



Derleme Makalesi / Review Article

Organotipik Beyin Kesitleri Kullanımının Nörobiyolojik Çalışmalardaki Yeri

Use of Organotypic Brain Slices in Neurobiological Studies

Elif MUTLU ^{1,*}, Hasan H. S. ABUIYADA ²

¹ Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik (İngilizce) Bölümü, 34000, İstanbul, Türkiye

² Üsküdar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nörobilim Anabilim Dalı, 34000, İstanbul, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Makale Tarihi

Alınış, 24 Mart 2021

Revize, 22 Nisan 2021

Kabul, 22 Nisan 2021

Online Yayınlama, 30 Nisan 2021

Anahtar Kelimeler

Beyin, Kesit kültürü, Organotipik beyin kesiti, Nörobiyoloji

ÖZ

Organotipik beyin kesit kültürleri günümüzde nörobiyoloji araştırmalarında rutin bir protokol haline gelmiştir. Beyin kesit kültürü tekniklerindeki ilerleme sayesinde birçok beyin hastalığı patofizyolojisinin *in vivo* duruma çok yakın bir şekilde doku bağlamında incelenmesi fırsatı doğmuştur. *In vivo* çalışmalarda anesteziğin ve kas gevşetici maddelerin uzun süreli kullanımına alternatif olması yanında hücre kültürlerinin ve homojenatlarının aksine yapısal bütünlüğünü sürdürebilmesi gibi avantajlar sunarken bu kültür ortamı bazı dezavantajları da beraberinde getirmektedir. Bu derleme çalışması boyunca beyin kesit kültürü teknolojisi avantajları ve dezavantajları ile birlikte ele alınarak nörobiyoloji çalışmalarındaki yeri incelenmiştir. Hüresel bütünlüğün korunduğu bu sistemlerin nörodejenerasyon, nörogenез, nörotoksisite gibi birçok alanda *in vitro* hücre kültürü ve *in vivo* deney hayvanı çalışmalarına kıyasla çok daha verimli ve kullanışlıdır.

ARTICLE INFO

Article History

Received, 24 March 2021

Revised, 22 April 2021

Accepted, 22 April 2021

Available Online, 30 April 2021

Keywords

Brain, Slice culture, Organotypic brain slice, Neurobiology

ABSTRACT

Organotypic brain slice cultures have now become a routine protocol in neurobiology researches. Thanks to the advancement in brain section culture techniques, the opportunity has emerged to examine the pathophysiology of many brain diseases in a tissue context very close to the *in vivo* situation. In addition to being an alternative to the long-term use of anesthetics and muscle relaxants in *in vivo* studies, it offers advantages such as maintaining the structural integrity of cell cultures and homogenates, while this culture environment also brings some disadvantages. Throughout this review study, brain slice culture technology was considered together with its advantages and disadvantages and its place in neurobiology studies was examined. These systems, in which cellular integrity is preserved, are much more efficient and useful in many areas such as neurodegeneration, neurogenesis, neurotoxicity compared to *in vitro* cell culture and *in vivo* experimental animal studies.

*Sorumlu Yazar

E-posta Adresleri: elifmutluem@gmail.com (Elif MUTLU), hasan.h.a.i181@gmail.com (Hasan H. S. ABUIYADA)

1. GİRİŞ

Yetişkin bir bireyde beyin, vücut ağırlığının ortalama %2'sini temsil etmekte ve nispeten küçük yapısına rağmen istirahat halinde vücuttaki oksijen ve kalorisinin yaklaşık %20'sini tüketmektedir [1]. Bunun yanında beyin, nöronlar ve destekleyici hücreler arasındaki doğal ve süregelen iletişimi sağlamak için vücuttaki toplam enerjinin %60-80'ini kullanmakta iken, bir faaliyet doğrultusunda aktif olan beyin toplam enerjinin sadece %0.5-1.0'unu kullanmaktadır [2]. İnsan beyni, karmaşık ve çok çeşitli hücre gruplarından oluşan karmaşık bir etkileşim ağıdır. Beyindeki bu mikroyapı Santiago Ramo'n y Cajal'ın öncülüğünde keşfedilmiş olup araştırmalar günümüze kadar ölüm sonrası insan beyin örnekleri üzerinde [3,4] ve deney hayvanı çalışmaları ile devam ettirilmektedir [5,6]. Merkezi sinir sistemi içindeki bu mikroyapının öz bileşenleri nöronlardır ve bu hücreler tarafından kendilerine ulaşan sinyallerin işlenmesi ve entegrasyonu ile oluşan çıktılar, biliş ve öğrenme gibi daha yüksek beyin fonksiyonlarının temelini oluşturduğu düşünülmektedir [6].

Organotipik beyin kesit modeli bilim camiasına ilk kez Crain ve arkadaşları tarafından 1982 yılında omurilik dorsal kök gangliyonu üzerinde yapılan bir çalışmada tanıtılmış; 1984 yılında Gähwiler ve Hefti tarafından silindir tüp kültürü şeklinde kullanıma uygun bir model haline getirilmiştir [7,8]. Teknik, zaman içinde membrana bağlı kalıcı kültürler olabilecek şekilde modifiye edilmiş [9,10] ve bu süreçte birçok bilim insanı tarafından kullanılmıştır [11-14]. Organotipik beyin kesitleri nöroprotektif molekülleri, büyüme faktörleri, nöroaktif ilaçlar gibi birçok ajanı test etmek için kolaylıkla kullanılabilirdiği gibi ayrıca nörotoksikolojik taramalar yapmak için de olanak sağlayan modellerdir [15-17]. Kesitler belirli bir beyin bölgesinden elde edilen tek bir kesit olarak kültüre edilebildiği gibi fokal olarak ilişkili iki beyin kesiti ko-kültür şeklinde kültüre edilebilmektedir [18].

