondrideki ATP üretimi yeniden sağlanır. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin üretiminde azalma, antioksidan etkiler, daha düşük inflamatuvar yanıt ve nörotrofik faktörlerin aktivitesinde artış gözlemlenmektedir. Diğer bir etki, artan Krebs döngüsü ara ürünleri seviyeleri, artan GABA-glutamat oranı ve ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının aktivasyonu yoluyla nöronların arasındaki sinaptik aktivitenin stabilizasyonunu içermektedir. Ketojenik diyetin Alzheimer hastalığının gelişimi üzerindeki yararlı etkisi altında yatan olası mekanizmalar Şekil 9'da verilmiştir [23].



Şekil 9. Ketojenik diyetin Alzheimer hastalığı gelişimini etkilediği varsayılan mekanizmalar

Aynı zamanda Alzheimer hastalığında net bir şekilde gözlenen amiloid beta birikimi vücuda alınan karbonhidrat ve şeker alımıyla doğrudan ilişkili bulunmuştur. Bunun yanı sıra yüksek miktarda karbonhidrat ve şeker alımı mitokondriyal disfonksiyona sebep olmaktadır. Dolayısıyla beyin için verimsiz olarak görülen glükozun yerine keton kullanımı, Alzheimer hastaları için iyileştirici olarak görülmektedir. Literatüre göre glükoz ile keton cisimcikleri karşılaştırıldığı zaman keton cisimciklerinden elde edilen ATP üretimi daha fazla gözlenmiştir. Mitokondrinin detoksifikasyon etkisini arttıran ketonlar NADH oksidasyonunu arttırmaktadır. Yapılan araştırmalara göre ketojenik diyet amiloid beta seviyesinin düşmesine ve hücre içi agregasyonunun azalmasına sebep olmaktadır.

Beyinde amiloid beta seviyelerinin düşmesi mitokondriyal fonksiyonu geliştirmektedir, çünkü amiloid beta seviyesinin düşmesi toksisiteyi azaltmaktadır. Dolayısıyla bu durum hafızayı ve öğrenmeyi geliştirmektedir [22]. Yapılan araştırmalar Alzheimer hastalığına sahip bireylerde glikoz hipometabolizmasının defalarca değişmesine rağmen keton cisimlerinin metabolizmasının hastalığın erke evrelerinde değişmediğini göstermektedir. Beynin enerji krizi durumunda keton cisimleri beyin metabolizması için yardımcı ve alternatif yakıt olarak kullanılmaktadır. Alzheimer hastalığına sahip beyindeki yakıt hipometabolizması glikoza özgü görüldüğünden, keton cisimciklerinin uygulanmasının glikoz alımı ve metabolizmasındaki azalmanın üstesinden gelebileceği ve beyindeki enerji açığını iyileştirebileceği düşünülmektedir. Hem kalori kısıtlaması hem de ketojenik diyet tüketiminin, karbonhidrat alımını azalttığı ve keton cisimlerinde telafi edici bir artışa yol açtığı gözlenmiştir. Bunun mitokondriyal fonksiyonu iyileştirdiği, apoptotik ve inflamatuvar araçların ekspresyonunu azalttığı ve nörotrofik faktörlerin aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Diyetteki karbonhidrat azaltımının nöroprotektif etkileri olduğu görülmektedir ve keton cisimciklerinin nöronları birçok tipte nöronal hasara karşı koruduğu ve kalori kısıtlaması veya ketojenik diyeti takip edenlerin benzer mitokondriyal etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Keton cisimciklerinin nöronları koruma yeteneği mitokondriyal enerji üretimindeki kusurların Alzheimer hastalığının patofizyolojisine katkıda bulunduğu ve keton cisimciklerinin terapötik potansiyele sahip olduğu araştırmacılar tarafından düşünülmektedir [24].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

- Stereotaksi intraseroventriküler enjeksiyon yapılacak sıçanların kafalarını sabitlemek ve koordinatları belirlemek amacıyla kullanıldı.
- Ethovision XT video görüntüleme sistemi kullanılarak Morris su labirenti ile öğrenme ve bellek parametreleri ölçüldü.
- Homojenizatör cihazı ile dokular homojenize edildi.
- Multiscan Go ELISA reader ile protein konsantrasyonu ölçüldü.
- Tıbbi biyoloji laboratuvarında bulunan pH metre (Hanna, ABD), mini santrifüj (İsolab,Almanya), çalkalayıcı (BioRocker 2d, ABD), soğutmalı inkübatör cihazı, hassas terazi (Precisa XB) deneylerde örneklerin hazırlanmasında kullanıldı.
- Western Blot işlemlerinde Bio-Rad, dikey elektroforez cihazı ve Bio-Rad Trans-Blot Turbo, transfer sistemi kullanıldı.
- Western blot membranların görüntülemesi ise Fusion Fx7 tarafından gerçekleştirildi.
- Histoloji laboratuvarında bulunan Leica Rm2245, Almanya kryostat cihazı ile dokulardan kesit alındı.
- Kesiti alınan dokular nissl boyaması sonrasında Nikon (Eclipse 920248, ABD) ışık mikroskopunda incelendi
- İmmünflorans boyamanın sonucu ve fotoğraflaması ise Leica (Sp8, Almanya) konfokal mikroskop kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.2. Sarf Malzemeler

- Doku Homojenizasyonu – RIPA lizis tamponu (Santa Cruz)
- Jel elektroforezinde protein denatürasyonu – Bio-Rad Laemmli Sample Buffer
- Sample Buffer hazırlanması- Sigma Aldrich 2-Mercaptoethanol
- Western Blot Transfer – IsoLab metanol
- TBST Buffer hazırlanması – Sigma Aldrich Sodium chloride, Tris Base, TWEEN 20
- Nissl boyama- Cresyl violet (Sigma Aldrich)
- Immunflorans boyama -DAPI

- Etil Alkol – TK200655
- Ksilen- TK090270
- Süt Tozu-(Santa cruz , sc-2325)
- Transfer Buffer- Bio-Rad
- Entellan- Sigma aldrich 107961
- GAPDH, İnsülin Reseptör, pAKT, ve PI3K antikorları

3.2. Yöntem

3.2.1 Hayvan Çalışmaları

Bezmialem Vakıf Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurul kararınca 23.11.2022 tarihinde “Alzheimer Hastalığında GLUT12 ekspresyonunun değişimi ve ketojenik diyetle ilişkisi” başlıklı projemiz 29.11.2022-E.86449 tarih ve sayı ile etik kurul onayı almıştır.

Bu çalışmada, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı’ndan temin edilen 3-4 aylık *Sprague Dawley* erkek sıçanlar (300-350 g) kullanıldı. Deneyler süresince hayvanlar standart olarak 12 saat aydınlık-12 saat karanlık sirkadiyen döngü içerisinde yem ve su alımları *ad libitum* olacak şekilde, sıcaklığı sabit tutulan ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) hayvan saklama odasında, her kafeste 4-5 sıçan olacak şekilde barındırıldı. Tüm deneyler günün aydınlık periyodunda (06.00-18.00), sıcaklığı sabit ve gürültüsüz bir ortamda yapıldı.

Randomize şekilde sıçanlar;

- 1.Grup: 2 ay ketojenik diyet sonrası intraserebroventriküler (i.c.v) streptozotosin (STZ) uygulanacak ve ketojenik diyet almaya devam eden Profilaktik grup (P)
- 2.Grup: icv-STZ uygulanacak ve sonrasında ketojenik diyet alacak Terapötik grup (T)
- 3.Grup: icv-STZ uygulanacak hastalık grubu (STZ)
- 4.Grup: icv-STZ uygulanmayıp yapay BOS verilecek sham kontrol grubu (Sham) olmak üzere 4 deney grubuna ayrıldı.

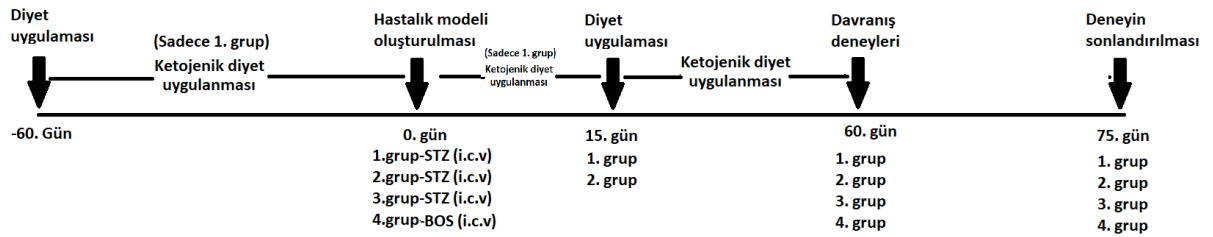
Profilaktik grup deney süresince (4 ay) ketojenik diyet ile beslenirken terapötik grup deneysel Alzheimer modeli oluştuktan sonra 2 ay ketojenik diyet ile beslendi.

Ketojenik diyet Arden firması tarafından hazırlandı ve hayvanlara günlük olarak verildi. Deney başladıktan 2 ay sonra sham kontrol grubu dışındaki diğer gruplara icv-STZ

enjeksiyonu yapıldı ve 2-3 hafta bekledikten sonra hayvanlar Alzheimer olarak kabul edildi.

3.2.1.1. STZ ile Alzheimer Hastalığı Modelinin Oluşturulması

Anestezi altındaki sıçanların her iki lateral ventrikülüne (bregmadan 0.8 mm posterior ve 1.5 mm lateral ve 3.5 mm derinlik) koordinatları ayarlanarak stereotaksik cerrahi ile 3mg/kg STZ 10µl'lik hacimde Hamilton enjektörü aracılığıyla bir gün ara ile 2 defa uygulandı (Şekil 10).



