



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**IN VITRO ORTAMDA ELEKTRİKSEL
STİMÜLASYONUN NÖRAL MEMBRAN LİPİT
PLASTİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Aytaç GÜZEL

Fizyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

***IN VITRO* ORTAMDA ELEKTRİKSEL
STİMÜLASYONUN NÖRAL MEMBRAN LİPİT
PLASTİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Aytaç GÜZEL

Danışman : Doç. Dr. Vedat EVREN

Fizyoloji Anabilim Dalı

Fizyoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Vedat EVREN

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Dilek TAŞKIRAN

Üye : Doç. Dr. Mümin Alper ERDOĞAN

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih: 27.01.2022

Önsöz

Gerçekleştirilen tez çalışmasının konusu ilk olarak, epilepsi etiyolojisi üzerine araştırmacıların genellikle odaklandığı protein merkezli yaklaşımın aksine bizim farklı bir bakış açısıyla konuya yaklaşmamız kaynaklı ortaya çıkmıştır. Buna ilaveten, acaba epileptik nöbet benzeri koşulları hücre kültürü üstünde nasıl taklit edebiliriz sorusu çalışmaya son şeklini vermiştir. Bu kapsamda çalışmamızda, nöral hücreler üzerinde elektrik alan stimülasyonları gerçekleştirilmiş ve bunun hücre membran lipit kompozisyonları üzerine olan etkisi ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 22929 proje numarasıyla desteklenmiştir.

İzmir, 13.01.2022

Aytaç GÜZEL

Özet

***In Vitro* Ortamda Elektriksel Stimülasyonun Nöral Membran Lipit Plastisitesi Üzerine Etkileri**

Nöronların uyarılabilirliğindeki değişimler birçok nörolojik hastalığın nedenleri arasında gösterilmektedir. Bunlardan en tipik olanı ise epilepsidir. Epileptogenez bugün bile tam olarak anlaşılamayan ve olasılıkla birden çok etkenin rol aldığı mekanizmalar sonucu kendini göstermektedir. Epilepside gözlenen nöron uyarılabilirliğindeki değişimler, nöbet esnasında nöronların ani ve çok hızlı bir şekilde depolarizasyonuna neden olmaktadır. Buna bağlı olarak, elektriksel alandaki yerel ve şiddetli dalgalanmaların nöron hücre membranlarında plastik değişimlere yol açması olasıdır. Nöron uyarılabilirliğindeki değişimleri açıklamaya çalışan çoğu çalışmada protein yapılı iyon kanalları ve sinaptik bağlantılarla ilişkili plastik değişimler sorumlu tutulmuş ancak bu değişimlerin nedeni tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. Nöron membranının kapasitif özelliği üzerinde etkili olması beklenen plazma mebranının lipit profili ise genellikle araştırmacılar tarafından göz ardı edilmektedir. Dolayısıyla, epileptik nöbet sırasında gözlenen elektriksel alan potansiyel değişimlerinin membran lipit kompozisyonu üzerindeki olası etkilerinin ortaya konulması gerekmektedir. Literatüre bakıldığında, nöronlar üzerinde elektriksel alan oluşturan çalışmalar arasında detaylı lipit analizi gerçekleştiren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ve öngörüler ışığında *in vitro* nöral eksitasyon sırasında oluşan elektriksel alan değişimlerinin, membranın kapasitif özelliğinde belirleyici rol oynayan lipit profilinde değişime neden olacağını hipotez olarak ileri sürmekteyiz. Bu hipotezimiz kapsamında *in vitro* koşullarda oluşturulan pulsatil akım elektrik alan potansiyellerinin (PCEF) membran lipit kompozisyonu üzerindeki etkisinin belirlendiği bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda; *in vitro* stimülasyon yapabilecek ve elektrofizyolojik deneylerde kullanılan Biopac sistemiyle uyumlu deney düzenekleri geliştirilmiş, deney düzenekleri aracılığıyla primer nöron ve SH-SY5Y hücre kültürlerine farklı stimülasyon parametreleri kullanılarak elektriksel stimülasyon uygulanmış ve çalışma sonunda ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle bu hücrelerin membran lipit profilleri analiz edilmiştir. Sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. Farkın anlamlı bulunduğu değişkenlerde

gruplar arası varyansın homojen olması durumunda Post-Hoc yöntem olarak Tukey testi, varyansın gruplar arası homojen olmadığı durumlarda Post-Hoc Dunnett T3 testi uygulanmıştır.

Çalışma sonucunda primer nöronlar ve nöron kökenli SH-SY5Y hücreleri üzerinde oluşturulan elektrik alan potansiyellerinin, her iki hücre tipindeki membran lipid profillerinde değişime yol açtığı gözlenmiştir. Lipid türlerinden özellikle kolesterol ve fosfatidiletanolamin (PE) moleküllerinin elektrik alan stimülasyonuna karşı gösterdikleri yanıtlar önemlidir. Kolesterolün primer nöronlardaki yüksek şiddetli elektrik alan stimülasyonlarında konsantrasyonunun azaldığı, buna karşılık hücre membranındaki PE seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. Yüksek elektrik alan şiddetinde uygulanan nöronların membranlarındaki kolesterol seviyelerinin azalması, hücrenin eksitotoksosite gibi hücre canlılığını tehdit eden olaylara karşı geliştirdiği bir tür savunma mekanizması olabilirken, PE seviyelerinin artması hücrenin, kolesterolün membran eğriliğine yaptığı katkıyı kompanze etmek adına gerçekleştirdiği bir düzenleme olabilir. PCEF uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ise hipokampal ve kortikal nöronlarda ortaya çıkan sonuçlara tamamen zıt bir şekilde artan elektrik alan şiddetine bağlı kolesterol seviyelerinde artış görülmüş ve bu da SH-SY5Y hücrelerinin toksisiteden korunma mekanizması olarak kullandığı kolesterolün burada da hücre canlılığını koruma amaçlı kullanılabileceğini bizlere düşündürmüştür.

Sonuç olarak çalışma hipotezimin temelini oluşturan elektriksel stimülasyona bağlı membran lipid profilinin plastik bir değişim görülmesi önemli fizyolojik etkiler gösterebilecek bir değişimdir ve özellikle hücre uyarılabilirliği kaynaklı deneysel hastalık modellerinde terapötik bir hedef olarak değerlendirilmesi ve bu konuda detaylı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler; elektriksel stimülasyon; membran lipidleri; in vitro teknikler; nöral iletim; epilepsi

Abstract

Effects of In Vitro Electrical Stimulation on Neural Membrane Lipid Plasticity

Changes in the excitability of neurons are among the causes of many neurological diseases. The most typical of these is epilepsy. Epileptogenesis manifests itself as a result of mechanisms that are not fully understood even today and possibly more than one factor having a role in. Changes in neuron excitability observed in epilepsy cause sudden and very rapid depolarization of neurons during seizures. Accordingly, local and severe fluctuations in the electrical field are likely to cause plastic changes in neuron cell membranes. In most studies trying to explain changes in neuron excitability, plastic changes associated with protein-structured ion channels and synaptic connections have been blamed, but the reason for these changes has not been fully elucidated. The lipid profile of the plasma membrane, which is expected to have an effect on the capacitive property of the neuron membrane, is generally ignored by researchers. Therefore, the possible effects of electrical field potential changes observed during epileptic seizures on membrane lipid composition should be revealed. When we look at the literature, there is no study that performs detailed lipid analysis among the studies that create an electrical field on neurons.

In the light of this information and predictions, we hypothesize that the electrical field changes that occur during in vitro neural excitation will cause a change in the lipid profile, which plays a decisive role in the capacitive property of the membrane. Within the scope of this hypothesis, a study was conducted to determine the effect of pulsatile current electric field potentials (PCEF) generated in vitro on membrane lipid composition. In this context, experimental setups compatible with the Biopac system used in electrophysiological experiments were developed, electrical stimulation was applied to primary neuron and SH-SY5Y cell cultures using different stimulation parameters, and at the end of the study, membrane lipid profiles of these cells were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) method.

The results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey test was used as Post-Hoc method in case the variance between groups was homogeneous in

the variables where the difference was significant, and Post-Hoc Dunnett T3 test was used in cases where the variance was not homogeneous between groups.

As a result of the study, it was observed that the electric field potentials created on primary neurons and neuron-derived SH-SY5Y cells to which PCEF was applied caused changes in membrane lipid profiles in both cell types. The responses of lipid species, especially cholesterol and phosphatidylethanolamine (PE) molecules to electric field stimulation are important. It was determined that the concentration of cholesterol in primary neurons decreased in high-intensity electric field stimulation, while the PE levels in the cell membrane increased. While the decrease in cholesterol levels in the membranes of neurons applied at high electric field intensity may be a kind of defense mechanism developed by the cell against events that threaten cell viability such as excitotoxicity, the increase in PE levels may be a regulation that the cell performs to compensate for the contribution of cholesterol to the membrane curvature. In contrast to the results in hippocampal and cortical neurons, cholesterol levels increased due to increased electric field intensity in SH-SY5Y cells treated with PCEF, suggesting that cholesterol, which SH-SY5Y cells use as a protection mechanism from toxicity, can also be used to protect cell viability here.

As a result, a plastic change in the membrane lipid profile due to electrical stimulation, which forms the basis of my working hypothesis, is a change that can have important physiological effects, and it should be evaluated as a therapeutic target especially in experimental disease models originating from cell excitability, and detailed studies should be conducted on this subject.

Keywords; Electric stimulation, membrane lipids, in vitro techniques, neural conduction; epilepsy

İçindekiler

Önsöz	I
Özet.....	II
Abstract.....	IV
İçindekiler	VI
Tablolar Dizini.....	X
Şekiller Dizini	XI
Grafikler Dizini	XIII
Kısaltmalar Dizini	XVI
Giriş	1
Genel Bilgiler	3
2.1. Hücre Membran Yapısı	3
2.1.1. Hücre Membran Lipitleri	4
2.1.1.1. Fosfolipitler	5
2.1.1.1.1. Fosfotidilkolin (Lesitin).....	6
2.1.1.1.2. Fosfotidilserin	6
2.1.1.1.3. Fosfotidiletanolamin.....	7
2.1.1.1.4. Fosfotidilinozitol	7
2.1.1.1.5. Sfingolipitler.....	7
2.1.1.2. Kolesterol	7
2.1.1.3. Lipit Raftlar	8
2.2. Uyarılabilir Hücre Membranları	9
2.2.1. Nöral Hücre Uyarılabilirliği	9
2.2.1.1.Hodgkin-Huxley Modeli.....	11
2.2.1.2. Kapasitans Kavramı ve Nöron Membranın Kapasitör Devre Analogisi	12

2.3. Elektrostatik Kapsamında Elektriksel Alan Kavramı ve Bunun Sinir Sistemindeki Yeri	12
2.4. Patolojik Elektriksel Alanlar ve Epilepsi	13
2.5. Epilepsi, Lipit Tabaka ve Kapasitans İlişkisi	13
2.6. İn Vitro Elektrik Alan Stimülasyon Teknikleri.....	14
Gereç ve Yöntem	16
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	16
3.2. Çalışmanın Genel Tasarımı	18
3.3. Ön Çalışmalar	19
3.3.1. SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücre Kültürü	19
3.3.1.1. Hücrelerin Pasajlanması ve Kültür Kaplarına Ekimi	20
3.3.2. 96'lı Kültür Kabı İçin Tasarlanan Deney Düzenekinin Geliştirilmesi ..	20
3.3.3. Tek Elektrotlu Monopolar Pulsatil Elektriksel Stimülasyonun Uygulanması.....	23
3.3.4. SH-SY5Y Hücre Canlılığı Testleri (MTS).....	27
3.4. Deney Hayvanları ve Primer Nöron Kültürünün Hazırlanması	28
3.4.1. Kültür Kaplarının Poly-L-Lizinle Kaplanması	28
3.4.2. Sıçandan Primer Nöronların Eldesi ve Hücre Kültürü	28
3.5. 6'lı Kültür Kabı İçin Tasarlanan Deney Düzenekinin Geliştirilmesi	31
3.6. Direkt Stimülasyon Metodu ile Hücreler Üzerinde Pulsatil Akım Elektrik Alanın Oluşturulması.....	34
3.7. Membran Lipit Analizi	37
3.7.1. Primer Nöron ve SH-SY5Y Hücre Kültürünün Homojenizasyonu	38
3.7.2. Membran Lipitlerinin Ekstraksiyonu	39
3.7.3. Membran Lipitlerinin HPLC Yöntemi ile Analizi	39
3.8. İstatistiksel Analiz	41
Bulgular.....	42
4.1. Hücre Canlılık Testleri (MTS)	42

4.2. Hücre Kültürünün Stimülasyon Kaynaklı Mikroskopik Bulguları	44
4.2.1. PCEF Sonrası Hipokampus Nöronları.....	44
4.2.2. PCEF Sonrası Korteks Nöronları	45
4.3. Lipit Analizleri.....	45
4.3.1. SH-SY5Y Hücreleri	45
4.3.1.1. Kolesterol Esterleri.....	47
4.3.1.2. Kolesterol	48
4.3.1.3. Fosfatidiletanolamin.....	50
4.3.1.4. Fosfatidilinozitol/Fosfatidilserin	51
4.3.1.5. Fosfatidilkolin	53
4.3.1.6. Sphingomyelin	54
4.3.2. Korteks Nöronları	55
4.3.2.1. Kolesterol Esterleri.....	57
4.3.2.2. Kolesterol	58
4.3.2.3. Fosfatidiletanolamin.....	59
4.3.2.4. Fosfatidilinozitol/Fosfatidilserin	60
4.3.2.5. Fosfatidilkolin	61
4.3.2.6. Sphingomyelin	62
4.3.3. Hipokampus Nöronları	63
4.3.3.1. Kolesterol Esterleri.....	64
4.3.3.2. Kolesterol	65
4.3.3.3. Fosfatidiletanolamin.....	66
4.3.3.4. Fosfatidilinozitol/Fosfatidilserin	67
4.3.3.5. Fosfatidilkolin	68
4.3.3.6. Sphingomyelin	69
Tartışma	71
Sonuç ve Öneriler	79

Kaynaklar	81
Ekler	88
Ek-1.....	88
Ek-2.....	89
Teşekkür	90
Özgeçmiş	91



Tablolar Dizini

Tablo 1. Membran lipit türleri.....	5
Tablo 2. SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı parametrelerdeki monopolar elektriksel stimülasyon değerleri (Plate 1).....	25
Tablo 3. SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı parametrelerdeki monopolar elektriksel stimülasyon değerleri (Plate 2).....	26
Tablo 4. SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı parametrelerdeki monopolar elektriksel stimülasyon değerleri (Plate 3).....	27
Tablo 5. Hipokampal nöron gruplarına uygulanan pulsatil akım elektrik alan stimülasyon parametreleri.....	35
Tablo 6. Korteks nöron gruplarına uygulanan pulsatil akım elektrik alan stimülasyon parametreleri.....	36
Tablo 7. SH-SY5Y A grubu hücrelerine uygulanan pulsatil akım elektrik alan stimülasyon parametreleri.....	37
Tablo 8. SH-SY5Y B grubu hücrelerine uygulanan pulsatil akım elektrik alan stimülasyon parametreleri.....	37
Tablo 9. Ters faz sistemi kullanılarak lipid ekstraktları için uygulanan HPLC koşulları.....	40
Tablo 10. Membran lipit türlerinin HPLC ölçüm sıraları ve ölçüm zaman aralıkları.....	40

Şekiller Dizini

Şekil 1. Akıcı mozaik zar modeli.....	3
Şekil 2. Lipit miselleri ve fosfolipit çift tabaka	4
Şekil 3. Lipit membran faz geçişleri.	4
Şekil 4. Fosfolipitlerin genel yapısı	6
Şekil 5. Kolesterol yapısı ve lipit çift tabakadaki lokasyonu.....	8
Şekil 6. Bir multipolar nöron	9
Şekil 7. Memeli nöronlarında transmembran aksiyon potansiyeli ve aşamaları.	10
Şekil 8. Nöronal hücre membran yapısının elektriksel devre karşılıkları.....	11
Şekil 9. Nöron membranının, bir kapasitör devresiyle analogik olarak karşılaştırması.	12
Şekil 10. Farklı kalınlıktaki nöral membranlar ve bunların kapasitans farklılıkları. .	14
Şekil 11. Elektriksel stimülasyon iletim metotları	15
Şekil 12. 96 kuyucuklu kültür kabı için geliştirilmiş olan deney düzeneğinin ön tasarımı.	21
Şekil 13. Tasarlanan deney düzeneğinin yapım aşamaları.	22
Şekil 14. Tasarlanan deney düzeneğinin son hali ve Biopac sistemiyle entegrasyonu.	22
Şekil 15. Monopolar elektrik stimülasyon mekanizması ve oluşan elektrik alanın temsili gösterimi.....	23
Şekil 16. İnkübatör içerisindeki SH-SY5Y hücrelerine uygulanan stimülasyon anına ait bir görsel.....	24
Şekil 17. SH-SY5Y Plate 2- Grup 9 hücrelerinin stimülasyon dalgaları.....	24
Şekil 18. Dekapitasyon işlemi ve beyin dokusu eldesinin gerçekleştirildiği stereomikroskop altındaki çalışma ortamı	29
Şekil 19. Stereomikroskop altındaki mikrodiseksiyon işlemleri.	29
Şekil 20. Hücrelerin kültür kaplarına ekim işlemi.	30
Şekil 21. Primer hipokampal nöron hücreleri (<i>in vitro</i> 2. gün).....	31
Şekil 22. 6 kuyucuklu kültür kabı için geliştirilmiş deney düzeneğinin ön tasarımı.	32
Şekil 23. Deney düzeneği yapım aşamaları	32
Şekil 24. Deney düzeneğini oluşturan elektrotlarının farklı açılardan görüntüsü.	33
Şekil 25. Deney düzeneği ve Biopac sisteminin entegre hali.	33
Şekil 26. Deney aşamaları.....	34

Şekil 27. Plate 2 (Kortikal Nöronlar) – Grup 5 stimülasyon dalgaları.	36
Şekil 28. Homojenizasyon işlemi	39
Şekil 29. PCEF stimülasyonu gerçekleştirilen hipokampal nöronların uygulama sonrasındaki invert mikroskop görüntüleri	44
Şekil 30. PCEF stimülasyonu gerçekleştirilen korteks nöronlarının uygulama sonrasındaki invert mikroskop görüntüleri	45
Şekil 31. PCEF sonrası SH-A grubu hücreleri kontrol grubuna ait lipid kromatogramı.	46
Şekil 32. PCEF sonrası SH-A grubu hücreleri 60 V/m - 1 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.	46
Şekil 33. PCEF sonrası SH-A grubu hücreleri 400 V/m - 1 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.	46
Şekil 34. PCEF sonrası korteks nöronları kontrol grubuna ait lipid kromatogramı. ..	55
Şekil 35. PCEF sonrası korteks nöronları 60 V/m - 1 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.	56
Şekil 36. PCEF sonrası korteks nöronları 200 V/m - 20 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.	56
Şekil 37. PCEF sonrası hipokampus nöronları kontrol grubuna ait lipid kromatogramı.	63
Şekil 38. PCEF sonrası hipokampus nöronları 200 V/m - 20 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.	63
Şekil 39. PCEF sonrası hipokampus nöronları 200 V/m – 50 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.	64

Grafikler Dizini

Grafik 1. Farklı parametrelerde uygulanan stimölasyonların hücre proliferasyonuna olan etkileri (Plate 1).....	42
Grafik 2. Farklı parametrelerde uygulanan stimölasyonların hücre proliferasyonuna olan etkileri (Plate 2).....	43
Grafik 3. Farklı parametrelerde uygulanan stimölasyonların hücre proliferasyonuna olan etkileri (Plate 3).....	43
Grafik 4. SH-SY5Y A grubu hücrelerin kolesterol esterleri (CE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiğı.	47
Grafik 5. SH-SY5Y B grubu hücrelerin kolesterol esterleri (CE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiğı.	47
Grafik 6. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları CE konsantrasyonlarının gruplara göre değışimini gösteren plot grafiğı.	48
Grafik 7. SH-SY5Y A grubu hücrelerin kolesterol (Cholesterol - C) membran konsantrasyonunun yüzde grafiğı.	48
Grafik 8. SH-SY5Y B grubu hücrelerin kolesterol (C) membran konsantrasyonunun yüzde grafiğı.....	49
Grafik 9. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları C konsantrasyonlarının gruplara göre değışimini gösteren plot grafiğı.	49
Grafik 10. SH-SY5Y A grubu hücrelerin fosfotidiletanolamin (PE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiğı.	50
Grafik 11. SH-SY5Y B grubu hücrelerin fosfotidiletanolamin (PE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiğı.	50
Grafik 12. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları PE konsantrasyonlarının gruplara göre değışimini gösteren plot grafiğı.	51
Grafik 13. SH-SY5Y A grubu hücrelerin fosfotidilinozitol/serin (PI/PS) membran konsantrasyonunun yüzde grafiğı.	51
Grafik 14. SH-SY5Y B grubu hücrelerin fosfotidilinozitol/serin (PI/PS) membran konsantrasyonunun yüzde grafiğı.	52
Grafik 15. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları PI/PS konsantrasyonlarının gruplara göre değışimini gösteren plot grafiğı.	52
Grafik 16. SH-SY5Y A grubu hücrelerin fosfotidilkolin (PC) membran konsantrasyonunun yüzde grafiğı.	53

Grafik 17. SH-SY5Y B grubu hücrelerin fosfatidilkolin (PC) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	53
Grafik 18. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları SP konsantrasyonlarının gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	54
Grafik 19. SH-SY5Y A grubu hücrelerin sfingomiyelin (SP) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	54
Grafik 20. SH-SY5Y B grubu hücrelerin sfingomiyelin (SP) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	55
Grafik 21. Korteks nöronlarının kolesterol esterleri (CE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	57
Grafik 22. PCEF sonrası korteks nöronları CE konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	57
Grafik 23. Korteks nöronlarının kolesterol (C) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	58
Grafik 24. PCEF sonrası korteks nöronları C konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	58
Grafik 25. Korteks nöronlarının fosfatidiletanolamin (PE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	59
Grafik 26. PCEF sonrası korteks nöronları C konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	59
Grafik 27. Korteks nöronlarının fosfatidilinozitol/serin (PI/PS) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	60
Grafik 28. PCEF sonrası korteks nöronları PI/PS konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	60
Grafik 29. Korteks nöronlarının fosfatidilkolin (PC) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.....	61
Grafik 30. PCEF sonrası korteks nöronları PC konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	61
Grafik 31. Korteks nöronlarının sfingomiyelin (SP) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.....	62
Grafik 32. PCEF sonrası korteks nöronları SP konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	62
Grafik 33. Hipokampus nöronlarının kolesterol esterleri (CE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	64

Grafik 34. PCEF sonrası hipokampus nöronları CE konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	65
Grafik 35. Hipokampus nöronlarının kolesterol membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	65
Grafik 36. PCEF sonrası hipokampus nöronları C konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	66
Grafik 37. Hipokampus nöronlarının fosfotidiletanolamin (PE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	66
Grafik 38. PCEF sonrası hipokampus nöronlarının PE konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	67
Grafik 39. Hipokampus nöronlarının fosfotidilinozitol/serin (PI/PS) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	67
Grafik 40. PCEF sonrası hipokampus nöronlarının PI/PS konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	68
Grafik 41. Hipokampus nöronlarının fosfotidilkolin (PC) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	68
Grafik 42. PCEF sonrası hipokampus nöronlarının PC konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	69
Grafik 43. Hipokampus nöronlarının sfingomiyelin (SP) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.	69
Grafik 44. PCEF sonrası hipokampus nöronlarının PC konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.	70

Kısaltmalar Dizini

CE; Kolesterol esterleri

C; Kolesterol

PC; Fosfotidilkolin

PS; Fosfotidilserin

PE; Fosfotidiletanolamin

PI; Fosfotidilinozitol

PLC; Fosfolipaz C

PIP₂; Fosfotidilinozitolbifosfat

DAG; Diaçilgliserol

GPI; Glikozilfosfotidilinozitol

mV; Milivolt

Na⁺; Sodyum iyonu

K⁺; Potasyum iyonu

Ca²⁺; Kalsiyum iyonu

Cl⁻; Klor iyonu

EEG; Elektroensefalografi

LFP; Lokal alan potansiyeli

DCEF; Direkt akım elektrik alan

ACEF; Alternatif akım elektrik alan

PCEF; Pulsatil akım elektrik alan

BCEF; Bifazik akım elektrik alan

SH-SY5Y; İnsan nöroblastoma hücre hattı

HPLC; Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

PBS; Fosfat tampon solüsyonu

FBS; Fetal sığır serumu

DMEM; Dulbecco Modifiye Eagle Besi Vasatı

PMS; Fenazin Metasülfat

MTS; (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3- karboksimetoksifenil)- 2-(4 -sulfofenil)-2H-tetrazolyum

rpm; Dakikadaki devir sayısı

UV; Mor ötesi

P₀; Yenidoğan

Rt; Alıkonma Zamanı

LPE; Lizofosfotidiletanolamin

GPCR; G proteiniyle eşleşmiş reseptör

ApoE; apolipoprotein E

Giriş

Nöronların uyarılabilirliğindeki değişimler birçok hastalığın nedenleri arasında gösterilmektedir. Bunlardan en tipik olanı ise epilepsidir. Epilepside gözlenen nöron uyarılabilirliğindeki değişimler, nöbet esnasında nöronların ani ve çok hızlı bir şekilde depolarizasyonuna neden olmaktadır. Nöronlardaki bu değişime sebep olan mekanizma halen tam olarak çözülememekle birlikte epileptogenez genellikle protein yapılı kanallar ve sinaptik bağlantılar ile açıklanmaya çalışılmış, nöron hücre membranının elektriksel özellikleri üzerinde önemli bir rol oynayan lipid kompozisyonları üzerinde çok fazla durulmamıştır.

Fosfolipit çift tabaka, nöral hücre membranının en önemli pasif elektriksel özelliklerinden biri olan kapasitans kavramının temelini oluşturmaktadır. Kapasitans, hücre membranının üzerinde bulundurabildiği yük miktarı anlamına gelmektedir. Lipit tabakada gerçekleşen herhangi bir değişimin hücre membranının kapasitansında dolayısıyla da hücre uyarılabilirliği üzerinde bir değişikliğe yol açması kaçınılmazdır. Epilepside gözlenen nöron uyarılabilirliğindeki değişimler sonucu ortaya çıkan elektrik alan potansiyellerinin de nöron membranında olası birçok değişime sebep olması, membranın lipid plastisitesinde de değişikliklere yol açma ihtimalini güçlendirmektedir.

Bu temel bilgiler ışığında, epileptik nöbet esnasında meydana gelen elektriksel alan potansiyellerinin membran lipid profili üzerinde ne gibi etkiler oluşturduğunun ortaya konmasına ihtiyaç vardır. Bu çerçevede hipotezimizi ve araştırma sorularımızı şu şekilde belirledik.

Hipotez

İn vitro nöral eksitasyon esnasında oluşan elektriksel alan değişimleri, membranın kapasitif özelliğinde belirleyici rol oynayan membran lipid profilinde değişime neden olur.

Araştırma Soruları

- I. Bir nöral devrede elektriksel alan potansiyellerindeki değişimlerin, membranın kapasitif özelliğinde belirleyici rol oynayan lipid kompozisyonu üzerinde bir etkisi var mıdır?
- II. Epileptik nöbet şartlarını taklit eden in vitro deney modelinde oluşturulan elektriksel stimülasyonun, epileptiform benzeri aktivitenin kronikleşmesinde etkisi var mıdır?
- III. Uygulanan in vitro elektriksel stimülasyonunun frekans ve şiddetinde gerçekleştirilen değişimler bu etkide nasıl bir rol oynamaktadır?

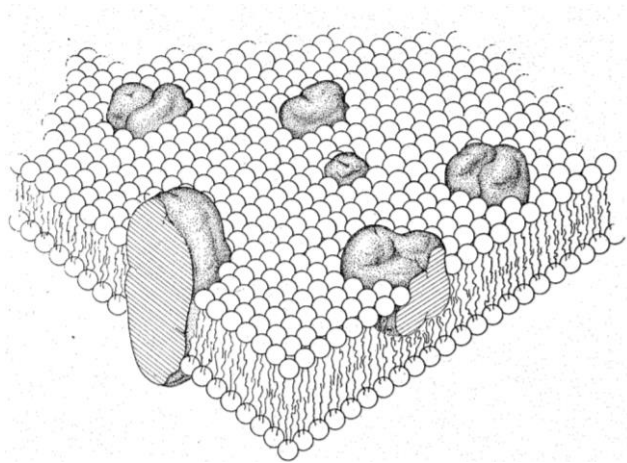
Bu noktada, yürütülen tez çalışması ile in vitro şartlarda oluşturulan epileptik nöbet benzeri aktivite esnasında meydana gelen elektriksel alan değişimlerinin membran lipid kompozisyonu üzerindeki etkisinin belirlenip, oluşturulan bu potansiyellerin frekans ve şiddetindeki farklılıkların etki düzeyinde nasıl bir rol oynadığının ortaya konulması ve membran lipid profilindeki olası değişimlerin varlığında membran lipidlerinin, epilepsi tedavisinde kullanılan mevcut farmakolojik hedeflere alternatif yeni bir potansiyel terapötik hedef olarak sunulabilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanında çalışmamızın kapsamı genişletilerek tüm bu uygulamaların nöral hücre kökenli insan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y hücre hattı) üzerinde de ne gibi etkiler gösterebileceğinin ortaya konulması hedeflenmektedir.

Genel Bilgiler

2.1. Hücre Membran Yapısı

Hücre membranı, prokaryot ve ökaryot hücreler farketmeksizin bütün canlı hücrelerde bulunan, hücrenin iç yapısını çevreleyen ve hücrenin dış ortamla ilişkisini belirleyen en önemli hücresel yapılardan biridir. Bulundurduğu molekül çeşitliliğine göre farklı özellikler gösteren esnek ve dinamik bu yapı; hücrenin yapısal olarak korunması, dış çevreyle olan madde alışverişinin sağlanması, sinyal iletimi ve diğer hücrelerle olan iletişim gibi birçok farklı temel fonksiyonlara sahiptir.

Bugün kabul edilen ve geçerliliğini halen koruyan Singer-Nicholson'ın akıcı-mozaik zar modeline göre membran, çoğunlukla akışkan iki katmanlı fosfolipit tabakadan ve bu tabaka içerisinde hareketli globüler integral membran proteinleri ve glikoproteinlerden oluşmuş bir matriks şeklindedir. Bunun yanında membran dinamik bir yapıda ve içerisindeki mozaik şeklinde dağılmış lipit ve proteinler devamlı bir hareket halindedir (Singer and Nicolson 1972).

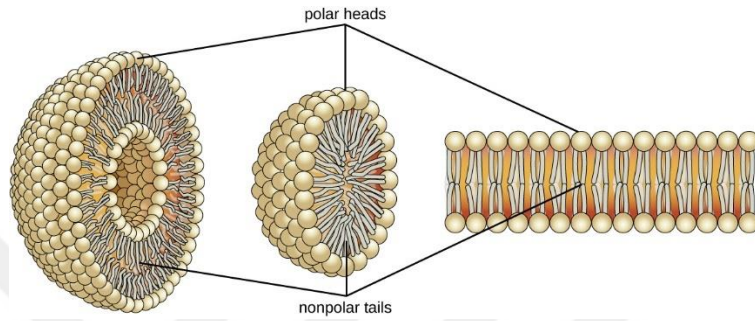


Şekil 1. Akıcı mozaik zar modeli (Singer and Nicolson 1972).

Özellikle fosfolipitler; lateral difüzyon, rotasyon, transvers difüzyon (flip-flop) ve fleksiyon hareketleriyle bunu güçlü bir biçimde yansıtırlar. Hücre membranının fonksiyonunu belirleyen en önemli etken ise proteinlerdir. Hücre membranlarındaki protein farklılıkları o membranın özgün fonksiyonlar göstermesine neden olur.

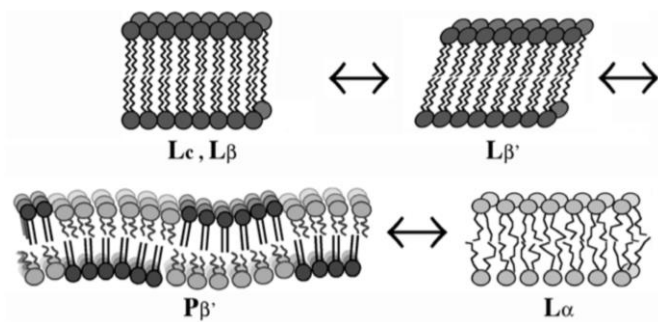
2.1.1. Hücre Membran Lipitleri

Hücre membran lipitleri polar bir baş grup ve apolar bir hidrokarbon zincir içeren amfipatik yapıdaki lipitlerdir. Lipitlerin genellikle yüklü bir grup barındıran baş kısmı hidrofilik özellik gösterirken, hidrokarbon zincir barındıran kuyruk kısmı ise hidrofobik özellik göstererek su ile etkileşime girmemektedir.



Şekil 2. Lipit miselleri (solda) ve fosfolipit çift tabaka (sağda).

Lipit moleküllerinin amfipatik özellik göstermeleri lipitlerin sıvı ortamlarda spontan bir şekilde bir araya gelmelerine neden olmaktadır. Bu bir araya geliş hidrofob kısımların sudan kaçıp iç kısma doğru yönelirken, hidrofilik kısmın su ile etkileşime girmek üzere dış kısma yönelmesi şeklindedir. Hidrofob kısımların bir araya gelmesi ile açığa çıkan su, entropiyi artırarak hidrokarbon zincirlerin arasında çok sayıda nonkovalan van der Waals bağlarının oluşmasına yol açar.



Şekil 3. Lipit membran faz geçişleri. Sıcaklık arttıkça L_c fazından diğer fazlara doğru (sırasıyla $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ ve L_{α}) zincir düzeninde azalma azalma meydana gelir (Heimburg 2007).

Bu yolla silindirik fosfolipit moleküllerinin su ortamında çift tabaka, konik lipit moleküllerinin ise misel oluşturma eğilimi termodinamik (enerjitik) açıdan en uygun olan yapılardır. Ancak miseller daha yüksek lipit konsantrasyonları varlığında lamellar fazlara geçerek çift tabaka oluşturmaya başlarlar. Birçok farklı lamellar faz bulunmakla birlikte bu faz değişiklikleri genellikle sıcaklık tarafından belirlenir (Janiak, Small, and Shipley 1979). L_c , L_{β} , P_{β} ve L_{α} adlı bu fazlar Şekil 3'te gösterilmektedir.

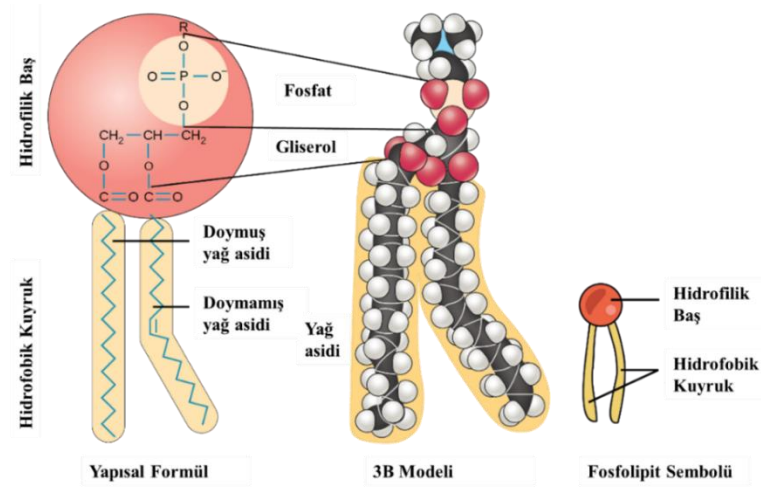
Hücre membranını oluşturan lipit türlerine bakıldığında başlıca üç sınıf karşımıza çıkar. Bunlar Tablo 1'de de gösterilen fosfolipitler, glikolipitler ve kolesteroldür.