2. ORGANOTİPİK BEYİN KESİTLERİ KULLANIMININ AVANTAJLARI

Beyin kesit kültürleri belirli *in vivo* deneylere alternatif olarak kullanılabilen, böylece belirli çalışmalar için kullanılması gereken deney hayvanı sayısı azaltılmakta ve nörodejenerasyon çalışmaları için birçok deney hayvanının yaşlandırılması gerekliliği ortadan kaldırılmaktadır [19].

Kesit kültürlerinin çoğu tipik olarak farelerden veya sıçanlardan doğum sonrası 12. günde alınan beyin dokularından üretilmektedir; bu dönemde nöronların hücre mimarisi kurulmuş olup, beyin kolaylıkla manipüle edilebilecek şekilde yeterince büyüktür ve nöronlar eksplantasyon sonrası hayatta kalabilecek kapasitededirler [20]. Ayrıca kesitler, yüksek düzeyde nöroplastisite gösterirler ve bu sayede kesit alma aşamasında gerçekleşen mekanik travmaya karşı direnç gösterirler [21]. Ek olarak, doku kesitlerinde glia ve sinir hücrelerinin birliktelik varlığının devam etmesi, nöronların farklılaşmasını kolaylaştıran bir mikro ortam sağlamaktadır [22]. Doğum sonrası ve süten kesilmeden önce farelerden

elde edilen beyin kesit kültürlerinin bir başka faydası da daha küçük fare kolonilerinin yeterli olması sebebi ile zamandan ve maliyetten tasarruf edilmesi, ağır fenotipli yaşlı farelere olan gereksinimin azaltılmasıdır [19].

Organotipik kültürler ve akut kesitler, *in vivo* olarak bulunan iç sinaptik bağlantıları koruyarak nöronlar ve astrositler gibi komşu hücreler arasındaki etkileşimlerin ve fonksiyonel ilişkilerin devamlılığını sağlamaktadır [23]. Ayrıca, beyin kesit kültürlerinde eksprese edilen bazı genlerin ve proteinlerin *in vivo* ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırılabilir olduğu da gösterilmiştir [20,24]. Beyin kesit kültürlerinde hücre ölümünün analizi propidyum iyodür veya benzer boyalar ile yapılabildiği gibi, metabolik aktivite ölçümü de yapılabilmektedir [25,26]. Bir deney hayvanından birden fazla kesit kültürü hazırlanabildiğinden, bir sistemdeki çeşitli değişkenlerin araştırılmasına olanak sağlanıp değişkenlik potansiyel olarak azaltılmış olur [27].

Bir tek P8/9 fareden 350µm kalınlığında 36 adet beyin kesiti elde edilebilir, böylece aynı zamanda aynı deney hayvanından elde edilen doku üzerinde, birçok hastalık ile ilgili değişimlerin zaman içinde gözlenmesi mümkün olmaktadır [27,19]. Bu şekilde de bir deney dizaynından en yüksek verimle faydalanmanın mümkün olduğu söylenebilir. Bu *ex vivo* sistemin bir başka avantajı, beyin kesit kültürlerinin hücre ve sinaps gelişiminin, *in vivo* beynin gelişimini taklit etmesidir [21].

Nöronlar, kesit preparatlarında *in vivo* durumda gösterdikleri gibi *ex vivo* morfolojik gelişir ve bozulmamış beyinde gözlemlendiği gibi benzer sinaptik bağlantıları sürdürür, sağlıklı nöronal fonksiyon gösterir ve nöral devreyi korurlar. Örneğin, organotipik hipokampal kesit kültürleri elektriksel özelliklerini sürdürür [28] ve sinaptik bağlantıları yetişkin beyindeki sürece paralel olarak olgunlaşır [20,21]. Bir başka çalışmada kesitlerdeki nöral dikenlerin yoğunluğu ve şekillerinde gözlemlenen gelişimsel değişikliklerin ve artan konnektivitenin yaşla eşlenmiş zaman noktalarında *in vivo* fenotipi yansıtmakta olduğu belirtilmiştir [21,29].

Adcock ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yayımlanan çalışmada organotipik serebellar kesit kültürlerinde purkinje hücrelerinin gelişimi incelenmiştir. Bir nöronun dendritik ağacının gelişiminin, duysal liflerden gelen sinaptik girdi ve nörotrofik faktörler tarafından aktiviteye bağlı sinyallemeyle düzenlendiği bilinmektedir. Fakat yapılan çalışmada, *ex vivo* beyin dilimlerinde purkinje hücreleri dendritik ağacı gelişiminin, uyarıcı nörotransmisyon ve beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) sinyali yokluğunda da normal olduğunu buldular. Bu gözlemlerden, purkinje hücreleri dendritik gelişiminin birçok yönünün içsel bir büyüme programı ile elde edildiği sonucuna varmışlardır. Dolayısıyla kesit kültürlerinde nöroplastisite ve gelişimin de *in vivo* koşullara paralel bir şekilde korunduğu ve devam ettiği görülmektedir [30].

3. ORGANOTİPİK BEYİN KESİTLERİ KULLANIMININ DEZAVANTAJLARI

Kültüre edilmiş kesitlerdeki bazı nöronlar kesit bütünlüğü içindeki diğer nöronlarla olan aksonal bağlantılarını korurken aynı zamanda kesitte yer almayan daha uzak seviyelerdeki nöronlarla olan normal bağlantılarını kaybederler. Kültüre edilmiş kesit içindeki duyuşal (afferent) bağlantıların kaybedilmesi ile birlikte uzak alanlara gönderilen motor (efferent) bağlantıların kaybedilmesi, aksonların denerve terminallere doğru yeniden organize olması ve genişlemesi ile sonuçlanmaktadır [31].