Şekil 10. Deney şeması

3.2.2. Davranış Deneyleri

3.2.2.1. Morris Su Labirenti

Uzun süreli hafızayı ölçmeye yarayan Morris su labirenti testi hipokampüse bağlı bellek ve öğrenme ölçümü için kullanılır. Kısaca, 150 x 150 x 60 cm genişlik ve derinliğindeki havuz 21⁰C (±1) sıcaklığındaki 45 cm yüksekliğinde su ile dolduruldu ve suya toksik olmayan boya katılarak opak hale getirildi. Morris su tankında sıçanlara gizlenmiş platformla 60 saniye süre verilerek öğrenme düzeyleri ve kaldırılmış platformla bellek düzeyleri belirlendi. Sıçanların havuzdaki hareketleri bilgisayarlı kamera sistemiyle (EthoVisionvideo Tracking System, Holland) otomatik olarak takip edildi. Havuz bilgisayar ekranında merkezden geçen iki doğru ile 4 eşit parçaya (kadranlara) ayrıldı. 11x11 cm büyüklüğündeki hayvanlar tarafından görülmeyen ve taşınabilen kaçış platformu bu bölgelerin birinin ortasına, suyun 2 cm altında kalacak şekilde yerleştirildi. Sıçanlara peş peşe 5 gün boyunca, günde 4 defa deneme yaptırıldı. Bilgisayar-kamera sistemiyle sıçanların havuzda, bırakıldığı noktadan platforma ulaşmaya kadar yüzülen mesafe ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak öğrenme kapasitelerindeki değişimler belirlendi. Öğrenilen yerin hafızadaki izlerinin ne kadar güçlü olduğunu test etmek için ana eğitimi bitirdikten bir gün sonra kaldırılmış platform ile yer tercihi testi yapıldı. Bu

denemede sıçanın daha önce platformun bulunduğu kadranda ne kadar yüzdüğü kaydedildi.

3.2.3. Western Blot Tekniği

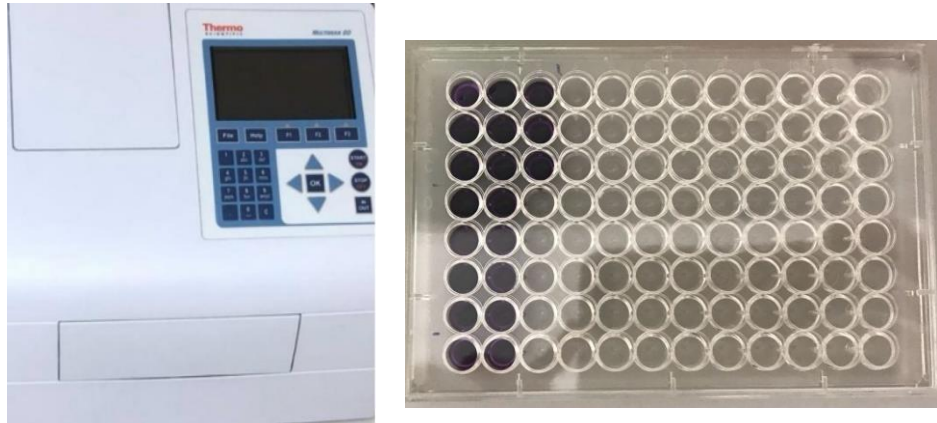
3.2.3.1. Homojenizasyon (Doku Hazırlanması)

Prefrontal korteks ve hipokampus dokuları 0.1M fosfat bufferı (PBS), proteaz inhibitör kokteyli (PIC) ve 3-4 çelik bilye (Retsch MN400) içeren tüpe eklenip homojenizatör cihazında 1 dk boyunca homojenize edildi. Homojenize edilen dokular buzun üzerine alındılar ardından 5000 x g'de 5 dk 4°C'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısım alınarak deneyler yapılncaya kadar uygun koşullarda -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.3.2. Protein Konsantrasyon Ölçümü

Protein konsantrasyonu ölçümü için bikinkoninik asit (BCA) kiti kullanıldı. Bu kit uygun ortamı sağlayarak protein tarafından Cu^{2+} 'nın Cu^{+} 'ya indirgenmesi ile oluşan kimyasal bir deney zinciri sayesinde protein konsantrasyonunu belirlemektedir.

İlk olarak etüv 37°C'ye ayarladı. 96 kuyucuklu plate kullanılarak ilk kuyu hariç (Blank kuyusu) bütün kuyulara standartlar ve örnekler koyuldu. 9 adet kuyuya standart protein örnekleri uygun olarak seyreltildikten (1000 µg – 25 µg) sonra eklendi. Örneklerin eklendiği kuyulara ise 9 µL homojenizasyon (lisis) tamponu ve 1µL örnek eklendi. Ardından her kuyuya 200µL BCA çalışma solüsyonu eklendi. Hazırlanan plate 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından Multiscan Go cihazına yerleştirilerek 562 nm'de ölçümler yapıldı (Şekil 11). Elde edilen konsantrasyon sonuçları western blot örnek hazırlamada kullanıldı.



Şekil 11. Multiscan go ölçüm cihazı ve BCA Assay sonucunda elde edilen proteinlerin ölçüm sonuçları

3.2.3.3. Örnek Hazırlama

Protein konsantrasyonları belirlendikten sonra her bir jel kuyusuna 40 µg/µl protein eklenecek şekilde hesaplamalar yapıldı. Hesaplanan miktardaki protein örnekleri laemli buffer solüsyonu ve β-merkaptoethanol ile karıştırıldı. Örnekler daha sonra 95°C’de 5 dakika kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlandı. Daha sonra protein örnekleri Western blot çalışmaları yapılncaya kadar -20°C’ye kaldırıldı.

3.2.3.4. SDS-PAGE

SDS-PAGE işleminde %4-20 Mini Protean Biorad jel kullanıldı. Distile sudan geçirilen jeller dikey elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın ortasına Tris içeren yürütme tamponu eklendi. Taraklar dikkatlice çıkartıldı. Moleküler ağırlıkları bilinen protein belirteci (See Blue Plus2 protein ladder, İnvitrogen) 5µl olacak şekilde ilk kuyuya yüklendi. Sonraki kuyulara da 10’ar µl olmak üzere örnekler yüklendi. Örnekler jelde 120 V gerilimde 1 saat yürütüldü (Şekil 12).



Şekil 12. Örneklerin jel elektroforezinde yürütülmesi

3.2.3.5. Proteinlerin Membrana Aktarılması

Önce distile suda ardından transfer tamponunda bekletilen PVDF membranlar 3 dk metanolde bekletilerek aktive edildiler. Daha sonra membran, jel ve filtre kağıtları transfer cihazına yerleştirildi. Transfer 25V gerilim ve 2.5A akımda 7 dk’da Biorad transfer

cihazında gerçekleştirildi. Transfer bitince membranlar 5 dk boyunca 0.1M TBST’de yıkandı.

3.2.3.6. Membranlara Antikor Muamelesi

Membrana transfer edilen örnekler ilk olarak bloklama için %5’lik süt tozunda (2.5 g süt tozu ve 50 ml Tween 20 içeren Tris bufferi (TBS-T)) oda sıcaklığında 1 saat ileri-geri çalkalayıcıda inkübe edildi. Böylelikle membrana aktarılan proteinlerin dışındaki boşlukların kapatılması ve bu sayede yine protein yapısında olan antikorların membranın boş kısımlarına bağlanması en aza indirgenerek spesifik olmayan bağlanmanın azalması ve hedef proteinlere bağlanma oranının da en üst seviyeye çıkarılması sağlanır. Bloklama işleminden sonra elde edilen membranlara Tablo 4’te görüldüğü üzere %5’lik süt tozu içerisinde hazırlanmış pAKT için 1:1000; (Cell signaling), insülin reseptörü için 1:500 (ABclonal), GLUT12 için 1:2000 (ABclonal), PI3K için 1:3000 (Cell signaling) primer antikorları eklendi ve membranlar 4⁰C’de gece boyunca inkübe edildi.

Tablo 4. Antikor muamelesinde kullanılan primer ve sekonder antikor örnekleri, dilüsyon miktarları ve elde edildikleri organizma

GLUT12 (1:2000)	Rabbit Antibody
pAKT (1:1000)	Rabbit Antibody
İnsülin Reseptör (1:500)	Rabbit Antibody
pI3K (8:3000)	Rabbit Antibody
HRP (1:5000)	Anti-Rabbit Antibody

Ertesi gün membranlar 3’er kez 5’er dk TBS-T ile yatay çalkalayıcıda yıkandı. Daha sonra membranlar 1:5000 oranında %5’lik süt tozu içerisinde hazırlanmış anti-rabbit ve anti-mouse HRP bağlı sekonder antikor ile ileri-geri çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi (Şekil 13).



Şekil 13. Örneklerin aktarıldığı membranlara primer ve sekonder antikor işleminin gerçekleştirilmesi

Sekonder antikorda bekletilen membranlar tekrar 0.1 M TBS-T ile yıkandı. Membranların üzerine 1ml elabscience excellent chemiluminescent substrate A ve 1 ml excellent chemiluminescent substrate B'den karıştırılarak eklendi. Belli bir süre inkübe edilen membranlar Fusion FX7 (Vilber Lourmat) görüntüleme cihazı ile görüntülendi (Şekil 14).