MEMBRAN LİPİTLERİ		
1. Fosfolipitler	2. Kolesterol	3. Glikolipitler
Fosfatidilkolin		Gangliozidler
Sfingomiyelin		Serebrozidler
Fosfatidilserin		
Fosfatidiletanolamin		
Fosfatidilinozitol		
Fosfatidilgliserol		
Kardiyolipin		

Tablo 1. Membran lipit türleri.

2.1.1.1. Fosfolipitler

Hücre membranında bulunan lipitlerin çok büyük bir kısmını fosfolipitler oluşturur. Membran üzerinde kısmi asimetri gösteren fosfolipitlerin diğer lipitlerde olduğu gibi hidrofilik bir baş ve hidrofobik bir kuyruk bölgesi bulunmaktadır. Hidrofilik baş kısmını oluşturan yapılar genellikle bir fosfat molekülü, bir gliserol/sfingozin ve bir de kolin/serin/etanolamin/inozitol grubu içermektedir ve içerdiği molekül çeşidine göre lipitin türünü belirlemektedir. Fosfolipitlerin genel yapısı Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Fosfolipitlerin genel yapısı (Alberts 2015).

Fosfolipitler, fosfogliserit ve sfingolipitler olarak iki temel sınıfa ayrılırlar. Bunlardan gliserol molekülü içeren fosfogliseritler, sfingozin molekülü içeren ise sfingolipitler adı verilmektedir.

2.1.1.1.1. Fosfatidilkolin (Lesitin)

Memeli hücre membranlarında en çok bulunan fosfogliseritlerden biri olan fosfatidilkolin (phosphatidylcholine-PC) membran ağırlığının yaklaşık olarak %50'sini oluşturmaktadır (Berg et al. 2015; Stillwell 2016). Membranda en çok bulunan fosfolipit türlerinden biri olan fosfatidilkolin, çoğunlukla membranın dış yaprağında yer almaktadır (Devaux 1991; Stillwell 2016).

2.1.1.1.2. Fosfatidilserin

Memeli hücre membranlarında yaygın olarak bulunan bir diğer fosfogliserit türü olan fosfatidilserin, memeli fosfolipitlerinin %10'unu oluşturmakta ve genellikle hücre membranının iç yaprağında bulunmaktadır. Fosfatidilserin (phosphatidylserine-PS), fosfatidilinozitol ile birlikte fosfolipitler arasında en fazla fonksiyonel çeşitliliğe sahip ve en dinamik lipid türlerinin başında gelmektedir (Stillwell 2016).

2.1.1.1.3. Fosfotidiletanolamin

Fosfotidiletanolamin (phosphatidylethanolamine-PE), hücre membranının iç yaprağında en çok bulunan fosfolipit türlerinin başında gelmektedir (Berg et al. 2015). PE birçok farklı hücrede bulunmasına rağmen başlıca beyin ak maddesi (beyaz cevher), sinirler ve omurilik gibi nöral dokuda görülmektedir (Stillwell 2016).

2.1.1.1.4. Fosfatidilinozitol

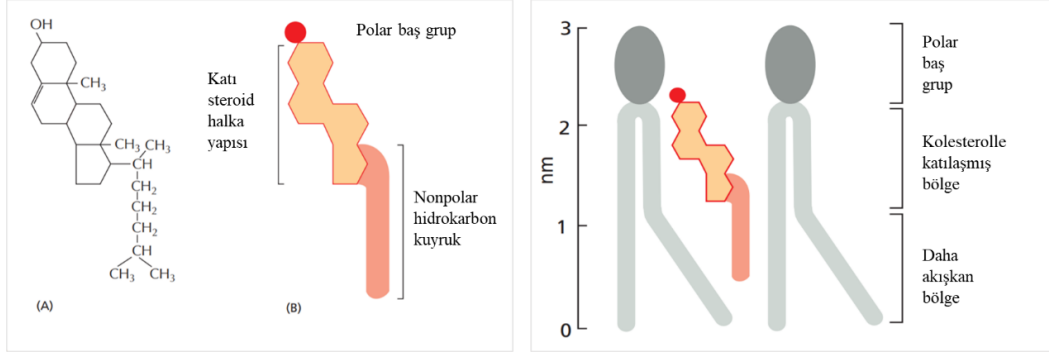
Anyonik bir molekül olan fosfatidilinozitol (phosphatidylinositol-PI), membranın negatif yükle yüklenmesine katkı sağlayan ve membranın iç yaprağında bulunan fosfolipit türlerinden bir tanesidir. Tüm doku ve hücrelerde bulunan PI, total fosfolipitin %10'luk bir kısmını oluşturmaya rağmen beyindeki miktarı diğer doku ve organlara göre çok daha yüksektir (Stillwell 2016).

2.1.1.1.5. Sfingolipitler

Moleküler temelinde gliserol yerine sfingozin molekülü bulunduran fosfolipitler, sfingolipitler olarak adlandırılır. Sfingolipitlerin tüm ökaryotik hücre membranlarında bulunmasının yanında konsantrasyon seviyesinin en yüksek olduğu yerin merkezi sinir sistemi olduğu bilinmektedir (Berg et al. 2015). Sfingolipitlerin en sık karşılaşılan türü ise sfingomiyelindir (Alberts 2015).

2.1.1.2. Kolesterol

Kolesterol üç ana membran lipitinin ikinci sınıfını oluşturan bir sterol türüdür. Yapısında 4 rijit halka yapısı, bu halkaya bağlı polar hidroksil grup ve kısa nonpolar hidrokarbon zinciri bulunmaktadır (Şekil 5). Kolesterolün membran üzerindeki yerleşimi fosfolipitin yağ asidi zincirleriyle paralel şekilde bulunmakta ve hidroksil grubu fosfolipitin baş kısmıyla etkileşmektedir (Berg et al. 2015).



Şekil 5. Kolesterol yapısı ve lipid çift tabakadaki lokasyonu (Alberts 2015).

Hücre membranlarındaki kolesterol miktarı her fosfolipit molekülüne karşılık bir kolesterol molekülü gelecek kadar çok yoğun miktardadır (Alberts 2015). İnsan vücudundaki kolesterolün en yüksek bulunduğu yerin ise beyin olduğu ve buradaki kolesterol oranının, tüm kolesterolün yaklaşık %20'sini oluşturduğu bilinmektedir (Björkhem, Meaney, and Fogelman 2004).

Fosfolipitlerle sıkı ilişkiler içinde olan kolesterollerin hücre membranındaki temel fonksiyonları olarak; mekanik güç sağlaması, faz davranışlarının kontrolü ve lateral organizasyon ve stabilizasyonun desteklenmesi sayılabilir (Stillwell 2016). Bunun yanında kolesterollerin membran kalınlığı, intrinsik membran eğriliği ve su penetrasyonu üzerinde de birçok etkisi bulunmaktadır (Yang et al. 2016). Kolesterolün en önemli fonksiyonu ise hücre akışkanlığı üzerindeki oynadığı belirleyici roldür.

2.1.1.3. Lipit Raftlar

Canlıların hücre membranlarına bakıldığında lipid ve proteinler hiçbir zaman homojen bir şekilde dağılım göstermezler. Bu moleküller, yapıları gereği sıklıkla küçük kümeler oluşturma eğilimindedir. Oluşan bu tarz yapılar genellikle mikrodomainer olarak ifade edilir (Karnovsky et al. 1982). Lipit raftlar ise kolesterol ve sfingolipitlerce zengin ve içerisinde özellikle sinyal ile ilişkili proteinlerin bulunduğu 10-200 nm boyutundaki dinamik lipid mikrodomaineridir (Berg et al. 2015; Bradshaw and Dennis 2010; Brown 2006). Lipit raftların en önemli ve şu ana kadar en net ortaya konulmuş fonksiyonu sinyalleşmede aldığı roldür (Anderson 1998; Brown 2006, 2013; Simons and Ikonen 1997). Bunun yanında lipid raftların membranda yer

aldıkları bölgelerin kalınlığını arttırdığının bilinmesi, membranın kapasitans özelliği üzerinde de etkili olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir.

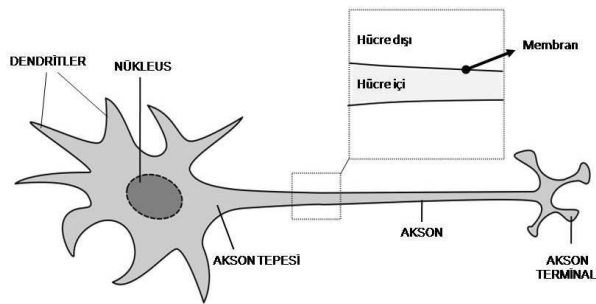
2.2. Uyarılabilir Hücre Membranları

Tüm vücut hücrelerinin bir dinlenme membran potansiyeli bulunmaktadır. Bu membran potansiyelinin kaynağı ise temelde hücre içi ve hücre dışı arasındaki maddelerin (elektrik yüklü iyonlar) konsantrasyon farklılığından kaynaklanmaktadır. Ancak tüm hücrelerin bir dinlenme potansiyeli olmasına rağmen bu potansiyeller her hücrede kolaylıkla değiştirilemez. Dinlenme membran potansiyeli değiştirilebilen hücreler ise elektriksel açıdan uyarılabilir hücreler olarak ifade edilmektedir.

Vücudumuzda bulunan en temel uyarılabilir hücreler sinir ve kas hücreleridir. Ancak bunun yanında bazı endokrin, bağışıklık ve üreme sistemi hücreleri de uyarılabilir hücreler olarak kabul edilmektedir.

2.2.1. Nöral Hücre Uyarılabilirliği

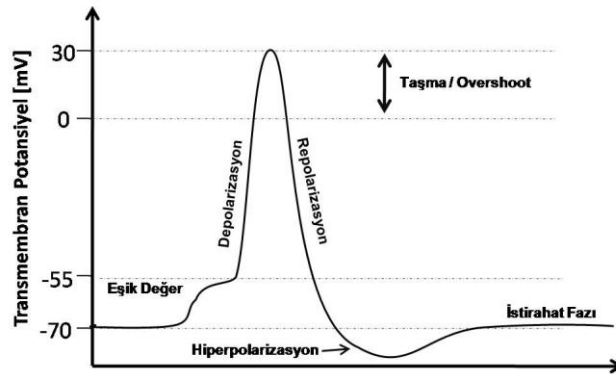
Nöronlar, bulundukları bölgelerde elektriksel sinyalleri çok hızlı iletebilmek için özelleşmiş yapılara sahip sinir sistemi hücreleridir. Bir nöron temel olarak hücre gövdesi (soma), dendritler ve aksondan oluşmaktadır (Şekil 6).



Şekil 6. Bir multipolar nöron. Bir nöronun fiziksel yapısı gövde (soma), dendritler ve aksondan oluşur. Nöron ayrıca makroskopik olarak iki kompartmanın etkileşimi olarak düşünülebilir. Bunlar sitoplazmik (hücre içi) sıvı ve nöronu çeviren dış ortamdır (hücre dışı).

Nöronlarda diğer vücut hücreleri gibi bir dinlenme membran potansiyeline sahiptir ve bu değer nöronlarda -70 milivolttur (mV) (Tamagawa 2019). Bu potansiyelin oluşumu ise membranda bulunan çeşitli iyon kanalları ve transporterler aracılığıyla (uniporter, kotransporter ve pompalar) gerçekleşen iyonların hareketinden kaynaklanmaktadır (Chrysafides, Bordes, and Sharma 2021). Dinlenme membran potansiyelinde temel rol oynayan kanal ve pompaların başında K^+ , Na^+ ve Cl^- 'a geçirgen sızıntı kanalları ve Na^+-K^+ ATPaz pompası gelmektedir. Bu kanal ve pompalar aracılığıyla dinlenme membran potansiyelini en çok etkileyen iyonlar ise K^+ ve Na^+ iyonlarıdır. Nöronların dinlenme membran potansiyellerinin değiştirilmesi yine nöron membranında bulunan özelleşmiş iyon kanalları aracılığıyla sağlanmaktadır. Bunlar ligand kapılı ve voltaj kapılı iyon kanallarıdır. Ligand kapılı iyon kanalları genellikle dendrit ve hücre gövdesinde, voltaj kapılı iyon kanalları ise aksonlarda bulunmaktadır.

Şekil 7’de nöronlarda gerçekleşen bir aksiyon potansiyeli görülmektedir. Artmış Na^+ kanal geçirgenliği hücre içi potansiyeli artırarak hücreyi depolarize eder. Depolarizasyon eşik değerine ulaştığında voltaj bağımlı iyon kanalları açılarak daha fazla Na^+ girişine yol açar ve hücreyi daha da depolarize eder.



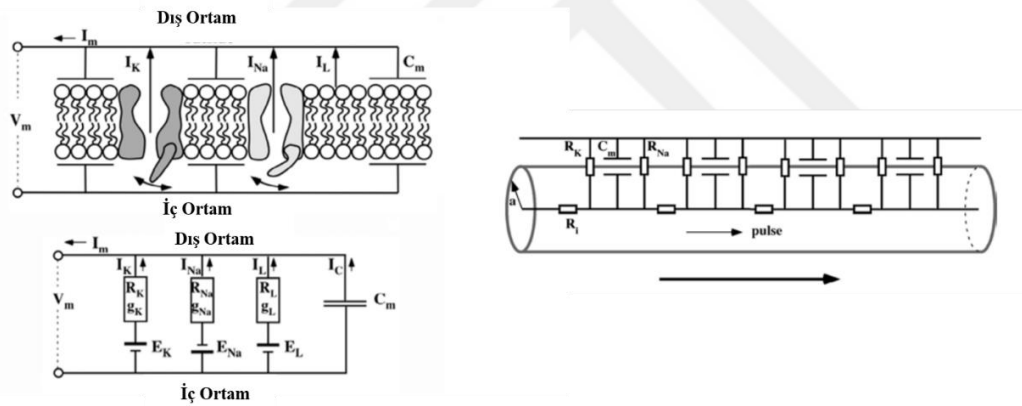
Şekil 7. Memeli nöronlarında transmembran aksiyon potansiyeli ve aşamaları.

Aksiyon potansiyel sırasında hızlı Na^+ içe akışı ile oluşan depolarizasyon dalgasını, hücre dışına K^+ çıkışının neden olduğu repolarizasyon dalgası takip eder. Değişen Na^+ ve K^+ konsantrasyon gradienti, $Na^+ - K^+$ ATPaz membran pompasının ATP aracılı aktivitesiyle başlangıç durumuna getirilerek dinlenme fazına dönlür.

2.2.1.1.Hodgkin-Huxley Modeli

Günümüzde kabul edilen aksiyon potansiyelinin nöral hücre membranı üzerindeki yayılım modeli Hodgkin ve Huxley adlı araştırmacılar tarafından oluşturulmuştur (Hodgkin and Huxley 1952). Bu modelin temelini ise protein yapılı iyon kanalları oluşturmaktadır. Bu iyon kanalları zaman ve voltaj bağımlı olarak açılıp kapanırlar ve farklı iyonların selektif geçirgenliklerinde önemli rol oynarlar. İyonlar bu kanallardan elektrokimyasal gradyan yönünde geçtikleri zaman membranın diğer tarafında voltaj değişikliklerine neden olur ve membran yüzeyinin elektriksel yükü değişir (Heimburg 2007)

Bu modelde membran lipit çift katmanı $C_m \approx 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ kapasitansına sahip bir kapasitör olarak kabul edilmektedir . Bu hücreyel yapılar Şekil 8’de görüldüğü üzere elektriksel devre yapısına aktarılmıştır.

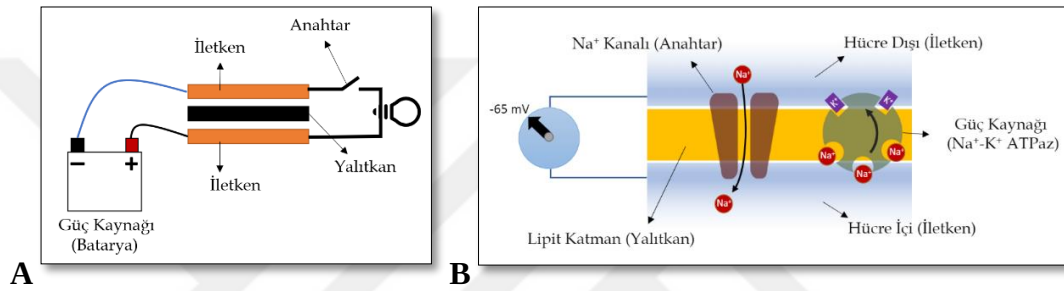


Şekil 8. Nöronal hücre membran yapısının elektriksel devre karşılıkları (Heimburg 2007).

İyonlar tarafından oluşturulan elektriksel akımın membran üzerinde yayılımı ise Şekil 8’in sağ kısmında gösterilmiştir ve kısaca şöyle özetlenebilir: Uzun nöron membranı (akson) boyunca çok sayıda sodyum ve potasyum kanalları homojen bir şekilde yayılım göstermekte, bu kanallar elektriksel bir uyarının ardından lokal olarak açılmakta ve ortamın elektriksel potansiyelinde bir değişiklik yaratarak civarındaki diğer kanallarının açılmasını sağlamaktadır. Böylece bir elektriksel ileti tüm membran boyunca yayılım gösterebilmektedir.

2.2.1.2. Kapasitans Kavramı ve Nöron Membranının Kapasitör Devre Analojisi

Hodgkin-Huxley modeli göz önünde bulundurulduğunda nöron membranı ile elektrik devresinde bulunan bir kapasitör arasında fonksiyonel olarak bir analogi kurulabilmektedir. Kapasitörler iki iletken katman arasında yalıtkan bir ortamın yer aldığı ve iletken katmanların güç kaynağı sayesinde şarj edilebildiği devre elemanlarıdır. Aslında nöronun membranı da bir kapasitöre benzemektedir. Burada hücre içi ve hücre dışı ortam iki iletken katmanı, membranın lipid kısmı ise arada bulunan yalıtkan ortamı temsil eder (Şekil 9).



Şekil 9. Nöron membranının, bir kapasitör devresiyle analojik olarak karşılaştırması. **A** bir elektrik devresini, **B** ise doğal bir elektriksel devre olarak görülen nöron membranının temel yapısını göstermektedir.

Tüm bunlardan yola çıkılarak, kapasitör için geçerli fiziksel kuralların nöron membranı için de geçerli olacağını rahatlıkla öngörebiliriz. Bu noktada bizi ilgilendiren en önemli kısım ise kapasitans kavramıdır. Kapasitans bir kapasitörün güç kaynağı varlığında üzerinde biriktirebildiği yük miktarıdır. Bunu belirleyen faktörlerden bir tanesi yalıtkan katmanın özelliğidir. Bu konunun devamı Epilepsi, Lipit Tabaka ve Kapasitans başlığı altında değerlendirilmektedir.

2.3. Elektrostatik Kapsamında Elektriksel Alan Kavramı ve Bunun Sinir Sistemindeki Yeri

Doğada elektriksel yükler birbirleriyle devamlı etkileşim halinde bulunmakta ve birbirlerini sürekli itip çekmektedir. Bu, yüklerin bulundukları ortamlarda birbirleri üzerinde etki gösterebilen elektrik alanların oluşmasından kaynaklanmaktadır. Elektrostatikte bir noktadaki elektrik alan, o noktada yük başına uygulanan kuvvet

şeklinde tanımlanmaktadır (Griffiths 2017; Nunez and Srinivasan 2009). Yöne ve büyüklüğe sahip bir vektör olan elektriksel alanın birimi ise N/C veya V/m şeklinde ifade edilmektedir.

$$\vec{E} = \frac{\vec{F}}{q} \quad E: \text{Elektrik alan, } F: \text{Elektrik Kuvveti (Newton), } q: \text{yük (Coulomb)}$$

Canlı sistemlerde ise elektrik alanların yoğun olarak bulunduğu sistemlerin başında sinir sistemi gelmektedir. Bu özellikle de elektriksel açıdan uyarılabilen hücrelerin en fazla bulunduğu sistemin sinir sistemi olmasından kaynaklanmaktadır. Sinir sistemini oluşturan nöron membranlarında sürekli depolarizasyonlar ve repolarizasyonlar meydana gelmekte ve bu da ortamda elektrik alan değişimlerine yol açmaktadır (Buzsáki, Anastassiou, and Koch 2012; Nunez and Srinivasan 2009). Beyinde oluşan bu elektrik alanlar ise iki lokasyon arasında oluşan voltaj farklılıkları olarak ifade edilmektedir (Liu et al. 2018).

2.4. Patolojik Elektriksel Alanlar ve Epilepsi

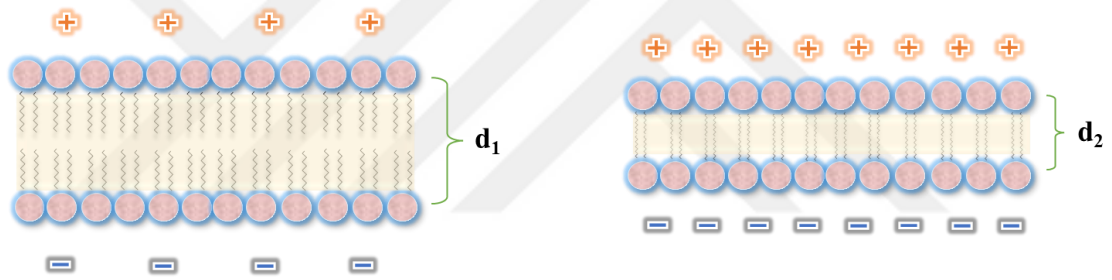
Epilepsi, nöronların uyarılabilirliğindeki değişimlerden kaynaklanan nörolojik bir hastalıktır. Epilepside gözlenen nöron uyarılabilirliğindeki değişimler, nöbet esnasında nöronların ani ve çok hızlı bir şekilde depolarizasyonuna ve ortamda ciddi elektrik alan potansiyellerinin meydana gelmesine neden olmaktadır. Nöronların uyarılabilirliğinde meydana gelen bu değişime sebep olan mekanizma araştırmacılar tarafından halen tam olarak çözülememekle birlikte nöral fizyoloji çalışmalarının genelde protein yapılı kanallar ve sinaptik bağlantılar üzerinden devam etmesi nöral hücre membranının elektriksel özellikleri üzerinde etkili olduğunu düşündüğümüz lipid kompozisyonlarının göz ardı edilmesine neden olmuştur (Bayés et al. 2011; Sheng and Hoogenraad 2007; Swulius et al. 2012; Tulodziecka et al. 2016).

2.5. Epilepsi, Lipit Tabaka ve Kapasitans İlişkisi

Nöral membranlar kolesterol, sfingolipit ve çoklu doymamış lipitçe zengin kendine özgü bir lipid kompozisyonuna sahiptir (Breckenridge, Gombos, and Morgan 1972; Cotman et al. 1969). Ancak nöral membrandaki lipid profilleri bölgesel olarak hatta hücreden hücreye değişiklik gösterebilmektedir. Dolayısıyla nöronlar üzerinde

gerçekleşen fizyolojik ve patolojik süreçlerin membran lipid profilindeki değişimlerden etkilenme olasılığı yüksektir. Nitekim hücre membranı lipid profilinde oluşan bozulmaların epilepsi, Alzheimer ve Parkinson gibi çeşitli nörolojik hastalıklarla ilişkilendirildiği bilinmektedir (Adibhatla and Hatcher 2007; Waugh 2015).

Tüm bu çerçevede hücre membran lipidlerinin birbirlerine göre olan oranlarındaki değişimler doğal olarak membranın ortalama fiziksel özelliklerini ve dolayısıyla kapasitansını etkileyebilir. Özellikle kapasitans kapsamında lipid profilindeki değişikliklere bağlı olarak gerçekleşen membran kalınlığı değişimleri membran üzerinde barındırılan yük miktarını değiştirerek voltaj farkının artması veya azalmasına ve nöron bağlamında konuşacak olursak nöronun uyarılabilirliğinin değişmesine neden olacaktır (Şekil 10).



Şekil 10. Farklı kalınlıktaki nöral membranlar ve bunların kapasitans farklılıkları.

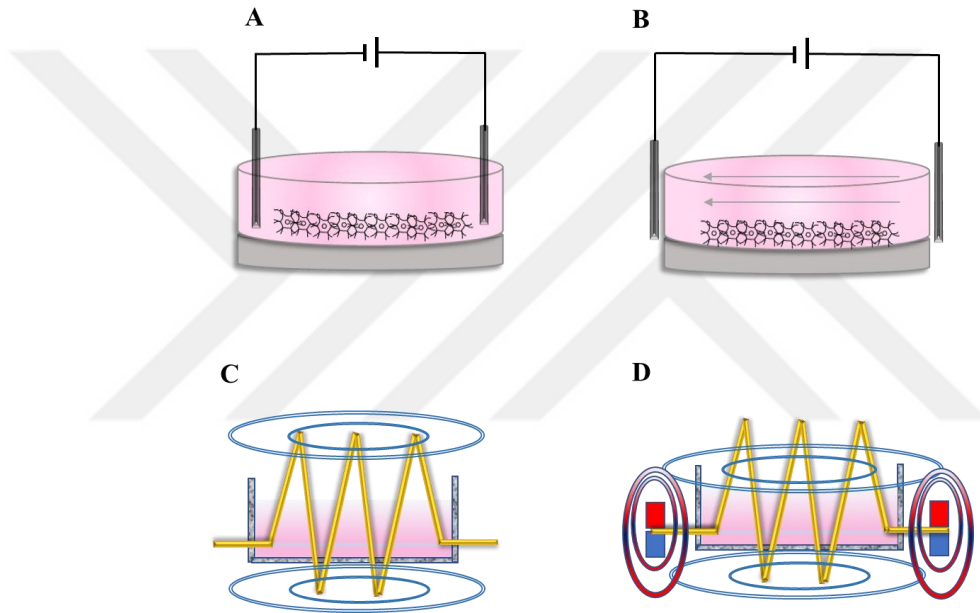
$d_2 < d_1$ olması sebebiyle sağ şekildeki membran üzerinde bulunan yük kapasitesi sol şekildeki membran üzerinde bulunan yük kapasitesinden fazladır. Bu sebeple sol taraftaki membran sağ taraftakine göre çok daha kolay uyarılabilir.

2.6. İn Vitro Elektrik Alan Stimülasyon Teknikleri

Hücre elektrik alan stimülasyonu kapsamındaki çalışmalarda 4 tür elektrik alan stimülasyonu kullanılmaktadır. Hücrelere uygulanan bu elektriksel akımların zamana göre değişen yönüne bağlı olarak elektrik alanlar direkt (direct current electric field - DCEF), alternatif (alternative current electric field - ACEF), pulsatil (pulsatile current electric field - PCEF) ve bifazik (biphasic current electrical field-BCEF) şeklinde sınıflandırılmaktadır (Zhu et al. 2019). Direkt akımın yönü ve büyüklüğü zamana bağlı

değişmezken, alternatif akımın yönü ve büyüklüğü zamana bağlı olarak periyodik bir şekilde değişmektedir. Pulsatil akım ise aralıklarla monofazik veya bifazik olarak uygulanabilmektedir.

Bu elektrik alan potansiyellerin hücrelere iletilme metotları ise direkt stimülasyon, kapasitif stimülasyon ve endüktif stimülasyon olarak üç farklı sınıfa ayrılmaktadır (Chen et al. 2019). Bazı araştırmacılar bu metotlara ek olarak kombine stimülasyon adında dördüncü bir metodu daha kullanmaktadır (Şekil 11) (Balint, Cassidy, and Cartmell 2013).



Şekil 11. Elektriksel stimülasyon iletim metotları. **A:** Direkt, **B:** Kapasitif, **C:** Endüktif ve **D:** Kombine elektriksel stimülasyon.

Gereç ve Yöntem

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

- 1.5 mL'lik kriyotüpler; (*ISOLAB*[®]).
- 15 ve 50 mL dereceli plastik falkon tüpler; (*BIOFIL*[®]).
- 6 ve 96 kuyucuklu kültür kapları; (*COSTAR*[®]).
- 0.2 µm'lik steril filtreler; (*CHROMAFIL*[®] CA-20/25 (S)).
- Plastik ve cam pipetler, şişeler, pipet uçları ve eppendorf tüpler; (*COSTAR*[®], *eppendorf*[®], *BIOFIL*[®]).
- SH-SY5Y hücre hattı (ATCC)
- Fetal Sığır Serum (FBS); Steril süzölmüş ve hücre kültürü için uygun; *Sigma* (Cat.No: F6178).
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS); MgCl₂ ve CaCl₂ içeren ve steril filterlenmiş hücre kültürü için uygun sıvı tamponlu tuz; *Sigma* (Cat.No: D8662).
- Penisilin-Streptomisin Çözeltilisi; Stabilize edilmiş; Steril filtrelenmiş ve hücre kültürü için uygun solüsyon; *Sigma* (Cat.No: P0781).
- Trypsin-EDTA (0.25%); Fenol kırmızı; *Gibco*[®] (Cat.No: 25200056).
- GlutaMAX[™] tamamlayıcı; Sıvı; *Gibco*[®] (Cat.No: 35050061).
- D-(+)-Glukoz monohidrat; Toz; *Sigma* (Cat.No: 16301).
- MTT Formazan tozu; *Sigma* (Cat.No: M2003).
- MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum); *Sigma*
- Fenazin metasülfat (PMS); *Sigma*
- Deiyonize su
- Tripan mavisi
- L-Glutamic Acid, Pharmagrade G5667-100G
- Hanks Balanced Salt Solution, Modified, With Sodium Bicarbonate, Without Phenol Red, Calcium Chloride And Magnesium Su H6648-500ML
- HEPES, Pharmagrade PHG0001-100G

- B-27® Supplement (50X), minus antioxidants; LIFETECH (Cat.No: 10889-038).
- Neurobasal® Medium; LIFETECH (Cat.No: 21103-049).
- Hibernate®-A Medium; LIFETECH (Cat.No: A12475-01).
- Minimum Essential Medium; Sigma (Cat.No: 51412C-1000ML).
- UltraPure™ BSA (50 mg/mL); LIFETECH (Cat.No: AM2616).
- Poly-L-lysine solution; Sigma (Cat.No: P4832-50ML).
- Serological pipette 10mL; SARSTEDT (Cat.No: 86.1254.001).
- Kesit kültürü için kullanılan Insertler (Transwell with 3.0 µm) pore polycarbonate membrane); (Cat. No: 3414)
- HPLC mobil fazları için kullanılan çözümler; Asetonitril, metanol, etanol, izopropil alkol, n-hegzan, etil asetat, TFA, THF (HPLC gradient grade); *Merck Co.*
- Kloroform; *Merck Co.*
- Argon (Ar) gazı
- Şiringa ucu filtre (0.45 µm, Hidrofilik, Nylon, 33 mm, non steril); *Merck Millex-FH* (Cat.No: SLHV033NK).
- HPLC viali (1.5mL Amber Short Thread, 9mm Thread 11.6*32mm, USP type 1); (Cat.No: V935).
- HPLC vial kapağı ve septumu (PTFE/White Silicone Septa, 9mm Blue Short Screw); (Cat.No: SC9291).
- Phosphatidylcholine; *Sigma* (Cat.No: 1535733-350MG).
- Phosphatidylethanolamine; *Sigma* (Cat.No: 1535744).
- Sphingomyelin (from bovine brain); *Santa Cruz Biotechnology* (CAS 85187-10-6).
- Kolon (Shim-Pack CLC-SIL(M) 25CM); *Shimadzu* (Cat.No: 228-17872-92).
- Kolon (Inertsil ODS-3 5µm 4.6*250 mm); *GL Sciences Inc.* (Cat.No: 5020-01732)
- Elektrotlar için kullanılan paslanmaz çelik tel ve 925 ayar gümüş tel
- Deney düzeneği için gerekli havya ve lehim
- Çabuk donabilir yapıştırıcı ve epoksi

Cihazlar

- Karbondioksitli inkübatör; (Thermo Scientific forma steril cycle CO₂ incubator TC115)
- Steril laminar akım kabini; (Thermo Scientific® Herasafe™ KS serisi)
- İnvert ışık mikroskobu; (Olympus-CH30)
- Stereomikroskop; (Olympus-SZX7)
- Mikroplaka spektrofotometre, Thermo Scientific® Multiskan Go
- Santrifüj, (Thermo Scientific®), SL16 santrifüj serisi
- Biopac MP30
- Sonikatör (Branson Sonifier Power Supply)
- Sıcak su banyosu; Techne®, TE-10D daldırma sirkülatörü, 120VAC
- Otoklav
- Thoma Lamı (Hemositometri)
- Pipetleme cihazları
- Karıştırıcı
- +4 ve -20 derece soğutucular
- HPLC sistem (LC-10ATvp quaterner pompalı, SIL-20A HT otomatik örnekleyici, FRC-10A fraksiyonlama kollektörü SPD-10AVP UV-Vis, RF-10AXL Floresan, SPD-M20A Diode Array, RID-10A Refraktif İndeks ve Raytest radyoaktivite dedektörlerini içeren Shimadzu sistem)
- Nüvefüge-CN-180 Santrifüj
- Vorteks cihazı (Ika)
- Milipor saf su cihazı (Milli-Q Gradient A-10)
- Hassas terazi

Hizmet Alımları

- Gümüş tellerin altın içerikli sıvıyla kaplanması

3.2. Çalışmanın Genel Tasarımı

- Deney Düzeneklerinin Geliştirilmesi
- SH-SY5Y Hücre Kültürü

- SH-SY5Y Hücre Kültürünün Monopolar Pulsatil Stimülasyonu
- MTS Hücre Canlılık Testi
- Optimal Elektriksel Stimülasyon Parametrelerinin Belirlenmesi
- Primer Nöron ve SH-SY5Y Hücre Kültürü
- Primer Nöronlar ve SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde Gerçekleştirilen Pulsatil Akım Elektrik Alan Stimülasyonu Uygulaması
- Membran Lipit Analizi (HPLC)
- İstatistiksel Analiz

3.3. Ön Çalışmalar

Hücreler üzerine uygulanacak ideal stimülasyon parametrelerini belirlemek amacıyla ön çalışmalar kapsamında insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücreleri üzerinde monopolar pulsatil elektriksel stimülasyon gerçekleştirilmiştir. Stimülasyon uygulamalarının ardından hücrelere canlılık testleri uygulanmıştır.

3.3.1. SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücre Kültürü

İdeal stimülasyon parametrelerini belirlemek ve aynı zamanda monopolar elektrik stimülasyonun etkilerini görme amacıyla, çeşitli metotlarla adrenerjik, kolinerjik ve dopaminerjik nöronlara dönüştürülebilen ve elimizde var olan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır (Påhlman et al. 1984; Shipley, Mangold, and Szpara 2016; Xie, Hu, and Li 2010).