Organotipik beyin kesit kültürlerinde sinir hücreleri bağlantılarını sürdürebilseler de, kesitler aksotomize bir sistem olduğu için hedef innervasyonlarını kaybedebilirler. Bu aksotomi hücre ölümüne sebep olduğu için, kesit kültür sisteminin en büyük dezavantajıdır [31]. Özellikle embriyonik ve yenidoğan beyinleri aksotomiye karşı oldukça duyarlıdır çünkü hedef kaynaklı nörotrofik faktörlere bağımlıdır. Daha olgun beyinlerde ise aksotomi, büyüme faktörlerinin yerel üretimi ve salınımına bağılı olarak hücre ölümüne sebep olmamakla birlikte rejeneratif yanıtların oluşturulmasına sebep olabilmektedir [31]. Bununla birlikte, farklı nöronal/astroglial sistemler ve tüm beyin yapısının kılcal damarlar ile arasındaki etkileşimin kaybı tek organotipik beyin kesitlerinin dezavantajlarından bir başkasıdır.

Bir başka çalışmada floresan boya ile işaretlenmiş nöronların takibi ile artan sinaptik bağlantı sayısı gözlemlenmiş ve organotipik beyin kesitlerinin düşünüldüğünden daha karmaşık bir yapıda olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bununla tutarlı olarak, organotipik dilimlerde glutamaterjik sinaps sıklığında önemli bir artış tespit edilmiştir. Kesitlerin hazırlanması aşamasında travmatize olan aksonlar kültür süreci boyunca yeni nöral bağlantılar oluşturmak üzere yönlendirilmektedirler, bu da artan sinaptik bağlantı sayısını açıklamaktadır [29].

Kesit kültürü yapılmadan önce belirli bir doku ve nöronal popülasyon için büyüme faktörlerine duyulan ihtiyaç deneysel olarak belirlenmelidir. Yapılan bir çalışmada, serotonerjik nöronların büyüme faktörü eklenmeden de hayatta kalabildiği raporlanmıştır; bununla birlikte bir beyin kesitindeki tüm nöronlar aksotomize olmamaktadır; örneğin, striatumdaki kolinerjik ara nöronlar aksotomize olmayan izole bir sistem olarak incelenebildiği belirtilmiştir [31].

Yetişkin hayvanlardan alınan beyin kesitleri birkaç saatten fazla hayatta kalamadığı için, bu yöntem kullanılarak raporlanmış çalışmalar oldukça az sayıdadır. Kültür ortamının sıcaklığını düşürme, farklı bileşenler ile hazırlanmış kültür ortamları, karbojen atmosferler ve bazı yetişkin beyin kesit kalınlığının azaltılması dâhil olmak üzere geleneksel protokol parametrelerinde önemli değişiklikler yapıldığını bildiren çalışmalar var olsa da geniş hücre kayıplarının varlığı hala gözlenmektedir [31-33]. Daha önce belirtildiği gibi, her teknik belirli bir zaman dilimi içinde en kullanışlıdır ve hasar erken tespit edilebilse de, tekniklerin çoğu ilk 24 saat içinde en güvenilir olanlardır. Bu durum analizlerin doğru bir

şekilde yapılabilmesi için, ölçümün yapılacağı zaman noktasının veya aralığının dikkatli bir şekilde seçilmesini gerektirmektedir. Dokuda oluşan hasar gözden kaçırılabilir; ilerlemiş zaman noktalarında skar dokusu oluşumu ve fagositozun karmaşık dinamikleri sebebi ile enfarktüs boyutu ile doku kaybı her zaman eşleşmeyebilir [34,35]. Kesit kalitesi yalnızca hazırlık sırasında oluşturulan doku hasarı ile ilişkili olmayıp aynı zamanda kesitin inkübasyon ortamına getirilmesine kadar geçen sürede oluşan dolaşım durması periyodu ile de ilişkilidir.

2011 yılında Ullrich ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada tüm beyin sagittal vibro-kesitlerinin doğum sonrası sıçanlarda birkaç hafta boyunca kültürlenebildiği, kesitlerde bulunan kolinerjik ve dopaminerjik nöronların, güçlü kılcak bağlantıların ve sinir lifi büyümesinin sürdürüldüğü gösterilmiştir [36]. Sinir lifi büyümesi son derece iyi kontrol edilen bir süreçtir ve ko-kültürlerdeki sinir lifleri kısmen tüm yönlerde büyümektedir, bu durum kesitlerin *in vivo* durumu tam olarak temsil edemediğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, beyne nöron transplantasyonu sonrasında belirli bölgelerde son derece kontrollü bir şekilde sinir lifi büyümesi görülmüştür fakat aynı zamanda liflerin *in vivo* uzun mesafeli büyümesi ve sinir liflerinin yeniden yapılanması başarısız olmaktadır. Dolayısıyla, bu modelde lif rekonstrüksiyonu üzerine daha ileri çalışmalarda bulunmak büyük zorluk olacaktır. Fakat izleme ve elektrofizyoloji çalışmalarının birlikteliği ile birbirinden uzakta bulunan farklı beyin alanları arasında işlevsel bir bağlantı olduğu kanıtlanabilir ve böyle bir model ile *in vitro* ortamda beynin kısmen yeniden oluşturulması ve kültüre edilmesi için bir şans sunabilir [36].