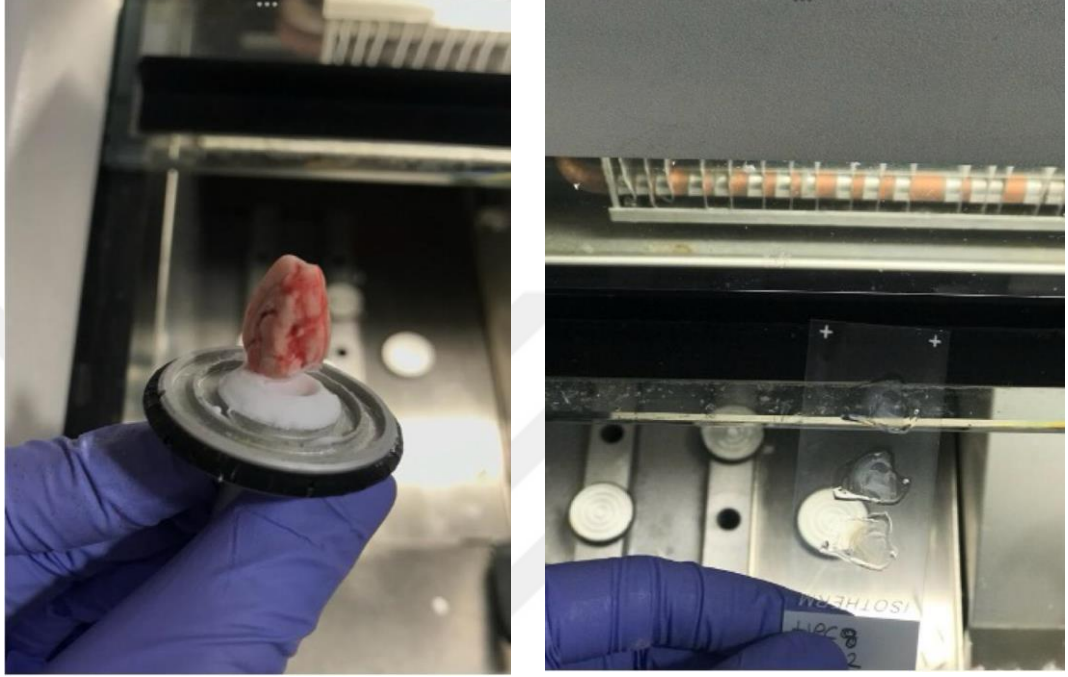


Şekil 14. Fusion FX7 Görüntüleme

3.2.4. İmmunohistokimya Çalışmaları

3.2.4.1 Kesit Alma

-80°C'ye kaldırılan yarım beyin dokularından kryostat cihazı ile 20 µm kalınlığında pozitif yüklü lamaların üzerine hipokampal bölgeyi ve prefrontal korteksi içeren kesitler alındı (Şekil 15).



Şekil 15. Sıçanlardan çıkarılan yarım beyin ve bu beyinlerden elde edilen hipokampus kesit örneği

3.2.4.2 Cresyl (Nissl) Boyama ve Görüntüleme

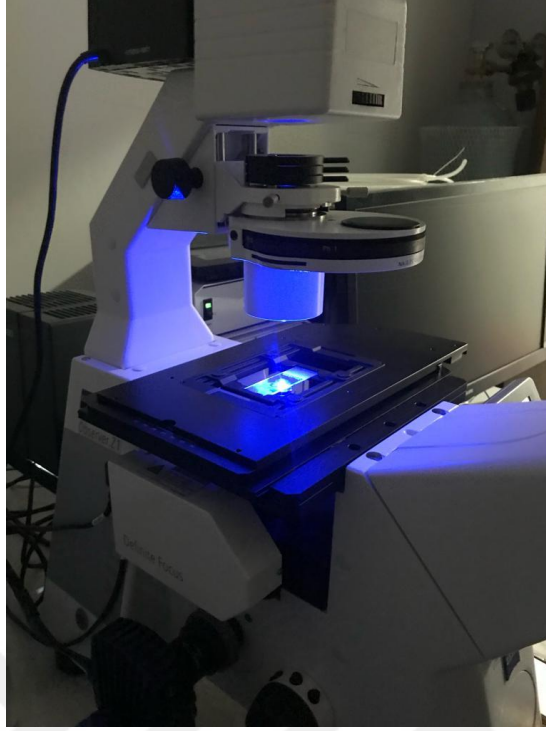
Kesitler 37°C'de 30 dk kurutuldu. Ardından şalelere yerleştirilen kesitler 4°C'de soğutulmuş %4'lük paraformaldehid (PFA) solüsyonunda 5 dk bekletilerek fiksle edildi. Fiksle edilen dokular 5 dk distile su kullanılarak yıkandı. Yeni bir şalede 2 dk sabit yerde ve 13 dk çalkalayıcıda daha önceden hazırlanmış cresyl violet boyası içerisinde inkübe edildi. Daha sonra kesitler 15 sn 3'er kez distile su ile yıkandı. Her bir kesit sırasıyla %70-%90-%95-%100-%100'lük ethanole 5'er kere batırıp çıkarılarak dehidrate edildi. Ardından yeni bir şalede ksilen solüsyonunda 2-3 dk bekletilerek yağdan arındırma işlemine tabi tutuldu. Son olarak kesitler entellan ile kapatıldı (Şekil 16). Daha sonra kesitlerden farklı hipokampal bölgelerden (CA1 ve DG) ve prefrontal korteksten 3'er tane ışık mikroskobu altında görüntü alındı ve Image J ile boyanan nöron hücreleri sayıldı.



Şekil 16. Cresyl Violet işlemi ile boyanmış hipokampus kesitleri

3.2.4.3 GLUT12 İmmunofloresan Boyama ve Görüntüleme

Kesitler 37⁰C’de 30 dk kurutuldu. Ardından kesitlerin etrafı yağlı kalemle çizildi. Kesitler şalelere dizildi ve %4’lük önceden soğutulmuş PFA’da oda ısısında 20 dk inkübe edildi. Daha sonra kesitler 3 kez 5 dk 0.1 M PBS ile çalkalayıcıda yıkandı. Ardından kaynatılmış sitrat tamponunda antijenik kısımların açığa çıkarılması için antijen retrieval yapıldı. Antijen retrievalda tamponun ve yüksek ısının yardımı ile antijenin proteinlerle olan çapraz bağı kırıldı ve antikorun bağlanma olasılığı arttırıldı. 15 dk sitrat tamponda bekletilen kesitler 3 kez 5’er dk 0.1 M PBS tamponu ile yıkandı. Daha sonra %10 normal keçi serumu (NGS) damlatılarak bloklama işlemi için 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilen kesitler %2 NGS ve %0.3 PBS-T tamponu içerisinde 1:100 oranında hazırlanmış primer GLUT12 antikoruna tabi tutuldu. Primer antikor eklenen kesitler gece boyunca 4⁰C’de inkübe edildi. Ertesi gün şalelere alınan kesitler 3 kez 5’er dk 0.1 M PBS ile yıkandı. Ardından kesitlerin üzerine sekonder antikorlama işlemi için floresan işaretli %2 NGS ve %0.3 PBST tamponu içerisinde 1:500 oranında hazırlanmış Anti-rabbit Ig Goat 555 antikorunu kesitlerin üzerine eklendi ve 1 saat boyunca ışıktan koruyarak oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler 4 kez 5’er dk 0.1 M PBS ile yıkanarak üzerlerine çekirdek boyası olan DAPI damlatıldı, sonrasında lamel ve su bazlı kapatıcı ile kesitler kapatıldı. Ertesi gün kesitler ışıktan korunarak konfokal mikroskopunda her bölgeden (hipokampus ve prefrontal korteks) 3’er tane fotoğraf çekildi ve çekilen fotoğraflarda GLUT12 pozitif hücreler sayıldı (Şekil 17).

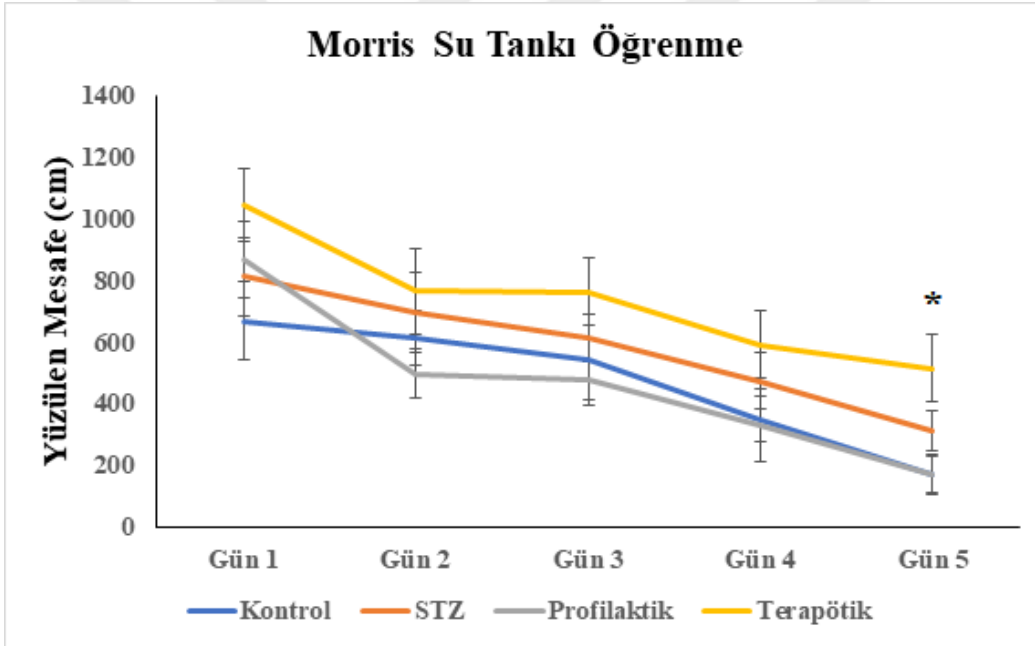


Şekil 17. Immünflorans boyaması gerçekleştirilen GLUT12 hücrelerinin görüntülenmesi için kullanılan konfokal mikroskop