İlk olarak kriyotüpler içerisinde -80 °C’de saklanan SH-SY5Y hücreleri 37 °C su banyosunda çözölmeye bırakıldı. Ardından çözdürölmüş bu hücreler üzerine laminar flow kabinde hücre süspansiyon hacminin 5 katı olacak şekilde besi vasatı [içeriğinde %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 Penisilin-streptomisinin bulunduğı DMEM/F-12 Dulbecco Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 besiyeri (37 °C’ye ısıtılmış)] ilavesi yapıldı. Hazırlanan bu süspansiyon daha sonra santrifüj işlemine tabi tutuldu. Bu santrifüj işlemi +4 °C’de, 1000 rpm ve 5 dk şeklinde gerçekleştirildi. Santrifüj işlemlerinin ardından süpernatant uzaklaştırılıp, hücre pelletlerine toplam 7 mL besiyeri ilave edilerek hücrelerin homojenizasyonu sağlandı. Daha sonra bu hücre

süspansiyonu 25cm² 'lik T25 flasklara ekilerek 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında bulunan inkübatör içerisine bırakıldı.

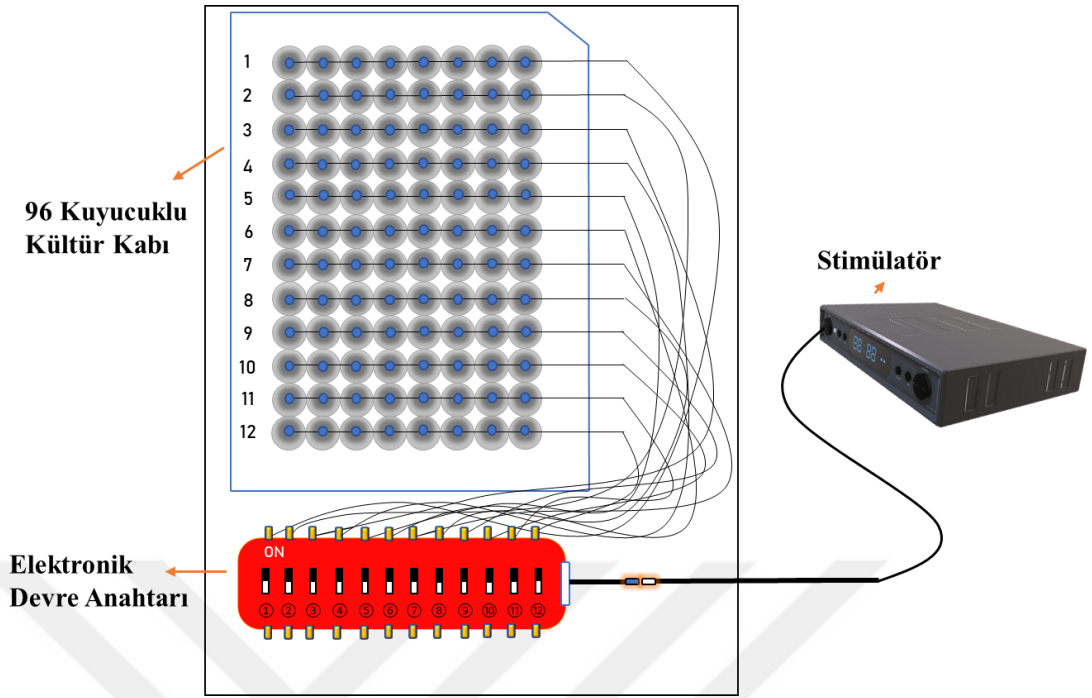
3.3.1.1. Hücrelerin Pasajlanması ve Kültür Kaplarına Ekimi

Flasklardaki hücre yoğunlukları %70-80 seviyelerine ulaştığında pasajlama işlemine geçildi. İlk olarak flaskların içeriğindeki besiyeri boşaltıldı ve üzerine her flaskın içinde 2 mL olacak şekilde su banyosunda 37 °C'ye ısıtılan steril Tripsin/EDTA solüsyonu eklendi. Ardından flasklar 2 dk süreyle inkübasyona bırakıldı ve bu sürenin sonunda tekrardan inkübatörden çıkarılarak invert mikroskopta hücrelerin flask tabanından kalkma durumları incelendi. Hücrelerin tamamının zeminden kalktığı gözlemlendiğinde ise tripsin enziminin aktivitesini inhibe etme amacıyla flask içerisine Tripsin/EDTA solüsyonunun iki katı kadar besiyeri ilave edildi ve bu içerik santrifüj tüplerine aktararak 4 °C' de 1000 rpm olacak şekilde 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti üzerine 2 ml besi vasatı ilave edildi.

Hücrelerin yoğunluğunu belirlemek amacıyla hücre süspansiyonundan 100 µL otomatik pipet yardımıyla çekildi ve üzerine aynı miktarda, canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilebilmesini sağlayan tripan mavisi (ölü hücrelerin mikroskop görüntüleri mavi, canlıların parlak beyaz renkte) eklendi ve bu karışım pipet yardımıyla Thoma lamı (hemasitometre) üzerine bırakılarak mikroskop üzerinden hücre sayımı gerçekleştirildi. Sayım işleminin ardından hücre süspansiyonu içerisinden toplamda 3 tane 96 kuyucuklu kültür kabına her kuyucukta yaklaşık olarak 6000 hücre ve 2 tane de 6 kuyucuklu kültür kabına her kuyucukta yaklaşık olarak 300.000 olacak şekilde ekim yapıldı ve 2 günlük inkübasyona bırakıldı. Ardından hücrelerin besiyerleri değiştirildi ve tekrardan 2 günlük inkübasyona bırakıldı ve inkübatör içerisindeki 4. günün sonunda hücreler üzerinde elektriksel stimülasyon uygulamasına geçildi.

3.3.2. 96'lı Kültür Kabı İçin Tasarlanan Deney Düzeneginin Geliştirilmesi

96 kuyucuklu kültür kaplarında monopolar pulsatil elektriksel alan oluşturmak için geliştirilen düzeneğin öncelikle ön tasarım çalışması yapılmış ve ardından bu tasarım uygulamaya konulmuştur (Şekil 12).

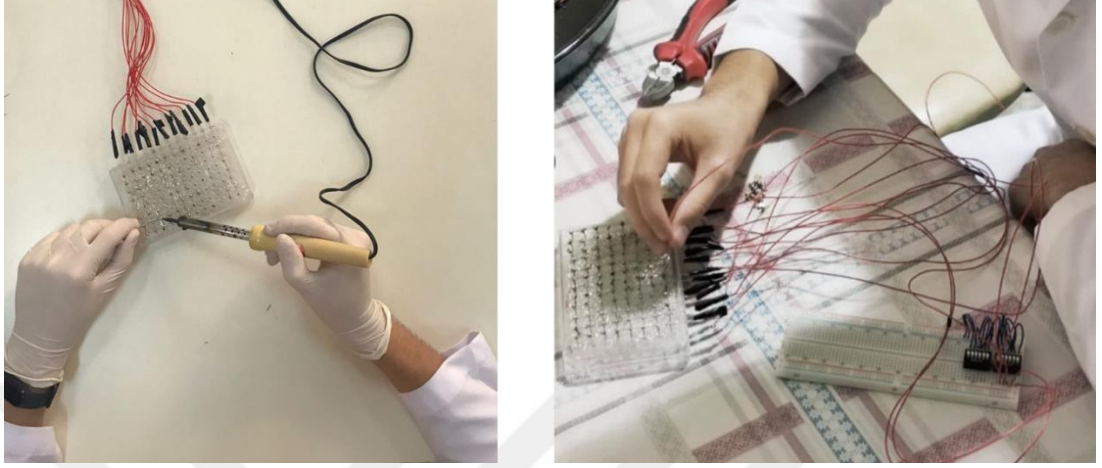


Şekil 12. 96 kuyucuklu kültür kabı için geliştirilmiş olan deney düzeneğinin ön tasarımı.

Deney düzeneğinin gerçekleştirilmesi sürecindeki yapım aşamaları ise aşağıda verilmiştir:

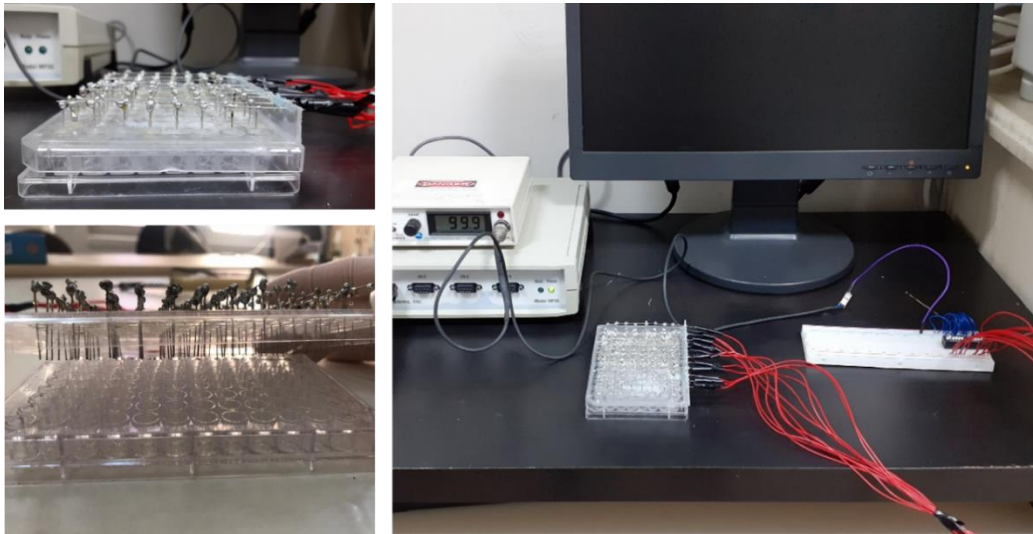
- Elektrot olarak kullanılmak üzere 0.4 mm çapındaki paslanmaz çelik telden 2 cm uzunluğunda kesimler yapılarak her kuyucuğa bir tane olmak üzere toplamda 96 tane, 2 cm uzunluğunda ve 0.4 mm çapında elektrotlar hazırlanmıştır.
- Hazırlanan bu elektrotlar hücre kültür kabının kapağı üzerine havya yardımı ile ısıtılarak kuyucukların orta noktalarına gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Elektrotların kuyucukların tabanına olan mesafesi yaklaşık olarak 1 mm olup elektrotlardan hiçbiri hücrelere temas etmemektedir.
- Yerleştirilen elektrotların sabit bir şekilde durması amacıyla her birinin kapakla birleşen kısımları epoksiyle kaplanmıştır.
- Ardından kültür kabının aynı sütununda bulunan elektrotların dışarı bakan kısımları tek bir çelik tel ile birbirlerine lehimlenmiştir. Çelik tellerin her biri ise ayrı birer kabloya lehimlenmiştir (Şekil 13).

- Elektrotlara bağlı olan kablolar (kırmızı renkli), kuyucuklara giden elektriksel akımı kontrol eden devre anahtarların bulunduğu elektronik devre tahtasına yerleştirilmiştir.



şekil 13. Tasarlanan deney düzeneğinin yapım aşamaları.

- Akımın hangi sütuna gidip gitmeyeceği devre anahtarındaki düğmeler aracılığıyla belirlenmektedir.
- Devre anahtarının diğer kısmının bulunduğu devre tahtası bölümüne ise stimülatörden gelen akımı devre tahtasına ve oradan da elektrotlara bağlı olan kablolarla iletecek diğer kablolar (mavi renkli) bağlanmıştır.

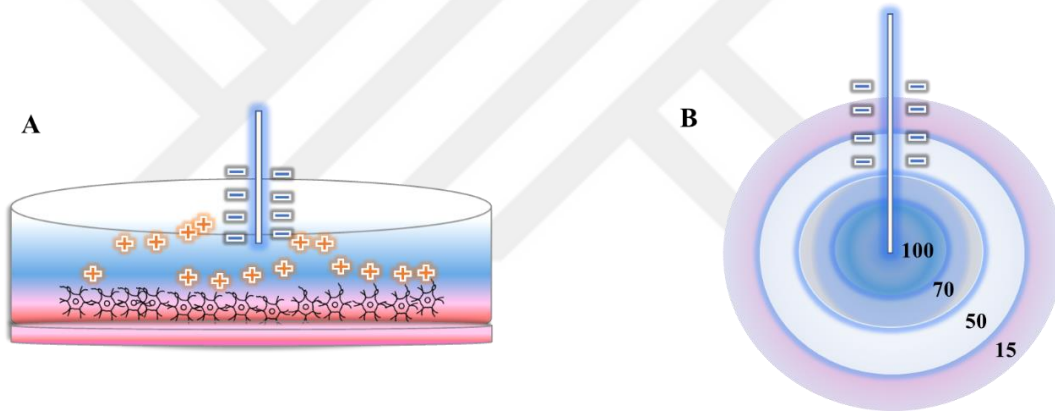


şekil 14. Tasarlanan deney düzeneğinin son hali ve Biopac sistemiyle entegrasyonu.

Tüm bu işlemlerin sonunda stimülatörden başlayan ve sütunlardaki elektrotlarda biten bir elektronik devre tasarlanmıştır.

3.3.3. Tek Elektrotlu Monopolar Pulsatil Elektriksel Stimülasyonun Uygulanması

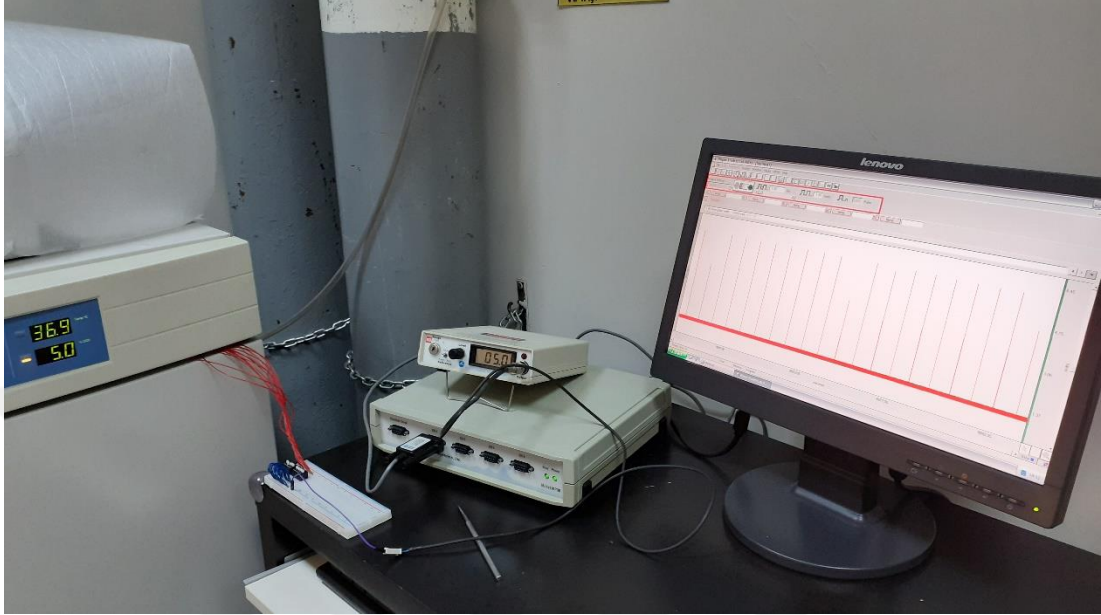
Tasarlanan elektronik devreyle SH-SY5Y hücrelerinin besiyeri üzerinden elektrotlar aracılığıyla stimülasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu stimülasyon yönteminde karşılığı olmayan tek elektrot (negatif elektrot veya sink-toprak elektrodu olmayan) kullanıldığı için besiyere içerisinde Şekil 15.B'dekine benzer şekilde kuyucuğun merkezinden başlayan ve kenarlara doğru yayılan potansiyel bir elektrik alan değişikliği oluşmakta fakat ortama elektrotlardan giden hiçbir akım bulunmamaktadır.



Şekil 15. Monopolar elektrik stimülasyon mekanizması ve oluşan elektrik alanın temsili gösterimi. **A.** Elektrot üzerine (katod) kapasitif olarak yüklenen negatif yükler hücrenin dış kısmında bulunan pozitif iyonlar üzerinde bir elektrik alan oluşturmaktadır ve bu iyonları kendine doğru çekmektedir. Bu da dinlenim membran potansiyelinin daha pozitif değerlere kaymasına dolayısıyla da aksiyon potansiyellerinin oluşmasına neden olur. **B.** Besiyerinde oluşan elektrik alanın merkezden kenarlara doğru zayıflaması (temsilî değerler: 100 -70 -50 -15 mV/mm).

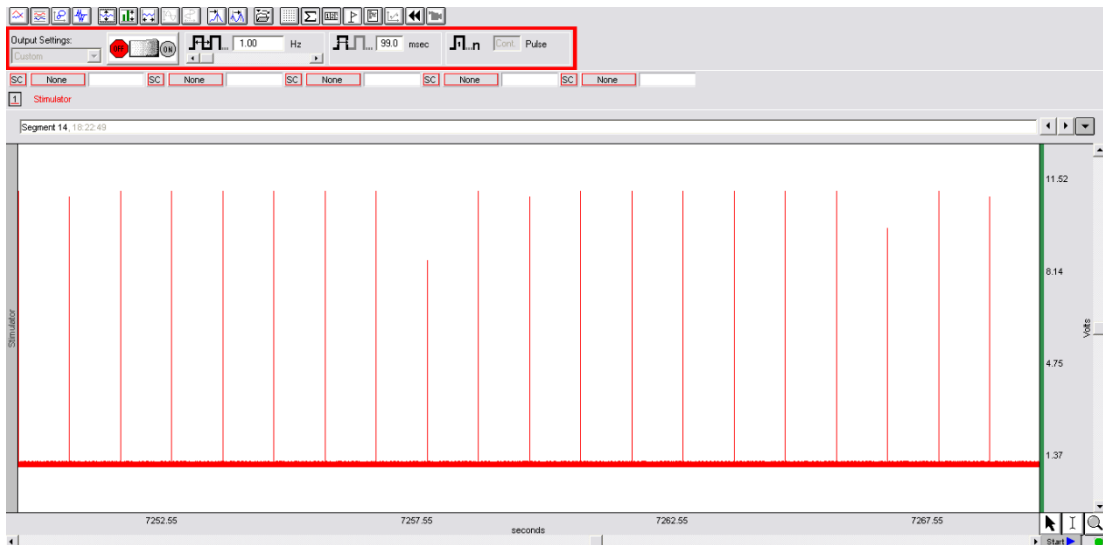
Karşılığı olmayan tek elektrotla gerçekleştirilen bu stimülasyon yöntemi formülizasyon zorluğu sebebiyle araştırmacılar tarafından tercih edilmediği için hücreler üzerine uygulanan stimülasyon parametreleri diğer stimülasyon yöntemlerinde kullanılan parametrelerden çıkarım yapılarak belirlenmiştir.

Stimölasyonu oluşturmak için kullanılan stimölator ise Biopac sisteminin STM200 sabit voltaj stimölatorü olup bununla ilgili kayıtlar yine Biopac sistemi aracılığıyla kaydedilmiştir (şekil 16).



şekil 16. İnkübatör içerisindeki SH-SY5Y hücrelerine uygulanan stimölasyon anına ait bir görsel.

Stimölasyon esnasında Biopac sisteminden elde edilen stimölasyon dalgalarına ait görsel ise şekil 17’de verilmiştir.



şekil 17. SH-SY5Y Plate 2 - Grup 9 hücrelerinin stimölasyon dalgaları.

Hücrelere uygulanacak elektriksel stimölasyon 2 gün süreyle ilk ve son sütun (kontrol) haricindeki her sütuna günde 10 dk olacak şekilde toplamda üç kültür kabında ve inkübatör içerisinde gerçekleştirilmiştir.

İlk uygulanacak stimölasyon işleminden bir gün önce elektrotlar sterilizasyon amacıyla 1 gün boyunca %90'lık etil alkol içerisinde tutulmuştur. Ardından 15 dk'lık UV maruziyetine bırakıldıktan sonra elektrotları taşıyan kapak SY-SH5Y hücrelerini barındıran kültür kabına yerleştirilerek deneye başlanmıştır.

Uygulamanın ikinci gününde ise elektrotlar 10 dk boyunca %90'lık etil alkol sterilizasyonuna, buna ek olarak da 15 dk'lık da UV sterilizasyonuna maruz bırakılmış ve ardından deneye geçilmiştir. Deney kapsamında oluşturulan kültür grupları ve uygulanan parametreler tablolarda verilmiştir.

Plate 1

Gruplar (Sütun)	Voltaj (V)	Frekans (Hz)	Puls Uzunluğu (ms)	Uygulanma Süresi (dk)
Kontrol	-	-	-	-
2	1	10	1	10
3	5	10	1	10
4	10	10	1	10
5	25	10	1	10
6	50	10	1	10
7	1	50	1	10
8	5	50	1	10
9	10	50	1	10
10	25	50	1	10
11	50	50	1	10
Blank	-	-	-	-

Tablo 2. SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı parametrelerdeki monopolar elektriksel stimölasyon değerleri (Plate 1).

Plate 2

Gruplar (Sütun)	Voltaj (V)	Frekans (Hz)	Puls Uzunluğu (ms)	Uygulanma Süresi (dk)
Kontrol	-	-	-	-
2	1	1	1	10
3	5	1	1	10
4	10	1	1	10
5	25	1	1	10
6	50	1	1	10
7	1	1	100	10
8	5	1	100	10
9	10	1	100	10
10	25	1	100	10
11	50	1	100	10
12	100	1	100	10

Tablo 3. SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı parametrelerdeki monopolar elektriksel stimülasyon değerleri (Plate 2).

Plate 3

Gruplar (Sütun)	Voltaj (V)	Frekans (Hz)	Puls Uzunluğu (ms)	Uygulanma Süresi (dk)
Kontrol	-	-	-	-
2	50	50	1	10
3	75	50	1	10
4	100	50	1	10
5	50	75	1	10
6	75	75	1	10
7	100	75	1	10
8	50	100	1	10

9	75	100	1	10
10	100	100	1	10
11	100	100	5	10
Blank	-	-	-	-

Tablo 4. SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı parametrelerdeki monopolar elektriksel stimülasyon değerleri (Plate 3).

3.3.4. SH-SY5Y Hücre Canlılığı Testleri (MTS)

MTS, kültür ortamında değişen koşullar karşısında hücre canlılığını belirleme amaçlı yapılan kalorimetrik bir sitotoksikite testidir. Bu testin temel mekanizması, içerisinde bulundurduğu 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyumun (MTS) oksijenli solunumun gerçekleştiği mitokondrideki NADPH'a bağımlı dehidrogenaz aktivitesiyle oluşturduğu formazan miktarına dayanmaktadır. Metabolik olarak aktif hücreler daha yoğun miktarda formazan oluşturup daha fazla renk değişimine neden olurken, metabolik inaktif ölü hücreler renk değişimine uğramazlar. MTS canlılık testi sonucunda canlı hücrelerin bulunduğu alanlar koyu kahverengi şeklinde bir renk verirken, ölü hücrelerin bulunduğu alanlar genellikle açık kahverengi-sarı renklerde gözlenir.

İçerisinde SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ve üzerine farklı parametrelerde elektriksel stimülasyon gerçekleştirilen toplamda 3 tane 96 kuyucuklu kültür kabı, parametrelerin hücre canlılığına olan etkisini görmek amacıyla, MTS testi uygulanmak üzere inkübatöre yerleştirildi ve burada yaklaşık olarak 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon ardından, ışıktan uzak tutularak hazırlanan MTS ve fenazin metosülfat (phenazine methosulfate-PMS) karışımı vortekslenerek (MTS-PMS, 20:1) her kuyucuğa 20 µL olacak şekilde kuyucuklara ilave edildi ve 1 saat süreyle inkübatöre bırakıldı. Bu işlemin sonrasında hücre kültür kapları oluşan renk değişimlerine göre ortaya çıkacak hücre canlılığını değerlendirme amacıyla mikropate okuyucuya (ELISA reader-BİOTEK) yerleştirilerek 490 nm dalga boyu altında okutuldu.

3.4. Deney Hayvanları ve Primer Nöron Kültürünün Hazırlanması

Primer nöron kültürünün gerçekleştirilmesi için 8 tane Sprague-Dawley türü yenidoğan (P0) sıçan Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden alınarak Ege Üni. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirildi. Dekapitasyon yöntemi ile beyin dokuları alınan hayvanlar primer kültür hazırlamak için kullanıldı. İn vitro nöron kültürünün hazırlanmasında yenidoğan sıçan yavrularının (P0) kullanımı için gerekli izinler Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınmış olup etik kurul onayı Ekler kısmında sunulmuştur.

****Çalışmada ilk kullanılan Poly-L-lizinin işlevini yerine getirememesi nedeniyle 8 tane sıçanın ilk dördünden elde edilen hücreler çalışmadan çıkarılmıştır.**

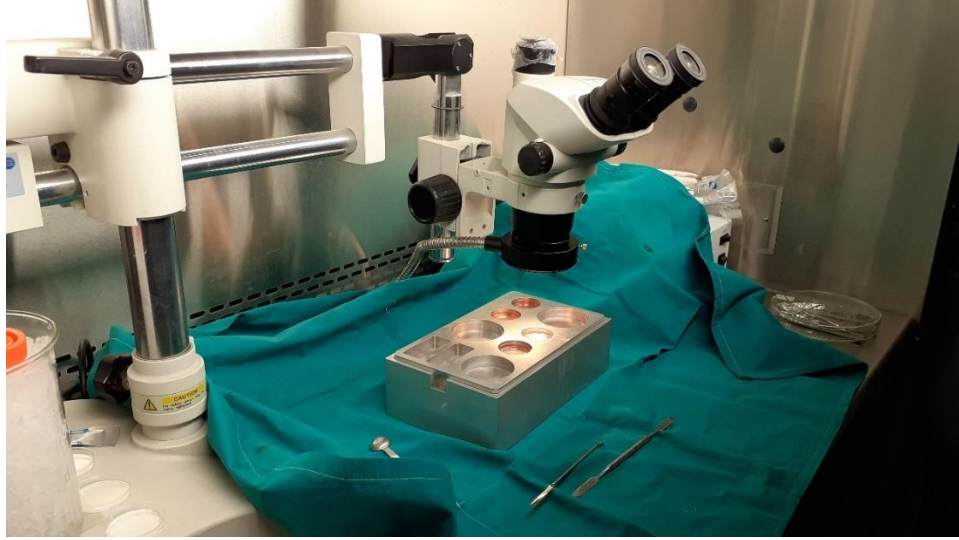
3.4.1. Kültür Kaplarının Poly-L-Lizinle Kaplanması

Hücre kültürünün başlamasından bir gün önce hücre kültürü yapılacak kapların zeminleri nöronal hücrelerin zemine tutunabilmesi sağlamak amacıyla Poly-L-lizin solüsyonu ile kaplandı.

6'lı kültür kaplarının her kuyucuğuna yaklaşık olarak 1,2 ml steril lizin solüsyonu eklendi. Ardından lizinin zemine tamamının yayılması sağlanarak kültür kapları 2 saat süreyle inkübatörde bırakıldı. 2 saatlik inkübasyonun ardından kuyucuk içerisindeki fazla lizinler pipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve steril fosfat tampon solüsyonu (phosphated buffer solution - PBS) ile kuyucuklara yıkama işlemi uygulandı. Yıkama işlemi sonrasında ise hücre kültür kapları UV ışık altında kurumaya bırakıldı. Tüm bu işlemlerin ardından hücre kültür kapları primer nöron kültürü için hazır hale getirildi.

3.4.2. Sıçandan Primer Nöronların Eldesi ve Hücre Kültürü

İlk olarak yenidoğan sıçanların dekapitasyon ve beyin dokusunun elde edilmesi işlemlerinin tamamının yapılacağı Class I Laminar Flow Kabin, alkol ve UV sterilizasyonundan geçirildi ve çalışma ortamı hazırlandı (Şekil 18).



Şekil 18. Dekapitasyon işlemi ve beyin dokusu eldesinin gerçekleştirildiği stereomikroskop altındaki çalışma ortamı.

Çalışma için kullanılacak yenidoğan sıçanlar ilk olarak makas yardımıyla dekapite edildi. Dekapitasyon sonrasında çıkarılan beyinler, Doç. Dr. Vedat EVREN tarafından geliştirilen cerrahi soğuk tabla içerisindeki kesit solüsyonunun (Gibco Hybernate-A vasatı) içine alındı. Elde edilen beyinlerin zarları stereomikroskop altında çıkarıldı ve mikrodiseksiyon ile beyinlerin korteks ve hipokampus alanları ayrıldı (Şekil 19).



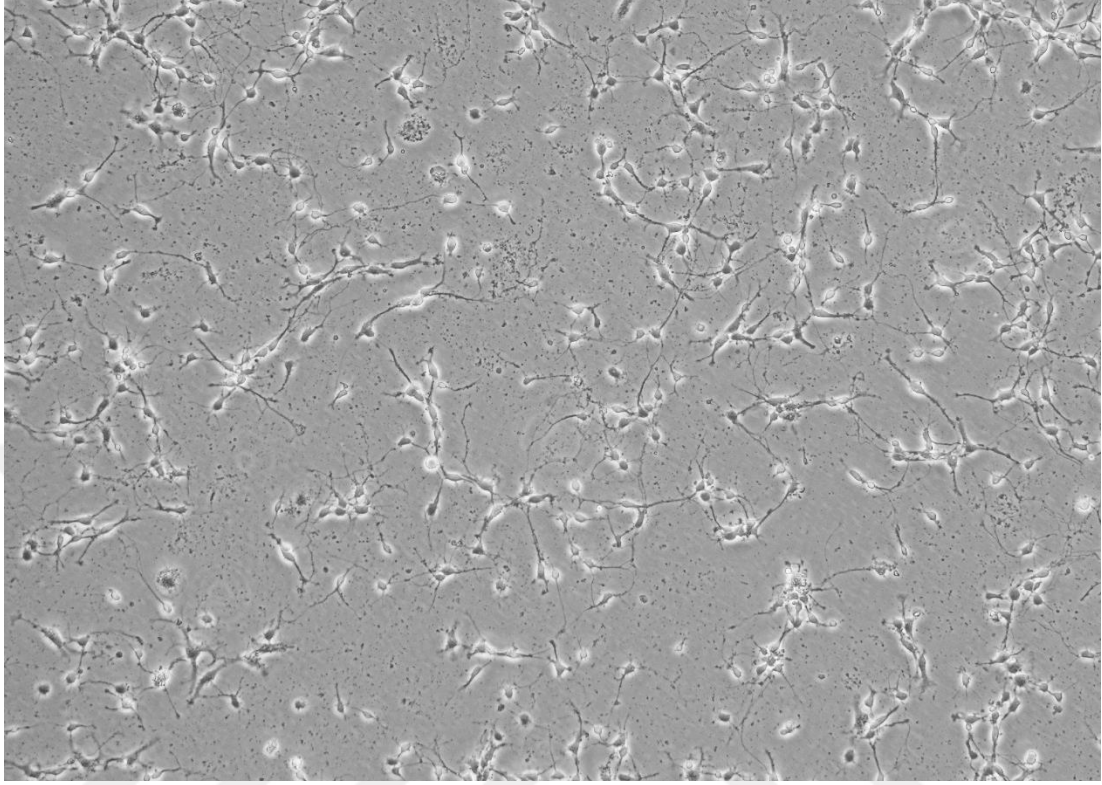
Şekil 19. Stereomikroskop altındaki mikrodiseksiyon işlemleri.

Ayrılan bu dokular bisturi yardımıyla çok küçük parçalara ($\sim 1 \text{ mm}^3$) kesildi ve dokular hibernate solüsyonu ile birlikte ayrı tüplere (hipokampus ve korteks) aktarıldı. Ardından tüpler 1 dk 1000 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra tüplerin üzerindeki süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve tüplere 5 ml tripsin ilave edildi. Doku parçalarının 12 dakikalık tripsinle muamelesinin ardından tüplerin içine tripsinin etkisini inhibe etmek amacıyla tam steril kültür vasatı (% 87 DMEM (glutaminsiz ve düşük glukozlu), % 10 Fetal Calf Serum, % 2 L-Glutamin 200 mmol, % 1 Penisilin-Streptomisin) eklendi ve tüpler 3 dk boyunca tekrardan santrifüj edildi. Tekrarlayan santrifüjün ardından tüplerdeki süpernatant kısmı atılarak içerisine primer nöron kültürü tam kültür vasatı (%97 Neurobasal-A (Gibco), % 2 B27, % 1 Penisilin-Streptomisin, 10 $\mu\text{g/L}$ βFGF ve 250 μL Glutamax) eklendi. 7-8 defa ucu ateşte cıllanmış steril pastör pipeti ile mekanik tritürasyon yapıldıktan sonra hücre süspansiyonu steril kültür süzgecinden geçirilerek tek hücre süspansiyonu elde edildi. Elde edilen süspansiyondaki canlı hücreler hemositometrede tripan mavisi kullanılarak sayıldı ve mililitrede 300000 hücre olacak şekilde seyreltilti. Ardından seyreltilen bu hücre solüsyonu 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek inkübatör içerisinde 37 °C ve %95 hava/%5 CO₂ olacak şekilde muhafaza edildi (Şekil 20).



Şekil 20. Hücrelerin kültür kaplarına ekim işlemi.

Kuyucuklara tutunan primer nöronların mikroskopik görüntüsü ise Şekil 21’de verilmiştir.



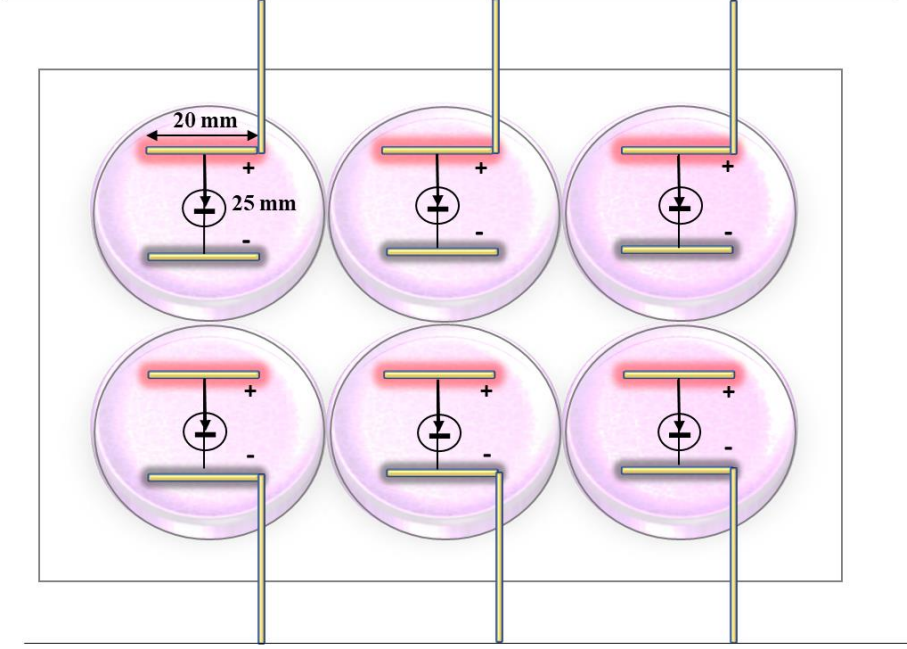
Şekil 21. Primer hipokampal nöron hücreleri (*in vitro* 2. gün).