4. HİPOKAMPAL KESİT KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Organotipik beyin kesit kültürleri, yeni oluşturulan granül hücrelerin hipokampal ağa anatomik ve fizyolojik olarak entegrasyonunun araştırılması için çeşitli avantajlar sağlamaktadır. 1-2 hafta içerisinde silindirik tüplü kültürler 400 µm kalınlıktan 50- ila 100 µm kalınlığa inceler; böylece nöronların görselleştirilmesi ve mikromanipülasyonu için tek tek hücrelere erişilebilirliği büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır [37]. Ayrıca bu durum hipokampus kesitleri üzerinde nörogenез çalışmaları açısından da avantajlıdır.

Beyin kesit kültürleri elektrofizyolojik çalışmalar için sıklıkla kullanılıyor olmasının yanında; nörodejenerasyon çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmakta olup, bu yöntem ile en çok kültüre edilen beyin bölgesi hipokampustur. Çünkü bu bölge birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkili patolojiler ve nöronal kayıplardan tipik olarak etkilenmektedir [27]. Bir çalışmada, lizozomotropik ajanlar ile muamele edilen organotipik hipokampal kesitlerde normal süreç içerisinde yaşlanan insan beyninin gösterdiği özelliklere benzer özellikler olduğu gözlenmiştir. Buna göre, hipokampus kesitlerinde mikrotübül ilişkili protein tau seviyesinin ve kesitlerin eksitotoksositeye karşı hassaslığının arttığı görülmüştür [20].

Genellikle hipokampus, sinaps oluşumu ve özellikle yosunsu lif filizlenmesi çalışmaları için seçilen bir beyin bölgesidir. Bu konudaki öncül çalışma 1993 yılında yapılmış olup; 1 ila 3 haftalık hipokampal organotipik kültürlerde nörit büyümesi ve sinaptogenez oluşumu gösterilmiştir [38]. Buna göre, lezyon oluşumundan bir gün sonra çok sayıda dejeneratif ve rejeneratif sürecin yer aldığı ve birçok yeni fonksiyonel sinaptik temasın oluştuğu ve iletimin 3 ila 6 gün içinde tamamen iyileştiği gözlemlenmiştir.

Ayrıca bu veriler, bir başka çalışma ile desteklenerek yosunsu liflerin uç alanlarının genişlediği ve dentat girus ile CA3 alanlarına doğru ilerlediği gösterilmiştir [39]. Aynı yıl yapılan bir başka çalışmada söz konusu filizlenme reaksiyonlarının, nöral hücre adezyon molekülerinin ekspresyonu ile tetiklendiğini ve bu reaksiyonların sinaps rejenerasyonu mekanizmasında önemli bir rol oynadığı bulunmuştur [40]. Bir dezavantaj olarak görünen aksotomi aynı zamanda hipokampal kesit kültürlerinde yosunsu liflerin yeniden düzenlenmesi, organotipik beyin kesit kültürlerinde reaktif sinaptogenez ve nöronal filizlenme gibi durumların incelenmesine izin vermektedir [41,42].

In vivo nörogenез, insanlar da dâhil olmak üzere birçok omurgalı türünün yetişkin hipokampusunda meydana gelmektedir [43]. Yeni granül nöronlar subventriküler bölgede doğar ve farklılaşmak üzere dentat girusa göç ederler. İskemik ve kimyasal hasar, yeni doğan hücrelerin sayısını geçici olarak artırıyor gibi görünse de bunların sürdürülebilir ve onarıma katkıda bulunma yetenekleri büyük ölçüde bilinmemektedir. Birçok çalışmada, kültürlenmiş postnatal hipokampal dokunun yeni glial hücreler ve nöronlar oluşturma kapasitesini incelemiştir. Serebral eksplantasyonun hemen ardından astrositlerin (çoğunlukla reaktif tip II), mikroglia ve fibroblastik hücrelerin, hipokampal kesit yüzeyinde tip II astrositik glial örtüye yol açan geniş bir proliferasyon gerçekleştirmektedir. Bununla birlikte tip I astrositlerin ve fibroblastların çoğunun, substratum kültür arayüzünde aşırı büyüme bölgeleri ile sınırlı olduğu görünmektedir. Bu veriler, önemli süreler boyunca hipokampal kesit kültürlerinde nöronların doğumunu ve olgunlaşmasını ve bu hücrelerin bölgesel ve fenotipik olarak uygun şekilde farklılaştığını açıkça göstermektedir [29].

5. İNSAN BEYİN KESİT KÜLTÜRLERİ

Kemirgen beyin dokusu ile yapılan çalışmalardan farklı olarak, insan beyin dokusuna ait organotipik beyin kesit kültürü oluşturmaya yönelik geçmiş çalışmalar dokunun canlılığı ve bütünlüğü açısından belirli kısıtlamalarla sınırlanmıştır [44,45]. Fakat insan beyin kesitleri üzerinde yapılan bazı çalışmalar ile elektrofizyolojik işlev ve optogenetik hedefleme [46] hakkında umut vaat edici veriler sağlamıştır. Devam eden çalışmalarda, birkaç gün gibi kısa süreli kültürler üzerinde ilgili problemlerin virüs güdümlü hızlı ekspresyonu ile başarılı bir şekilde nöral etiketleme, optik manipülasyon ve kalsiyum görüntüleme gerçekleştirilmiştir [47].