4. SONUÇLAR

4.1. Davranış Deneyleri

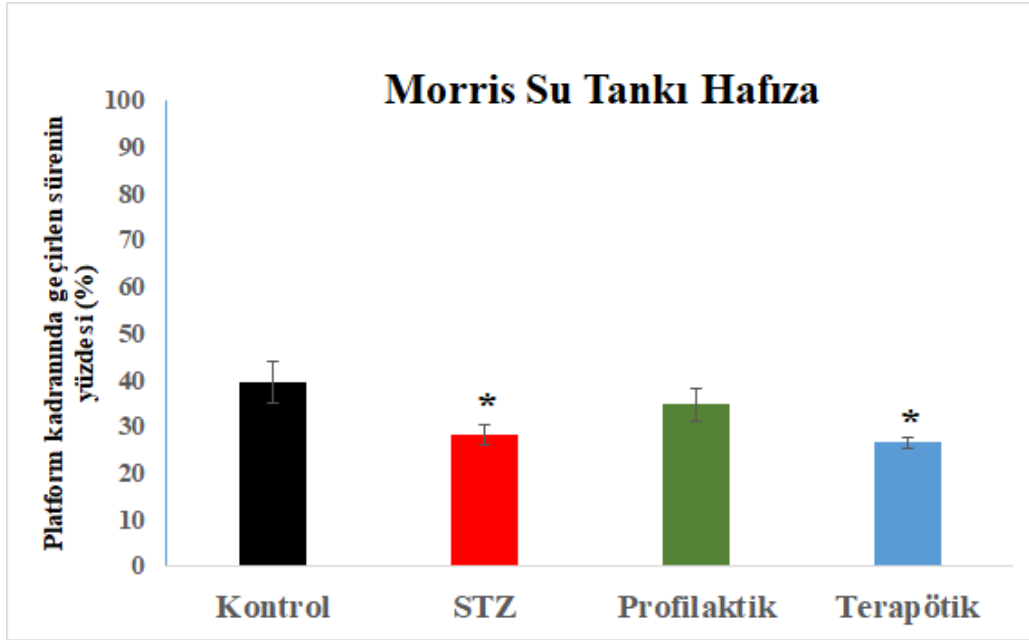
Morris su labirenti testi deney hayvanlarındaki bellek performansını ölçmek amacıyla gerçekleştirilen hipokampusu incelemeyi hedef alan bir deneydir. Şekil 18’de görüldüğü üzere ve tekrarlı ölçüm varyans analizi (rANOVA) sonucuna göre günler arasında anlamlı bir fark bulundu ($F_{(4,80)}=16.435$, $p<0.001$). Bunun yanı sıra gruplar arasında da anlamlı bir farklılık tespit edildi ($F_{(3,20)}=6.221$, $p=0.004$). Tek yönlü ANOVA analizi ile her güne bakıldığında özellikle 5. gün gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi ($F_{(3,20)}=4.057$, $p=0.021$). Post hoc LSD testine göre, terapötik grubundaki öğrenme performansı hem kontrole göre hem de profilaktik gruba göre anlamlı derecede düşük idi ($p=0.010$ ve $p=0.006$, sırasıyla) (Şekil 18).



Şekil 18. Sıçanların Morris su tankında 5 gün boyunca platforma ulaşmaya kadar yüzdükleri mesafe. * $p<0.05$

Öğrenme deneyleri sonrası yapılan platformsuz hafıza ölçümleri deneylerinde platform çeyreğinde geçirilen sürenin toplam geçirilen süreye oranları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($F_{(3,21)}=3.794$, $p=0.029$). Post hoc LSD ile ikili grup karşılaştırmalarında, STZ ile oluşturulan Alzheimer hastalığı grubu ve Terapötik diyet grubunun kontrol grubuna göre platformun bulunduğu alanda daha az vakit geçirdiği tespit edildi ($p=0.022$ ve $p=0.007$, sırasıyla) (Şekil 19). Profilaktik diyet grubunun da terapötik

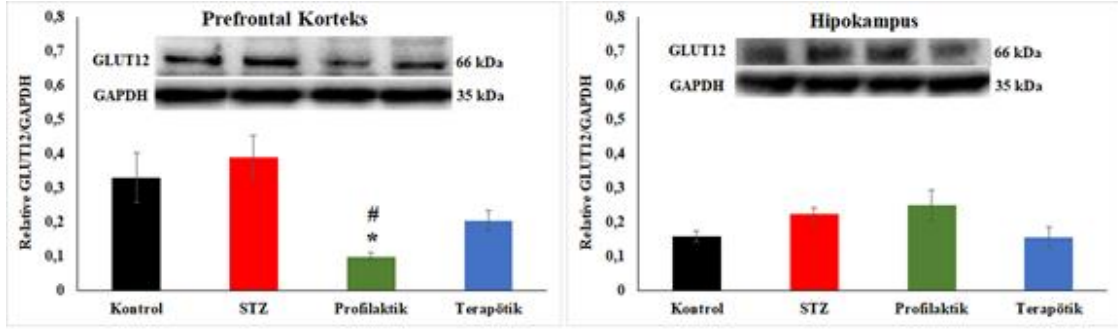
diyet grubuna göre platformun olduğu çeyrekte daha fazla vakit geçirdiği gözlemlendi ($p=0.61$).



Şekil 19. Morris su labirenti deneyinde platformun olduğu çeyrekte geçirdikleri süreye bağlı bellek değerlendirmesi * $p<0.05$.

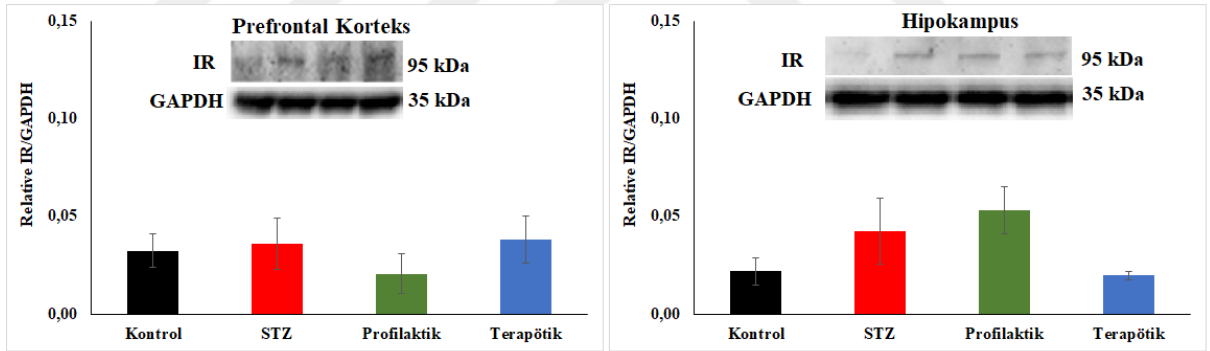
4.2. Western Blot Sonuçları

Alzheimer hastalığı ile ilişkisi olduğu düşünülen GLUT12 proteininin ekspresyonu hipokampüste ve prefrontal kortekste değerlendirildi. Prefrontal kortekste GLUT12 ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlenirken ($F_{(3,11)}=4.135$, $p=0.048$), hipokampüste gruplar arasında fark tespit edilemedi ($F_{(3,11)}=2.148$, $p=0.172$). Hem hipokampus hem de prefrontal kortekste STZ enjeksiyonu verilen grupta GLUT12 ekspresyonunda değişim gözlenmedi. Profilaktik gruptaki sıçanların prefrontal kortekslerinde GLUT12 ekspresyonu hem kontrole göre hem de STZ grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldı ($p=0.013$ ve $p=0.023$, sırasıyla) (Şekil 20). Hipokampüste profilaktik grupta GLUT12 ekspresyonunun istenilen anlamlılık değerine ulaşmasa da kontrole ve terapötik gruba göre arttığı gözlemlendi ($p=0.063$ ve $p=0.056$, sırasıyla).



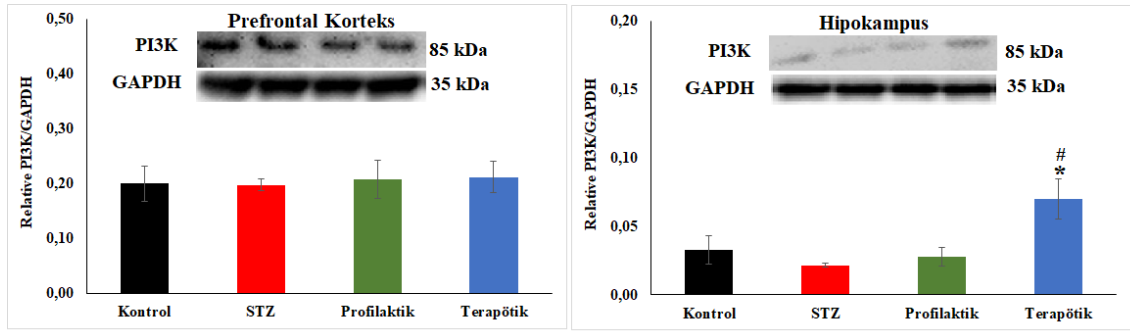
Şekil 20. GLUT12 proteinin prefrontal kortekste ve hipokampüsteki ekspresyonel değişimi. * $p<0.05$ kontrole göre, # $p<0.05$ STZ grubuna göre.

Çalışmada ayrıca GLUT12 ile ilişkili olan proteinlerden IR'nin ekspresyonunun Alzheimer hastalığı ve ketojenik diyet ile nasıl değiştiğine bakıldı. IR'nin ekspresyonel değişimi GLUT12 ile paralellik gösterse de hem prefrontal kortekste hem de hipokampüste anlamlı bir değişim göstermedi (Şekil 21). Hipokampüste profilaktik grupta IR ekspresyonu istenilen anlamlılık değerine ulaşmasa da kontrole ve terapötik gruba göre arttığı gözlemlendi ($p=0.080$ ve $p=0.064$, sırasıyla).



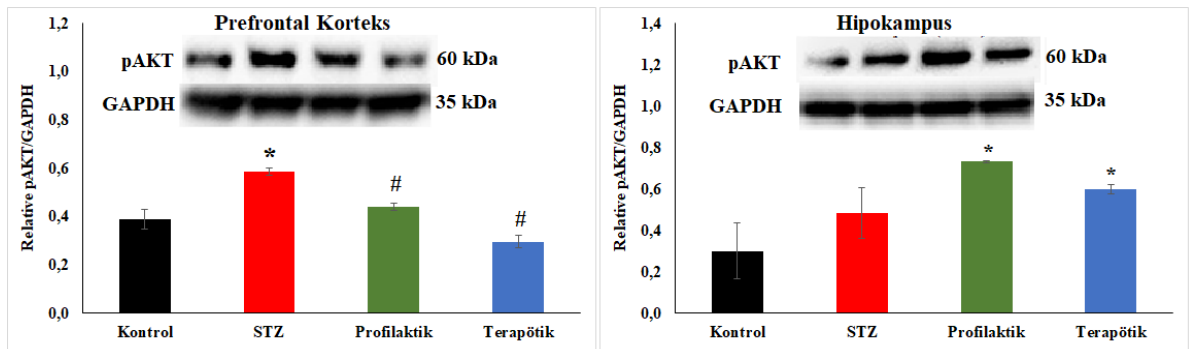
Şekil 21. IR proteinin prefrontal kortekste ve hipokampüsteki ekspresyonel değişimi.

