



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜMÖR HÜCRE Sİ ÖZELLİKLERİNİN
DOĞRUSAL OLMAYAN METODLAR İLE İNCELENMESİ

Mahmut AKILLI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Handan TUNCEL

Biyofizik Anabilim Dalı

Biyofizik Programı

Aralık, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Mahmut AKILLI tarafından, **Prof. Dr.Handan TUNCEL** danışmanlığında hazırlanan "**Tümör Hücresi Özelliklerinin Doğrusal Olmayan Metodlar ile İncelemesi**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **28/12/2022** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
	Prof. Dr. Handan TUNCEL	<input type="checkbox"/>
DANIŞMAN	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Biyofizik Anabilim Dalı	Kabul <input type="checkbox"/> Ret
	Doç. Dr.Bilge Güvenç TUNA	<input type="checkbox"/>
ÜYE	Yeditepe Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı	Kabul <input type="checkbox"/> Ret
	Doç. Dr.Yelda Tarkan ARGÜDEN	<input type="checkbox"/>
ÜYE	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Kabul <input type="checkbox"/> Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Mahmut AKILLI



Anneme ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

TÜMÖR HÜCRESİ ÖZELLİKLERİNİN DOĞRUSAL OLMAYAN METODLAR İLE İNCELENMESİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam boyunca birikim ve tecrübelerinden faydalandığım, gösterdiği her türlü destek ve katkılarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. Handan TUNCEL'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında yer alan ve tezdeki verilerin elde edilmesinde Laboratuvar ve eğitim imkânı sağlayan Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Fatma SÖĞÜT'e teşekkür eder ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans eğitimi boyunca ders aldığım tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Aralık 2022

Mahmut AKILLI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xiv
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	3
2.1. HÜCRENİN ELEKTRİKSEL AKTİVİTESİ VE İYON KANALLARI.....	4
2.2. PATCH CLAMP TEKNİĞİ.....	4
2.2.1. Patch Clamp Uygulamaları.....	7
2.2.1.1. Hücre Üzerinde (Cell attached-on cell) Kayıt.....	7
2.2.1.2. Tüm Hücre (Whole cell) Kaydı.....	9
2.2.1.3. Dışı Dışarıda (Outside Out) Kayıt.....	10
2.2.1.4. İçi Dışarıda (Inside Out) Kayıt.....	10
2.2.2. Patch Clamp Kayıt Setini Oluşturan Temel Ekipmanlar.....	10
2.3. İYON KANALLARIN ELEKTRİKSEL İLETKENLİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	12
2.4. HÜCRE İYONİK AKIM SİNYALLERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	13
2.5. KANSERLİ HÜCRELERİN ELEKTRİKSEL AKTİVİTESİ VE İYON KANALLARI.....	14
2.6. ENTROPİ VE CANLILIK.....	18
2.6.1. Hücrenin Entropisi.....	20