3.5. 6’lı Kültür Kabı İçin Tasarlanan Deney Düzeneğinin Geliştirilmesi

Esas çalışmada kullanılacak olan deney düzeneği, 6’lı kültür kabına uyumlu olacak şekilde Leppik ve ark. tarafından oluşturulan düzeneden ilham alınarak tasarlanmıştır (Leppik et al. 2019). Düzeneğin yapım aşamaları aşağıda açıklanmaktadır:

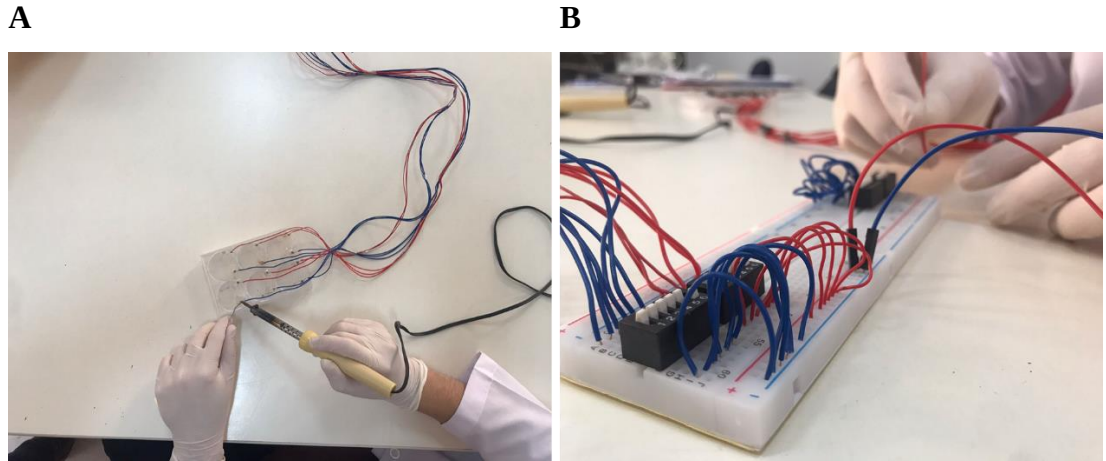
- İlk olarak 1 m uzunluğunda ve 0.6 mm çapındaki gümüş telden 5 cm uzunluğunda parçalar kesilerek her kuyucuk için 2 olmak üzere toplamda 12 tane gümüş tel parçası elde edilmiştir.
- Gümüşün hücrelere olan toksik etkisi sebebiyle bu teller kuyumcular tarafından uygulanan özel bir teknik ile altın kaplanmıştır.
- Ardından altın kaplanan 5 cm uzunluğundaki teller kuyucuk içerisine girecek olan yatay kısmın uzunluğu 2 cm, kuyucuk dışarısına çıkan kısmın uzunluğu 3 cm olacak şekilde bükülerek L harfi şekline getirilmiştir.

- Daha sonra kültür kabı kapağındaki 6 bölmenin her birine 25 mm aralıkla iki delik açılmış ve L harfi şeklindeki teller bu deliklere yerleştirilmiştir (Şekil 22)
- Tellerin tamamı çabuk donabilir yapıştırıcı ile kapağın üst kısmından sabitlenmiştir.



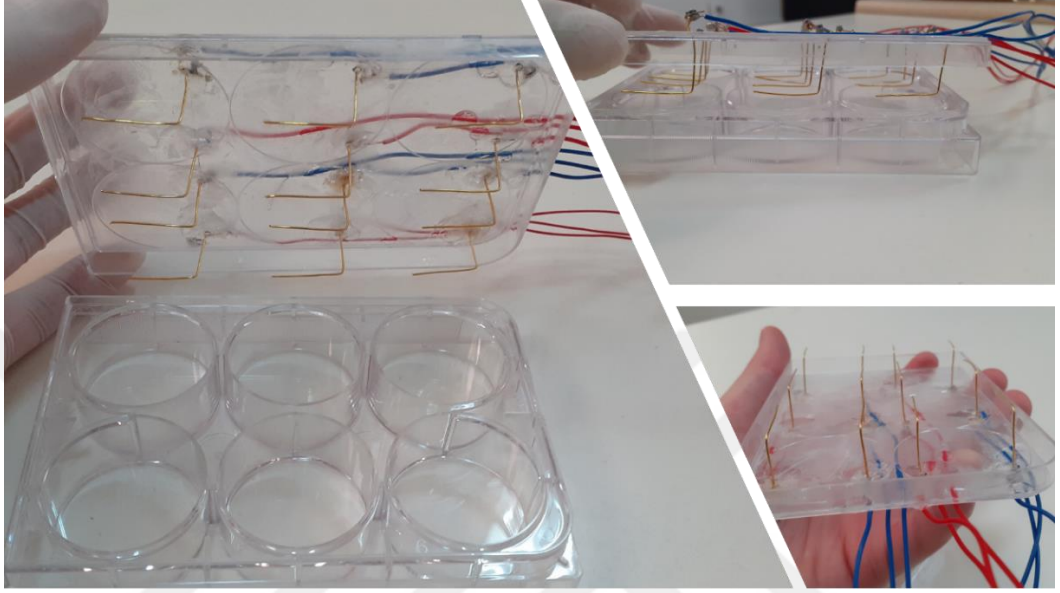
Şekil 22. 6 kuyucuklu kültür kabı için geliştirilmiş deney düzeneğinin ön tasarımı.

- Ardından tellerin üst kısımları halka şeklinde bükülmüş ve uç plastik kısımları çıkarılan kablolar ile lehimlenmiştir (Şekil 23A).

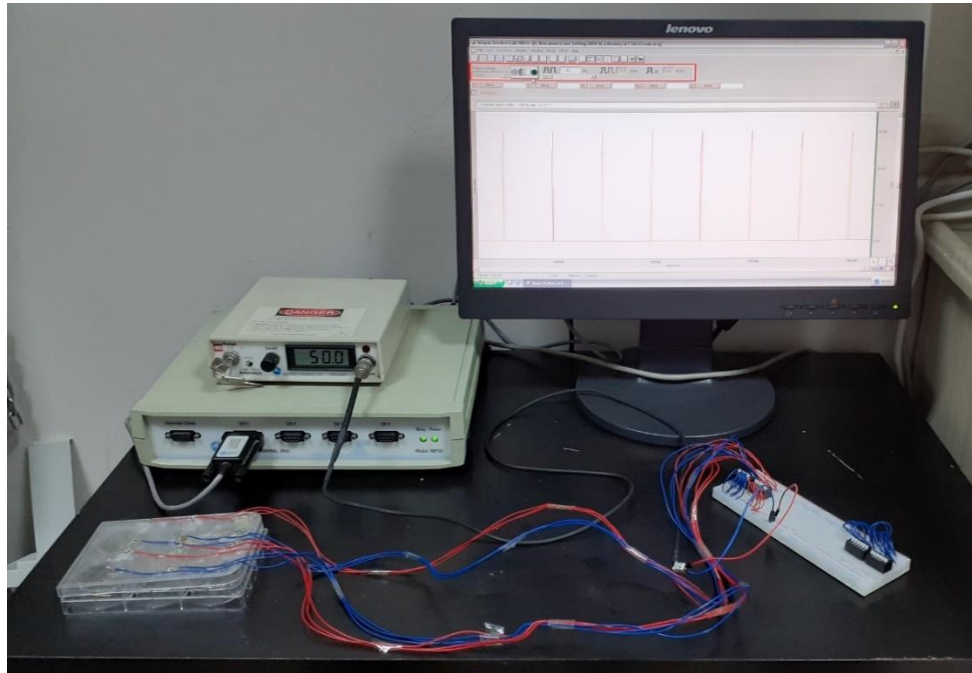


Şekil 23. Deney düzeneği yapım aşamaları. **A.** Kabloların elektrotlara havya yardımıyla lehimlenmesini, **B.** kabloların devre tahtasına yerleştirilmesini göstermektedir.

- Pozitif olan 6 tane elektrottan çıkan kırmızı renkte kablolar, devre anahtarlarının bulunduğu elektronik devre tahtasının pozitif kısmına, negatif olan 6 tane elektrottan çıkan mavi kablolar ise elektronik devre tahtasının negatif kısmına yerleştirilmiştir (Şekil 23B).



Şekil 24. Deney düzeneğini oluşturan elektrotlarının farklı açılardan görüntüsü.

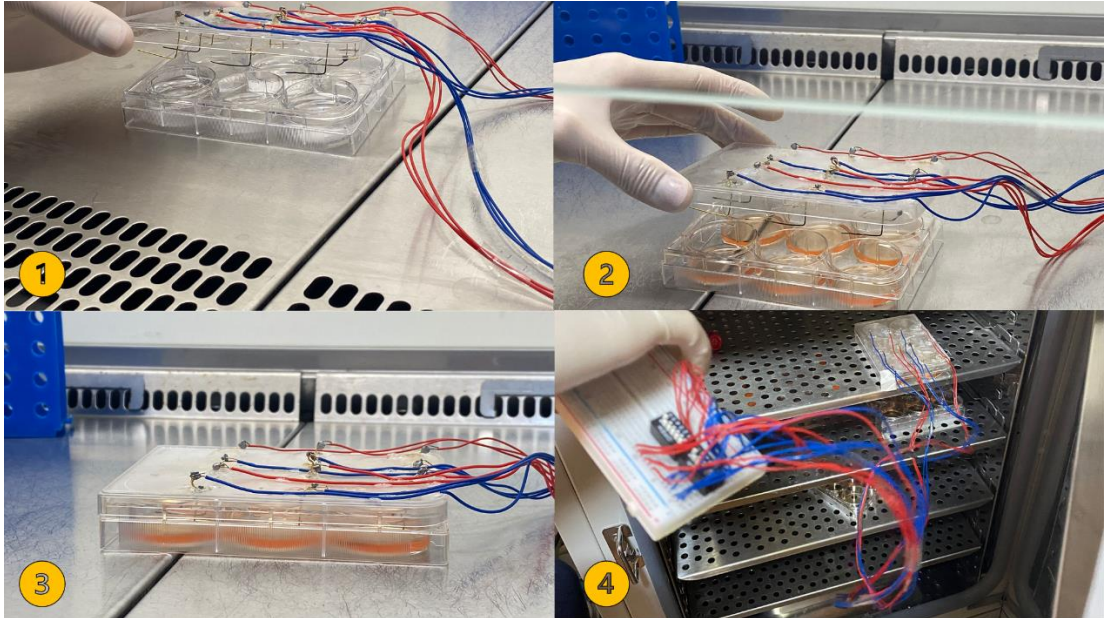


Şekil 25. Deney düzeneği ve Biopac sisteminin entegre hali.

3.6. Direkt Stimölasyon Metodu ile Hücresler Üzerinde Pulsatil Akım Elektrik Alanın Oluşturulması

6 kuyucuklu költür kabı için tasarlanan deney düzeneği ile direkt stimölasyon metodu kullanılarak hücreler üzerinde pulsatil akım elektrik alan (PCEF) oluşturulmuştur. Bu stimölasyon yönteminde her kuyucukta biri pozitif, diğeri negatif olmak üzere 2 elektrot bulunmakta ve besi vasatı içerisinde pulsatil elektrik akımlar meydana gelmektedir. Bu akımların tek bir yönde (pozitif elektrottan negatif elektroda doğru) oluşmaması için stimölatorün pozitif ve negatif ucundan gelen kablolar 1 dk aralıklarla yer değıştirilerek pozitif elektrotun negatif, negatif elektrodun da pozitif olması sağlanarak besi vasatı içerisinde iki yönlü akımlar geçirilmiştir.

Stimölasyon işlemleri başlamadan önce deney düzeneğine ilk olarak %90'lık alkol sterilizasyonu, ardından da UV sterilizasyonu uygulanmıştır. Hücresler üzerinde uygulanan pulsatil akım elektrik alan stimölasyonu, hipokampal nöronlar ve SH-SY5Y hücreleri üzerinde her kuyucuk için günde 10 dk olmak üzere toplamda 1 gün, kortikal nöronlar üzerinde ise yine her kuyucuk için günde 10 dk fakat toplamda 2 gün olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 26. Deney aşamaları. 1 numaralı şekil, deneye başlamadan önce elektrotların alkol sterilizasyonunu, 2 ve 3 numaralı şekil elektrotların hücrelerin bulunduğu sıvıya

daldırılmasını, 4 numaralı şekil ise hücre ve elektrotların bulunduğu deney düzeneğinin esas kısmının inkübatör içerisine yerleştirilmesini göstermektedir.

Hücreler üzerinde oluşturulan elektrik alan şiddeti $E = V/m$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. V ; uygulanan voltajı, m ise elektrotlar arasındaki mesafeyi (metre) ifade etmektedir. Deney düzeneğindeki elektrotlar arasındaki mesafe 0.025 m (25 mm) şeklindedir.

Deney kapsamında oluşturulan kültür grupları ve uygulanan parametreler aşağıdaki gibidir.

Plate 1 (Hipokampal Nöronlar)

Gruplar (Sütun)	Voltaj (V)	Frekans (Hz)	Elektrik Alan Şiddeti (V/m)	Puls Uzunluğu (ms)	Uygulanma Süresi (dk)
Kontrol	-	-	-	-	-
2	1,5	1	60	1	10
3	5	20	200	1	10
4	5	50	200	1	10
5	50	20	2000	1	10
6	50	50	2000	1	10

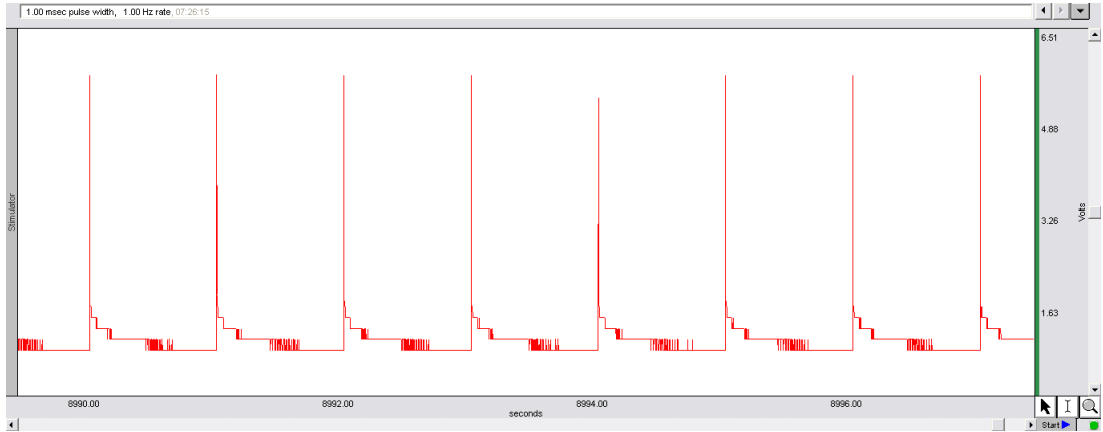
Tablo 5. Hipokampal nöron gruplarına uygulanan pulsatil akım elektrik alan stimülasyon parametreleri.

Plate 2 (Kortikal Nöronlar)

Gruplar (Sütun)	Voltaj (V)	Frekans (Hz)	Elektrik Alan Şiddeti (V/m)	Puls Uzunluğu (ms)	Uygulanma Süresi (dk)
Kontrol	-	-	-	-	-
Kontrol	-	-	-	-	-
3	1,5	1	60	1	10
4	1,5	20	60	1	10
5	5	1	200	1	10
6	5	20	200	1	10

Tablo 6. Korteks nöron gruplarına uygulanan pulsatil akım elektrik alan stimölasyon parametreleri.

Şekil 27’de ise kortikal nöronların stimölasyonu esnasında Biopac sistemiyle elde edilen stimölasyon dalgaları görölmektedir.



Şekil 27. Plate 2 (Kortikal Nöronlar) – Grup 5 stimölasyon dalgaları.

SH-SY5Y A Grubu

Gruplar (Sütun)	Voltaj (V)	Frekans (Hz)	Elektrik Alan Şiddeti (V/m)	Puls Uzunluğu (ms)	Uygulanma Süresi (dk)
Kontrol	-	-	-	-	-
2	1,5	1	60	1	10
3	1,5	20	60	1	10
4	5	1	200	1	10
5	5	20	200	1	10
6	10	1	400	1	10

Tablo 7. SH-SY5Y A grubu hücrelerine uygulanan pulsatil akım elektrik alan stimülasyon parametreleri.

SH-SY5Y B Grubu

Gruplar (Sütun)	Voltaj (V)	Frekans (Hz)	Elektrik Alan Şiddeti (V/m)	Puls Uzunluğu (ms)	Uygulanma Süresi (dk)
Kontrol	-	-	-	-	-
2	1,5	1	60	1	10
3	1,5	20	60	1	10
4	5	1	200	1	10
5	5	20	200	1	10
6	10	1	400	1	10

Tablo 8. SH-SY5Y B grubu hücrelerine uygulanan pulsatil akım elektrik alan stimülasyon parametreleri.

3.7. Membran Lipit Analizi

Pulsatil akım elektrik alan stimülasyonunun hücre membran lipitleri üzerine olan etkisini görmek amacıyla stimülasyonun ardından hücrelerin membran lipit analizi

gerçekleştirilmiştir. Primer nöron ve SH-SY5Y hücre membran lipitleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High-Performance Liquid Chromatography-HPLC) yöntemi ile analiz edilmiştir.

HPLC, bir karışım içerisindeki bileşenleri ayırmak, tanımlamak ve miktarını belirlemek amacıyla kullanılan kromatografik bir analiz yöntemidir (Blum 2014). Bu analiz yönteminin temelini sıvı fazın katı adsorban maddelerden geçirilmesi ve sıvı örneklerin bu maddelerle etkileşimine bağlı olarak kolondan farklı sürelerde çıkması oluşturmaktadır. Bileşiklerin kolonu terk etme süresi ise Alıkonma Zamanı (Retention Time; Rt) olarak tanımlanır. Eğer sıvı bir örnek katı bir destek üzerindeki durgun faz ile çok fazla etkileşime girerse kolon dışına çıkma süresi fazla, az etkileşime girerse veya hiç etkileşime girmezse de kolon dışına çıkma süresi çok kısa olacak şekilde gerçekleşmektedir. Bu da kromatogramda farklı piklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Membran lipitlerinin analizi için ise hücrelerin öncelikle homojenizasyon ve ekstraksiyon işlemlerinden geçmesi gerekmektedir.

3.7.1. Primer Nöron ve SH-SY5Y Hücre Kültürünün Homojenizasyonu

Membran lipitlerinin izolasyonu için hücrelerin homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu kapsamda ilk olarak kültür kabındaki besiyerleri otomatik pipet yardımıyla çekildi ve PBS ile bir yıkama gerçekleştirildi. Bu işlemin devamında ise her kuyucuğa 1 ml tripsin eklenerek hücrelerin kaldırılma işlemine geçildi. Hücrelerin zeminden kalkmasının ardından aynı oranda serumlu besiyeri eklenerek tripsinin etkisi inhibe edildi. Bu hücre süspansiyonu daha sonra ependorf tüplerine aktarılarak 5000 rpm'de 3 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi ardından tüplerdeki süpernatant atılarak yerine PBS solüsyonu (~ 1.5 ml) eklendi ve vortekslendi. PBS içerisinde süspanse hale getirilen bu hücreler devamında sonikatör içerisinde (her örnek için 10 saniye x 2) homojenize edildi ve ardından örnekler membran lipitlerinin ekstraksiyon işlemine kadar -80 °C'lik buzdolabında muhafaza edildi (Şekil 28).



Şekil 28. Homojenizasyon işlemi. **Şekil A.** homojenizasyon işlemi, **B.** homojenizasyon işleminde kullanılan sonikatörü göstermektedir.

3.7.2. Membran Lipitlerinin Ekstraksiyonu

Membran lipitlerinin ekstraksiyonu için Bligh & Dyer ve Folch metodunun modifiye edilmiş bir protokolü kullanılmıştır (Abbott et al. 2013; Bligh and Dyer 1959). Bu kapsamda ilk olarak -80 °C'deki örnekler dışarı çıkarılarak çözülmeye koyuldu ve ardından vortekslendi. Bu işlem sonrasında ependorf tüplerinin içine homojenettan 0.5 ml alındı ve üzerine aynı miktarda metanol (MeOH) ilave edildi. Hazırlanan bu tüpler daha sonra 1 saat boyunca vortekslendi. Vorteks işleminin bitmesinin ardından tüplerin içine yüksek yoğunluklu 5 µL HCl ve de 1 ml kloroform eklendi ve tüpler 2000 rpm'de 10 dk olacak şekilde santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonrasında tüpler içerisinde alt fazda lipitleri bulunduran kloroform, üst fazda da metanol olacak şekilde iki farklı faz ortaya çıktı. Bu iki farklı fazdan lipitleri bulunduran kloroform fazı pipetler yardımıyla alınarak başka bir ependorfa nakledildi.

3.7.3. Membran Lipitlerinin HPLC Yöntemi ile Analizi

Membran lipitlerinin analizi için kullanılan HPLC koşulları 214S673 proje numarasıyla 3001 Tübitak proje kapsamında gerçekleştirilen ve Doç. Dr. Ayfer YURT

KILÇAR ve ark. tarafından yürütülen “*In Vitro* Koşullarda Oluşturulan Kronik Eksitotoksisitenin Nöral Membran Lipid Profili Üzerine Etkisinin Araştırılması” adlı çalışmasında belirlenen şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki koşullar Tablo 9’da gösterilmiştir.

Kolon	Shim-pack CLC-SIL (6.0mm x 25cm)
Akış Hızı	1.5 mL / dak.
Mobil Faz	% 60 Asetonitril (ACN) - % 20 Metanol - % 20 Su
Dalga Boyu	203 – 205 nm
Sıcaklık	45 °C
Zaman programı	Uygulanmadı

Tablo 9. Ters faz sistemi kullanılarak lipid ekstraktları için uygulanan HPLC koşulları.

HPLC analizlerine başlanmadan önce ilk olarak kloroformun analizde girişim yapması sebebiyle uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem Argon gazı aracılığıyla kloroformun uçurulması şeklinde gerçekleşti. Bu işlemin ardından örneklerin bulunduğu tüplere 0.5 ml metanol ilave edildi. Daha sonra tüplerdeki bu çözelti enjeksiyon filtresi kullanılarak viallere aktarıldı ve örnekler analiz için hazır hale getirildi.

Ölçüm Sırası	Membran Lipit Türü	Ölçüm Zaman Aralıkları (dk)
1	Kolesterol esterleri (CE)	1.095 – 1.800
2	Kolesterol (C)	1.860 – 2.205
3	Fosfotidiletanolamin (PE)	2.220 – 2.460
4	Fosfotidilinozitol/serin (PI/PS)	2.490 – 3.195
5	Fosfotidilkolin (PC)	3.225 – 3.795
6	Sfingomiyelin (Sfingolipit- SP)	3.810 – 5.025

Tablo 10. Membran lipit türlerinin HPLC ölçüm sıraları ve ölçüm zaman aralıkları.

Primer nöron hücrelerinden elde edilen örneklerin, her biri için 6 tekrar ve her tekrarda 10 µL enjeksiyon hacmi, SH-SY5Y örneklerinin ise her biri için 3 tekrar ve her tekrarda 10 µL enjeksiyon hacmi olacak şekilde analizi gerçekleştirildi. Bu analizdeki membran lipid kompozisyonları ise Tablo 10’da gösterilen ölçüm zaman aralıklarında 6 farklı lipid grubu şeklinde belirlendi.

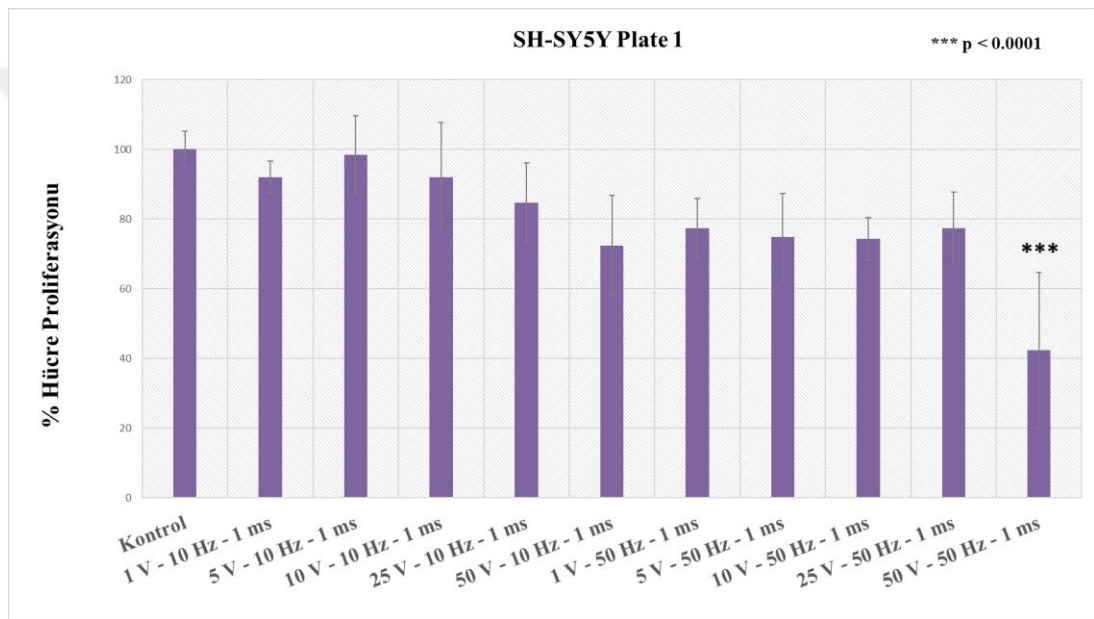
3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada gerçekleştirilen istatistiksel analiz için SPSS istatistik paketi kullanılmış ve gruplar arasında gerçekleşen farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. Farkın anlamlı bulunduğu değişkenlerde gruplar arası varyansın homojen olması durumunda Post-Hoc yöntem olarak Tukey testi kullanılmıştır. Varyansın gruplar arası homojen olmadığı durumlarda Post-Hoc Dunnett T3 testi uygulanmıştır. Tüm hipotez testlerinde anlamlılık düzeyi 0.05 alınmıştır.

Bulgular

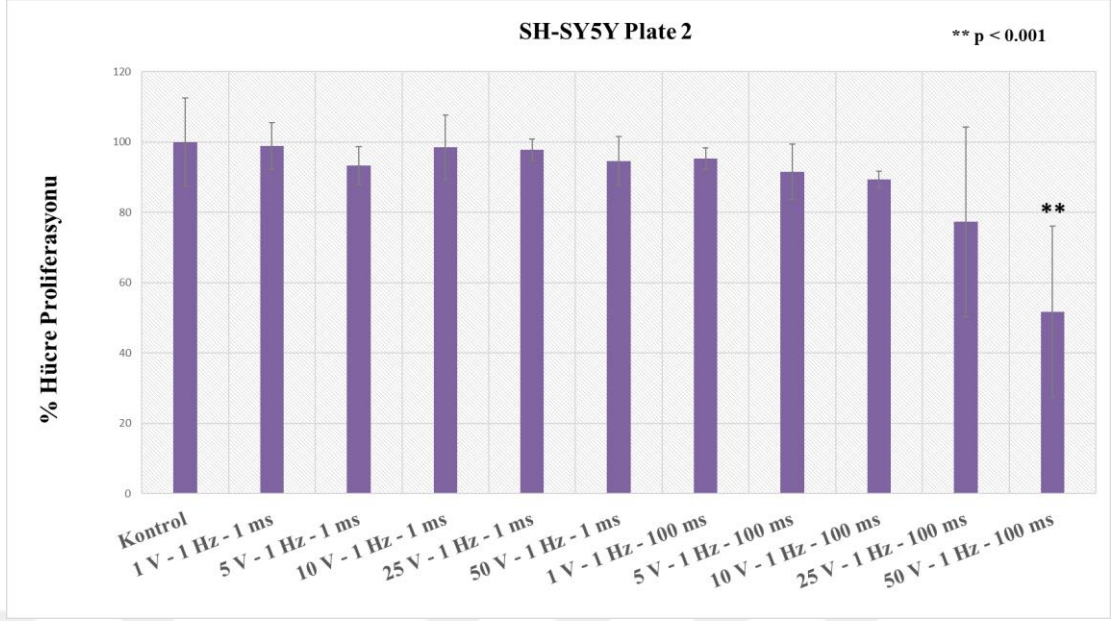
4.1. Hücre Canlılık Testleri (MTS)

96 kuyucuklu kültür kabında bulunan SH-SY5Y hücrelerinde, farklı voltaj ve frekanstaki elektriksel stimülasyonunun hücre proliferasyonundaki etkilerini göstermek amacıyla hücre canlılık testi (MTS) gerçekleştirildi ve sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldı.



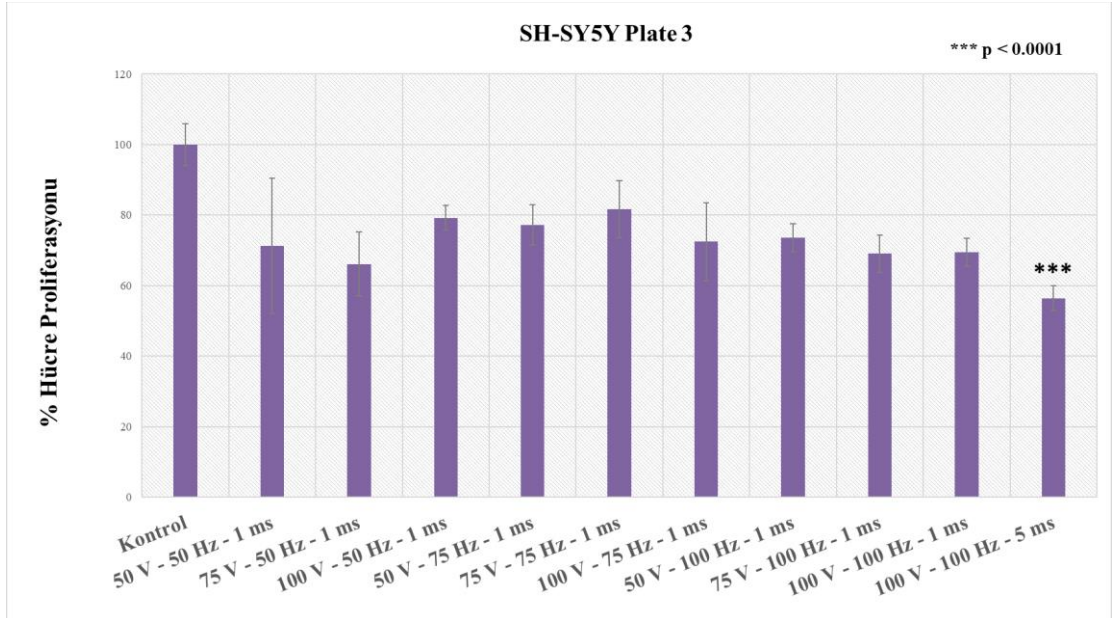
Grafik 1. Farklı parametrelerde uygulanan stimülasyonların hücre proliferasyonuna olan etkileri (Plate 1).

Değişik voltaj ve frekansta uyarılan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında uyarılan bütün grupların hücre proliferasyonunda bir azalma olduğu ancak içlerinden istatistiksel olarak en anlamlı grubun Plate 1'e uygulanan en yüksek dozdaki 50 V ve 50 Hz'deki grup ($p < 0.0001$) olduğu belirlenmiştir (Grafik 1).



Grafik 2. Farklı parametrelerde uygulanan stimülasyonların hücre proliferasyonuna olan etkileri (Plate 2).

Grafik 1 ile paralel bir şekilde Plate 2'ye uygulanan dozlar arasında yine 50 V'luk grubun (frekansı;1 Hz, uygulama süresi 100 ms) hücre proliferasyonunu anlamlı derecede azalttığı ($p < 0.001$) görülmektedir (Grafik 2).



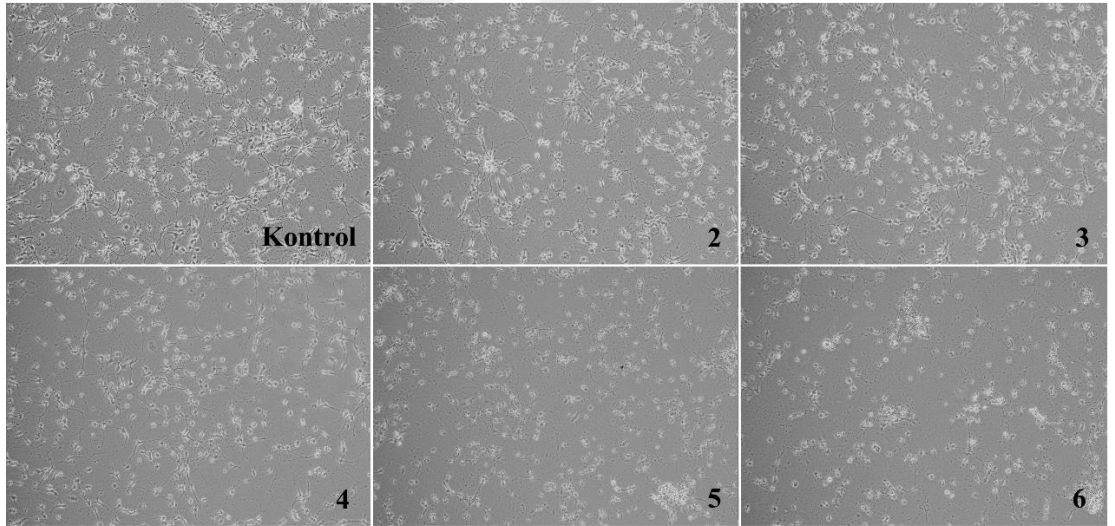
Grafik 3. Farklı parametrelerde uygulanan stimülasyonların hücre proliferasyonuna olan etkileri (Plate 3).

İlk 2 testten elde edilen sonuçlarda yalnızca 50 V değerindeki grubun anlamlı bir düşüş yaratması üzerine bu grubun parametrelerinden daha yüksek değerlerdeki canlılık aktivitesine bakılmış ve 100 V – 100 Hz – 1 ms grubunun aksine 100 V – 100 Hz – 5 ms grubunun ($p<0.0001$) anlamlı derecede hücre canlılığını azalttığı ortaya koyulmuştur.

4.2. Hücre Kültürünün Stimülasyon Kaynaklı Mikroskopik Bulguları

Pulsatil akım elektrik alan stimülasyonu uygulamasından sonra hipokampal ve kortikal nöronların mikroskop görüntüleri kaydedilmiş ve stimülasyonun hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir.

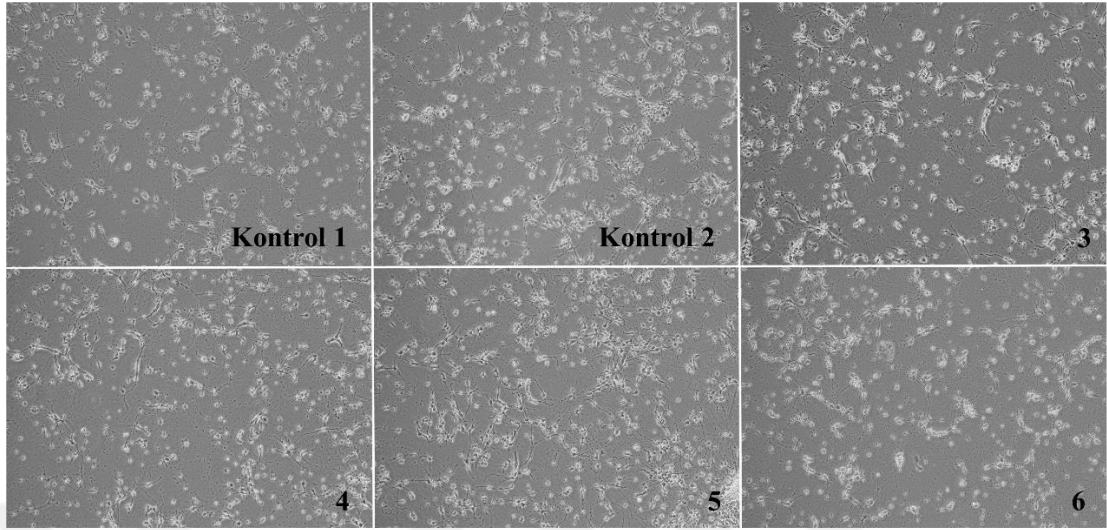
4.2.1. PCEF Sonrası Hipokampus Nöronları



Şekil 29. PCEF stimülasyonu gerçekleştirilen hipokampal nöronların uygulama sonrasındaki invert mikroskop görüntüleri.