IR'nin aktivasyonu ile değişen proteinlerden biri olan PI3K proteininin değişimine bakıldığında prefrontal kortekste gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmezken ($F_{(3,11)}=0.056$, $p=0.981$), hipokampüsteki PI3K ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlendi ($F_{(3,11)}=4.998$, $p=0.031$). İkili grup karşılaştırmalarında ise terapötik grupta diğer tüm gruplara göre hipokampüste anlamlı bir PI3K ekspresyonu tespit edildi ($p=0.027$ -kontrol, $p=0.008$ -STZ, ve $p=0.016$, profilaktik) (Şekil 22).



Şekil 22. PI3K proteinin prefrontal kortekste ve hipokampüsteki ekspresyonel değişimi. * $p < 0.05$ kontrole göre, # $p < 0.05$ STZ grubuna göre.

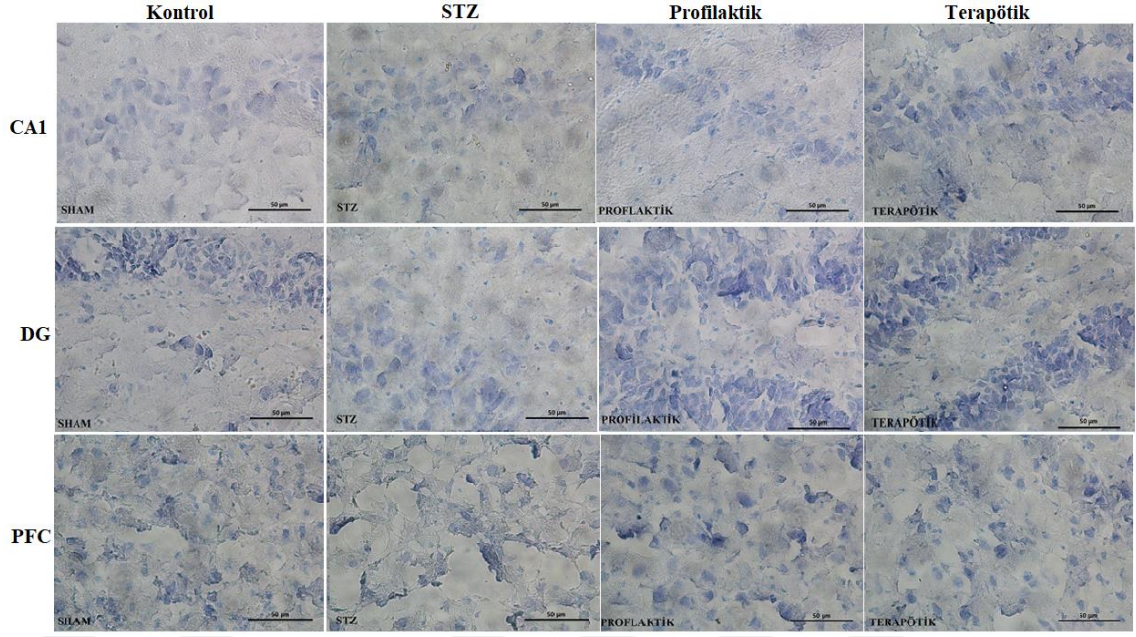
PI3K'nin etkileşimde olduğu AKT'nin fosforlanmış aktif formuna baktığımızda hem prefrontal kortekste hem de hipokampüste gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($F_{(3,11)}=21.495$, $p < 0.001$ ve $F_{(3,11)}=3.948$, $p=0.053$, sırasıyla). Prefrontal kortekste STZ grubunda pAKT kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken ($p=0.001$), profilaktik ve terapötik gruplardaki sıçanların prefrontal kortekslerinde STZ grubundakine oranla anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0.004$ ve $p < 0.001$, sırasıyla) (Şekil 23). Hipokampüste ise STZ verilen grupta anlamlı bir değişim görülmezken profilaktik grupta ve terapötik grupta pAKT ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.011$ ve $p=0.051$, sırasıyla) (Şekil 23).



Şekil 23. pAKT proteinin prefrontal kortekste ve hipokampüsteki ekspresyonel değişimi. * $p < 0.05$ kontrole göre, # $p < 0.05$ STZ grubuna göre.

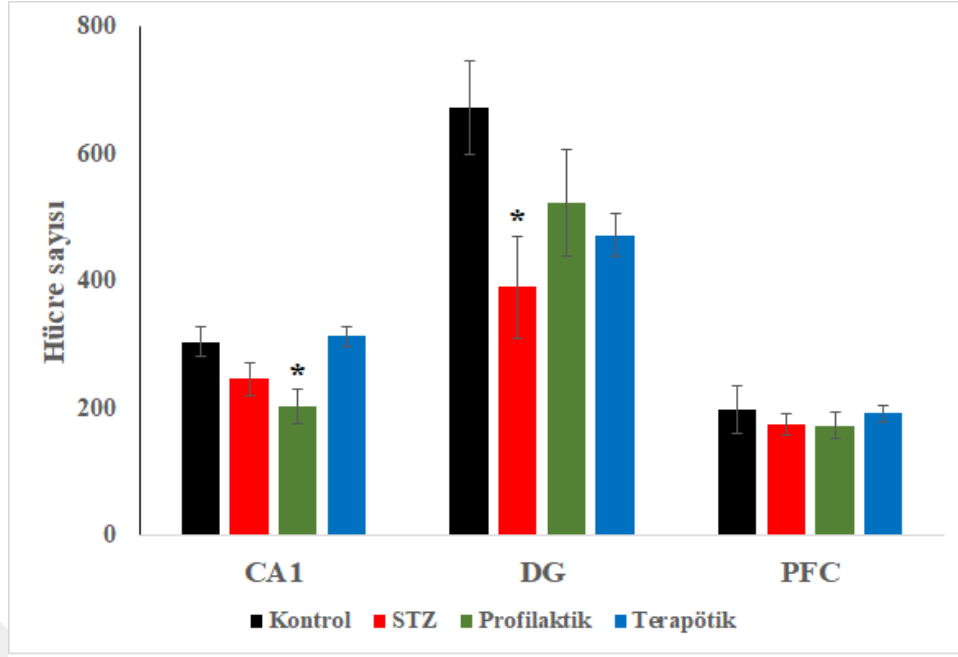
4.3. Cresyl Violet Boyama

Cresyl violet boyama ile hücredeki nissl cisimcikleri boyandı. Yapılan boyamanın sonucunda hipokampüsten CA1 ve Dentat girus bölgeleri ile prefrontal kortekste hücre sayımları gerçekleştirildi (Şekil 24).



Şekil 24. Nissl boyaması sonucu hipokampusun CA1 ve DG bölgeleri ile prefrontal korteksten (PFC) alınmış her gruba ait örnekler.

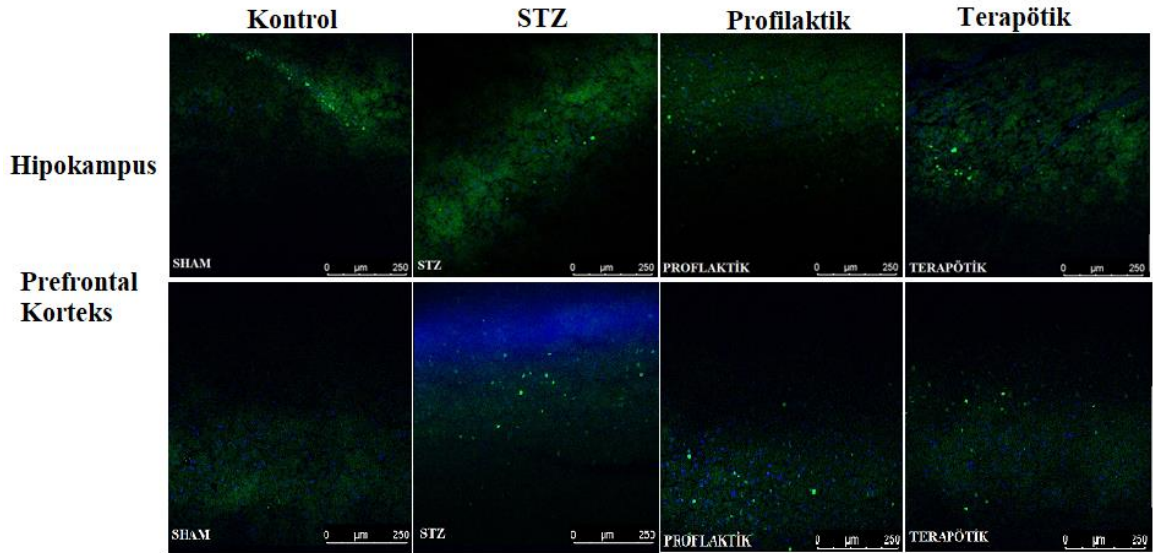
Hücre sayılarına baktığımızda STZ verilen grupta CA1 ve prefrontal kortekste değişim görülmezken, DG bölgesinde STZ ile Alzheimer geliştirilen sıçanlarda hücre sayısında kontrole oranla anlamlı bir azalma görüldü ($p=0.025$). Diğer taraftan ketojenik diyet verilen gruplarda ise bir iyileşme söz konusuydu. Fakat CA1 bölgesinde profilaktik ketojenik diyet verilen grupta kontrole oranla hücre sayısında anlamlı bir azalma vardı ($p=0.011$) (Şekil 25).



Şekil 25. Nissl boyama sonucu hipokampus CA1 ve DG bölgeleri ve prefrontal korteksten (PFC) alınan kesitlerdeki toplam hücre sayısı. * $p < 0.05$ kontrole göre.