Bir başka çalışmada insan beyin omurilik sıvısının nöral canlılığı ve insan beyni kesit kültürlerinin uzun vadeli hayatta kalmasını önemli ölçüde desteklediği ve 21. güne kadar nöral ağ aktivitesinin kayıtlarının alınmasını sağladığı gösterilmiştir. Çalışmada, 2 hafta boyunca genel elektrofizyolojik ve yapısal stabilite sağlandığından tüm katmanlar boyunca piramidal nöronlar ve ara nöronların sistematik analizinin yapılma imkânı yakalanmıştır. Kesit kültür nöronları üzerinde ölçülen parametrelerin çoğunun (virüs aracılı gen ekspresyonu, dentritik diken morfolojisi, glutamaterjik nöron popülasyonu analizi) akut (0. gün), erken (2-3. gün) ve geç (7-14) aşama kültürlerinde farklılık göstermediği ortaya koyulmuştur. Tek fark gösteren parametre olarak, piramidal nöronlarda 0. günde ölçülen dinlenme zar potansiyeli diğer günlerden küçük bir farkla da olsa anlamlı derecede düşük çıkmıştır. Yine de, 14 günlük kültür süreci boyunca yapılan analizler sonucunda kesit kültürlerinin kortikal ağ bileşeni olan piramidal nöronların morfolojik ve elektrofizyolojik parametrelerinde dikkate değer bir stabilite olduğu gösterilmiştir [48].

2019 yılında yapılan bir nöro-onkoloji çalışmasında insan beyin kesitleri kullanılmış ve kesit kültürlerine hastalardan elde edilmiş tümör hücreleri enjekte edilerek glioblastomanın doğal ortamında ilerleyişi incelenmiştir. Çalışmada, serumsuz büyüme ortamında kültüre edilen 300-µm kalınlığındaki kesitlerin 7 güne kadar hücre mimarisinin korunduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan elektrofizyolojik, immunohistokimyasal ve gen ekspresyonu değerlendirmeleri ile insan kesit kültürlerinin *in vivo* ortamı son derece iyi yansıttığı gösterilmiştir. Kanser patolojisi mekanizmaları ve kanser ilacı geliştirme çalışmaları çoğunlukla genetiği değiştirilmiş hücre hatları ksenogreftleri ve hastadan türetilmiş ksenogreft fare modellerine dayanmaktadır. Geleneksel bu teknikler belirli immün yanıtlara sebep olmalarının yanı sıra bir dezavantaj olarak türler arası farklılıkları da büyük ölçüde yansıtmaktadır. Ravi ve arkadaşları tarafından bu çalışma ile insan beyni kesit kültürleri malign glioma invazyonunun *ex vivo* incelenmesi için bir alternatif olarak önerilmiştir [18]. Serumsuz ortamda hücre canlılığının devamlılığı, serum varlığının aşırı nörotrofik faktör ve enerji kaynaklarından kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir.

6. BULGULAR VE TARTIŞMA

Özellikle artan sayıda hayvan araştırma deneyi göz önüne alındığında, *in vitro* kültürler deney hayvanlarının sayısının ve acılarının belirgin şekilde azaltılmasına olanak sağlayarak 4R kuralına katkıda bulunmaktadır. Yaygın kullanılan bir deney yöntemi olarak birincil hücre kültürleri foksion, morfoloji ve sağ kalım çalışmalarının yanı sıra koruyucu veya toksik kimyasalların etkilerinin incelenmesine olanak tanımaktadır. Fakat izole edilmiş hücrelerin, bu izolasyondan dolayı doğal ortamında bulunan komşu hücreler ile olan temasının kesilmesi sebebi ile organizmanın doğasını yansıtmadığı söylenebilir. Buna rağmen son 10 yılda organotipik kültürlerin *in vivo* benzeri durumları simüle edebilme konusunda büyük bir adım olduğu bulunmuştur.

Organotipik kültürler, orijinal dokunun sinaptik organizasyonunun ve yapısal bütünlüğünün birçok yönden korunmasına ve devamlılığına olanak tanımaktadır. Yolaklar büyük ölçüde bağlantısız kalmasına rağmen, karmaşık üç boyutlu mimari kısmen korunmaya devam eder. Bu yüzden, birincil hücre kültürleriyle kıyaslandığında, organotipik kesit kültürleri *in vivo* duruma en yakın teknik olduğu görülmektedir.

Organotipik kesit kültürlerinin, beyindeki çok çeşitli hücre tiplerinin karmaşık bir ağ içinde çalışmasına izin veren yenilikçi ve güçlü bir *in vitro* metot olduğu söylenebilir. Beyin kesiti analizlerine dayanan deneyler, sakrifiye edilen deney hayvanlarına ait beyin dokusunun *in vivo* durumdaki hücresel ve moleküler işlevlerine çok yakın bir şekilde incelenmesini sağlama avantajına sahiptir.

Kesit kültürleri deney hayvanları refahı etik kurallarına uyum için sağladığı zeminin yanında insan beyni üzerinde gerçekleştirilen nöro-onkoloji çalışmalarında kullanılan ksenograft çalışmalarında karşılaşılan immünolojik reaksiyonlar ve türler arası farklılıklardan kaynaklanan moleküler düzeydeki sorunlara da alternatif olmaktadır.

Organotipik beyin kesitlerinde *in vitro* nöral yeniden düzenlemelerin gözlenmesi, destekleyici bir ortamda hasarlı aksonların yeniden oluşturulabileceğini gösterdiğinden lezyon sonrası büyümenin incelenmesi ve akut iskemi, travmatik yaralanma gibi nöral yaralanmalar ve uzun süreli iyileşme süreçleri üzerine eksitotoksosite ve sinaptik ateşlemenin etkilerinin incelenmesi gibi önemli konularda çalışma alanı sağlamakta olduğu dikkat çekmektedir.

Tek organotipik beyin kesit kültürlerinin tüm beyin vasküler sisteminden ayrılması bu sistemi genel vasküler çalışmalar açısından uygun bir ortam sağlamamaktadır. Bununla birlikte beyin kesitlerinde yerel düzeyde oksijen-glukoz deprivasyon uygulamaları ile iskemi modellemesi gerçekleştirilebilmektedir.