PCEF sonrası hipokampal nöronların mikroskopik görüntülerine bakıldığında artan voltaj ve frekansla hücrelerin canlılığı ve sinaptik bağlantılarında gözle görülebilir bir azalma olduğu ortaya çıkmıştır. 5. ve 6. Gruptaki hücrelerin tamamına yakını canlılığını yitirdiği için bu grupların lipid analizleri gerçekleştirilmemiştir (Şekil 29).

4.2.2. PCEF Sonrası Korteks Nöronları



Şekil 30. PCEF stimülasyonu gerçekleştirilen korteks nöronlarının uygulama sonrasındaki invert mikroskop görüntüleri.

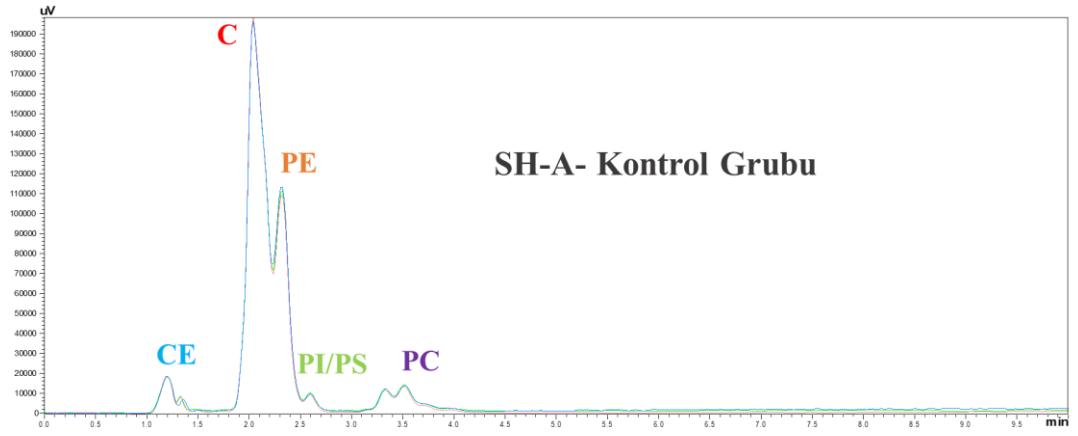
PCEF sonrası korteks nöronların mikroskopik görüntüleri hücre canlılığı ve sinaptik bağlantı kapsamında incelendiğinde yalnızca 6. Grubun (200 V/m - 20 Hz) kontrol gruplarıyla arasında az da olsa bir fark olduğu gözlenmiştir.

4.3. Lipit Analizleri

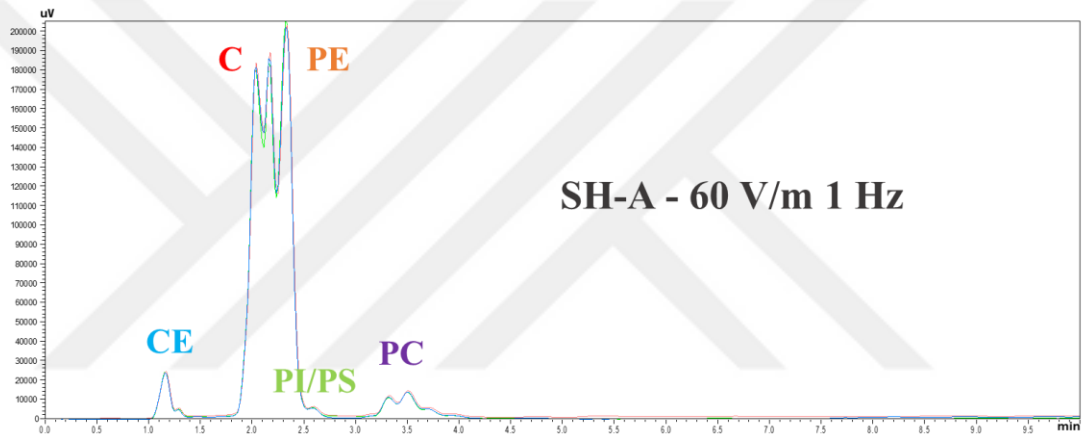
Tez kapsamında sıçanların korteks ve hipokampus bölgelerinden elde edilen primer nöronlar ile SH-SY5Y hücrelerine uygulanan elektriksel alanın membran lipitleri konsantrasyonları üzerindeki etkileri yüzdesel miktarda hesaplanmış ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. HPLC analizindeki membran lipitleri için elde edilen kromatogramlardan bazıları her hücre tipinin genel başlığı altında sunulurken, istatistiksel analiz sonucu oluşan grafiklere alt başlıklarda altında yer verilmiştir.

4.3.1. SH-SY5Y Hücreleri

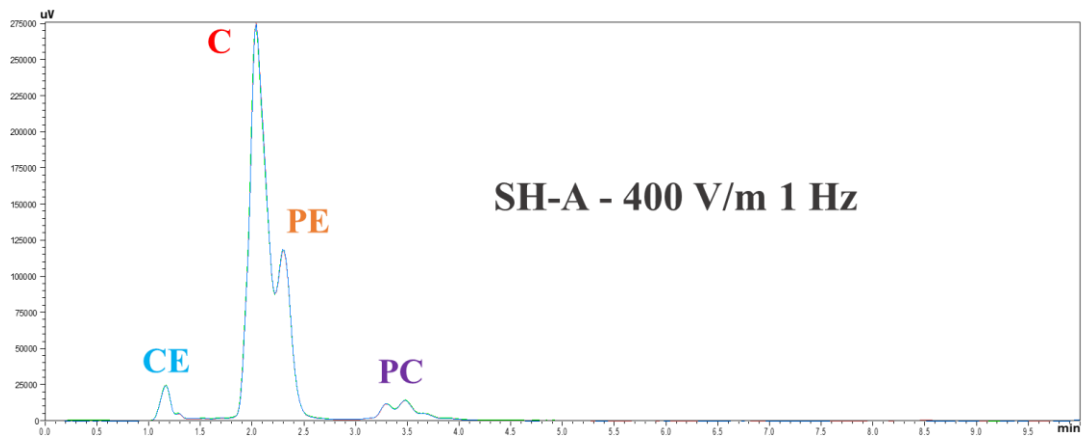
SH-SY5Y hücrelerinin lipit analiz sonuçları, iki farklı hücre kültürü kabı üzerinde gerçekleşen grupları belirtmek adına SH-A ve SH-B şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 31. PCEF sonrası SH-A grubu hücreleri kontrol grubuna ait lipid kromatogramı.

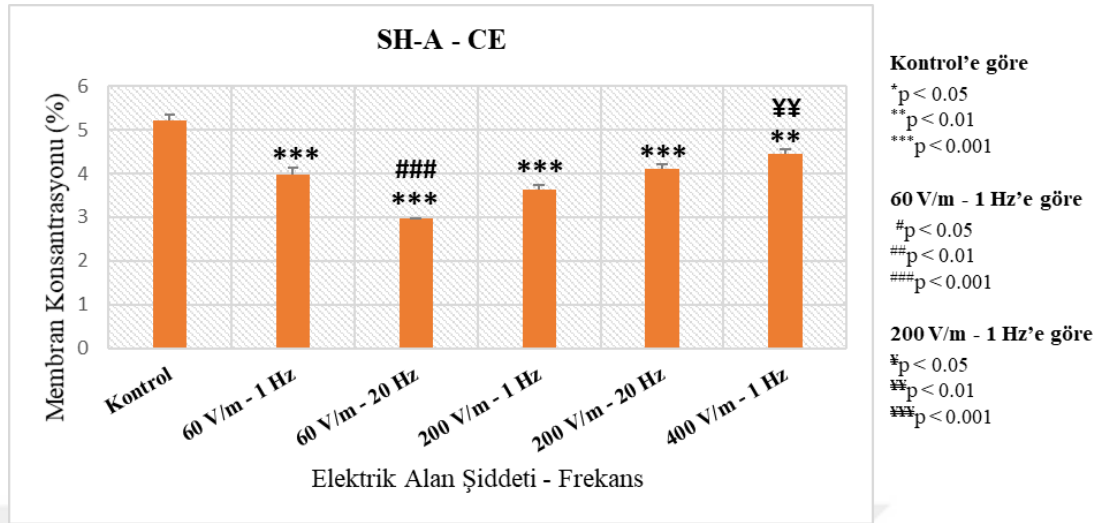


Şekil 32. PCEF sonrası SH-A grubu hücreleri 60 V/m - 1 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.

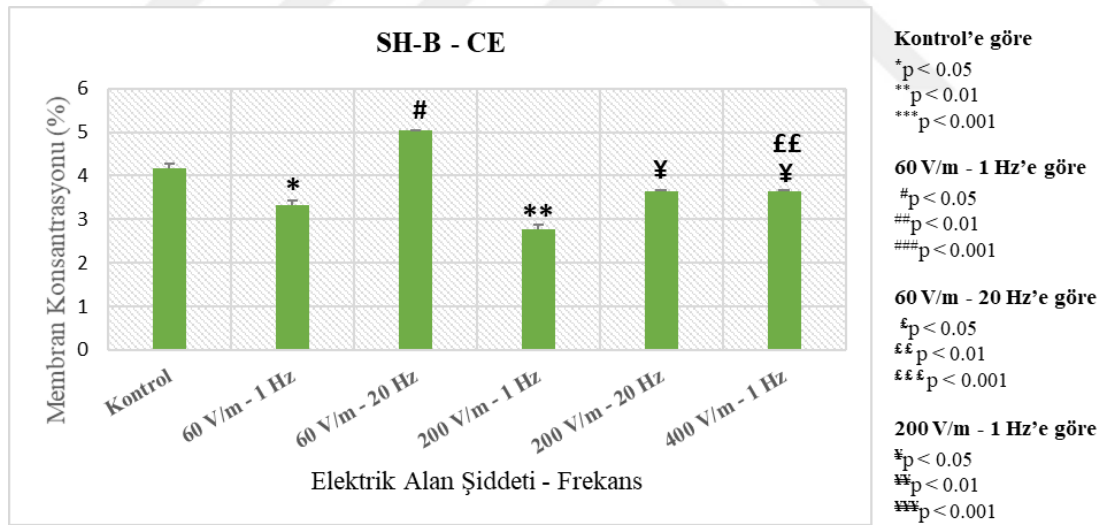


Şekil 33. PCEF sonrası SH-A grubu hücreleri 400 V/m - 1 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.

4.3.1.1. Kolesterol Esterleri



Grafik 4. SH-SY5Y A grubu hücrelerin kolesterol esterleri (CE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

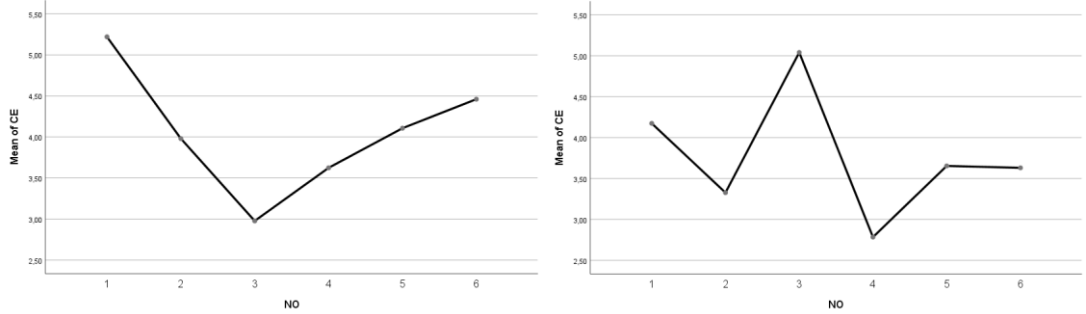


Grafik 5. SH-SY5Y B grubu hücrelerin kolesterol esterleri (CE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

SH-SY5Y A grubu hücrelerine uygulanan tüm parametrelerdeki PCEF'lerin kontrol grubuyla arasında anlamlı bir değişiklik bulunmakta birlikte stimülasyonun CE'lerin tüm gruplarda azalmasına yol açtığı ortaya çıkmıştır (Grafik 4). Bunun yanında

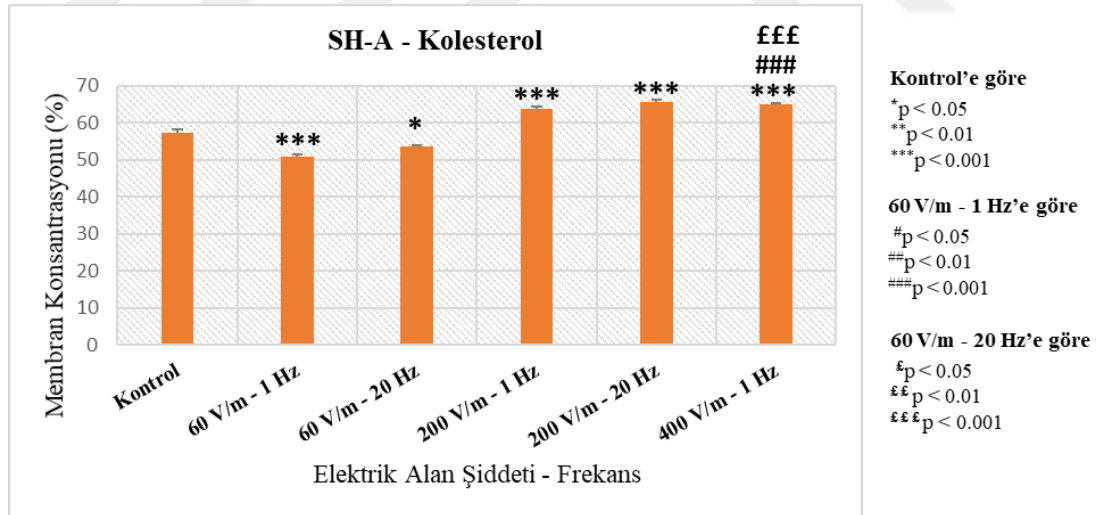
60 V/m elektrik alan şiddeti uygulanan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde frekansı daha yüksek grubun membranda daha fazla CE miktarında azalmaya yol açtığı belirlenmiştir ($p<0.001$).

SH-SY5Y B grubu CE'lerine bakıldığında ise yalnızca 2 ve 4. Gruplarda kontrole göre anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür (Grafik 5).



Grafik 6. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları CE konsantrasyonlarının gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

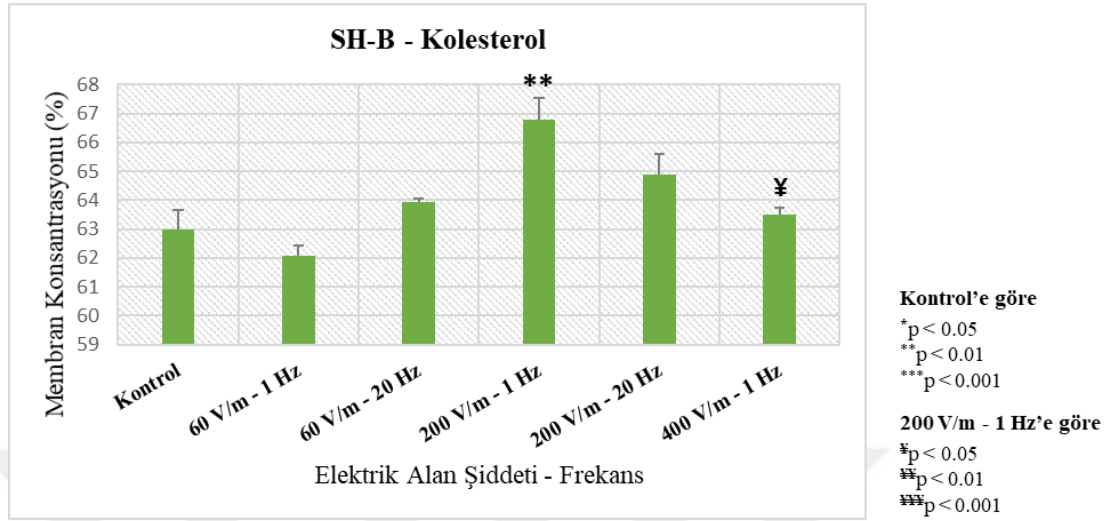
4.3.1.2. Kolesterol



Grafik 7. SH-SY5Y A grubu hücrelerin kolesterol (Cholesterol - C) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

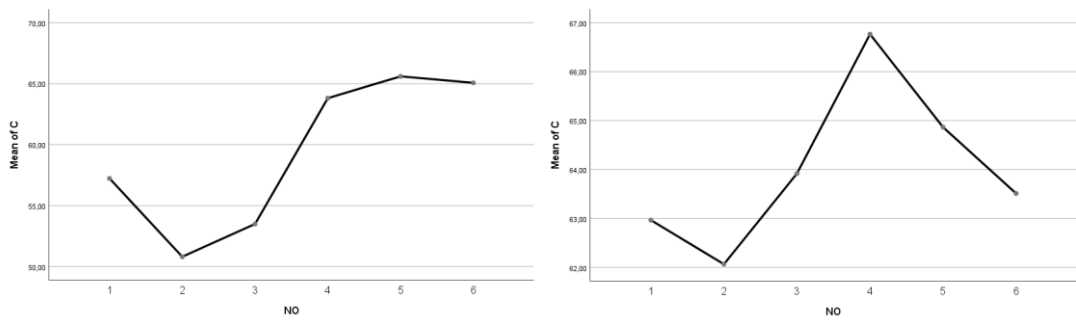
SH-A grubu hücrelerin membran kolesterol konsantrasyonları 1-20 Hz frekanslardaki 60 V/m gruplarında kontrole göre anlamlı derecede azalırken, bu grupların üzerinde değerlere sahip tüm gruplardaki kolesterol seviyelerinin anlamlı derecede arttığı

gözlenmiştir. Buna ilaveten, en yüksek elektrik alan şiddetine sahip olan 6. gruptaki C seviyelerinin de 2. ve 3. gruba göre anlamlı şekilde ($p<0.001$) arttığı belirlenmiştir.



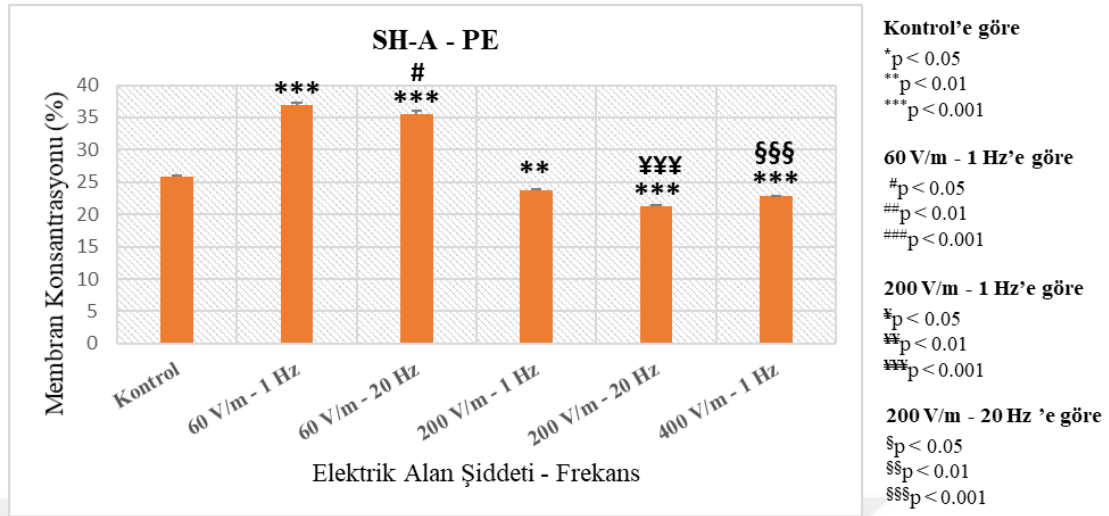
Grafik 8. SH-SY5Y B grubu hücrelerin kolesterol (C) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

Grup B hücrelerindeki C seviyeleri incelendiğinde ise yine Grup A'daki hücelere benzer şekilde 4. gruptan itibaren C seviyelerinin arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak en anlamlısının yine 4. grupta gerçekleştiği kaydedilmiştir ($p<0.01$).



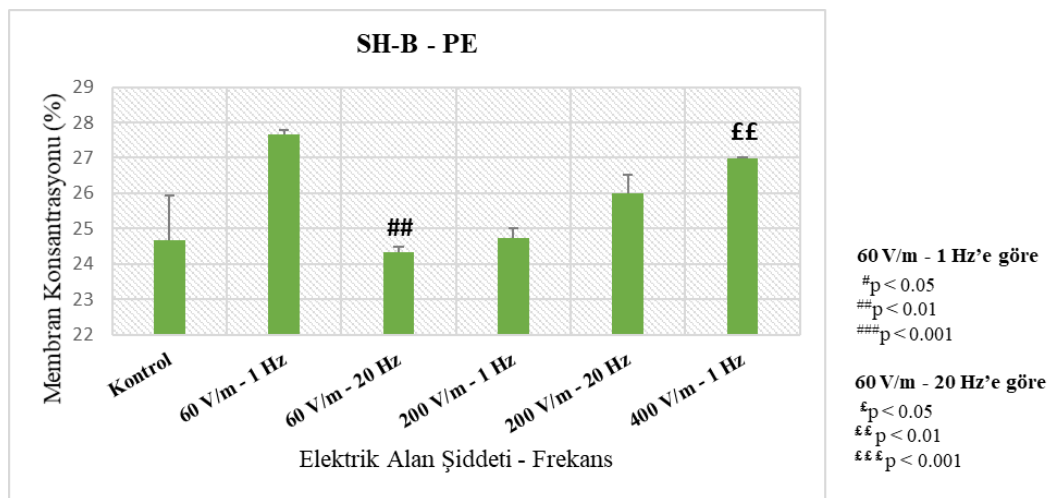
Grafik 9. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları C konsantrasyonlarının gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

4.3.1.3. Fosfotidiletanolamin



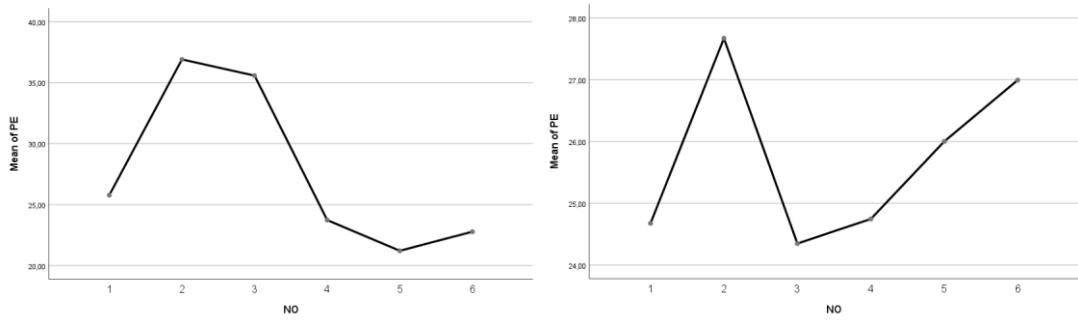
Grafik 10. SH-SY5Y A grubu hücrelerin fosfotidiletanolamin (PE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

A grubu hücrelerin memrandaki PE konsantrasyonları tüm gruplarda kontrole göre anlamlı bir farklılık gösterirken, bu farklılık 2 ve 3. gruplarda PE seviyelerinde artış, 3,4 ve 5. gruplarda ise bir azalış şeklinde kendini göstermektedir. 2. ve 3. grupların kendi aralarındaki değerlendirme de ise frekansın PE konsantrasyonundaki artışı etkilediği ortaya koyulmuştur. Grup 4 ve 5'teki bu frekanstaki artışın kontrasyondaki azalışa etkisi de Grup 2 ve 3'tekine benzer şekilde gerçekleşmiştir.



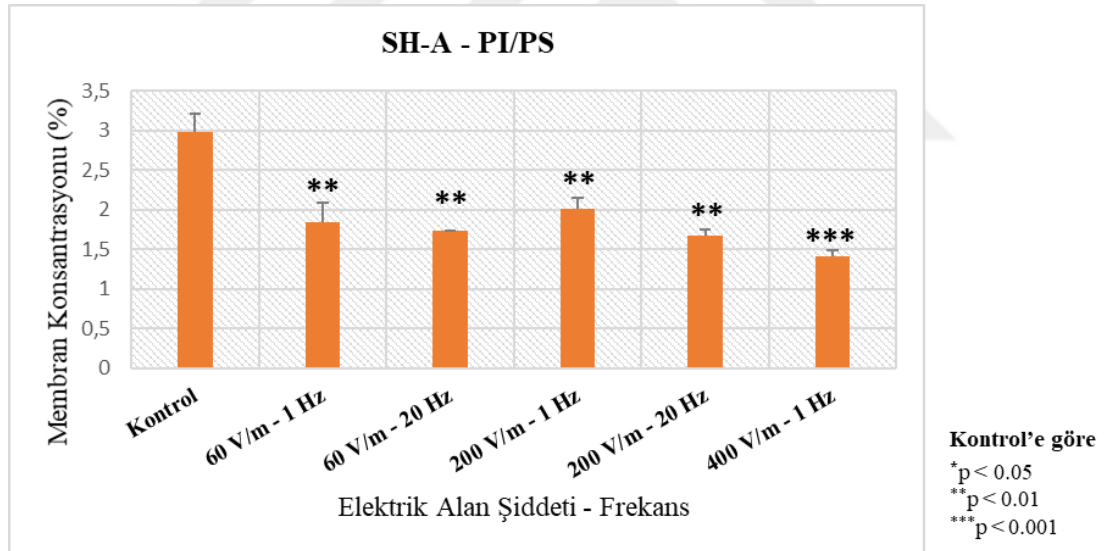
Grafik 11. SH-SY5Y B grubu hücrelerin fosfotidiletanolamin (PE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

SH-B grubu hücrelerinde ise kontrole göre anlamlı herhangi bir değişiklik söz konusu değildir (Grafik 11).



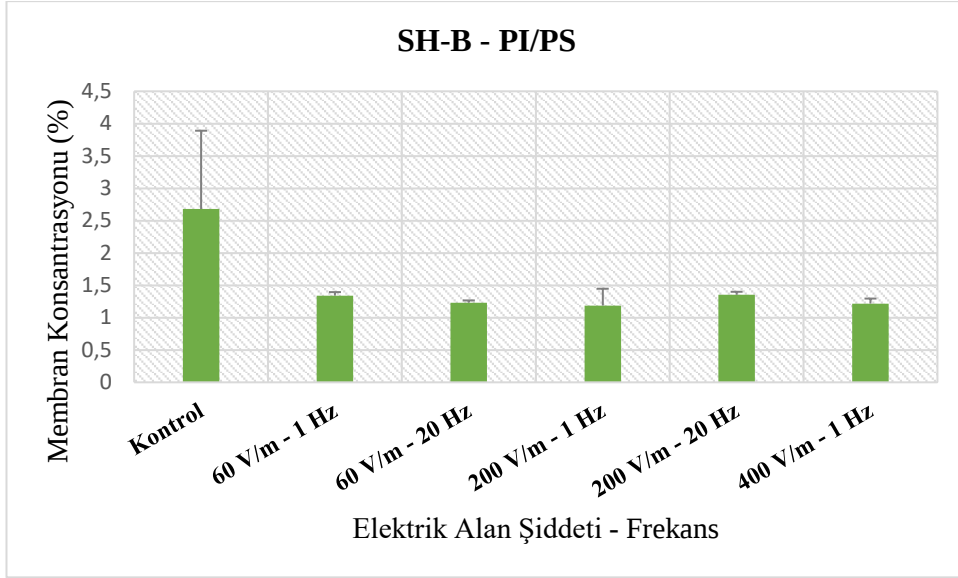
Grafik 12. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları PE konsantrasyonlarının gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

4.3.1.4. Fosfotidilinozitol/Fosfotidilserin



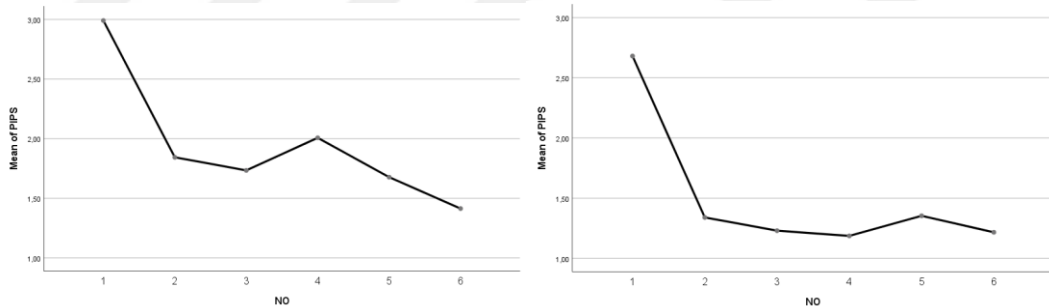
Grafik 13. SH-SY5Y A grubu hücrelerin fosfotidilinozitol/serin (PI/PS) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

SH-A grubundaki PI/PS seviyeleri kontrole göre tüm gruplarda anlamlı şekilde azalırken bu azalıştaki oran SH-A grubu PE oranlarındakine benzer şekilde frekansla ilişkilidir (Grafik 13).



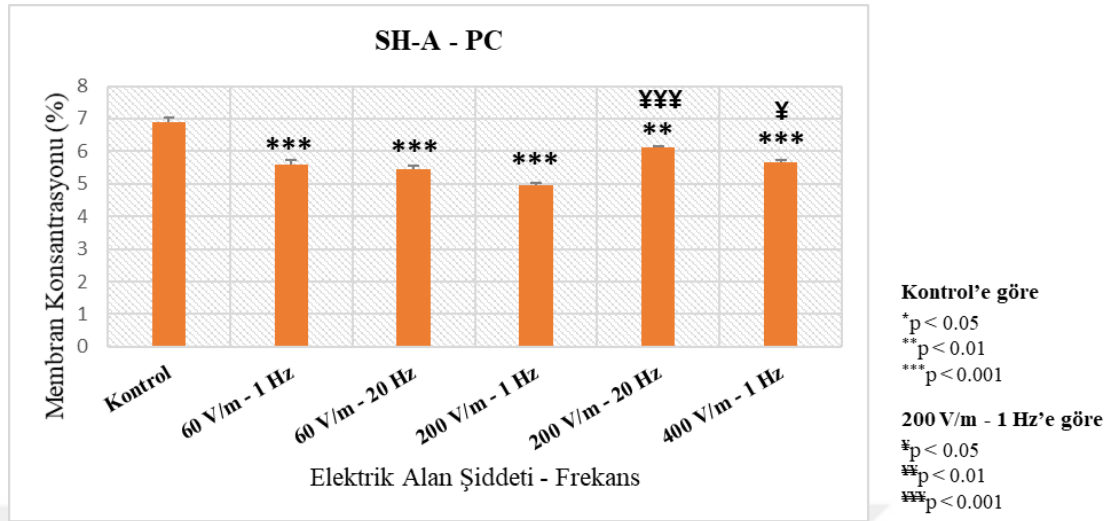
Grafik 14. SH-SY5Y B grubu hücrelerin fosfotidilinozitol/serin (PI/PS) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

SH-B ise SH-A'ya benzer şekilde azalışlar görülürken standart sapmanın yüksek olması bu azalışların istatistiksel olarak anlamlı bulunmasını engellemiştir.



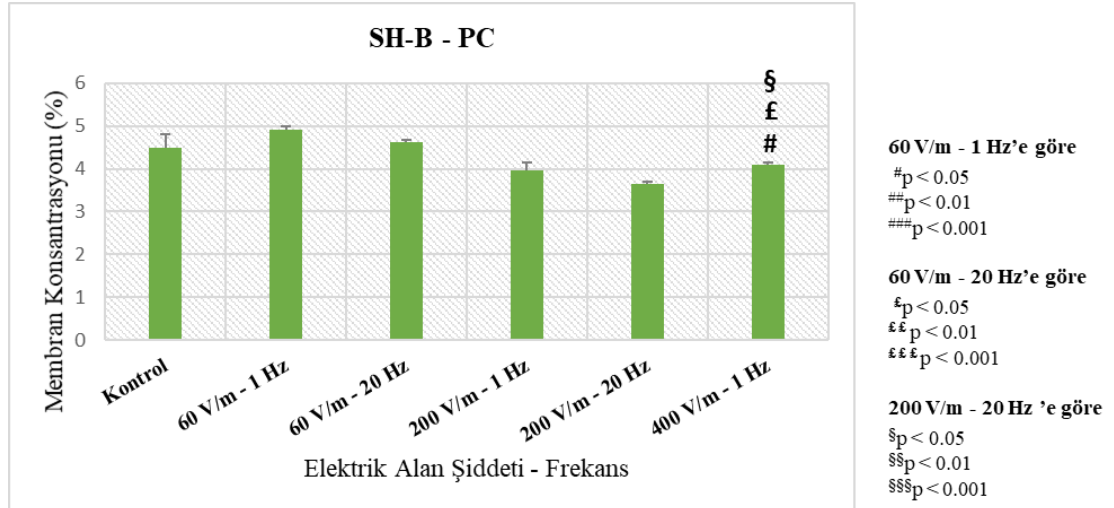
Grafik 15. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları PI/PS konsantrasyonlarının gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

4.3.1.5. Fosfotidilkolin

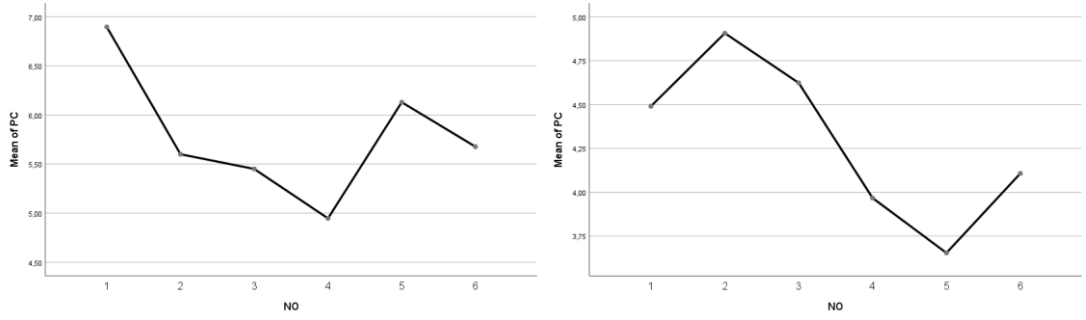


Grafik 16. SH-SY5Y A grubu hücrelerin fosfotidilkolin (PC) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

SH-A grubu hücreleri membran PC konsantrasyonları tüm gruplarda kontrole göre anlamlı şekilde azalmıştır. Ancak 5. ve 6. gruplardaki bu azalış diğer gruplara göre nispeten daha düşük değerlerdedir (Grafik 16).