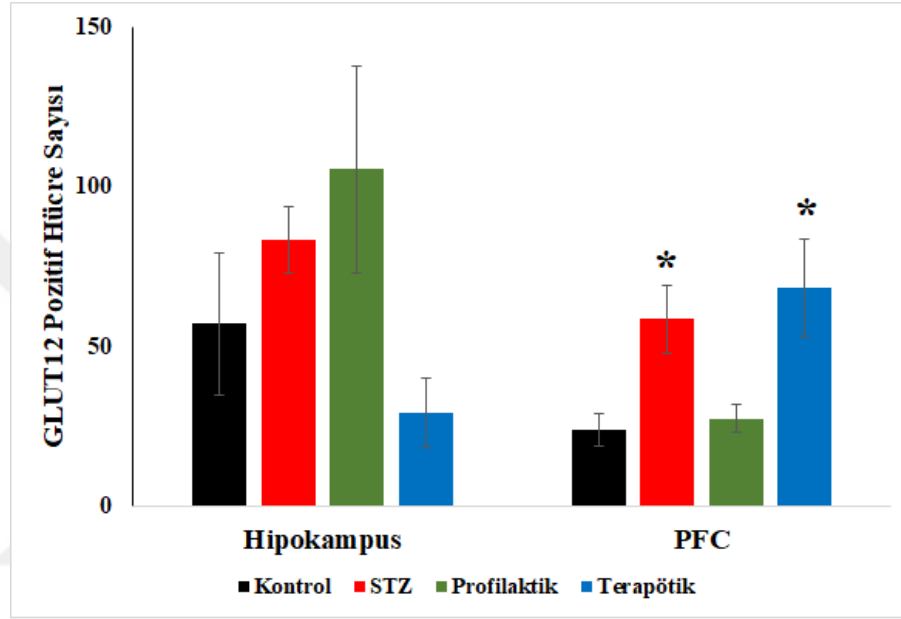
4.4. GLUT12 Immunfloresan Boyama

Prefrontal korteks ve hipokampusdaki GLUT12 hücresinin lokalizasyonuna ve ekspresyonuna bakmak amacıyla immunofloresan boyama yapılmıştır (Şekil 26).



Şekil 26. Hipokampus ve prefrontal kortekste GLUT12 ekspresyonunun immunofloresan olarak görüntülenmesi. GLUT12 yeşil floresan boya ile boyanmıştır. Mavi DAPI boyası ise çekirdek boyasıdır.

Hipokampüsteki GLUT12 pozitif hücrelerin sayısına bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 27). Diğer taraftan prefrontal kortekste STZ verilen Alzheimer hastalığı grubunda kontrole oranla anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.024$). Diğer taraftan profilaktik ketojenik diyet kullanımının GLUT12 pozitif hücre sayısını tekrar kontrol seviyelerine taşıdığı gözlemlendi ($p=0.065$, STZ grubuna oranla). Fakat, terapötik diyet grubunda GLUT12 pozitif hücre sayısı yine kontrole oranla anlamlı derecede arttı ($p=0.006$).



Şekil 27. GLUT12 immunfloresan boyama sonucu hipokampus ve prefrontal kortekste bulunan pozitif hücrelerin sayısı. * $p<0.05$ kontrole göre.

5.TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı günümüzde yaşla doğru orantılı bir şekilde artış gösteren en yaygın nörolojik hastalıklardan birisidir. Literatürde de yapılan çalışmalar incelendiği zaman Alzheimer hastalığına kesin olarak çözüm bulunamamıştır ancak genel hedef meydana getirdiği bilişsel fonksiyonlardaki azalmayı hafifletmek veya geriletmektir. Bu doğrultuda biz bu çalışmada Alzheimer hastalığının glikoz metabolizmasındaki değişimlerden de kaynaklandığını varsayarak bu değişimlerde GLUT12'nin rolünü araştırmak ve Alzheimer hastalığında ketojenik beslenmenin fonksiyonunu araştırmayı amaçladık.

Öncelikle Alzheimer modelinin başarısını ve uygulanan diyetin öğrenme ve bellek performansını üzerindeki etkisini ölçmek amacıyla Morris su tankı deneyi gerçekleştirildi. Öğrenme deneyinde sıçanların günler arası yüzülen mesafelerinde azalma yani öğrenmenin gerçekleştiği tespit edildi. Bu teste göre STZ ile yapılan sporadik Alzheimer modeli sıçanlarda öğrenmede bir değişim gözlenmezken uzun süreli mekansal belleklerinde beklenildiği üzere bir bozulma söz konusu oldu. Literatüre bakıldığında da Alzheimer hastalığı modellerinde Morris su tankı testinde hastalığın başlangıç semptomları ile ilişkili olarak en çok etkilenen bilişsel süreçlerden olan hafıza kaybının tespit edildiği görülmektedir [25]. Önceki çalışmalar, amiloid beta agregasyonu olmasa bile STZ'nin nörodejeneratif değişikliklerin patogeneğinde bir rolü olduğunu gösterilmiştir [26]. Sıçanlara i.c.v olarak STZ uygulanması, bilişsel bozukluk oluşması nedeniyle Alzheimer hastalığı fenotipini taklit etmektedir. Bizim çalışmamızda da STZ indüksiyonu, Morris su labirenti eğitimi ile doğrulandığı üzere mekansal öğrenmede kesin bir bozulma geliştirmiştir. Diğer taraftan ketojenik diyetle uzun süreli beslenen profilaktik diyet grubundaki sıçanlarda ise uzun süreli bellek fonksiyonlarında STZ'ye bağlı herhangi bir bozulma gözlenmemiştir. Ama terapötik olarak model geliştirildikten sonra uygulanan ketojenik diyetin bellek fonksiyonlarının düzelmesine herhangi bir etkisi olmamıştır. Ketojenik diyetin kognitif fonksiyonlara iyi geldiğine dair literatürde çalışmalar bulunmaktadır [27-30]. Örneğin yapılan bir çalışmada orta yaşların sonunda olan farelere (18 aylık) 5 ay boyunca ketojenik diyet uyguladıklarında yaşlanmaya bağlı belleklerinde bir iyileşmenin olduğu gözlenmiştir [31]. Epilepsi modeli geliştirilmiş sıçanlarda yapılan diğer bir çalışmada da ketojenik diyet uygulamasının olumlu etkileri olduğu ve bu etkilerin sinaptik plastisitenin değişmesi ile olduğu gösterilmiştir [28]. Yapılan

alışmalara bakıldığında ketojenik diyetin sadece uzun süreli mekânsal belleğe değil aynı zamanda çalışma belleği ve dikkat gibi alanlarda da bilişsel fonksiyonları iyileştirici etkiler sağladığı düşünülmektedir. Hayvan çalışmalarının yanında insanlarla yapılan çalışmaların da %80'inden fazlasında ketojenik diyet kullanımının olumlu bir etkisinin olduğu bunu da hiçbir zararlı etki göstermeden yaptığı belirtilmiştir [30]. Bu iyileşmenin uzun süreli ketojenik diyetle beslenme sonucu tedavi edici değil de koruyucu özellikte olduğu düşünülmektedir.

Ketojenik diyetle gerçekleşen bellek performansındaki iyileşmeye paralel olarak hipokampal dokudaki hasarı incelemek amacıyla histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. Tüm bunlara paralel olarak hücre sayısı incelendiğinde Alzheimer hastalığı modelindeki sıçanların DG bölgelerindeki granül hücre sayılarında anlamlı bir azalmanın gözleendiği ve davranış parametreleri ile paralel olarak profilaktik olarak ketojenik diyetle beslenenlerde bu hücrelerin sayısının tekrar kontrol grubundaki sayılara yakınladığı gözleendi. Profilaktik gruba ek olarak terapötik ketojenik diyet grubunda da hücre sayısında bir artışın olduğu gösterildi. Prefrontal korteksteki sayılarda ise hücre sayısında herhangi bir değişim söz konusu olmadı. Dentat girusun hipokampal devrenin bir parçası olarak episodik belleğin oluşumuna ve yeni ortamların kendiliğinden keşfedilmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca DG beyindeki nörogenezin olduğu yerlerden biridir [32]. Literatüre bakıldığında 1 aylık bir ketojenik diyet uygulamasının patolojiye bağlı hücre sayılarındaki azalmaları düzelittiği tespit edilmiştir [33]. Bu da ketojenik diyetin apoptoza karşı beyin hücrelerini koruyarak nöroprotektif bir etki gösterdiğine işaret etmektedir. Profilaktik grupta görülen davranışsal iyileşmenin de uzun süreli ketojenik diyet kullanımı ile birlikte DG'de oluşan nörogenezin etkisi ile olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan CA1 bölgesinde ketojenik diyetle herhangi değişimin görölmemesi literatürde de paralel çalışmalarda belirtilmiştir [34,35].

Alzheimer hastalığında beynin enerji kaynağı olan glikoz kullanım kapasitesinde bozukluk meydana gelmektedir [36]. Alzheimer hastalığı aynı zamanda insülin eksikliği ve beyin omurilik sıvısındaki yüksek düzeydeki glikozun yanı sıra beyindeki bozulmuş insülin sinyalizasyonu nedeniyle tip 3 diyabet olarak da bilinmektedir [37]. Alzheimer hayati bir organ olan beyin insülin direncinden önemli ölçüde etkilenmekte ve nörodejeneratif bozukluğun ayırt edici özellikleri olan enerji açıkları ve nöronal hasara neden olmaktadır. İnsülin direnci, insülin duyarlılığının azalmasına (hiperglisemi) ve bozulmuş glikoz alımı arasında önemli bir bağlantı görevi görmektedir. Bu nedenle bu