Söz konusu kesit kültürleri kullanılarak yapılan çalışmalarda ekipman tedariki açısından mütevazı bir yatırımın yeterli olması, bu modelin alımında büyük kısıtlamalar ile karşılaşılmayacağını da göstermektedir. Doku diseksiyonu ve kesit alma metodları çok çeşitli olup farklılıklar gösterse de teknik kolaylıkla uygulanabilmektedir.

7. SONUÇLAR

Araştırma boyunca incelenen ve tartışılan deneyler ve bulgular, kapsamlı karakterizasyon ve optimizasyondan sonra, böyle bir sistemin potansiyel olarak insan hastalıkları çalışmalarına ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine bir araç olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. Araştırma kaynaklarında gösterilen bulgular tümü ile ele alındığında, uzun süreli organotipik kesit kültürlerinin

nörodejenerasyon, nörogenez, nörotoksisite, nöro-onkoloji, sinaptogenez, nöronal plastisite, hücrel atrofi ve yaş ile ilişkili süreçleri incelemek ve belirli ajanların nicel ve nitel etkilerini gözlemlemek için güçlü bir model olduğu açıktır.

Sonuç olarak, sahip olduğu dezavantajlara rağmen hücrel bütünlüğün korunduğu beyin kesit kültürleri, doğru deney düzenekleri ve deney parametreleri kurgulandığında birincil hücre kültürleri ve *in vivo* çalışmalara alternatif ve/veya tamamlayıcı olarak verimli bilimsel sonuçlar elde edilmesi yönünden oldukça kullanışlıdır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmektedirler.

YAZARLARIN KATKILARI

Elif MUTLU: Orijinal taslak hazırlama, düzenleme ve veri toplama. Hasan HS ABUIYADA: veri toplama, yazma-gözden geçirme ve düzenleme.

KAYNAKLAR

- [1] D. D. Clarke and L. Sokoloff, *Circulation and energy metabolism of the brain*. In: Sigel GJ, Agrano BW, Albers RW, Fisher SK and Uhler MD (eds.), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1999, pp. 637-669.
- [2] M. E. Raichle and M. A. Mintun, "Brain work and brain imaging", *Annu Rev Neurosci*, no. 29, pp. 449-476, 2006, doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112819.
- [3] G. N. Elston and J. DeFelipe, "Spine distribution in cortical pyramidal cells: a common organizational principle across species" *Prog. Brain Res*, no. 136, pp. 109-133, 2002, doi: 10.1016/s0079-6123(02)36012-6.
- [4] G. N. Elston, R. Benavides-Piccione, and J. DeFelipe, "The Pyramidal Cell in Cognition: A Comparative Study in Human and Monkey," *Journal Neurosci*, vol. 21, no. 17, pp. RC163-RC163, Sep. 2001, doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-j0002.2001>.
- [5] T. Branco and M. Häusser, "Synaptic Integration Gradients in Single Cortical Pyramidal Cell Dendrites," *Neuron*, vol. 69, no. 5, pp. 885-892, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.006.
- [6] P. Somogyi, G. Tamás, R. Lujan, and E. H. Buhl, "Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex1Published on the World Wide Web on 3 March 1998.1," *Brain Res Rev*, vol. 26, no. 2-3, pp. 113-135, May 1998, doi: 10.1016/s0165-0173(97)00061-1.
- [7] S. M. Crain, B. Crain, and E. R. Peterson, "Development of cross-tolerance to 5-hydroxytryptamine in organotypic cultures of mouse spinal cord-ganglia during chronic exposure to morphine," *Life Sci*, vol. 31, no. 3, pp. 241-247, Jul. 1982, doi: 10.1016/0024-3205(82)90584-7.

- [8] B. H. Gähwiler and F. Hefti, "Guidance of acetylcholinesterase-containing fibres by target tissue in co-cultured brain slices," *Neurosci*, vol. 13, no. 3, pp. 681–689, Nov. 1984.
- [9] L. Stoppini, P.-A. Buchs, and D. Muller, "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue," *J. Neurosci. Methods*, vol. 37, no. 2, pp. 173–182, Apr. 1991, doi: 10.1016/0165-0270(91)90128-m.
- [10] P. A. Buchs, L. Stoppini, and D. Muller, "Structural modifications associated with synaptic development in area CA1 of rat hippocampal organotypic cultures," *Brain Res. Dev. Brain Res*, vol. 71, no. 1, pp. 81–91, Jan. 1993, doi: 10.1016/0165-3806(93)90108-m.
- [11] K. Ostergaard, J. P. Schou, and J. Zimmer, "Rat ventral mesencephalon grown as organotypic slice cultures and co-cultured with striatum, hippocampus, and cerebellum," *Exp. Brain Res*, vol. 82, no. 3, Nov. 1990, doi: 10.1007/BF00228796.
- [12] K. Ostergaard, "Organotypic slice cultures of the rat striatum—I. A histochemical and immunocytochemical study of acetylcholinesterase, choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase and GABA," *Neurosci*, vol. 53, no. 3, pp. 679–693, Apr. 1993, doi: 10.1016/0306-4522(93)90616-n.
- [13] B. H. Gähwiler, L. Rietschin, T. Knöpfel, and A. Enz, "Continuous presence of nerve growth factor is required for maintenance of cholinergic septal neurons in organotypic slice cultures," *Neurosci*, vol. 36, no. 1, pp. 27–31, Jan. 1990, doi: 10.1016/0306-4522(90)90348-8.
- [14] R. Robertson, J. Baratta, G. Kageyama, D. Ha, and J. Yu, "Specificity of attachment and neurite outgrowth of dissociated basal forebrain cholinergic neurons seeded on to organotypic slice cultures of forebrain," *Neurosci*, vol. 80, no. 3, pp. 741–752, Jul. 1997, doi: 10.1016/s0306-4522(97)00067-5.
- [15] L. Sundstrom, A. Pringle, B. Morrison, and M. Bradley, "Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS," *Drug Discov*, vol. 10, no. 14, pp. 993–1000, Jul. 2005, doi: 10.1016/S1359-6446(05)03502-6.
- [16] B. Drexler, H. Hentschke, B. Antkowiak, and C. Grasshoff, "Organotypic Cultures as Tools for Testing Neuroactive Drugs – Link Between In-Vitro and In-Vivo Experiments," *Curr. Med. Chem*, vol. 17, no. 36, pp. 4538–4550, Dec. 2010, doi: 10.2174/092986710794183042.
- [17] J. Noraberg, "Organotypic Brain Slice Cultures: An Efficient and Reliable Method for Neurotoxicological Screening and Mechanistic Studies," *ATLA*, vol. 32, no. 4, pp. 329–337, Oct. 2004, doi: 10.1177/026119290403200403.
- [18] M.V. Ravi, K. Joseph, J. Wurm, S. Behringer, N. Garrelfs, P. d'Errico, Y. Naseri, P. Franco, M. Meyer-Leuhmann, R. Sankowski, M.J. Shah, I. Mader, D. Delev, M. Follo, J. Beck, O. Schnell, U.G. Hofmann U.G and D.H. Heiland, "Human organotypic brain slice culture: a novel framework for environmental research in neuro-oncology," *Life Sci. Alliance*, vol. 2, no. 4, e201900305, 2019, doi: 10.26508/lsa.201900305.
- [19] C. L. Croft and W. Noble, "Preparation of organotypic brain slice cultures for the study of Alzheimer's disease," *F1000 Res*, vol. 7, pp. 592, 2018, doi: 10.12688/f1000research.14500.2.
- [20] B. A. Bahr, "Long-term hippocampal slices: A model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes," *J. Neurosci. Res*, vol. 42, no. 3, pp. 294–305, Oct. 1995, doi: 10.1002/jnr.490420303.