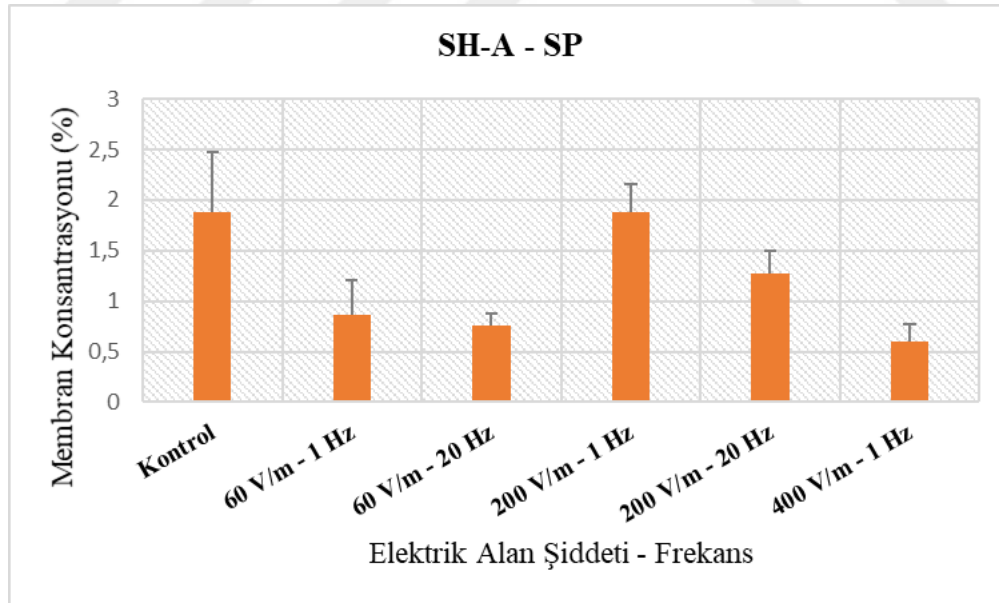
Grafik 17. SH-SY5Y B grubu hücrelerin fosfotidilkolin (PC) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.



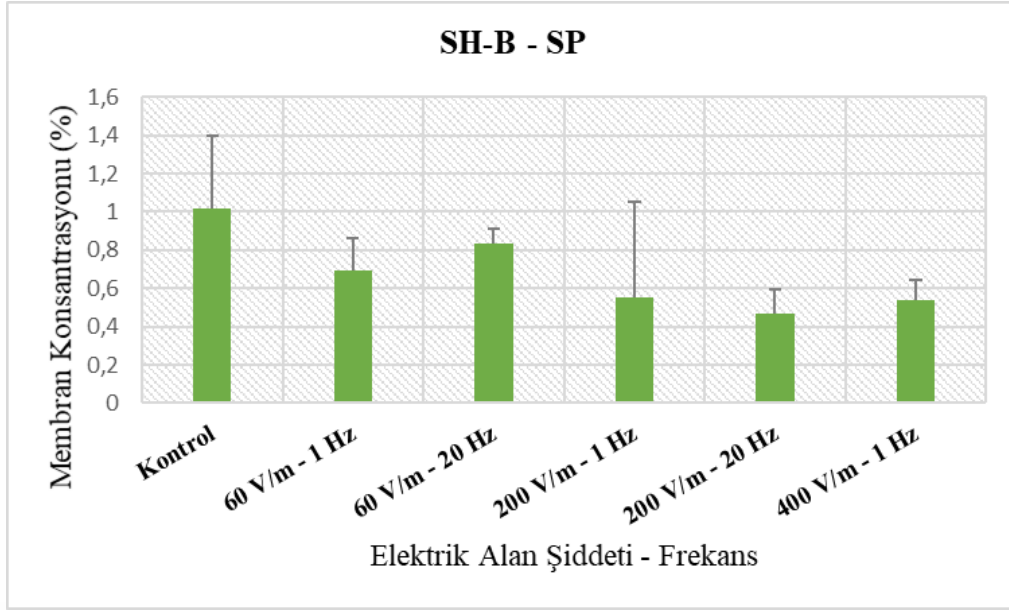
Grafik 18. PCEF sonrası SH-A (solda) ve SH-B (sağda) grupları SP konsantrasyonlarının gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

4.3.1.6. Sfingomiyelin

Sfingolipitlerin (SP) en çok bilinen ve membranda en çok bulunan türü olan sfingomiyelinlerin PCEF sonrası SH-SY5Y hücrelerinin her iki grubunda da anlamlı hiçbir değişiklik gözlenmemiştir (Grafik 19 ve 20).

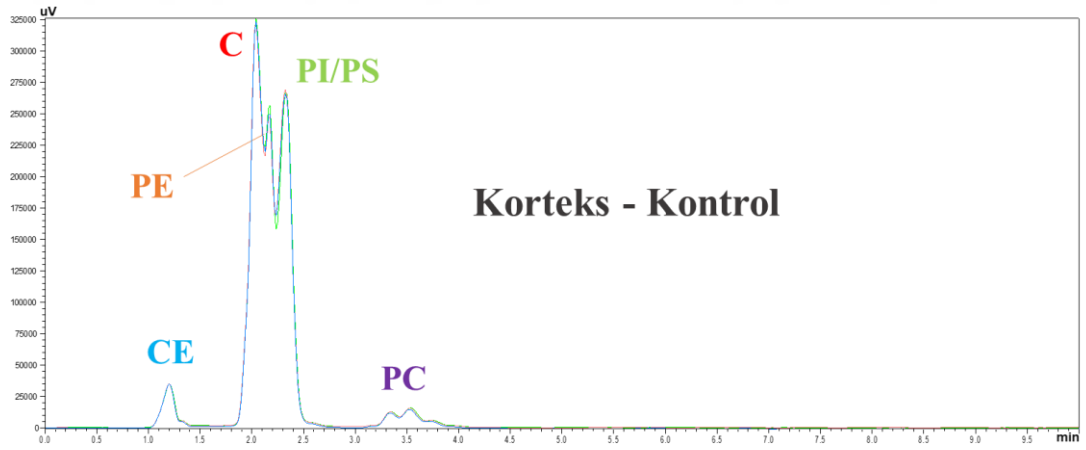


Grafik 19. SH-SY5Y A grubu hücrelerin sfingomiyelin (SP) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

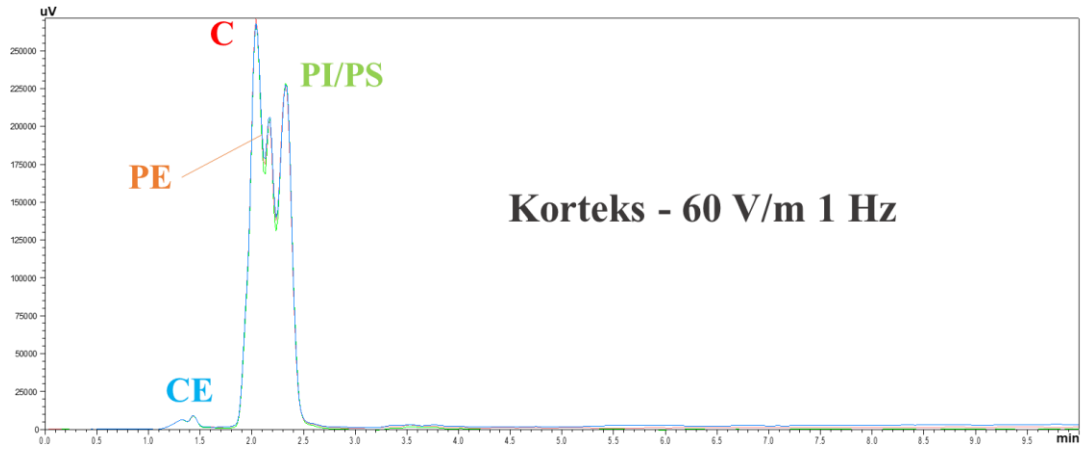


Grafik 20. SH-SY5Y B grubu hücrelerin sfingomiyelin (SP) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

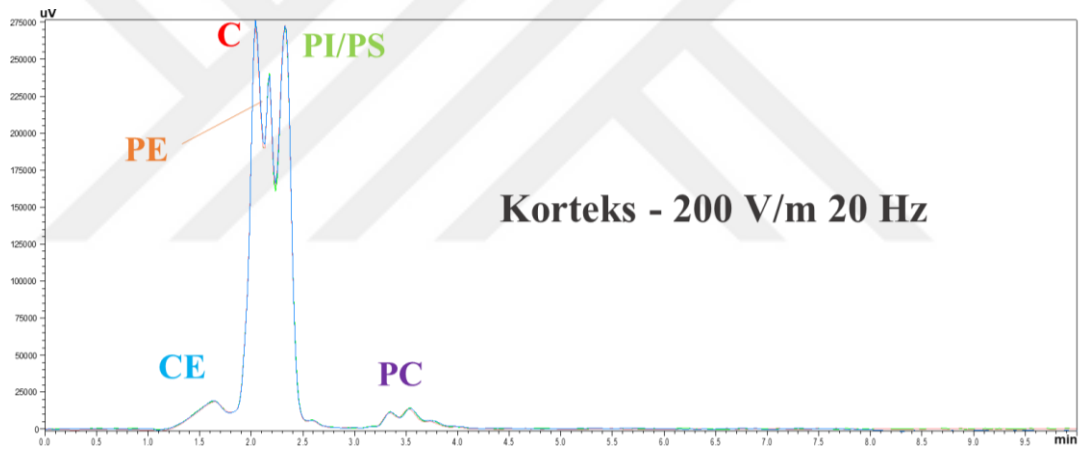
4.3.2. Korteks Nöronları



Şekil 34. PCEF sonrası korteks nöronları kontrol grubuna ait lipid kromatogramı.

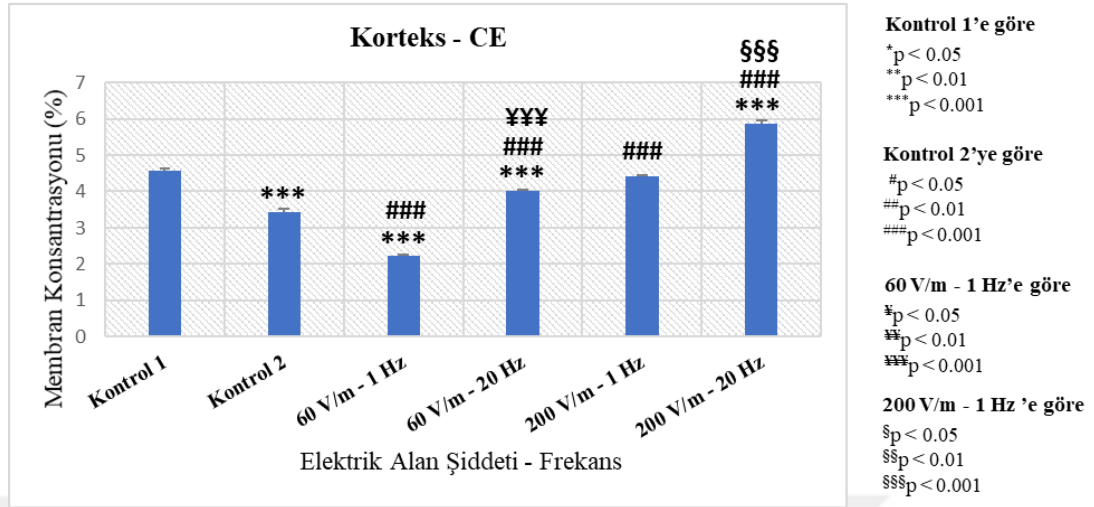


Şekil 35. PCEF sonrası korteks nöronları 60 V/m - 1 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.



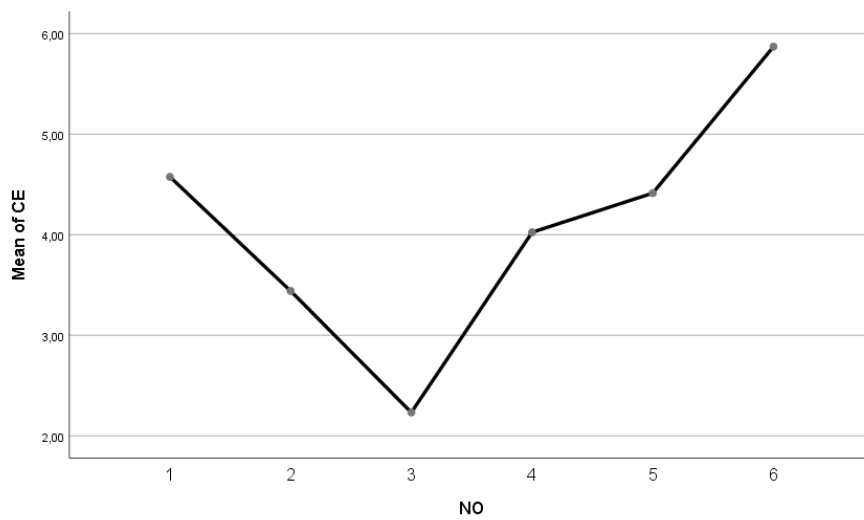
Şekil 36. PCEF sonrası korteks nöronları 200 V/m - 20 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.

4.3.2.1. Kolesterol Esterleri



Grafik 21. Korteks nöronlarının kolesterol esterleri (CE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

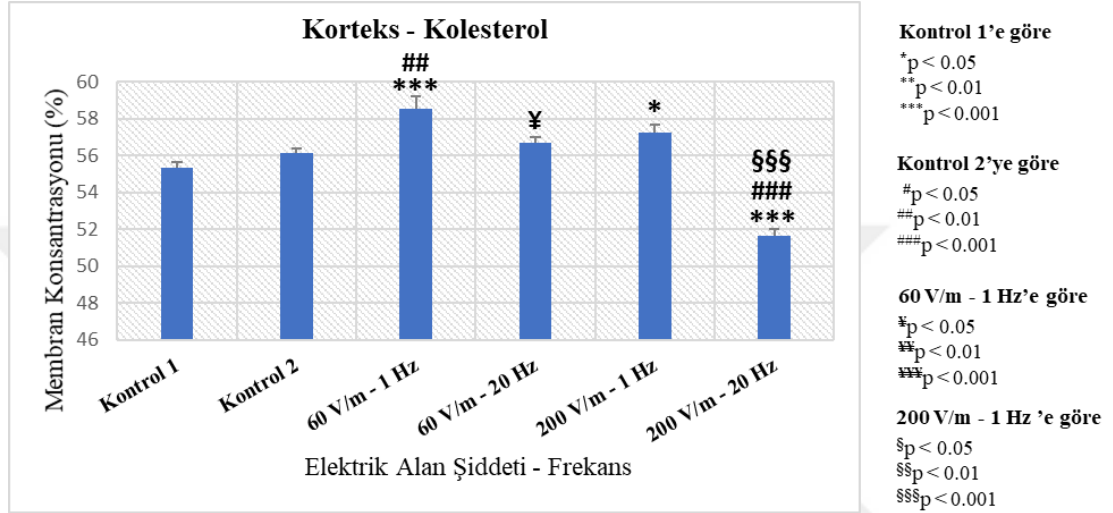
PCEF sonrası korteks nöronları membran CE değerleri incelendiğinde 5. Grup hariç diğer grupların tamamında Kontrol 2'ye göre anlamlı bir değişiklik söz konusudur. Bu değişiklik 3. grupta azalış yönündeyken, diğer tüm gruplarda artış yönünde kendini göstermektedir.



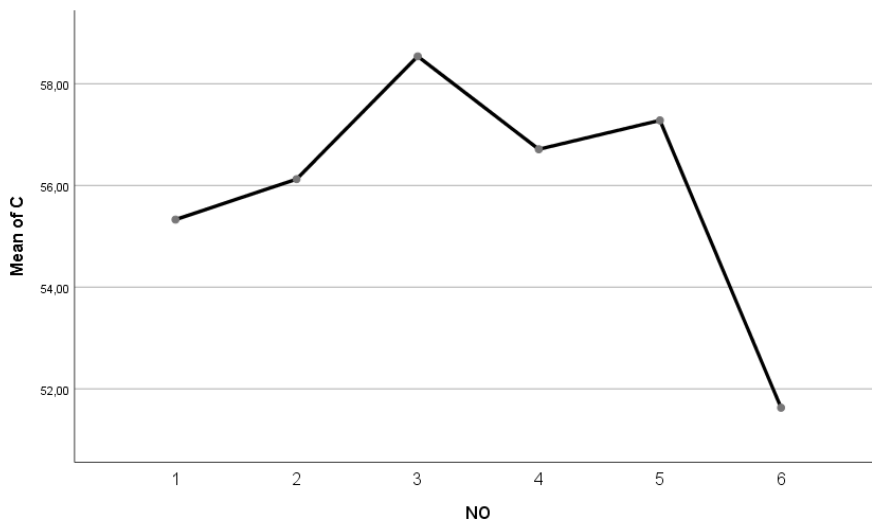
Grafik 22. PCEF sonrası korteks nöronları CE konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

Bunun yanında aynı zamanda 6. Grubun Kontrol 1 grubuyla da anlamlı derecede bir farklılığı bulunmaktadır. Kontrol 1 ile Kontrol 2 grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunması örneklerin bu gruplar arasında homojen bir şekilde dağılmadığını yansıtmaktadır (Grafik 21).

4.3.2.2. Kolesterol



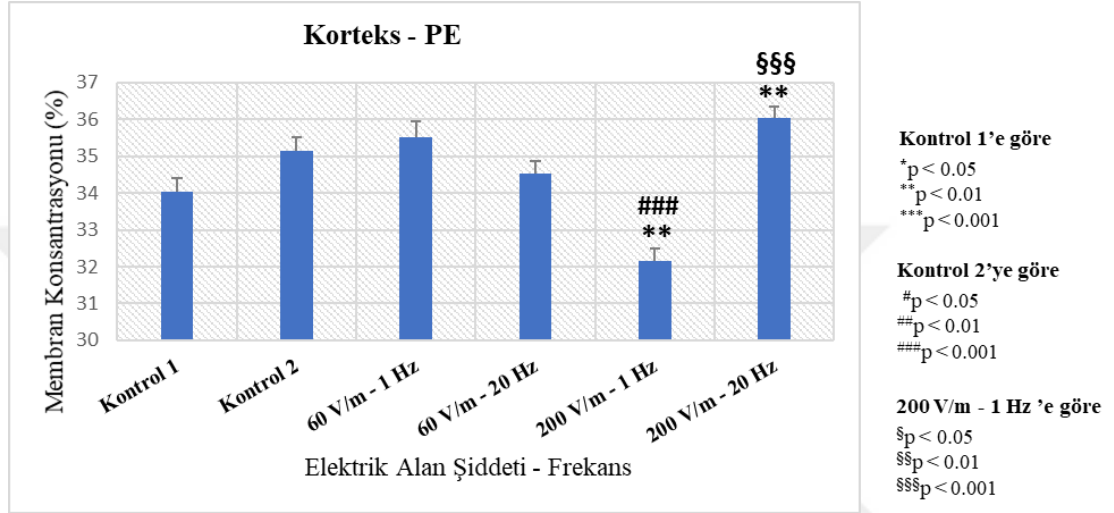
Grafik 23. Korteks nöronlarının kolesterol (C) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.



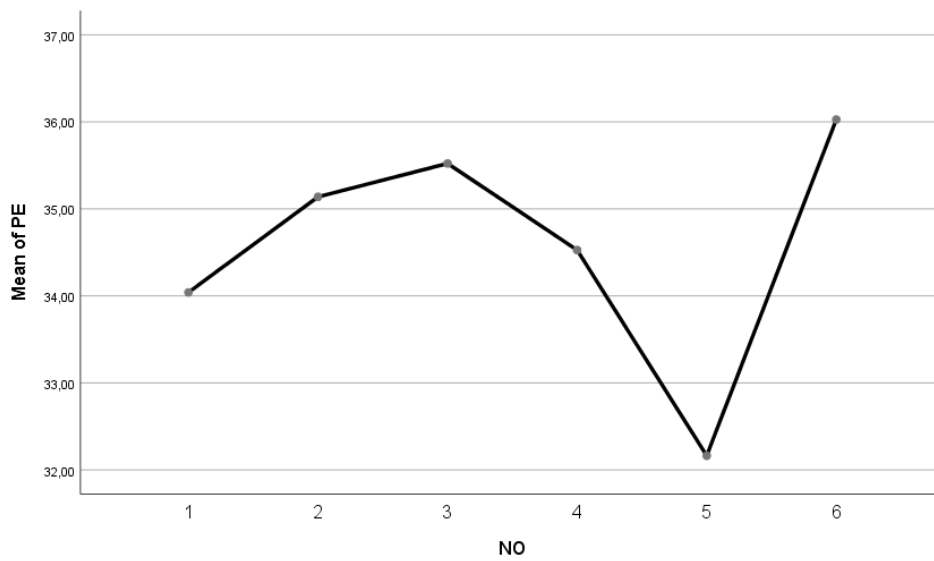
Grafik 24. PCEF sonrası korteks nöronları C konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

Korteks nöronları C membran konsatrasyonları 3, 5 ve 6. Gruplarda kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde değişiklik göstermektedir. Bu değişiklik 3 ve 5. gruplarda artış şeklinde görülürken, gruplar içerisindeki en yüksek elektrik alan şiddeti - frekans oranına sahip grupta bir azalış şeklindedir.

4.3.2.3. Fosfotidiletanolamin



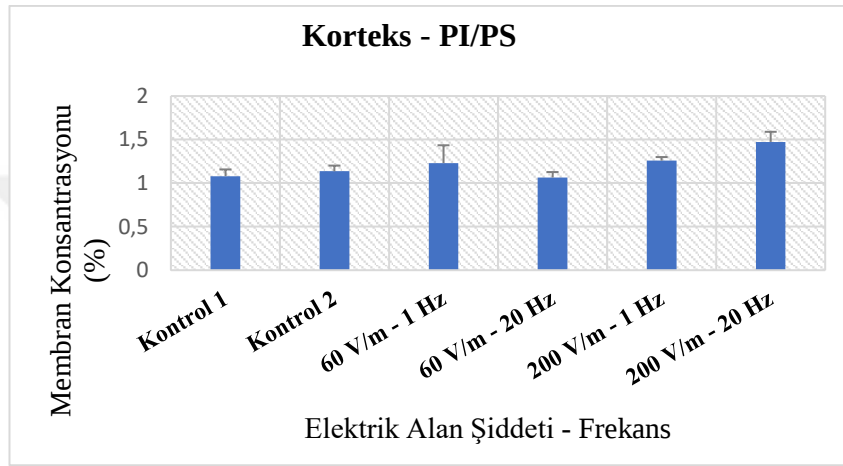
Grafik 25. Korteks nöronlarının fosfotidiletanolamin (PE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.



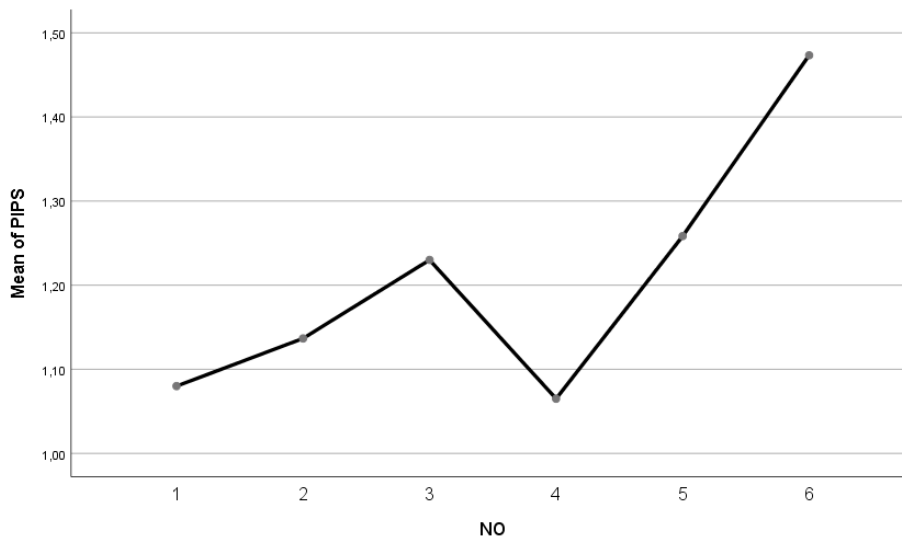
Grafik 26. PCEF sonrası korteks nöronları C konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

PCEF uygulanan korteks nöronlarının membran PE oranları karşılaştırıldığında 200 V/m elektrik alan şiddetinde anlamlı değişimler söz konusudur. Bu değer hipokampal PE değişimlerinin de gerçekleştiği değerle aynıdır. Fakat düşük frekanslı 5. Gruptaki PE değerleri kontrole göre azalmışken, 5. Gruba göre daha yüksek frekansa sahip 6. Grubun PE değerleri anlamlı şekilde artmıştır (Grafik 25).

4.3.2.4. Fosfotidilinozitol/Fosfotidilserin



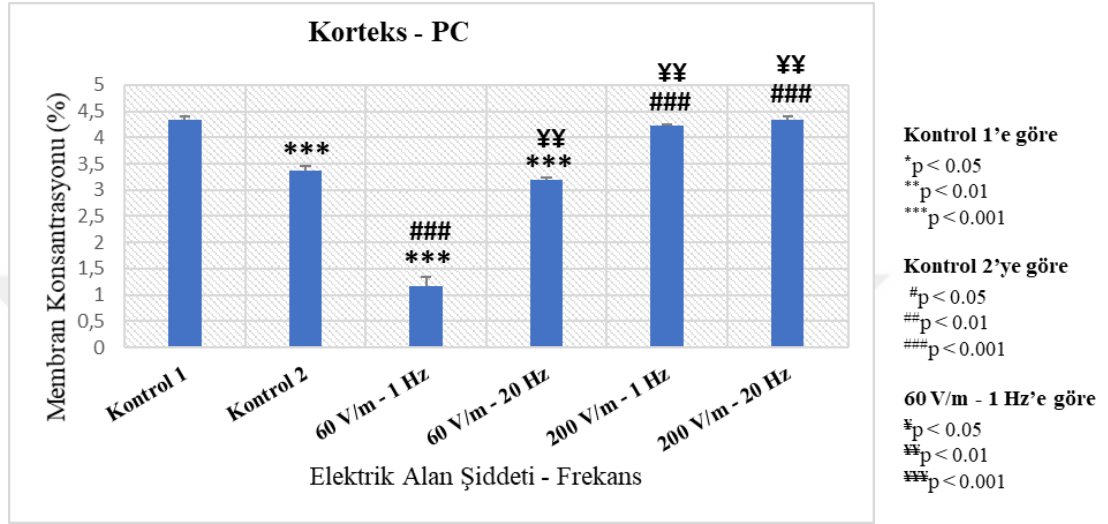
Grafik 27. Korteks nöronlarının fosfotidilinozitol/serin (PI/PS) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.



Grafik 28. PCEF sonrası korteks nöronları PI/PS konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

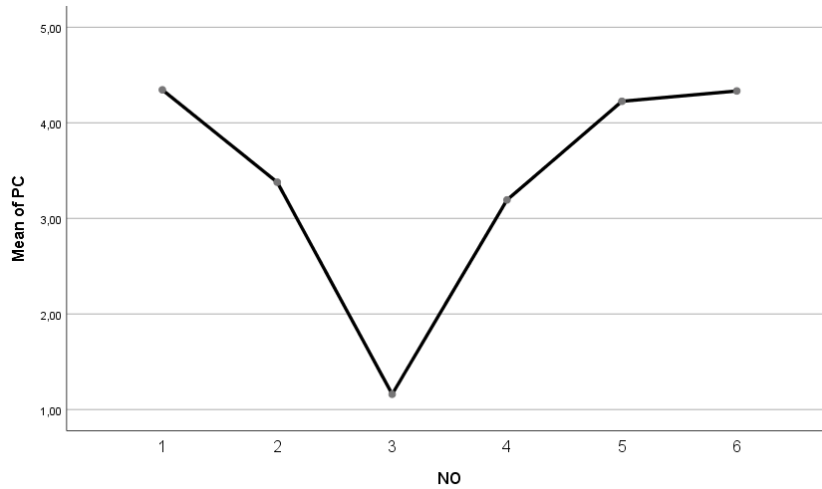
Korteks nöronları membran PI/PS konsantrasyonlarında olasılıkla yüksek standart sapma yüzünden yüzdesel bakımdan anlamlı hiçbir sonuç bulunmamaktadır (Grafik 27).

4.3.2.5. Fosfotidilkolin



Grafik 29. Korteks nöronlarının fosfotidilkolin (PC) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

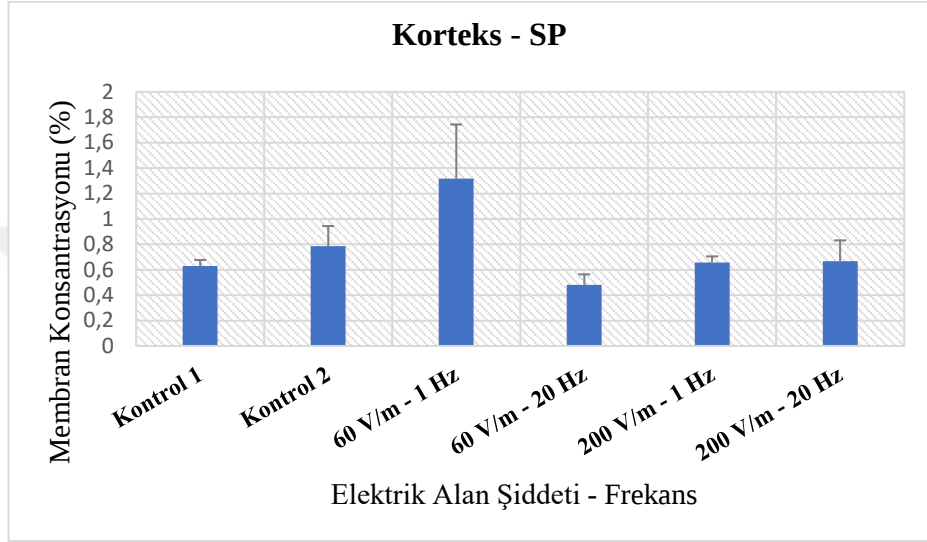
Korteks nöronları membran PC oranları Kontrol 1'e göre tüm gruplarda azalma yönündedir ancak bu azalmalar yalnızca 3. ve 4. grupta anlamlı bir şekildedir ($p < 0.001$).



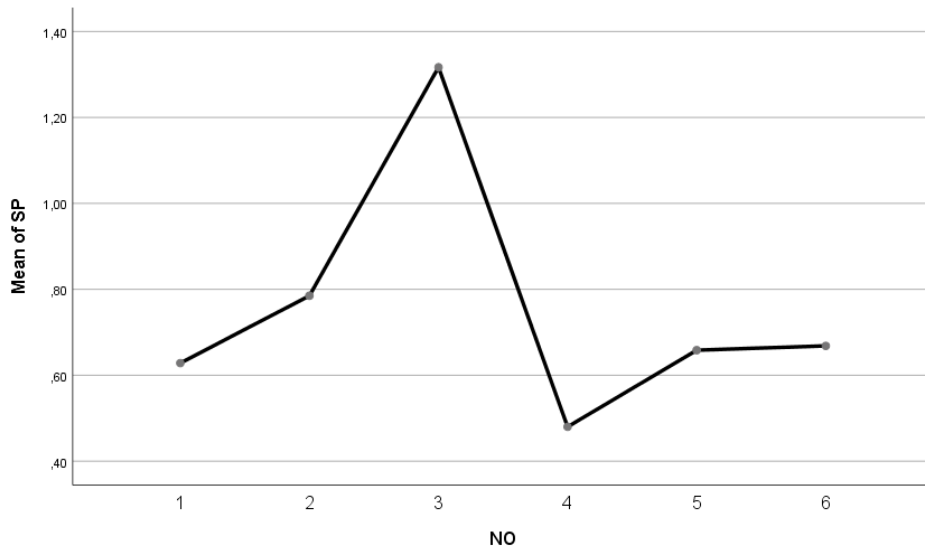
Grafik 30. PCEF sonrası korteks nöronları PC konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

Kontrol 2'ye göre ise 3. grup PC oranları azalmaya, 5. ve 6. gruplara göre ise artmaya eğilimlidir ($p<0.001$). Bunların dışında, 3. grupta 4, 5 ve 6. gruplar arasında, artan elektrik alan şiddeti - frekans oranıyla paralel ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış görülmektedir (Grafik 29).

4.3.2.6. Sfingomiyelin



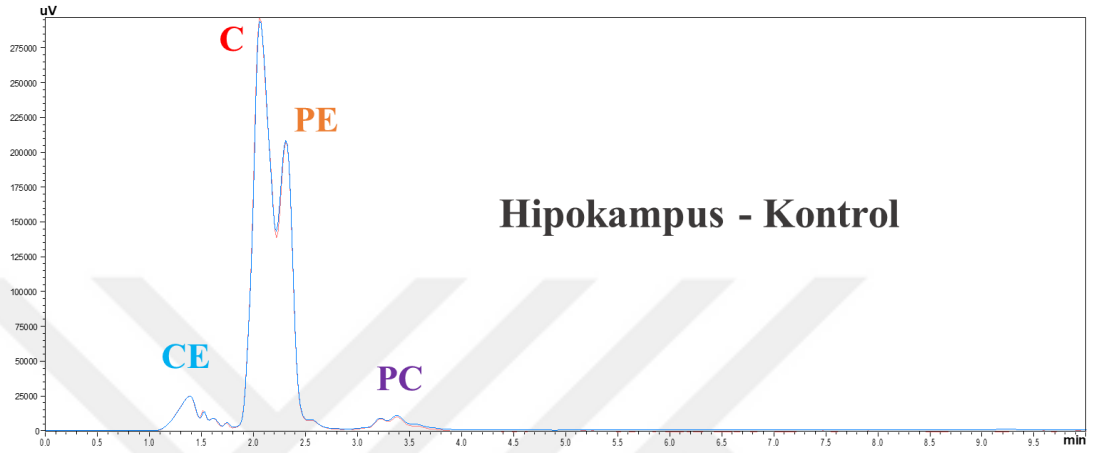
Grafik 31. Korteks nöronlarının sfingomiyelin (SP) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.



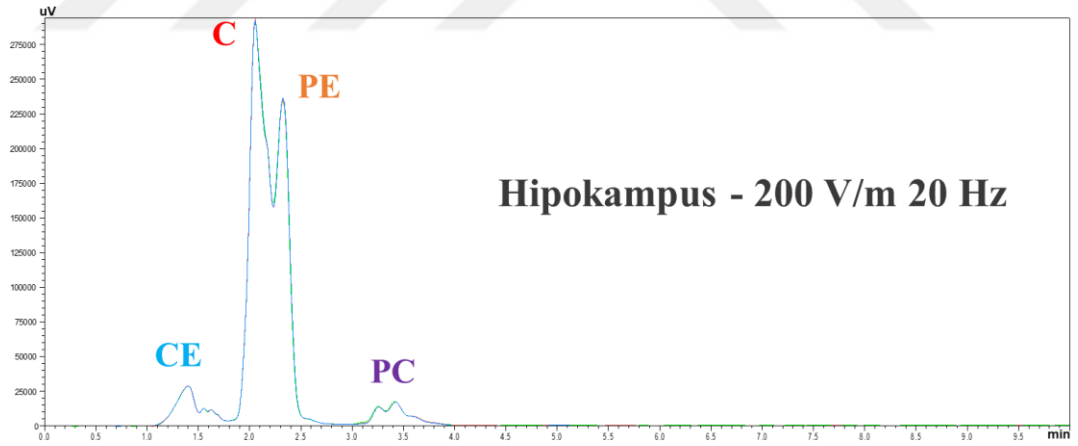
Grafik 32. PCEF sonrası korteks nöronları SP konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

Ortaya çıkan yüksek standart sapma olasılığıyla korteks nöron membranları SP konsantrasyonlarında elektrik alana bağlı anlamlı bir değişiklik söz konusu değildir (Grafik 31).