çalışmada glikoz alımında görevli olan ve beyindeki rolü tam olarak anlaşılmayan GLUT12 proteinin ekspresyonuna bakıldı. GLUT12 insüline bağımlı hareket eden PI3K ve pAKT gibi yardımcı proteinlerle etkileşim gösteren bir taşıyıcı proteindir. Beyindeki GLUT12 proteininin ekspresyonu ile amiloid beta arasında doğrudan bir ilişkinin olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Sayıca az olan bu çalışmalarda Alzheimer hastalığına sahip olan bireylerin beyinlerinde GLUT12 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir [38,39]. Bizim çalışmamızda da GLUT12 pozitif hücrelerin STZ indüksiyonu ile oluşturulan Alzheimer modeli sıçanların prefrontal kortekslerinde anlamlı derecede arttığı hipokampüste de artmasına rağmen bu artışın anlamlı olmadığı görülmektedir. Diğer taraftan western çalışmalarında ise hem prefrontal kortekste hem de hipokampüste GLUT12 ekspresyonunda bir artma gözlense de bu artışlar belirlenen anlamlılık seviyelerine ulaşmamıştır. Uzun süre ketojenik diyet beslenmesinin ise artan GLUT12 ekspresyonunu normal seviyelerine tekrar çektiği gözlenmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda diğer glikoz taşıyıcılarının (GLUT1 ve GLUT3 gibi) ekspresyonunun ketojenik diyet kullanımı ile arttığı gösterilmiştir [40]. Fakat yapılan bu çalışmalarda beyinde hipoglisemi olan durumlar söz konusudur. Böyle bir patolojide ketojenik diyet beyinde yoğunlukla bulunan GLUT'ların (GLUT1, GLUT3 ve GLUT4) gen ekspresyonunu arttıran mekanizmaları aktive etmektedir. Bizim çalışmamız ketojenik diyetin GLUT12 ekspresyonunu beyinde düşürdüğüne dair ilk yapılan çalışmalardan biridir. GLUT12'nin insüline duyarlı bir molekül olduğunu ve aşırı ekspresyonunun sistemik glikoz toleransını ve insülin duyarlılığını geliştirdiğini düşünecek olursak ketojenik diyetin artmış GLUT12 ekspresyonunu azaltmasının nöroprotektif bir etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Ketojenik diyetle GLUT12'de gerçekleşen ekspresyonel değişimin GLUT12'yi aktive eden sinyalizasyon mekanizması ile ilişkisini göstermek amacıyla IR, PI3K ve fosforile AKT'nin hem STZ indüksiyonunda hem de profilaktik ya da terapötik ketojenik diyetteki değişimine bakıldı. Buna göre, IR ekspresyonunda hem hipokampüste hem de prefrontal kortekste GLUT12 ekspresyonu ile paralel bir değişim gözlense de gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Yapılan çalışmalar ketojenik diyetin sıçanların sistemik insüline duyarlılığını arttırdığı aynı zamanda da insülin reseptör mRNA'sının ekspresyon seviyelerini arttırdığını göstermiştir [41]. Çalışmamızda ketojenik diyet kullanımının IR reseptörlerindeki ekspresyonu az da olsa azaltmasını GLUT12 ekspresyonundaki düşme ile ilişkilendirilebilmektedir.

İnsülin sinyal yolağında önemli bir kinaz olan PI3K bir dizi fosforilasyon olayı yoluyla glikoz alımını düzenlemektedir [42]. Çalışmamızda prefrontal kortekste PI3K'nın ekspresyonunda herhangi bir değişim gözlenmezken, hipokampüste terapötik ketojenik diyet kullanımı ile miktarının arttığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar ketojenik diyetin PI3K sinyal yolağında azalmalara sebep olduğunu göstermiştir. Bunun nedeninin de kandaki insülin seviyelerindeki azalmadan kaynaklandığını belirtmişlerdir [43]. Bizim çalışmamızda terapötik ketojenik diyet tedavisinin PI3K'de artışa sebep olmasının insülin mekanizması ile üzerinden olduğu değil de, PI3K'nin yer aldığı diğer mekanizmalarla ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Hücre proliferasyonu ve sağ kalımında önemli bir protein olan AKT proteinin aktif formu olan pAKT'ye baktığımızda, STZ ile indüklenen Alzheimer hastalığında aktif AKT formunun anlamlı derecede prefrontal kortekste arttığı gözlenmektedir. Hipokampüsteki artış ise anlamlı değildir. AKT fosforilasyonu sonucu birçok sinyalizasyon yolunu kontrol eden merkezi proteindir. Bu durumda beynin zararlara karşı kendini koruma mekanizması AKT sinyal yolağının aktive olması ile ilişkilendirilebilmektedir [44]. Ketojenik diyetin hem profilaktik kullanımı hem de terapötik kullanımı prefrontal kortekste aktif AKT ekspresyonunu azaltırken, hipokampüste AKT ekspresyonunu daha da arttırmaktadır. Yapılan bir çalışmada ketojenik diyetin artan AKT sinyalizasyonun azalmasına sebep olduğu ve böylelikle apoptoz yerine otofajiyi aktive ettiği gösterilmiştir [45].

Literatürde Alzheimer hastalığına sahip hastalarda yapılan çalışmalar ketonların yalnızca *ApoE* geninin varyantına sahip bireylerde Alzheimer hastalığının tedavisinde yararlı olabileceğini ve karbonhidrat alımının azaltılmasının bilişsel gerilemenin tersine çevrilmesinde etkili olabileceğini göstermiştir [46].Yapılan bir başka çalışmada ise ketojenik diyetin olası etki mekanizmaları üzerine geliştirilen hipotezlerde en güçlü olanının karaciğer hücrelerinin mitokondrisinde yağ oksidasyonu ile elde edilen enerjinin ketojenik diyetle sağlaması ve böylece vücutta fonksiyonların gerçekleşmesidir. Karaciğerde gerçekleşen bu oksidasyon sonucunda Aseti CoA, beta-hidroksibutirat ve asetoasetat sentezlenir. Bu yapılar kan-beyin bariyerini geçerek enerji kaynağı olarak alternatif substrat görevi görmektedir ve nörodejeneratif hastalıkların sebep olduğu nöbetlerde azalmayı sağlamaktadır. Koenzim Q10 seviyelerini azaltarak serbest radikal oluşumunu engelleyen ketonlar sayesinde glutatyon peroksidaz aktivitesi arttırılarak lipid peroksidasyonu önlenmektedir. Alzheimer hastası olan bireylerde insülin sinyallerinde ve seviyelerinde değişiklik gözlemlenirken aynı zamanda glikoz kullanımında azalma

meydana gelmektedir. Bu durumda da motor fonksiyonlarında dejenerasyon olmaktadır. Alzheimer hastalığının temel sebebi olan amiloid beta plak birikimi düşük serebral glikoz kullanımında ortaya çıkmaktadır. Nöronal hücreler düşük serebral glikoz kullanımında enerji bakımından yetersiz kaldığı için fonksiyonlarında bozulma meydana gelmektedir. Alzheimer hastalığında mitokondrideki enzim etkinliğinin azalması mitokondriyal DNA'ların oksidatif stresten hasar görmesiyle ortaya çıkmaktadır ve bu durum amiloid beta üretimini tetiklemektedir. Beyinde enerji dengesizliğine neden olan mitokondriyal disfonksiyon glikoz yerine keton kullanıldığında iyileşmektedir. Çünkü glikoza göre keton cisimcikleri daha fazla ATP üretilmesine neden olmaktadır. Ketonların nörokoruyucu etkisine de artan mitokondriyal solunum ile ulaşılmaktadır. Artmış insülin duyarlılığı ise nöroprotektif fayda sağlandığını göstermektedir. Ketonlar mitokondriyal solunum zincirinde bulunan NADH oksidasyonunu arttırdığı için NAD^+ ve NADH arasındaki oranı dengelemektedir, böylece oksidatif strese karşı koruma sağlanmaktadır. Sonuç olarak insanlar üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen literatürden yola çıkılarak ketojenik diyetin oksidatif stres oluşumunu etkileyerek glikoza kıyasla mitokondriyal işlevde iyileşme sağladığını ve böylelikle beyinde GLUT12 üzerinden nöronal sağkalıma yardım ettiğini görmekteyiz [22].

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda ketojenik diyetin nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığını tedavi edip edemediği veya bu hastalığa karşı bir koruma oluşturup oluşturmadığını bir glikoz taşıyıcısı olan GLUT12 üzerinden incelemeyi amaçladık. Yapılan literatür taramalarında GLUT12 ile ketojenik diyet arasındaki bağlantının araştırılmadığını gözlemledik. Bu nedenle bu çalışmamız bu açıdan özgünlük taşımaktadır.

Çalışmamızda STZ ile indüklenen Alzheimer hastalığında bozulan bellek fonksiyonlarına karşı profilaktik olarak tüketilen ketojenik diyetin koruyucu etkisi olduğunu tespit ettik. Tedavi amacıyla kullanılan terapötik ketojenik diyetin ise bellek fonksiyonları üzerinde düzelme sağlayacak kadar etkili olmadığını gözlemledik. Bunun paralelinde yapılan moleküler incelemelerde bellekte oluşan düzelmelerin profilaktik diyetle görülen DG bölgesindeki hücre artışı ile ilişkili olabileceği ve böylelikle ketojenik diyetin nöroenez ve nöroplastisiteyi arttırabileceğini belirledik. GLUT12 ekspresyonuna baktığımızda ise özellikle prefrontal kortekste literatürle paralel olarak STZ verilen grupta hem immunofloresan işaretlemeye hem de western blot yönteminde ekspresyonunda artışların olduğunu gözlemledik. Bu artışın yine profilaktik ketojenik diyet kullanımı ile azaldığını tespit ettik. GLUT12 ile ilişkili proteinlerin analizlerine baktığımızda IR'nin paralel bir etki gösterdiğini PI3K ekspresyonunda değişimin görülmediğini AKT proteinin aktif formunun Alzheimer hastalığı ile arttığını hem profilaktik hem de terapötik ketojenik diyet kullanımının prefrontal kortekste AKT aktivelemesini azalttığı, hipokampüste tersine artırdığını tespit ettik.