- [21] A. Simoni, C. B. Griesinger and F. A. Edwards, “Development of Rat CA1 Neurones in Acute Versus Organotypic Slices: Role of Experience in Synaptic Morphology and Activity,” *J. Physiol*, vol. 550, no. 1, pp. 135–147, Jul. 2003, doi: 10.1113/jphysiol.2003.039099.
- [22] A. İrem Lütfiye, “nAChR $\alpha 7$ 'nin Sinaptik Plastisite Üzerine Etkilerinin Olfaktör Bulbus Ve Hippokampus Organotipik Kesit Kültürlerinde İncelenmesi,” Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, 2018.
- [23] B. Gähwiler, “Organotypic slice cultures: a technique has come of age,” *Trends Neurosci*, vol. 20, no. 10, pp. 471–477, Oct. 1997, doi: 10.1113/jphysiol.2003.039099.
- [24] J. G. Mielke, T. Comas, J. Woulfe, R. Monette, B. Chakravarthy and G.A.R Mealing, “Cytoskeletal, synaptic, and nuclear protein changes associated with rat interface organotypic hippocampal slice culture development.” *Brain Res. Dev. Brain Res*, vol. 160, no. 2, pp. 275–86, 2005, doi: 10.1016/j.devbrainres.2005.09.009.
- [25] K. Duff, W. Noble, K. Gaynor, and Y. Matsuoka, “Organotypic Slice Cultures from Transgenic Mice as Disease Model Systems,” *J Mol Neurosci*, vol. 19, no. 3, pp. 317–320, 2002, doi: 10.1385/JMN:19:3:317.
- [26] J. Norberg, B. W. Kristensen, and J. Zimmer, “Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures,” *Brain Res. Brain Res. Protoc*, vol. 3, no. 3, pp. 278–290, Jan. 1999, doi: 10.1016/s1385-299x(98)00050-6.
- [27] C. L. Croft, H. S. Futch, B. D. Moore, and T. E. Golde, “Organotypic brain slice cultures to model neurodegenerative proteinopathies,” *Mol. Neurodegener*, vol. 14, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13024-019-0346-0.
- [28] M. Finley, D. Fairman, D. Liu, P. Li, A. Wood, and S. Cho, “Functional validation of adult hippocampal organotypic cultures as an in vitro model of brain injury,” *Brain Research*, vol. 1001, no. 1–2, pp. 125–132, Mar. 2004, doi: 10.1016/j.brainres.2003.12.009.
- [29] S. Cho, A. Wood, and M. Bowlby, “Brain Slices as Models for Neurodegenerative Disease and Screening Platforms to Identify Novel Therapeutics,” *Curr Neuropharmacol*, vol. 5, no. 1, pp. 19–33, Mar. 2007, doi: 10.2174/157015907780077105.
- [30] K.H. Adcock, F. Metzger and J.P. Kapfhammer, “Purkinje cell dendritic tree development in the absence of excitatory neurotransmission and of brain-derived neurotrophic factor in organotypic slice cultures,” *Neuroscience*, May 2004, doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.04.032.
- [31] C. Humpel, “Organotypic vibrosections from whole brain adult Alzheimer mice (overexpressing amyloid-precursor-protein with the Swedish-Dutch-Iowa mutations) as a model to study clearance of beta-amyloid plaques,” *Front. Aging Neurosci*, vol. 7, Apr. 2015, doi: 10.3389/fnagi.2015.00047.
- [32] Z. Xiang, S. Hrabetova, S. I. Moskowitz, P. Casaccia-Bonnet, S. R. Young, V. C. Nimmrich, H. Tiedge, S. Einheber, S. Karnup, R. Bianchi, and P. J. Bergold, “Long-term maintenance of mature hippocampal slices in vitro,” *J Neurosci Methods*, vol. 98, no. 2, pp. 145–154, Jun. 2000, doi: 10.1016/s0165-0270(00)00197-7.
- [33] A. Daria, A. Colombo, G. Llovera, H. Hampel, M. Willem, A. Liesz, C. Haass, and S. Tahirovic, “Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia,” *The EMBO J*, vol. 36, no. 5, pp. 583–603, Dec. 2016, doi: 10.15252/embj.201694591.