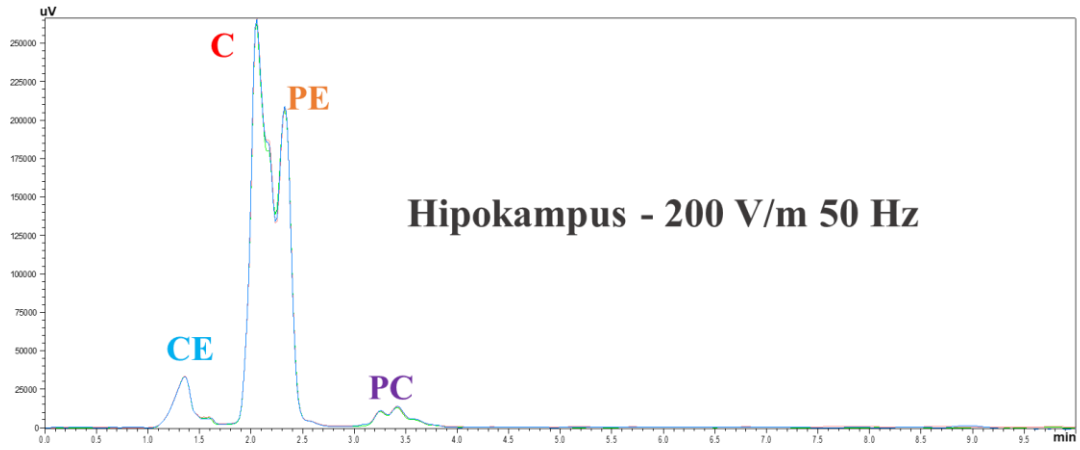
4.3.3. Hipokampus Nöronları



Şekil 37. PCEF sonrası hipokampus nöronları kontrol grubuna ait lipid kromatogramı.



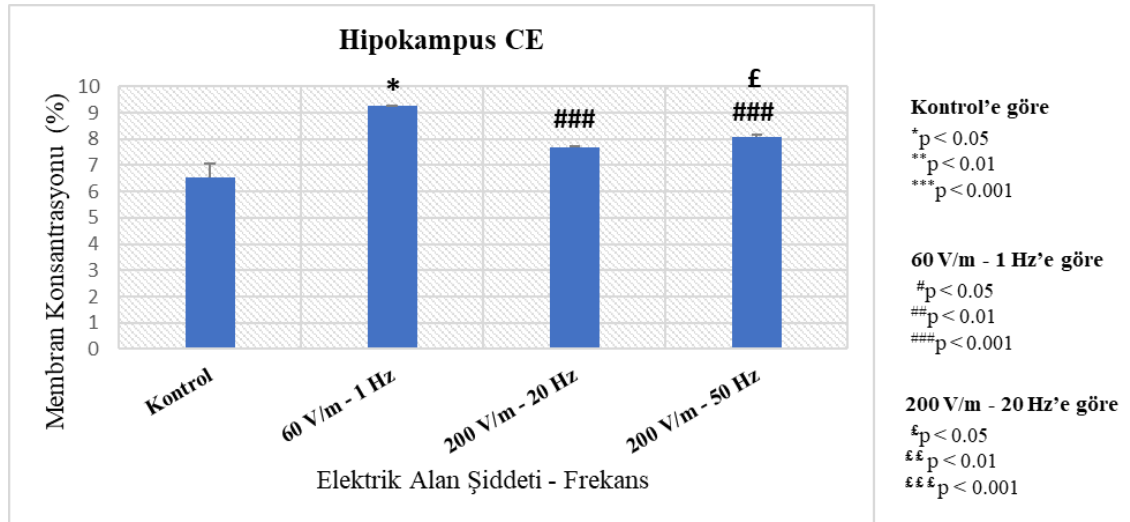
Şekil 38. PCEF sonrası hipokampus nöronları 200 V/m - 20 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.



Şekil 39. PCEF sonrası hipokampus nöronları 200 V/m – 50 Hz grubuna ait lipid kromatogramı.

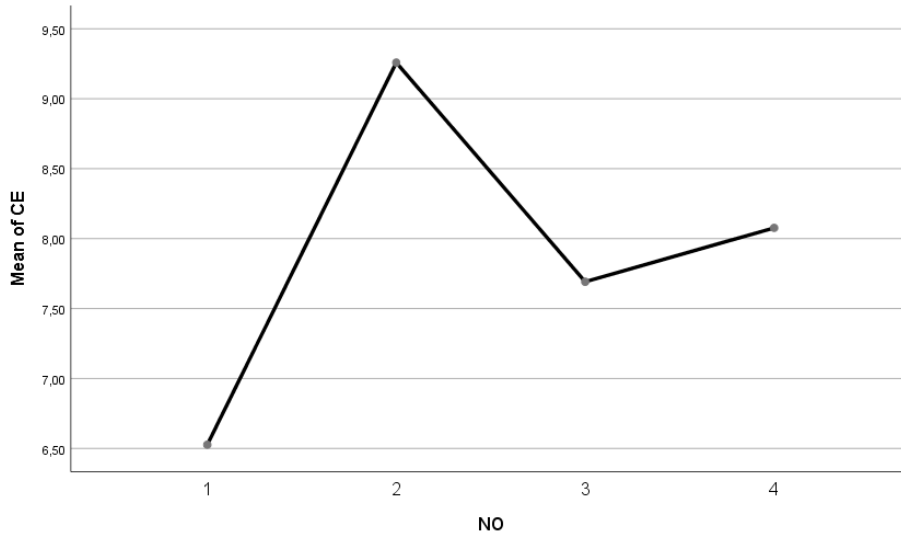
4.3.3.1. Kolesterol Esterleri

PCEF uygulanan grupların tamamında kontrole göre membran CE konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı tek grubun 2. grup olduğu belirlenmiştir. 3. ve 4. gruptaki CE konsantrasyonlarının ise 2. gruba göre anlamlı bir düşüşü söz konusudur. Buna ek olarak, 4. grupta 3. gruba göre az da olsa bir artış görülmektedir (Grafik 33).



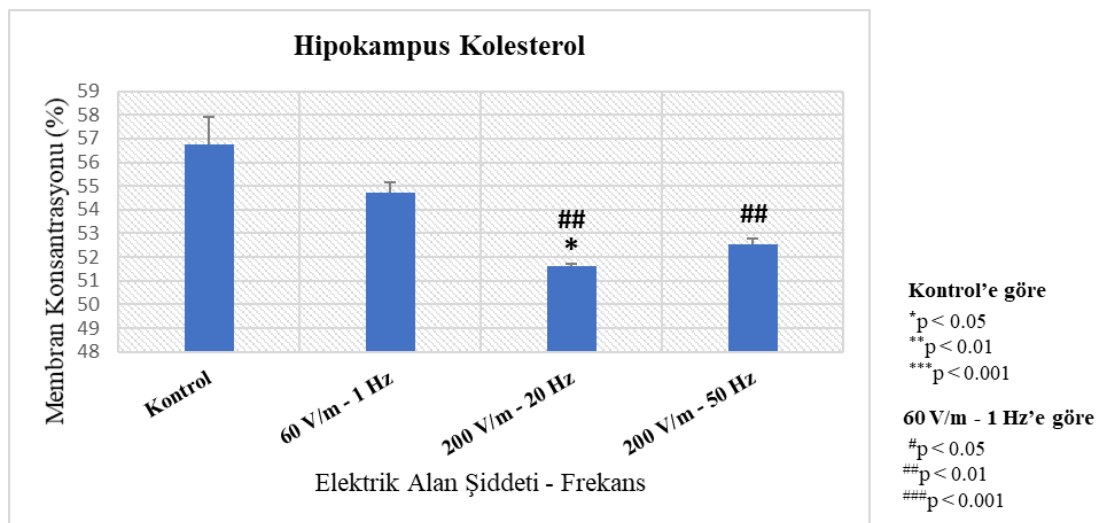
Grafik 33. Hipokampus nöronlarının kolesterol esterleri (CE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

PCEF uygulanan grupların tamamında kontrole göre membran CE konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı tek grubun 2. grup olduğu belirlenmiştir. 3. ve 4. gruptaki CE konsantrasyonlarının ise 2. gruba göre anlamlı bir düşüşü söz konusudur. Buna ek olarak, 4. grupta 3. gruba göre az da olsa bir artış görülmektedir (Grafik 33).



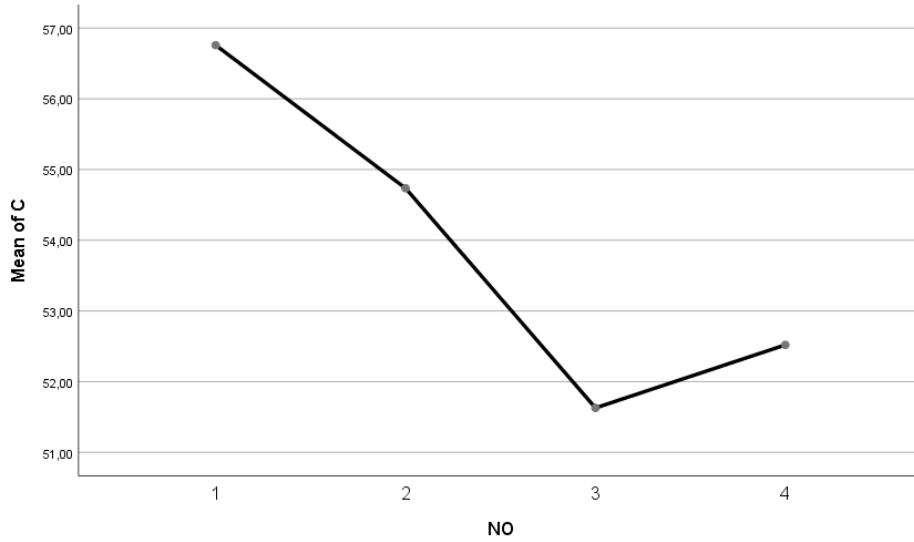
Grafik 34. PCEF sonrası hipokampus nöronları CE konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

4.3.3.2. Kolesterol



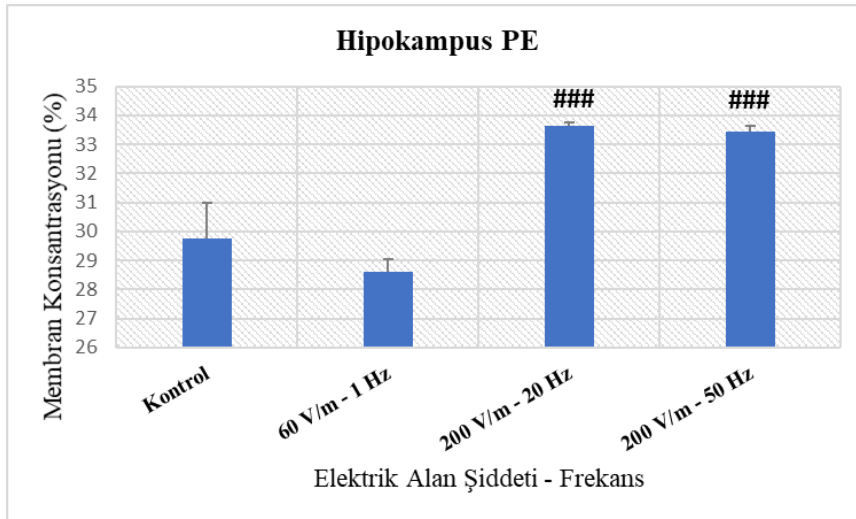
Grafik 35. Hipokampus nöronlarının kolesterol membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

PCEF uygulanan hipokampal nöronların membran C seviyelerinde kontrole göre tek anlamlı düşüş yaşayan grubun 3. grup olduğu belirlenmiştir. Bunun dışında diğer tüm grupların istatistiksel olarak anlamlı olmasa da C seviyelerinde bir düşüş gözlenmektedir.



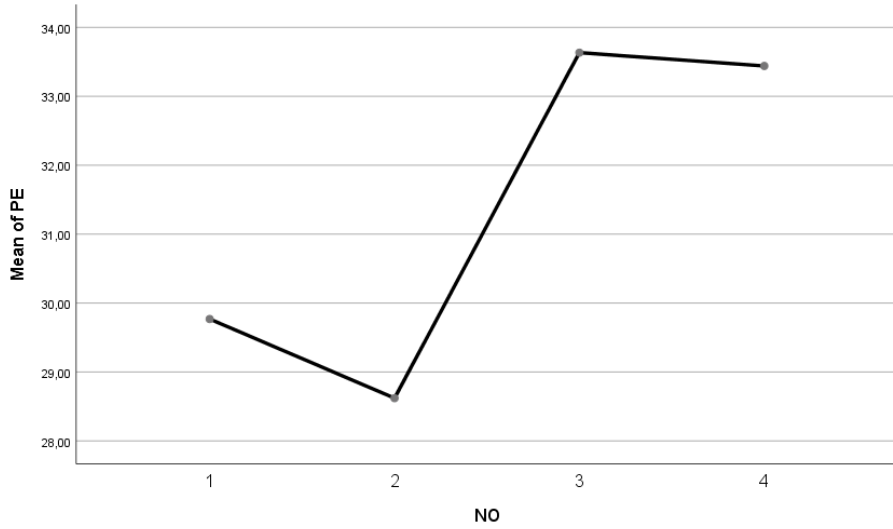
Grafik 36. PCEF sonrası hipokampus nöronları C konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

4.3.3.3. Fosfotidiletanolamin



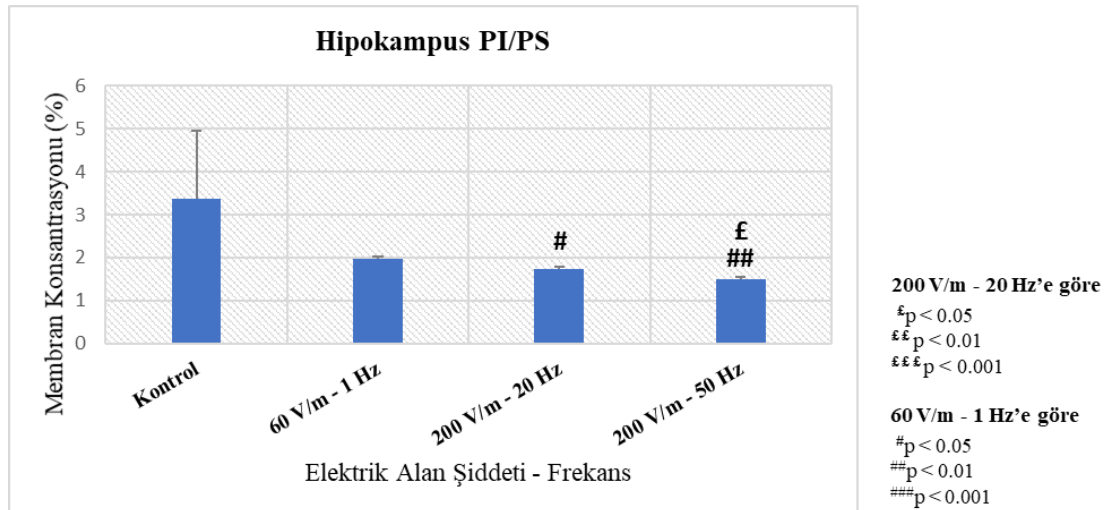
Grafik 37. Hipokampus nöronlarının fosfotidiletanolamin (PE) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

Kontrol grubundaki hücrelerin membran lipid konsantrasyonlarının analizinde görülen yüksek standart sapma sebebiyle diğer grupların kontrol grubuyla anlamlı bir ilişkisi ortaya çıkmamıştır. Bunun dışında 3. ve 4. grubun 2. gruba arasında anlamlı bir farklılık bulunmakla birlikte bu artış yönünde kendini göstermiştir.



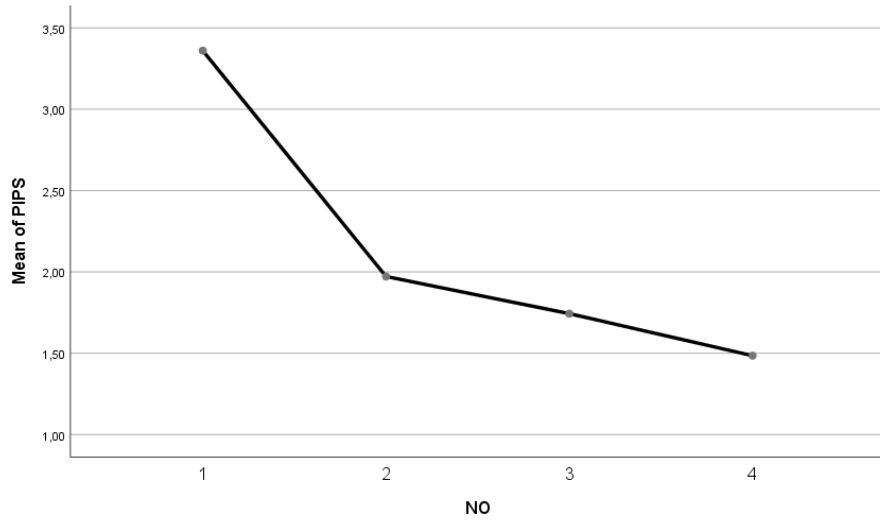
Grafik 38. PCEF sonrası hipokampus nöronlarının PE konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

4.3.3.4. Fosfotidilinozitol/Fosfotidilserin



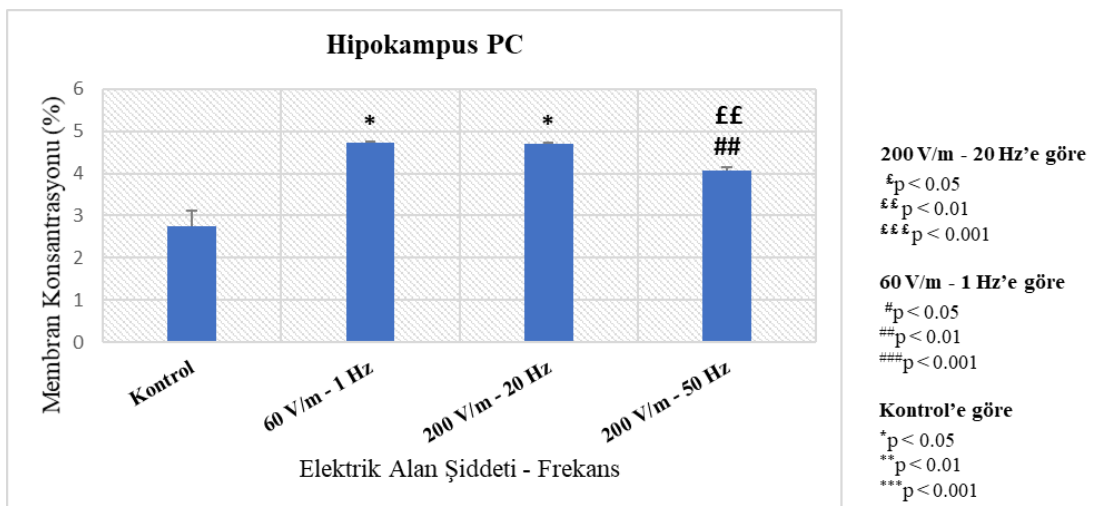
Grafik 39. Hipokampus nöronlarının fosfotidilinozitol/serin (PI/PS) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

Kontrole göre anlamlı çıkmayan çoğu sonuçtakine benzer şekilde PI/PS analiz sonuçlarında da kontrol grubunun yüksek standart sapmaya sahip olması nedeniyle grupların kontrolle olan anlamlı değişiklikleri gözlenmemiştir. Ancak bunun dışında artan elektrik alan şiddeti - frekans oranına bağlı olarak gruplarda anlamlı olmayan PI/PS konsantrasyon düşüşleri görülmüştür.



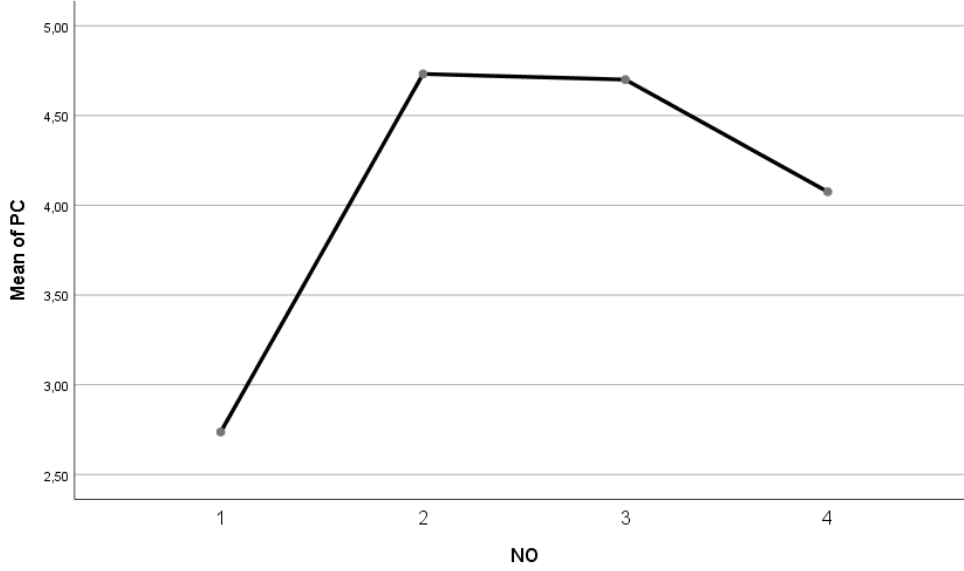
Grafik 40. PCEF sonrası hipokampus nöronlarının PI/PS konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

4.3.3.5. Fosfotidilkolin



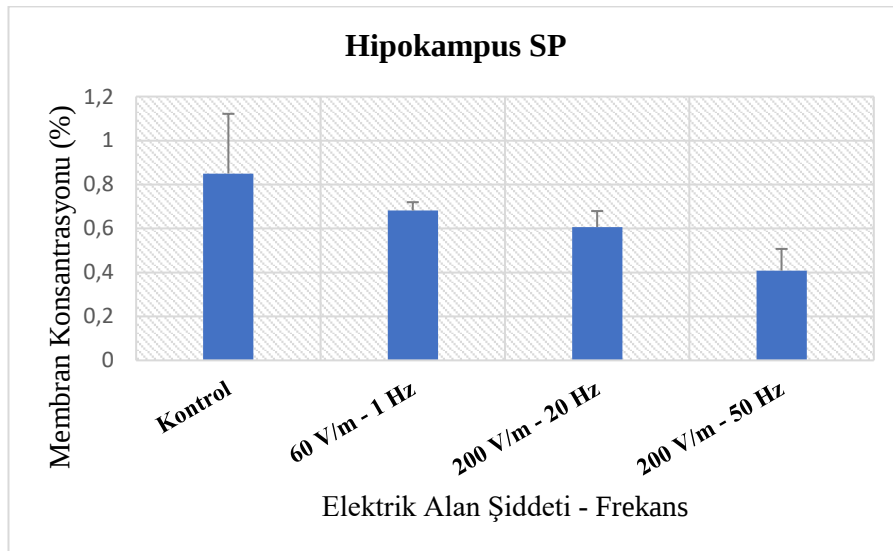
Grafik 41. Hipokampus nöronlarının fosfotidilkolin (PC) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

Hipokampus nöron membranları PC konsantrasyonları yüzde oranlarına bakıldığında kontrole göre 2 ve 3. grupta anlamlı bir şekilde, 4. grupta ise anlamlı olmayan bir artış söz konusudur.



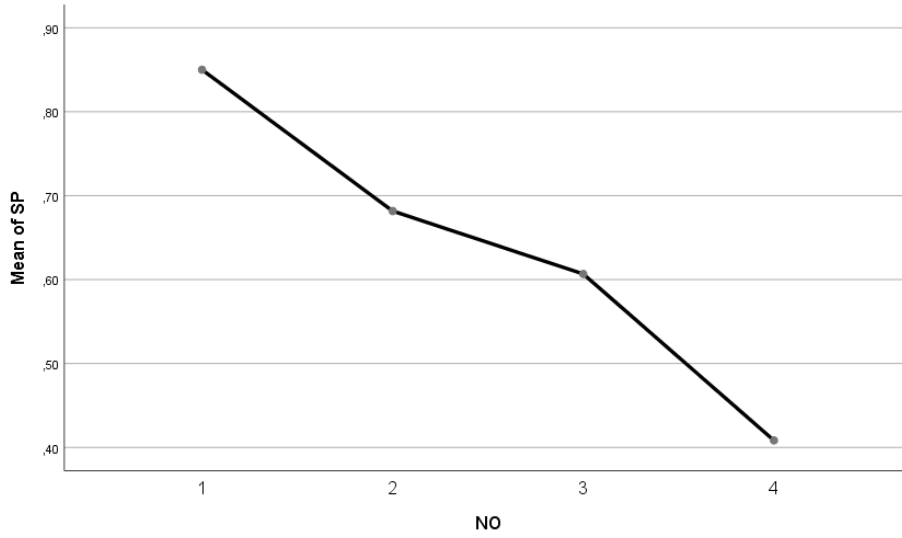
Grafik 42. PCEF sonrası hipokampus nöronlarının PC konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

4.3.3.6. Sfingomiyelin



Grafik 43. Hipokampus nöronlarının sfingomiyelin (SP) membran konsantrasyonunun yüzde grafiği.

PCEF sonrası hipokampal nöronların SP membran konsantrasyonlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan fakat artan elektrik alan şiddeti - frekans oranıyla ters orantılı şekilde azalan bir durum söz konusudur.



Grafik 44. PCEF sonrası hipokampus nöronlarının PC konsantrasyonunun gruplara göre değişimini gösteren plot grafiği.

Tartışma

Bu tez çalışmasıyla özellikle epilepsi gibi nöral uyarılabilirliğin değiştiği hastalıkları, oluşturulan deney düzeneği ile taklit ederek, ortamda oluşan elektrik alanların nöral hücre membran lipitleri üzerinde ne gibi değişiklikler oluşturduğunu göstermeye çalıştık. Aynı zamanda oluşturulan deney düzeneğini tümöral bir hücre olan ve nöronal hücrelere benzer aktiviteler gösterebilen insan nöroblastoma hücreleri üzerinde de kullanarak çalışmamızın alanını genişletmiş olduk.

Epilepsi de dahil birçok nörolojik hastalığın altında yatan temel sebep nöronların uyarılabilirliğindeki değişimlerdir. Ancak bu değişimlere sebep olan mekanizmalar bugün halen çözülebilmemiş değildir. Nöron uyarılabilirliğindeki bu değişimler araştırmacılar tarafından genellikle membran proteinleri ve ilişkili süreçler üzerinden açıklanmaya çalışılmıştır. Özellikle nöral fizyoloji alanında da en fazla yoğunlaşılan konuların başında membran proteinleri ve ilişkili sinaptik yapılar gelmekte fakat membran lipitleriyle alakalı çok az şey bilinmektedir (Bayés et al. 2011; Sheng and Hoogenraad 2007; Swulius et al. 2012; Tulodziecka et al. 2016).

Lipitler beynin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturmasıyla nöral moleküler çevrenin en önemli bileşenlerinden biridir (Fantini and Barrantes 2009; Lim and Wenk 2009). Membran lipitleri ise, yapısal birçok fonksiyonu bulunmasına rağmen membranın pasif elektrik özelliklerden biri olan kapasitans özelliğinde çok önemli bir rol üstlenmektedir. Bununla alakalı olarak nöral sinyallerin hücre membranı üzerindeki iletimiyle alakalı mekanizmayı ortaya koyan Hodgkin - Huxley modelinde lipit membran, yalıtkan bir katman görevi görmekte ve etrafındaki yükleri üzerinde toplamasıyla biyolojik bir kapasitör gibi davranmaktadır. Nöronların kolesterol, sfingolipit ve çoklu doymamış lipitlerle zengin özgün lipit profilleri göz önünde alındığında da lipit içerik bakımından farklı olan her membranın kapasitans özelliğinde de bir farklılık söz konusu olması kaçınılmazdır. Buradan yola çıkarak da membranın lipit profilinde gerçekleşen herhangi bir değişimin membranın kapasitans özelliğini ve dolayısıyla da hücre uyarılabilirliğini etkileyebileceği söylemek yanlış olmaz. Buna tam tersi yönden bakacak olursak da herhangi bir nedenden ötürü hücre uyarılabilirliğindeki değişim kaynaklı oluşan elektrik alanların da membran lipit kompozisyonlarını ve kapasitansını etkileyebilmesi mümkündür.

Hodgkin-Huxley oluşturduğu bu modelin tüm kısımları eş devreler ve Kirchhoff yasalarına dayanmaktadır ancak sıcaklık, entropi ve basınç gibi faktörleri açıkça ele almadığından termodinamik bir model olarak kabul görmemektedir. Bu sebeple aksiyon potansiyelinin yayılımı sırasında etkili bu faktörler termodinamik açıdan araştırmacılar tarafından incelemeye tutulmuş ve Hodgkin-Huxley modeliyle bazı çelişkili durumlar ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda özellikle aksiyon potansiyeli esnasında membranda sıcaklık ve kalınlık ve de lipit faz geçişlerinde değişiklikler gözlenmiş ve bu değişiklikler Hodgkin-Huxley modeliyle tam manasıyla açıklanamamıştır (Abbott, Hill, and Howarth 1958; Heimbürg 2007; Heimbürg and Jackson 2005; Hodgkin and Huxley 1952; Howarth, Keynes, and Ritchie 1968; Iwasa and Tasaki 1980; JM and RD 1985; Kobatake, Tasaki, and Watanabe 1971; Tasaki and Byrne 1992; Tasaki, Kusano, and Byrne 1989). Özellikle aksiyon potansiyeli sırasında membran kalınlığının değiştiğinin gözlemlenmesi ve termodinamik açıdan eksikleri bulunan Hodgkin - Huxley modeline alternatif olarak sinir sinyallerinin aslında lipit membranlarda ortaya çıkan mekanik bir faz değişim dalgası olduğu iddia edilen soliton teorisinin ortaya atılması, lipitlerin hücre uyarılabilirliğinde önemli bir rolü olduğu öngörülerimizi destekler niteliktedir (Heimbürg and Jackson 2005; Iwasa and Tasaki 1980).

Tüm bu bilgiler ve öngörüler ışığında çalışmamızda;

- Epileptik koşulları kısa süreli olarak taklit edebilmemizi sağlayan biri ön çalışma ve diğeri de çalışmanın esas deneyleri için geliştirilen iki deney düzeneği oluşturulmuş,
- Bu düzenekler ile yenidoğan sıçanlardan (P0) elde edilen primer hipokampal ve kortikal nöronlar ve de bunun dışında SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde pulsatil akım elektrik alan (PCEF) stimülasyonu gerçekleştirilmiş ve
- Stimülasyon sonrasında hücrelerin membran lipit konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler incelenmiştir.

Tezin ön çalışmaları kapsamında 96 kuyucuklu kültür kabına uyumlu deney düzeneği geliştirilmiş ve SH-SY5Y hücrelerinin bu düzenekle uyarılmasının ardından MTS ile hücre canlılık testi yapılmıştır. Literatürde monopolar stimülasyonun çok fazla tercih edilmemesi sebebiyle uygulanan stimülasyon parametreleri diğer stimülasyon

metodlarının kullanıldığı çalışmalardan çıkarım yapılarak belirlenmesinde literatürden faydalanılamamıştır.

Artan dozlar şeklinde stimülasyon uygulanan kültür kaplarının hücre proliferasyonları incelendiğinde tüm kültür kabı gruplarında kontrole göre anlamlı olmasa da bir düşüş söz konusudur. Kültür kaplarının tamamında anlamlı olan grupların o kültür kabındaki en yüksek voltaj ve stimülasyon süresine sahip olan gruplar olması SH-SY5Y hücrelerindeki proliferasyonun stimülasyon frekansına bağlı gibi durmadığını, hücrelerin özellikle uygulanan voltaj ve stimülasyon süresinden etkilendiğini göstermektedir. SH-SY5Y hücrelerinin stimülasyon frekansından etkilenmemesi ise bu hücrelerin her ne kadar nöron kökenli hücreler olduğu bilinse de tam olarak bir nöron hücresi olmamasından kaynaklı olabilir. Bunların haricinde hücrelerin bu kadar yüksek voltajlara dayanmasının sebebi elektrotun hücreler üzerinde doğrudan bir akım oluşturmayıp kapasitif bir akım yaratması şeklinde açıklanabilir. Dolayısıyla burada oluşturulan elektrik alan, elektrotun çapı ve yüzey alanıyla doğrudan ilişkilidir. Bu ön çalışma sonuçları, çalışmamızın esas kısmında hücrelere uyguladığımız PCEF stimülasyon değerleri kapsamında bizlere üst sınırın ne olabileceği konusunda önemli fikirler vermiştir.

Çalışmamızın esas kısmı primer hipokampal ve kortikal nöronlar ile SH-SY5Y hücreleri üzerinde gerçekleştirilen deneylerdir. Bu kapsamda çalışmamız 6 kuyucuklu kültür kabıyla uyumlu düzenek geliştirme, hücreler üzerinde PCEF oluşturma ve son olarak da bunların HPLC ile lipit analizlerini gerçekleştirme aşamalarından geçmiştir.

6 kuyucuklu kültür kabına uyumlu deney düzeneği Leppik ve ark. tarafından geliştirilen düzenden esinlenerek yapılmıştır (Leppik et al. 2019). Direkt stimülasyon metodu ile PCEF oluşturan bu düzende uygulanacak parametreler ise literatüre bakılarak belirlenmiştir (Ariza et al. 2010; Du et al. 2018; Leppik et al. 2019; Riquelme et al. 2011; Zhu et al. 2019). Elektriksel stimülasyonun uygulandığı sinir sistemi hücreleri özelinde yapılan diğer çalışmalarda, nöral kök hücre ve nöronlarda dört farklı elektriksel alan çeşidinin de (DCEF, ACEF, PCEF ve BCEF) uygulandığı görülmektedir. Bu çalışmalar arasında elektrot türünden stimülasyon frekansı, şiddeti ve süresine kadar birçok farklılık göstermektedir (Zhu et al. 2019). İn vitro uygulanan elektriksel alanların çalışmalarda kullanılma amaçları ise genellikle hücrelerin

migrasyon, proliferasyon, farklılaşma, aksonların uzaması ve rejenerasyonu ile ilişkilidir (Ariza et al. 2010; Chang et al. 2011; Dong et al. 2017; Du et al. 2018; Feng et al. 2012; Kobelt et al. 2014; Li et al. 2008; Riquelme et al. 2011)

Riquelme ve ark. tarafından Sprague-Dawley sıçanlardan elde edilen ve primer nöronlar üzerinde uygulanan yüksek elektriksel alan şiddet değeri, çalışmamızın hipokampal nöron gruplarına uygulanan üst sınır olarak kabul edilmiştir. Ancak hipokampal nöronların lipit analizine girmeden önce PCEF sonrası mikroskopik görüntülerine bakıldığında elektrik alanın şiddetiyle orantılı olarak hipokampus nöronlarında akut hasarın ortaya çıktığı görülmektedir. Bunun nedeninin ise yalnızca elektrik alanın şiddetinden kaynaklı olduğu düşünülmemekle birlikte çalışmamızda tercih edilen direkt stimülasyon metodu ile akım verilmesinin kültür sıvısında elektrolize neden olabileceği ve ortamın pH'ında akut ve çok hızlı değişimlere yol açabileceği de düşünülmektedir (Chen et al. 2019; Ercan and Webster 2010). Özellikle 2000 V/m elektrik alan şiddeti uygulanan primer hipokampal nöronların Riquelme ve ark.'nın söylediğinin aksine tamamına yakını canlılığını yitirmiş ve bu gruplar HPLC analizden çıkarılmıştır (Şekil 30) (Riquelme et al. 2011) . Bu sebeple korteks nöronlarında üst değer Du ve ark. tarafından uygulanan 200 V/m değerine çekilmiştir (Du et al. 2018). Diğer yandan SH-SY5Y hücrelerine Riquelme ve ark. tarafından uygulanan değer ile Du ve ark. tarafından uygulanan değer arasında bir elektriksel alan uygulanarak bu değerlerin hücreler üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Çalışmamızın lipit analizleri değerlendirilmesinde öncelikle iki lipit türü ön plana çıkmaktadır. Membranın çok büyük kısmını oluşturan bu iki lipit türü kolesterol ve fosfatidiletanolamin lipitleridir ve bu lipitlerin PCEF sonrası membran konsantrasyonlarında bazı anlamlı sonuçlar görülmektedir. Bu lipit türlerinden kolesterole, nöral membranın hem dış hem de iç yaprağında yüksek oranda bulunması ve de membran üzerinde çok farklı etkilere neden olması sebebiyle özellikle değinilmesi gerekmektedir.