Sonuç olarak, literatürde ilk olarak çalıştığımız ketojenik diyet ve GLUT12 ekspresyonu arasında bir ilişkinin olduğunu ve bu ilişkinin hem kognitif fonksiyonlara hem de morfolojik fonksiyonlara yansıdığını tespit ettik. Bu çalışmanın, Alzheimer hastalığı riski taşıyan kişilerde ketojenik diyetlerin erken ve uzun süreli kullanımına dair bir parça olumlu kanıt sağlayacağını düşünmekteyiz.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda daha uzun süreli terapötik ketojenik diyet uygulamasının yapılması ve daha fazla sayıda hayvan üzerinde çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca GLUT12 sinyalizasyonunda yer alan diğer

proteinlerinde ekspresyonlarının incelenerek moleküler temelini daha fazla aydınlatılması planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] **K, S. ve Editor**, (Şti; 2003). A selekler k. alzheimer hastalığı: patoloji, klinik, tanı ve ayırıcı tanı. modern tıp semineri.26. alheimer ve diğer demanslar. . Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. .
- [2]**Özkay, Ü. D., Öztürk, Y., & Can, Ö.** (2011). YAŞLANAN DÜNYANIN HASTALIĞI: ALZHEİMER HASTALIĞI. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 18(1), 35-42
- [3]**Öztürk, G. B., & Karan, M. A.** (2009). Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi. Klinik gelişim, 22(3), 36-45
- [4] **Engin E., (Mart 2008).** Türkiye’de sık karşılaşılan psikiyatrik hastalıklar ,alzheimer hastalığı,sempozyum dizisi . S:85-110.
- [5] **Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E.** (1998). Tau in Alzheimer's disease. Trends in cell biology, 8(11), 425-427
- [6] **März, W., Scharnagl, H., Kirca, M., Bohl, J., Gross, W., & Ohm, T. G.** (1996). Apolipoprotein E Polymorphism Is Associated with Both Senile Plaque Load and Alzheimer-Type Neurofibrillary Tangle Formation a. Annals of the New York Academy of Sciences, 777(1), 276-280.
- [7] **Ayla, Ö. B. E. R.** (2008). Alzheimer hastalığında moleküllerin rolü. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, (1), 23-31
- [8] **Özpak, L., PAZARBAŞI, A., & Keser, N.** (2017). Alzheimer hastalığının genetiği ve epigenetiği. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 26(1), 34-49
- [9]**Winslow, B. T., Onysko, M. K., Stob, C. M., & Hazlewood, K. A.** (2011). Treatment of Alzheimer disease. American family physician, 83(12), 1403-1412

- [10] Purcell, S. H., Aerni-Flessner, L. B., Willcockson, A. R., Diggs-Andrews, K. A., Fisher, S. J., & Moley, K. H. (2011). Improved insulin sensitivity by GLUT12 overexpression in mice. *Diabetes*, 60(5), 1478-1482.
- [11] Brown, G. K. (2000). Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*, 23(3), 237-246.
- [12] Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 121-138.
- [13] Dunder, B. (2017). GLUT-1 (SLC2A1) ve GLUT-3 (SLC2A3) genlerinin ve bu genleri hedefleyen mikrona ekspresyonlarının farklı meme kanseri hücre hatlarında (SKBR-3, MDA-MB-231, MCF-7, hTERT) karşılaştırılması (Master's thesis, Uludağ Üniversitesi)
- [14] Simpson, I. A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K. H., Travis, A., & Vannucci, S. J. (2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(2), E242-E253.
- [15] KARABULUT, S. ALZHEİMER HASTALIĞI ve İNSÜLİN DİRENCİ. *Sağlık & Bilim 2022: Güncel Tıp-1*, 117.
- [16] Katırcı, E. (2017). Stevioside'nin diyabetik sıçan plasentasında glukoz taşınımında rol alan GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 ekspresyonları üzerine etkisi.
- [17] Pujol-Gimenez, J., Martisova, E., Perez-Mediavilla, A., Lostao, M. P., & Ramirez, M. J. (2014). Expression of the glucose transporter GLUT12 in Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(1), 97-101.
- [18] Dewanjee, S., Chakraborty, P., Bhattacharya, H., Chacko, L., Singh, B., Chaudhary, A., ... & Kandimalla, R. (2022). Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease: Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 193, 134-157.

- [19] **Iturbe, E. G.** (2019). *Study of GLUT12 expression and regulation in small intestine and adipose tissue, and the possible implication of the transporter in obesity, alzheimer's disease and cancer* (Doctoral dissertation, Universidad de Navarra).
- [20] **Hartman, A. L., Gasior, M., Vining, E. P., & Rogawski, M. A.** (2007). The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatric neurology*, 36(5), 281-292.
- [21] **Masino, S. A., & Rho, J. M.** (2012). Mechanisms of ketogenic diet action. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]*. 4th edition.
- [22] **Gülsüm, K. A. R. A., & KILINÇ, G. E.** (2021). Alzheimer hastalığında ketojenik diyet tedavisi. *İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (15), 630-638.
- [23] **Hersant, H., & Grossberg, G.** (2022). The ketogenic diet and Alzheimer's disease. *The journal of nutrition, health & aging*, 26(6), 606-614.
- [24] **Lange, K. W., Lange, K. M., Makulska-Gertruda, E., Nakamura, Y., Reissmann, A., Kanaya, S., & Hauser, J.** (2017). Ketogenic diets and Alzheimer's disease. *Food Science and Human Wellness*, 6(1), 1-9.
- [25] **Tran, T. T., Srivareerat, M., & Alkadhi, K. A.** (2011). Chronic psychosocial stress accelerates impairment of long-term memory and late-phase long-term potentiation in an at-risk model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 21(7), 724-732.
- [26] **Grünblatt, E., Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic, J., Riederer, P., & Hoyer, S.** (2007). Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of neurochemistry*, 101(3), 757-770.
- [27] **Qin, Y., Bai, D., Tang, M., Zhang, M., Zhao, L., Li, J., ... & Jiang, G.** (2023). Ketogenic diet alleviates brain iron deposition and cognitive dysfunction via Nrf2-mediated ferroptosis pathway in APP/PS1 mouse. *Brain Research*, 1812, 148404.

- [28] Qiao, Q., Tian, S., Zhang, Y., Che, L., Li, Q., Qu, Z., & Wang, W. (2023). A Ketogenic Diet may Improve Cognitive Function in Rats with Temporal Lobe Epilepsy by Regulating Endoplasmic Reticulum Stress and Synaptic Plasticity. *Molecular Neurobiology*, 1-16.
- [29] Hernandez, A. R., Barrett, M. E., Lubke, K. N., Maurer, A. P., & Burke, S. N. (2023). A long-term ketogenic diet in young and aged rats has dissociable effects on prelimbic cortex and CA3 ensemble activity. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15.
- [30] Chinna-Meyyappan, A., Gomes, F. A., Koning, E., Fabe, J., Breda, V., & Brietzke, E. (2023). Effects of the ketogenic diet on cognition: A systematic review. *Nutritional Neuroscience*, 26(12), 1258-1278.
- [31] Zhou, Z., Kim, K., Ramsey, J. J., & Rutkowski, J. M. (2023). Ketogenic diets initiated in late mid-life improved measures of spatial memory in male mice. *GeroScience*, 1-14.
- [32] Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research*, 163, 3-790.
- [33] Noh, H. S., Kim, Y. S., Lee, H. P., Chung, K. M., Kim, D. W., Kang, S. S., ... & Choi, W. S. (2003). The protective effect of a ketogenic diet on kainic acid-induced hippocampal cell death in the male ICR mice. *Epilepsy research*, 53(1-2), 119-128.
- [34] Schwartzkroin, P. A., Wenzel, H. J., Lyeth, B. G., Poon, C. C., DeLance, A., Van, K. C., ... & Nguyen, D. V. (2010). Does ketogenic diet alter seizure sensitivity and cell loss following fluid percussion injury?. *Epilepsy research*, 92(1), 74-84.
- [35] Simeone, K. A., Wilke, J. C., Matthews, S. A., Simeone, T. A., & Rho, J. M. (2021). Ketogenic diet-mediated seizure reduction preserves CA1 cell numbers in epileptic Kcna1-null mice: An unbiased stereological assessment. *Epilepsia*, 62(8), e123-e128.

- [36] **Pujol-Gimenez, J., Martisova, E., Perez-Mediavilla, A., Lostao, M. P., & Ramirez, M. J.** (2014). Expression of the glucose transporter GLUT12 in Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(1), 97-101.
- [37] **Yao, J., He, Z., You, G., Liu, Q., & Li, N.** (2023). The deficits of insulin signal in Alzheimer's disease and the mechanisms of vanadium compounds in curing AD. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(8), 6365-6382.
- [38] **Kyrtata, N., Emsley, H. C., Sparasci, O., Parkes, L. M., & Dickie, B. R.** (2021). A systematic review of glucose transport alterations in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 626636.
- [39] **Pujol-Gimenez, J., Martisova, E., Perez-Mediavilla, A., Lostao, M. P., & Ramirez, M. J.** (2014). Expression of the glucose transporter GLUT12 in Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(1), 97-101.
- [40] **Cheng, C. M., Kelley, B., Wang, J., Strauss, D., Eagles, D. A., & Bondy, C. A.** (2003). A ketogenic diet increases brain insulin-like growth factor receptor and glucose transporter gene expression. *Endocrinology*, 144(6), 2676-2682.
- [41] **Kinzig, K. P., Honors, M. A., & Hargrave, S. L.** (2010). Insulin sensitivity and glucose tolerance are altered by maintenance on a ketogenic diet. *Endocrinology*, 151(7), 3105-3114.
- [42] **Knight, Z. A., Gonzalez, B., Feldman, M. E., Zunder, E. R., Goldenberg, D. D., Williams, O., ... & Shokat, K. M.** (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling. *Cell*, 125(4), 733-747.
- [43] **Chen, Y., Yamamoto, T., Takahashi, Y., Moro, T., Tajima, T., Sakaguchi, Y., ... & Ohki, R.** (2023). Metabolic intervention by low carbohydrate diet suppresses the onset and progression of neuroendocrine tumors. *Cell Death & Disease*, 14(9), 597.
- [44] **Elibol, B., Beker, M., Terzioglu-Usak, S., Dalli, T., & Kilic, U.** (2020). Thymoquinone administration ameliorates Alzheimer's disease-like phenotype by

promoting cell survival in the hippocampus of amyloid beta1–42 infused rat model. *Phytomedicine*, 79, 153324.

[45] Mu, E., Wang, J., Chen, L., Lin, S., Chen, J., & Huang, X. (2021). Ketogenic diet induces autophagy to alleviate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in murine models. *Experimental Lung Research*, 47(1), 26-36.

[46] Broom, G. M., Shaw, I. C., & Rucklidge, J. J. (2019). The ketogenic diet as a potential treatment and prevention strategy for Alzheimer's disease. *Nutrition*, 60, 118-121.