- [34] H. D. Müller, K. M. Hanumanthiah, K. Diederich, S. Schwab, W.-R. Schäbitz, and C. Sommer, “Brain-Derived Neurotrophic Factor But Not Forced Arm Use Improves Long-Term Outcome After Photothrombotic Stroke and Transiently Upregulates Binding Densities of Excitatory Glutamate Receptors in the Rat Brain,” *Stroke*, vol. 39, no. 3, pp. 1012–1021, Mar. 2008, doi: 10.1161/strokeaha.107.495069.
- [35] E. V. Shanina, C. Redecker, S. Reinecke, T. Schallert, and O. W. Witte, “Long-term effects of sequential cortical infarcts on scar size, brain volume and cognitive function,” *Behav. Brain Res*, vol. 158, no. 1, pp. 69–77, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.bbr.2004.08.007.
- [36] C. Ullrich, N. Daschil, and C. Humpel, “Organotypic vibrosections: Novel whole sagittal brain cultures,” *J Neurosci Methods*, vol. 201, no. 1, pp. 131–141, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.07.021.
- [37] R. A. McKinney, M. Capogna, R. Dürr, B. H. Gähwiler and S. M. Thompson, “Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation,” *Nat Neurosci*, vol. 2, no. 1, pp. 44–49, Jan. 1999, doi: 10.1038/4548.
- [38] L. Stoppini, P. A. Buchs, and D. Müller, “Lesion-induced neurite sprouting and synapse formation in hippocampal organotypic cultures,” *Neurosci*, vol. 57, no. 4, pp. 985–994, Dec. 1993, doi: 10.1016/0306-4522(93)90043-f.
- [39] O. Robain, G. Barbin, T. Billette de Villemeur, L. Jardin, T. Jahchan, and Y. Ben-Ari, “Development of mossy fiber synapses in hippocampal slice culture,” *Brain Res Dev Brain Res*, vol. 80, no. 1–2, pp. 244–250, Jul. 1994, doi: 10.1016/0165-3806(94)90109-0.
- [40] D. Müller, L. Stoppini, C. Wang, and J. Z. Kiss, “A role for polysialylated neural cell adhesion molecule in lesion-induced sprouting in hippocampal organotypic cultures,” *Neurosci*, vol. 61, no. 3, pp. 441–445, Aug. 1994, doi: 10.1016/0306-4522(94)90424-3.
- [41] J. Zimmer and B. H. Gähwiler, “Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata,” *J Comp Neurol*, vol. 228, no. 3, pp. 432–446, Sep. 1984, doi: 10.1002/cne.902280310.
- [42] B.H. Gähwiler, “Morphological differentiation of nerve cells in thin organotypic cultures derived from rat hippocampus and cerebellum,” *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 211, no. 1184, pp. 287–290, Mar. 1981, doi: 10.1098/rspb.1981.0007.
- [43] G. Kempermann, “Why New Neurons? Possible Functions for Adult Hippocampal Neurogenesis,” *J Neurosci*, vol. 22, no. 3, pp. 635–638, Feb. 2002, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00635.2002.
- [44] W. M. O’Connor, B. L. Davidson, M. G. Kaplitt, M. V. Abbey, M. J. During, P. Leone, D. Langer, M. J. O’Connor, and A. Freese, “Adenovirus Vector-Mediated Gene Transfer into Human Epileptogenic Brain Slices: Prospects for Gene Therapy in Epilepsy,” *Exp. Neurol*, vol. 148, no. 1, pp. 167–178, Nov. 1997, doi: 10.1006/exnr.1997.6658.
- [45] R. W. H. Verwer, E. J. G. Dubelaar, W. T. J. M. C. Hermens, and D. F. Swaab, “Tissue cultures from adult human postmortem subcortical brain areas,” *J Cell Mol Med*, vol. 6, no. 3, pp. 429–432, Jul. 2002, doi: 10.1111/j.1582-4934.2002.tb00522.x.
- [46] M. Andersson, N. Avaliani, A. Svensson, J. Wickham, L. H. Pinborg, B. Jespersen, S. H. Christiansen, J. Bengzon, D. P. D. Woldbye, and M. Kokaia, “Optogenetic control of human neurons in organotypic brain cultures,” *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, Apr. 2016, doi: 10.1038/srep24818.

- [47] J. T. Ting, B. Kalmbach, P. Chong, R. de Frates, C. D. Keene, R. P. Gwinn, C. Cobbs, A. L. Ko, J. G. Ojemann, R. G. Ellenbogen, C. Koch, and E. Lein, “A robust ex vivo experimental platform for molecular-genetic dissection of adult human neocortical cell types and circuits,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, May 2018, doi: 10.1038/s41598-018-26803-9.
- [48] N. Schwarz, B. Uysal, M. Welzer, J. C. Bahr, N. Layer, H. Löffler, K. Stanaitis, H. PA, Y. G. Weber, U. B. Hedrich, J. B. Honegger, A. Skodras, A. J. Becker, T. V. Wuttke, and H. Koch, “Author response: Long-term adult human brain slice cultures as a model system to study human CNS circuitry and disease,” *eLife*, Aug. 2019, doi: 10.7554/eLife.48417.