Hücre membranlarındaki kolesterol miktarı her fosfolipit molekülüne karşılık bir kolesterol molekülü gelecek kadar çok yoğun miktardadır (Alberts 2015). Çoğu durumda total membran lipitinin %50'sini oluşturan kolesterolün en yüksek bulunduğu yerin beyin dokusu olduğu ve buradaki kolesterol oranının, tüm

kolesterolün yaklaşık %20-25'ini oluşturduğu bilinmektedir (Björkhem et al. 2004; Stillwell 2016). Nöronların kolesterol plazma membran oranı %10 seviyelerindeyken bu oran miyelin kılıfta %70 şeklindedir (Petrov, Kasimov, and Zefirov 2016).

Kan beyin bariyerini geçemeyen beyin kolesterolünün çoğu (%95) glial hücre kaynaklı *in situ* sentez aracılığıyla sağlanmaktadır (Dietschy 2009). Bunun dışında nöronlar hem kendi kolesterol sentezini gerçekleştirirken hem de glial hücrelerde sentezlenen kolesterolü kullanırlar. Dolayısıyla beyin kolesterol metabolizması astrositler ve nöronlar arasında gerçekleşen karmaşık bir olaydır. Beyindeki kolesterol sentezinin çoğu *in situ* olarak astrosit endoplazmik retikulumunda (ER) gerçekleşmektedir (Petrov et al. 2016). Astrositlerden çıkan kolesterol ve esterleri apolipoproteinler aracılığıyla (ApoE gibi) nöronlara taşınmakta ve birçok işlem sonunda nöron membranına difüze olmaktadır. Kolesterol sentezi INSIG, SREBP, and SCAP proteinleri aracılığıyla gen düzeyinde regüle edilmektedir. Sentezin hız sınırlayıcı enzimi ise statinlerin temel farmakolojik hedefi olan HMG-CoA redüktaz enzimidir (DeBose-Boyd and Ye 2018; Shimano and Sato 2017).

Kolesterolün yapısal anlamda membran akışkanlığı gibi çok önemli rolleri bulunurken membranın elektriksel özelliği üzerinde de ciddi etkileri bulunmaktadır. Kolesterolün özellikle nöral membranlarda yoğun bir şekilde bulunması ve de bulunduğu membran bölgelerinde membranın kalınlığını arttırdığını bilinmesi, kolesterolü membran kapasitans özelliğinde temel rol oynayan moleküllerin başında getirmektedir (Kučerka et al. 2009). Kolesterolün membran kalınlığını arttırdığının bilinmesi aynı zamanda lipit raftların bulunduğu membran bölgelerindeki kalınlaşmayı da bizlere açıklamaktadır. Dolayısıyla nöral membran kolesterol konsantrasyonlarında gerçekleşecek herhangi bir değişim hücrenin kapasitansını ve de bununla ilişkili olarak hücrelerin uyarılabilirliğini etkileyecektir. Diğer taraftan hücre uyarılabilirliği kaynaklı herhangi bir değişimin de membrandaki kolesterol seviyelerini değiştirmesi kaçınılmazdır.

Kolesterolle ilişkili çalışmalar incelendiğinde Heverin ve ark. tarafından farelerde gerçekleştirilen bir çalışmada uzamış nöbetlerin (status epilepticus) beyin kolesterol seviyelerinde değişikliğe neden olduğu ve kolesterol molekülünün temporal lob epilepsi patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (Heverin et al.

2012). Buna ilaveten, kolesterol sentezi inhibisyonu sağlayan farmakolojik ajanların başında gelen statinlerin kullanıldığı birçok epilepsi çalışmasında statinlerin nöbetleri azalttığına dair kanıtlar mevcuttur (Quintana-Pájaro et al. 2018). Epileptik nöbet sonrası koşulları in vitro düzeyde taklit eden eksitotoksisite modellerinin uygulandığı çoğu çalışmada da kolesterol seviyelerinde ciddi değişimler mevcuttur (He et al. 2006; Kim et al. 2010; Ong et al. 2010).

Primer nöronlar ve SH-SY5Y hücreleri üzerinde direkt stimlasyon metodu ile pulsatil akım elektrik alan stimlasyonu gerçekleştirilen çalışmamızda ise hücre membran lipidlerinin PCEF sonrası analizleri yapılmış ve kolesterol ve PE molekülleriyle alakalı ilginç sonuçlar bulunmuştur. Bunun dışında, fosfolipit metabolizmasının oldukça dinamik bir metabolizma olması ve kolesterol ve PE haricindeki lipidlerin membrandaki oranlarının düşük olması, konsantrasyonlarındaki çok küçük değişimlerin ölçümler arasında ciddi varyasyonlara ve istatistiksel bakımdan anlamlı sonuçların ortaya çıkmamasına neden olmaktadır. Bu beklenen bir sonuç olduğu için kolesterol ve PE dışındaki diğer lipid türleri hakkında bir yorumlama yapılmamıştır:

- Hipokampus nöronları membran kolesterol konsantrasyonlarına bakıldığında genel bir düşüş eğilimi söz konusu iken bu düşüşün en anlamlı olduğu grubun 200 V/m - 20 Hz grubunda olduğu görülmektedir. Bunun sebebi ise yüksek elektrik alan şiddeti altında hipokampal nöronların, membran kolesterol oranını azaltarak membran kapasitansını arttırıp hücre uyarılabilirliğini azaltmaya ve hücre canlılığını korumaya yönelik bir davranışı olabilir. Bunun yanında, aynı elektrik alan şiddetinde fakat 50 Hz frekansında uygulanan grubun anlamlı bir yanıt oluşturmamasının ise lipid analizindeki ölçüm varyasyonundan kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz.
- Nöral membranın iç yaprağında en çok bulunan lipidlerden biri olan fosfatidiletanolaminlerin (PE) hipokampal hücre membran seviyeleri incelendiğinde ise yalnızca yüksek elektrik alan şiddetindeki gruplarda bir artış söz konusudur. Bu gruplarda PE seviyelerindeki artış yine bu gruplardaki kolesterol oranının azalmasıyla zıt bir şekilde gerçekleşmektedir. Bunun sebebi ise kolesterolün membran eğriliğine yaptığı negatif katkının (negative curvature) azalması ve PE'nin membran konsantrasyonunun arttırılarak membran eğriliğinin

korunmasına yönelik bir kompanzasyon gerçekleştirmesi olabilir (Churchward et al. 2008; McMahon and Boucrot 2015; Najafinobar et al. 2016; Wang, Yang, and Huang 2007; Yesylevskyy, Rivel, and Ramseyer 2017). Diğer yandan yüksek elektrik alan şiddetindeki gruplarda PE seviyelerinin artmasının nedenlerinden bir diğeri de PE'nin nötral bir yüke sahip olması ve bu yüzden de membranın iç tarafında toplanan negatif yük sayısını arttırarak hücre uyarılabilirliğinin azalmasını ve böylece hücrenin eksitotoksisite gibi olaylardan uzaklaşmasını sağlamış olması olabilir (Heimburg 2007).

- Korteks nöronları membran kolesterol konsantrasyonları incelendiğinde sonuçlar, hipokampal nöron kolesterolleriyle paralel gibi gözükmetedir. 200 V/m - 20 Hz grubundaki kolesterol konsantrasyonu bu nöronlarda da hem Kontrol 1 hem Kontrol 2'ye göre anlamlı şekilde ($p < 0.001$) bir azalma görülmüştür. Bu azalmanın nedeni yine nöronların hücre canlılığını koruma amaçlı olmuş olabilir. Diğer yandan korteks nöronlarının 60 V/m - 1 Hz grubundaki kolesterol seviyelerinin kontrol gruplarına göre artması kortikal nöronların kültür ortamında belirli seviyelere kadar eksitasyonu tercih etmesinden kaynaklı olabilir. Fakat belirli bir eşik değeri geçtikten sonra hücre, kendi canlılığını koruma amacıyla membrandaki kolesterol oranını azaltma yoluna gitmiş olabilir.
- Korteks nöronları membran PE seviyelerine bakıldığında ise yine kolesterol ile zıt bir ilişki içinde olduğu görülür. Bu özellikle en yüksek değerdeki elektrik alan şiddeti - frekans grubunda oldukça belirgindir. Bunun sebebi ise hipokampusta belirtildiği gibi membran eğriliğinin stabilizasyonu veya hücre içindeki negativitenin arttırılmaya çalışılması olabilir.
- SH-SY5Y hücreleri üzerinde gerçekleştirilen PCEF sonrası kolesterol konsantrasyonları oranları hipokampal ve kortikal nöronlarda görülen azalma yöneliminin aksine artma şeklinde kendini göstermektedir. SH-A grubu hücrelerinin tamamında kontrol grubuyla anlamlı farklılıklar bulunurken, SH-B grubundaki kolesterol konsantrasyonları değerlerinin standart sapmanın yüksek olması nedeniyle anlamlı değildir. SH-A grubundaki kolesterol oranlarının hipokampal ve kortikal nöronlarda görülen azalma yöneliminde değil de artma yöneliminde olması, SH-SY5Y hücrelerinin toksisiteye karşı koruma mekanizması

olarak kullandığı kolesterolün bu olayda da hücre sağ kalımında rol oynayan bir koruma mekanizması olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (Xicoy et al. 2020).

- PCEF sonrası SH-SY5Y hücreleri PE oranları incelendiğinde özellikle SH-A grubu hücrelerinin yüksek elektrik alan şiddeti uygulanan gruplarında anlamlı bir azalma görülmektedir. Bunun sebebinin ise ortamdaki yüksek elektrik alan şiddetinin hücre membranındaki PE'lerin Fosfolipaz A2 enzimi tarafından lizofosfatidiletanolamin (lysophosphatidylethanolamine – LPE) metabolitlerine dönüştürülerek hücreler arası sinyalleşmede veya hücre içindeki kalsiyum oranını arttırarak G-proteinleriyle eşleşmiş reseptörler (GPCR) üzerinde bir rol oynuyor olması olabilir (Lee, Park, and Im 2017). Bunun dışında PE'nin SH-SY5Y hücrelerindeki fonksiyonuyla alakalı çok az şey bilinmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları incelendiğinde in vitro eksitasyon ile primer nöronlar ve nöron kökenli SH-SY5Y hücreleri üzerinde oluşturulan elektrik alan potansiyellerinin, her iki hücre tipinde de membranın kapasitif özelliği üzerinde belirleyici rol oynayan membran lipid profillerinde değişime yol açtığı gözlenmiştir. Bu, başlangıçta kurduğumuz hipotezle tamamen uyan bir sonuçtur.

Bir nöral devrede elektriksel alan potansiyellerindeki değişimlerin, membranın lipid kompozisyonu üzerinde etkisini sorgulayan ilk araştırma sorumuz ortaya çıkan sonuçlarla anlam kazanmıştır.

“Epileptik nöbet şartlarını taklit eden in vitro deney modelinde oluşturulan elektriksel stimülasyonun, epileptiform benzeri aktivitenin kronikleşmesinde etkisi var mıdır ?” sorusuna yanıt olarak ise çalışma sonuçları bize, in vitro elektriksel stimülasyonun epileptiform benzeri aktivitenin kronikleşmesinde etkisi olmadığını tam aksine primer nöronlar özelinde özellikle yüksek şiddetli stimülasyonlarda kolesterol seviyelerinin azalmasının bu değişimlerin epileptiform benzeri aktiviteleri engellemeye yönelik olabileceğini düşündürmüştür.

Son olarak **“Uygulanan in vitro elektriksel stimülasyonunun frekans ve şiddetinde gerçekleştirilen değişimler bu etkide nasıl bir rol oynamaktadır ?”** şeklindeki üçüncü sorumuza karşılık çalışma sonuçlarında ortaya çıkan durumda ise özellikle yüksek elektrik alan şiddeti alan gruplarda frekansın önemli bir faktör olabileceği ancak temel parametrenin elektrik alan şiddeti gibi durduğu anlaşılmaktadır.

Bunların dışında lipid türlerinden özellikle kolesterol ve PE moleküllerinin elektrik alan stimülasyonuna karşı gösterdikleri yanıtlar önemlidir. Kolesterolün primer nöronlardaki yüksek şiddetli elektrik alan stimülasyonlarında konsantrasyonunun azalması eksitotoksisite gibi hücre canlılığını tehdit eden olaylara karşı hücrenin geliştirdiği bir tür savunma mekanizması olabilir. PE’nin de hücrenin kolesterol azalması karşısında konsantrasyonunun artmasıyla buna kompanzasyon etki

göstermesi ilginçtir. Birbirleriyle zıt bir ilişki içerisinde olan bu lipid molekülleri arasındaki ilişkinin daha detaylı incelenmesi gerekmektedir.

SH-SY5Y hücrelerinde gerçekleşen ve hipokampal ve kortikal nöronlarda ortaya çıkan sonuçlara tamamen zıt sonuçlar görülmesi dikkatli incelenmesi gereken bir başka konu gibi gözükmektedir. Özellikle kolesterol molekülü konsantrasyonlarının elektrik alan şiddeti alan grupların tamamında yükseliş paterni göstermesi kanser hücrelerindeki kolesterolün konsantrasyon artışlarının, hücrelerin toksisiteye karşı oluşturduğu savunma mekanizmalarından biri olabileceğini bizlere düşündürmüştür. Bu konuda detaylı bir çalışma yapılması ilginç sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir.

Tüm bunların haricinde çalışma hipotezimizin temelini oluşturan elektriksel stimülasyona bağlı membran lipid profilinin plastik bir değişim göstermesi önemli fizyolojik etkiler gösterebilecek bir değişimdir ve özellikle hücre uyarılabilirliği kaynaklı deneysel hastalık modellerinde terapötik bir hedef olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Abbott, B. C., A. V. Hill, and J. V. Howarth. 1958. "The Positive and Negative Heat Production Associated with a Nerve Impulse." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 148(931):149–87.
- Abbott, Sarah K., Andrew M. Jenner, Todd W. Mitchell, Simon H. J. Brown, Glenda M. Halliday, and Brett Garner. 2013. "An Improved High-Throughput Lipid Extraction Method for the Analysis of Human Brain Lipids." *Lipids* 2013 48:3 48(3):307–18.
- Adibhatla, Rao Muralkrishna, and James F. Hatcher. 2007. "Role of Lipids in Brain Injury and Diseases." *Future Lipidology* 2(4):403–22.
- Alberts, Bruce. 2015. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition. Vol. 21.
- Anderson, Richard G. W. 1998. "The Caveolae Membrane System." *Annual Review of Biochemistry* 67:199–225.
- Ariza, Carlos Atico, Asha T. Fleury, Christian J. Tormos, Vadim Petruk, Sagar Chawla, Jisun Oh, Donald S. Sakaguchi, and Surya K. Mallapragada. 2010. "The Influence of Electric Fields on Hippocampal Neural Progenitor Cells." *Stem Cell Reviews and Reports* 6(4):585–600.
- Balint, Richard, Nigel J. Cassidy, and Sarah H. Cartmell. 2013. "Electrical Stimulation: A Novel Tool for Tissue Engineering." *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 19(1):48–57.
- Bayés, Álex, Louie N. Van De Lagemaat, Mark O. Collins, Mike D. R. Croning, Ian R. Whittle, Jyoti S. Choudhary, and Seth G. N. Grant. 2011. "Characterization of the Proteome, Diseases and Evolution of the Human Postsynaptic Density." *Nature Neuroscience* 14(1):19–21.
- Berg, M. Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto, and Lubert Stryer. 2015. *Biochemistry*.
- Björkhem, Ingemar, Steve Meaney, and Alan M. Fogelman. 2004. "Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(5):806–15.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification." *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8):911–17.
- Blum, Francesca. 2014. "High Performance Liquid Chromatography." *British Journal of Hospital Medicine* 75(2).

- Bradshaw, Ralph A., and Edward A. Dennis. 2010. "Handbook of Cell Signaling, 2/E." *Handbook of Cell Signaling, 2/E* 1–3.
- Breckenridge, W. C., G. Gombos, and I. G. Morgan. 1972. "The Lipid Composition of Adult Rat Brain Synaptosomal Plasma Membranes." *BBA - Biomembranes* 266(3):695–707.
- Brown, D. A. 2006. "Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signals." *Physiology (Bethesda, Md.)* 21(6):430–39.
- Brown, D. A. 2013. "Lipid Rafts." *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* 741–44.
- Buzsáki, György, Costas A. Anastassiou, and Christof Koch. 2012. "The Origin of Extracellular Fields and Currents — EEG, ECoG, LFP and Spikes." *Nature Reviews Neuroscience* 2012 13:6 13(6):407–20.
- Chang, Keun-A., Jin Won Kim, Jeong a Kim, Sungeun Lee, Saeromi Kim, Won Hyuk Suh, Hye-Sun Kim, Sunghoon Kwon, Sung June Kim, and Yoo-Hun Suh. 2011. "Correction: Biphasic Electrical Currents Stimulation Promotes Both Proliferation and Differentiation of Fetal Neural Stem Cells." *PLoS ONE* 6(5):e18738.
- Chen, Cen, Xue Bai, Yahui Ding, and In Seop Lee. 2019. "Electrical Stimulation as a Novel Tool for Regulating Cell Behavior in Tissue Engineering." *Biomaterials Research* 2019 23:1 23(1):1–12.
- Chrysafides, Steven M., Stephen Bordes, and Sandeep Sharma. 2021. "Physiology, Resting Potential." *StatPearls*.
- Churchward, Matthew A., Tatiana Rogasevskaja, David M. Brandman, Houman Khosravani, Phillip Nava, Jeffrey K. Atkinson, and Jens R. Coorssen. 2008. "Specific Lipids Supply Critical Negative Spontaneous Curvature—An Essential Component of Native Ca²⁺-Triggered Membrane Fusion." *Biophysical Journal* 94(10):3976–86.
- Cotman, Carl, M. L. Blank, Anita Moehl, and Fred Snyder. 1969. "Lipid Composition of Synaptic Plasma Membranes Isolated from Rat Brain by Zonal Centrifugation." *Biochemistry* 8(11):4606–12.
- DeBose-Boyd, Russell A., and Jin Ye. 2018. "SREBPs in Lipid Metabolism, Insulin Signaling, and Beyond." *Trends in Biochemical Sciences* 43(5):358–68.
- Devaux, Philippe F. 1991. "Static and Dynamic Lipid Asymmetry in Cell Membranes." *Biochemistry* 30(5):1163–73.

- Dietschy, John M. 2009. "Central Nervous System: Cholesterol Turnover, Brain Development and Neurodegeneration." *Biological Chemistry* 390(4):287–93.
- Dong, Zhi yong, Zhe Pei, Zhe Li, Yan ling Wang, Amber Khan, and Xiao ting Meng. 2017. "Electric Field Stimulation Induced Neuronal Differentiation of Filum Terminale Derived Neural Progenitor Cells." *Neuroscience Letters* 651:109–15.
- Du, Jian, Gehua Zhen, Huanwen Chen, Shuming Zhang, Liming Qing, Xiuli Yang, Gabsang Lee, Hai Quan Mao, and Xiaofeng Jia. 2018. "Optimal Electrical Stimulation Boosts Stem Cell Therapy in Nerve Regeneration." *Biomaterials* 181:347–59.
- Ercan, Batur, and Thomas J. Webster. 2010. "The Effect of Biphasic Electrical Stimulation on Osteoblast Function at Anodized Nanotubular Titanium Surfaces." *Biomaterials* 31(13):3684–93.
- Fantini, Jacques, and Francisco J. Barrantes. 2009. "Sphingolipid/Cholesterol Regulation of Neurotransmitter Receptor Conformation and Function." *Biochimica et Biophysica Acta* 1788(11):2345–61.
- Feng, Jun Feng, Jing Liu, Xiu Zhen Zhang, Lei Zhang, Ji Yao Jiang, Jan Nolte, and Min Zhao. 2012. "Guided Migration of Neural Stem Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells by an Electric Field." *STEM CELLS* 30(2):349–55.
- Griffiths, David J. 2017. "Introduction to Electrodynamics." *Introduction to Electrodynamics*.
- He, Xin, Andrew M. Jenner, Wei Yi Ong, Akhlaq A. Farooqui, and Shutish C. Patel. 2006. "Lovastatin Modulates Increased Cholesterol and Oxysterol Levels and Has a Neuroprotective Effect on Rat Hippocampal Neurons after Kainate Injury." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65(7):652–63.
- Heimburg, Thomas. 2007. *Thermal Biophysics of Membranes*. Wiley-VCH.
- Heimburg, Thomas, and Andrew D. Jackson. 2005. "On Soliton Propagation in Biomembranes and Nerves." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(28):9790–95.
- Heverin, Maura, Tobias Engel, Steve Meaney, Eva M. Jimenez-Mateos, Reza Al-Saudi, and David C. Henshall. 2012. "Bi-Lateral Changes to Hippocampal Cholesterol Levels during Epileptogenesis and in Chronic Epilepsy Following Focal-Onset Status Epilepticus in Mice." *Brain Research* 1480:81–90.
- Hodgkin, A. L., and A. F. Huxley. 1952. "A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve." *The Journal*

- of Physiology* 117(4):500.
- Howarth, J. V., R. D. Keynes, and J. M. Ritchie. 1968. "The Origin of the Initial Heat Associated with a Single Impulse in Mammalian Non-Myelinated Nerve Fibres." *The Journal of Physiology* 194(3):745.
- Iwasa, K., and I. Tasaki. 1980. "Mechanical Changes in Squid Giant Axons Associated with Production of Action Potentials." *Topics in Catalysis* 95(3):1328–31.
- Janiak, M. J., D. M. Small, and G. G. Shipley. 1979. "Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin." *Journal of Biological Chemistry* 254(13):6068–78.
- JM, Ritchie, and Keynes RD. 1985. "The Production and Absorption of Heat Associated with Electrical Activity in Nerve and Electric Organ." *Quarterly Reviews of Biophysics* 18(4):451–76.
- Karnovsky, Morris J., Alan M. Kleinfeld, Richard L. Hoover, and Richard D. Klausner. 1982. "The Concept of Lipid Domains in Membranes." *Journal of Cell Biology* 94(1):1–6.
- Kim, Ji Hyun, Jinatta Jittiwat, Wei Yi Ong, Akhlaq A. Farooqui, and Andrew M. Jenner. 2010. "Changes in Cholesterol Biosynthetic and Transport Pathways after Excitotoxicity." *Journal of Neurochemistry* 112(1):34–41.
- Kobatake, Y., I. Tasaki, and A. Watanabe. 1971. "Phase Transition in Membrane with Reference to Nerve Excitation." *Undefined*.
- Kobelt, Liza J., Ashley E. Wilkinson, Aleesha M. McCormick, Rebecca Kuntz Willits, and Nic D. Leipzig. 2014. "Short Duration Electrical Stimulation to Enhance Neurite Outgrowth and Maturation of Adult Neural Stem Progenitor Cells." *Annals of Biomedical Engineering* 42(10):2164–76.
- Kučerka, Norbert, Mu Ping Nieh, Jeremy Pencer, Jonathan N. Sachs, and John Katsaras. 2009. "What Determines the Thickness of a Biological Membrane." *General Physiology and Biophysics* 28(2):117–25.
- Lee, Jung Min, Soo Jin Park, and Dong Soon Im. 2017. "Calcium Signaling of Lysophosphatidylethanolamine through LPA1 in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells." *Biomolecules & Therapeutics* 25(2):194.
- Leppik, Liudmila, Mit B. Bhavsar, Karla M. C. Oliveira, Maria Eischen-Loges, Sahba Mobini, and John H. Barker. 2019. "Construction and Use of an Electrical Stimulation Chamber for Enhancing Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Stem/Stromal Cells In Vitro." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*

2019(143):e59127.

- Li, Lei, Youssef H. El-Hayek, Baosong Liu, Yonghong Chen, Everlyne Gomez, Xiaohua Wu, K. E. Ning, Lijun Li, Ning Chang, Liang Zhang, Zhengguo Wang, Xiang Hu, and Q. I. Wan. 2008. "Direct-Current Electrical Field Guides Neuronal Stem/Progenitor Cell Migration." *STEM CELLS* 26(8):2193–2200.
- Lim, L., and M. R. Wenk. 2009. "Neuronal Membrane Lipids – Their Role in the Synaptic Vesicle Cycle." *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* 223–38.
- Liu, Anli, Mihály Vöröslakos, Greg Kronberg, Simon Henin, Matthew R. Krause, Yu Huang, Alexander Opitz, Ashesh Mehta, Christopher C. Pack, Bart Krekelberg, Antal Berényi, Lucas C. Parra, Lucia Melloni, Orrin Devinsky, and György Buzsáki. 2018. "Immediate Neurophysiological Effects of Transcranial Electrical Stimulation." *Nature Communications* 2018 9:1 9(1):1–12.
- McMahon, Harvey T., and Emmanuel Boucrot. 2015. "Membrane Curvature at a Glance." *Journal of Cell Science* 128(6):1065–70.
- Najafinobar, Neda, Lisa J. Mellander, Michael E. Kurczyk, Johan Dunevall, Tina B. Angerer, John S. Fletcher, and Ann Sofie Cans. 2016. "Cholesterol Alters the Dynamics of Release in Protein Independent Cell Models for Exocytosis." *Scientific Reports* 2016 6:1 6(1):1–10.
- Nunez, Paul L., and Ramesh Srinivasan. 2009. *Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG*. Oxford University Press.
- Ong, Wei Yi, Ji Hyun Kim, Xin He, Peng Chen, Akhlaq A. Farooqui, and Andrew M. Jenner. 2010. "Changes in Brain Cholesterol Metabolome after Excitotoxicity." *Molecular Neurobiology* 41(2–3):299–313.
- Påhlman, Sven, Aino Inkeri Ruusala, Lars Abrahamsson, Maria E. K. Mattsson, and Thomas Esscher. 1984. "Retinoic Acid-Induced Differentiation of Cultured Human Neuroblastoma Cells: A Comparison with Phorbol-Induced Differentiation." *Cell Differentiation* 14(2):135–44.
- Petrov, A. M., M. R. Kasimov, and A. L. Zefirov. 2016. "Brain Cholesterol Metabolism and Its Defects: Linkage to Neurodegenerative Diseases and Synaptic Dysfunction." *Acta Naturae* 8(1):58.
- Quintana-Pájaro, Loraine, Yancarlos Ramos-Villegas, Eileen Cortecero-Sabalza, Andrei Joaquim, Amit Agrawal, Alexis Narvaez-Rojas, and Luis Moscote-Salazar. 2018. "The Effect of Statins in Epilepsy: A Systematic Review." *Journal*

of Neurosciences in Rural Practice 9(4):478–86.

- Riquelme, Denise, Alvaro Alvarez, Nancy Leal, Tatiana Adasme, Italo Espinoza, Juan Antonio Valdés, Natalia Troncoso, Steffen Hartel, Jorge Hidalgo, Cecilia Hidalgo, and M. Angélica Carrasco. 2011. “High-Frequency Field Stimulation of Primary Neurons Enhances Ryanodine Receptor-Mediated Ca²⁺ Release and Generates Hydrogen Peroxide, Which Jointly Stimulate NF-KB Activity.” *Antioxidants & Redox Signaling* 14(7):1245–59.
- Sheng, Morgan, and Casper C. Hoogenraad. 2007. “The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View.” *Annual Review of Biochemistry* 76:823–47.
- Shimano, Hitoshi, and Ryuichiro Sato. 2017. “SREBP-Regulated Lipid Metabolism: Convergent Physiology — Divergent Pathophysiology.” *Nature Reviews Endocrinology* 2017 13:12 13(12):710–30.
- Shipley, M. M., C. A. Mangold, and M. L. Szpara. 2016. “Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line.” *J. Vis. Exp* (108):53193.
- Simons, Kai, and Elina Ikonen. 1997. “Functional Rafts in Cell Membranes.” *Nature* 387(6633):569–72.
- Singer, S. J., and Garth L. Nicolson. 1972. “The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes.” *Science* 175(4023):720–31.
- Stillwell, William. 2016. *An Introduction to Biological Membranes: Composition, Structure and Function: Second Edition*. Elsevier Inc.
- Swulius, M. T., M. M. Farley, M. A. Bryant, and M. N. Waxham. 2012. “Electron Cryotomography of Postsynaptic Densities during Development Reveals a Mechanism of Assembly.” *Neuroscience* 212:19–29.
- Tamagawa, Hirohisa. 2019. “Mathematical Expression of Membrane Potential Based on Ling’s Adsorption Theory Is Approximately the Same as the Goldman-Hodgkin-Katz Equation.” *Journal of Biological Physics* 45(1):13–30.
- Tasaki, I., K. Kusano, and P. M. Byrne. 1989. “Rapid Mechanical and Thermal Changes in the Garfish Olfactory Nerve Associated with a Propagated Impulse.” *Biophysical Journal* 55(6):1033.
- Tasaki, Ichiji, and Paul M. Byrne. 1992. “Heat Production Associated with a Propagated Impulse in Bullfrog Myelinated Nerve Fibers.” *The Japanese Journal of Physiology* 42(5):805–13.
- Tulodziecka, Karolina, Barbara B. Diaz-Rohrer, Madeline M. Farley, Robin B. Chan,

- Gilbert Di Paolo, Kandice R. Levental, M. Neal Waxham, and Ilya Levental. 2016. "Remodeling of the Postsynaptic Plasma Membrane during Neural Development." *Molecular Biology of the Cell* 27(22):3480–89.
- Wang, Wangchen, Lin Yang, and Huey W. Huang. 2007. "Evidence of Cholesterol Accumulated in High Curvature Regions: Implication to the Curvature Elastic Energy for Lipid Mixtures." *Biophysical Journal* 92(8):2819–30.
- Waugh, Mark G. 2015. "PIPs in Neurological Diseases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851(8):1066–82.
- Xicoy, Helena, Jos F. Brouwers, Oleksandra Kalnytska, Bé Wieringa, and Gerard J. M. Martens. 2020. "Lipid Analysis of the 6-Hydroxydopamine-Treated SH-SY5Y Cell Model for Parkinson's Disease." *Molecular Neurobiology* 57(2):848–59.
- Xie, Hong Rong, Lin Sen Hu, and Guo Yi Li. 2010. "SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line: In Vitro Cell Model of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease." *Chinese Medical Journal* 123(8):1086–92.
- Yang, Sung Tae, Alex J. B. Kreutzberger, Jinwoo Lee, Volker Kiessling, and Lukas K. Tamm. 2016. "The Role of Cholesterol in Membrane Fusion." *Chemistry and Physics of Lipids* 199:136–43.
- Yesylevskyy, Semen O., Timothée Rivel, and Christophe Ramseyer. 2017. "The Influence of Curvature on the Properties of the Plasma Membrane. Insights from Atomistic Molecular Dynamics Simulations." *Scientific Reports* 2017 7:1 7(1):1–13.
- Zhu, Rong, Zhongqing Sun, Chuping Li, Seeram Ramakrishna, Kin Chiu, and Liumin He. 2019. "Electrical Stimulation Affects Neural Stem Cell Fate and Function in Vitro." *Experimental Neurology* 319(April):112963.

Ekler

Ek-1

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2020-092
KONU: Onay

26.08.2020

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda “İN VİTRO ORTAMDA ELEKTRİKSEL STİMÜLASYONUN NÖRAL MEMBRAN LİPİT PLASTİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ” isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Doç. Dr. Vedat Evren, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD
YL Öğr. Aytaç Güzel, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda her iki eşeyden 20 adet yenidoğan (P₀) Sprague Dawley sıçan deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Ek-2



T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

Konu: Yürürlüğe Giren Proje Öneriniz

Tarih
15.06.2021

Sayın Arş.Gör. Dr. VEDAT EVREN

Aşağıda bilgileri özetlenen proje önerinize yönelik değerlendirme süreci tamamlanmış ve BAP Komisyonu tarafından desteklenmesi uygun görülen projeniz, proje sözleşmesinin Rektörlük Makamı tarafından onaylanmasıyla yürürlüğe girmiş bulunmaktadır.

Tebrik eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Saygılarımla,

Prof.Dr. Mehmet ERSAN
Koordinatör

Proje Başlığı: İn Vitro Ortamda Elektriksel Stimülasyonun Nöral Membran Lipit Plastisitesi Üzerine Etkileri

Proje No: TYL-2021-22929

Teşekkür

Lisansüstü eğitim sürecimde insan fizyolojisi alanında bizlere değerli bilgiler veren ve çalışmalarımız için önemli imkanlar sunan Ege Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı hocalarıma, yaptığımız çalışma ve projeler başta olmak üzere birçok konuda bana yol gösteren ve yardımcı olan danışmanım sayın Doç. Dr. Vedat EVREN'e, lisansüstü sürecimde çok önemli katkılar veren Sayın Doç. Dr. Ayfer YURT KILÇAR'a, bilgisine güvendiğim ve süreç içerisinde imkanlarını bizden esirgemeyen Doç. Dr. Mümin Alper ERDOĞAN'a, eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi her konuda bana destek olan ve tez sürecimde de önemli katkılar sağlayan annem Necla GÜZEL, babam Muharrem GÜZEL ve abim Aykut GÜZEL'e, son olarak da bu sürecin iyi ve kötü dönemlerinin tamamında yanımda duran ve beni destekleyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İzmir, 13.01. 2022

Aytaç GÜZEL

Özgeçmiş

Aytaç GÜZEL

EĞİTİM

YÜKSEK LİSANS EĞİTİMİ | 2019-2022

- Fizyoloji Yüksek Lisans Programı | **AGNO:** 4.00/4.00
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD | İzmir, Türkiye

LİSANS EĞİTİMİ | 2014-2019

- Biyoloji Bölümü | **AGNO:** 3.82/4.00
Ege Üniversitesi Fen Fakültesi | İzmir, Türkiye

İS/STAJ DENEYİMİ

- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (Staj) | 2018
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi | İzmir, Türkiye

YABANCI DİL

- İngilizce | B2

YÖKDİL Puan: 91.25

BAŞARILAR/SERTİFİKALAR

Başarılar

- Fen Fakültesi Birincilik Ödülü
- Biyoloji Bölümü Birincilik Ödülü
- Ege Üniversitesi Yüksek Onur Belgesi
- TEKNOFEST 2021 Biyoteknoloji İnovasyon Yarışması Finalisti

Sertifikalar

- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
- Indiana Üniversitesi İleri Seviye İntihal Sertifikası
- TÜBİTAK ARDEB - BİDEB ve Uluslararası Projeler Eğitimi

- Girişimcilik 101 EğitimiSpringer Nature Yazar alıştayı Sertifikası
- Springer Nature Yazar alıştayı Sertifikası