2.7. BİYOLOJİK SİSTEMLER İÇİN DOĞRUSAL OLMAYAN ANALİZ YÖNTEMLERİ	21
3. YÖNTEM.....	23
3.1. DALGACIK DÖNÜŞÜMÜN TEMEL KAVRAMLARI.....	23
3.2. DALGACIK DÖNÜŞÜMÜNE DAYALI ENTROPİ HESAPLAMA TEKNİĞİ.....	24
3.2.1. Skalogram Entropi.....	24
3.2.2. Pencerele Skalogram Entropi.....	25
3.2.3. Pencerele Ölçek İndeksi.....	26
3.3. SAMPLE (ÖRNEK) ENTROPİ.....	27
3.4. EN BÜYÜK LYAPUNOV ÜSTELLERİ.....	28
3.5. PATCH CLAMP DENEY PROTOKOLÜ.....	28
3.5.1. Hücre Kültürü.....	28
3.5.2. Patch Clamp Kaydı.....	29
4. BULGULAR.....	31
4.1. Tümör Hücreleri Olarak MCF-7’de Elde Edilen Sonuçlar.....	31
4.2. Normal Hücre Olarak ARPE-19’da Elde Edilen Sonuçlar.....	43
4.3. MCF-7 ve ARPE-19 Hücrelerden Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması.....	54
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	74
ETİK KURUL İZİN YAZISI	75
KURUM İZİNİ YAZILARI	76
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: İyon kanal türleri.....	4
Şekil 2.2: Patch Clamp Kayıtlarının Genel Prensibi.....	5
Şekil 2.3: Cam mikroeletrot ile hücre membranı arasındaki kenetleme (mühürleme) durumu.....	6
Şekil 2.4: Patch clamp tekniğinin biyofiziksel şeması.....	6
Şekil 2.5: Patch clamp tekniğinin kayıt türleri.....	7
Şekil 2.6: Hücre dışı (ekstrasellüler) ortam sıvısı içinde mikroeletrodun hareketinden kaynaklı kare dalga oluşumu.....	8
Şekil 2.7: ‘Gigaseal’ oluşumu.....	8
Şekil 2.8: Whole-Cell (tüm hücre) Patch Clamp kaydında zamana bağlı iyonik akım grafiği.....	9
Şekil 2.9: Patch clamp sisteminin kayıt alma şeması.....	12
Şekil 2.10: Whole-Cell Patch Clamp yöntemi ile yapılan bir deneyde elde edilen akım-voltaj grafiği.....	13
Şekil 2.11: Whole-cell patch clamp yöntemi ile yapılan bir hücre membran akım kayıttı.....	14
Şekil 2.12: Tek bir iyon kanalındaki iyonik akım sinyali.....	14
Şekil 2.13: Kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki farklar.....	15
Şekil 2.14: Sağlıklı ve hastalıklı iyon kanalların yapıları.....	16

Şekil 2.15: Zamanın bir fonksiyonu olarak entropi.....	20
Şekil 2.16: Canlı bir hücrenin basit bir termodinamik analizi.....	21
Şekil 3.1: 1000 ms boyunca -140 mV'dan +60 mV'a kadar yükseltilecek rampa potansiyelin şematik şekli.....	29
Şekil 3.2: Hücre membran akım kayıtların alındığı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarı ve patch-clamp kayıt teknik ekipmanları.....	30
Şekil 4.1.1: 22122004 kayıt nolu MCF-7'deki EAGI potasyum iyon kanalların akım sinyalleri ve iletkenliğin hesaplanması	33
Şekil 4.1.2: 22122004 kayıt nolu MCF-7 için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, skalogram entropi ve skalogram ölçek indeks spektrumları.....	34
Şekil 4.1.3: 22122005 kayıt nolu MCF-7'deki EAGI potasyum iyon kanalların akım sinyalleri ve iletkenliğin hesaplanması.....	35
Şekil 4.1.4: 22122005 kayıt nolu MCF-7 için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, skalogram entropi ve skalogram ölçek indeks spektrumları.....	36
Şekil 4.1.5: 22122006 kayıt nolu MCF-7'deki EAGI potasyum iyon kanalların akım sinyalleri ve iletkenliğin hesaplanması.....	37
Şekil 4.1.6: 22122006 kayıt nolu MCF-7 için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, skalogram entropi ve skalogram ölçek indeks spektrumları.....	38
Şekil 4.1.7: 22122008 kayıt nolu MCF-7'deki EAGI potasyum iyon kanalların akım sinyalleri ve iletkenliğin hesaplanması.....	39
Şekil 4.1.8: 22122008 kayıt nolu MCF-7 için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, skalogram entropi ve skalogram ölçek indeks spektrumları.....	40
Şekil 4.1.9: 22122009 kayıt nolu MCF-7'deki EAGI potasyum iyon kanalların akım sinyalleri ve iletkenliğin hesaplanması.....	41

Şekil 4.1.10: 22122009 kayıt nolu MCF-7 için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, skalogram entropi ve skalogram ölçek indeks spektrumları.....	42
Şekil 4.2.1: 208070040 kayıt nolu kontrol ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyali için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, pencereleli skalogram entropi ve pencereleli skalogram ölçek indeks spektrumları.....	44
Şekil 4.2.2: 208070160 kayıt nolu kontrol ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyali için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, pencereleli skalogram entropi ve pencereleli skalogram ölçek indeks spektrumları.....	45
Şekil 4.2.3: 208110680 kayıt nolu kontrol ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyali için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, pencereleli skalogram entropi ve pencereleli skalogram ölçek indeks spektrumları.....	46
Şekil 4.2.4: 208121090 kayıt nolu 50 µg/mL SiO ₂ doz uygulaması yapılan ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyali için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, pencereleli skalogram entropi ve pencereleli skalogram ölçek indeks spektrumları.....	46
Şekil 4.2.5: 208123630 kayıt nolu 50 µg/mL SiO ₂ doz uygulaması yapılan ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyali için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, pencereleli skalogram entropi ve pencereleli skalogram ölçek indeks spektrumları.....	48
Şekil 4.2.6: 208120110 kayıt nolu 100 µg/mL SiO ₂ doz uygulaması yapılan ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyali için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, pencereleli skalogram entropi ve pencereleli skalogram ölçek indeks spektrumları.....	49
Şekil 4.2.7: 208120350 kayıt nolu 100 µg/mL SiO ₂ doz uygulaması yapılan ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyali için hesaplanan en büyük Lyapunov üsteli, örnek entropi, pencereleli skalogram entropi ve pencereleli skalogram ölçek indeks spektrumları.....	50

Şekil 4.2.8: Kontrol grubundaki ARPE-19 hücrelerdeki TRP iyon kanallarının iletkenlikleri ve denge potansiyellerinin hesaplanması.....	51
Şekil 4.2.9: 50 µg/mL SiO ₂ doz uygulaması yapılan ARPE-19 hücrelerdeki TRP iyon kanallarının iletkenlikleri ve denge potansiyellerinin hesaplanması.....	52
Şekil 4.2.10: 100 µg/mL SiO ₂ doz uygulaması yapılan ARPE-19 hücrelerdeki TRP iyon kanallarının iletkenlikleri ve denge potansiyellerinin hesaplanması.....	53



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon akım sinyallerin kayıt numaraları.....	31
Tablo 4.3.1: MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyallerinin en büyük Lyapunov üstellerin ortalamaları (ort.) ve standart sapma (sd.) değerleri. Ayrıca belli voltajlarda Lyapunov üstellerin aldığı değerler.....	54
Tablo 4.3.2: En büyük Lyapunov üstel değerlerinin (Tablo 4.3.1) genel özeti.....	55
Tablo 4.3.3: MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyallerinin örnek entropilerinin ortalamaları (ort.) ve standart sapma (sd.) değerleri. Ayrıca belli voltajlarda örnek entropilerinin aldığı değerler.....	55
Tablo 4.3.4: Örnek entropi değerlerinin (Tablo 4.3.3) genel özeti.....	55
Tablo 4.3.5: MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyallerinin pencereleli skalogram entropilerinin ortalamaları (ort.) ve standart sapma (sd.) değerleri. Ayrıca belli voltajlarda pencereleli skalogram entropilerinin aldığı değerler.....	56
Tablo 4.3.6: Pencereleli skalogram (WS) entropi değerlerinin (Tablo 4.3.5) genel özeti.....	56
Tablo 4.3.7: MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon kanalların akım sinyallerinin pencereleli ölçek indekslerinin ortalamaları (ort.) ve standart sapma (sd.) değerleri. Ayrıca belli voltajlarda pencereleli ölçek indekslerinin aldığı değerler.....	56
Tablo 4.3.8: Pencereleli ölçek indeks değerlerinin (Tablo 4.3.7) genel özeti.....	57
Tablo 4.3.9: MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon kanallarının elektriksel iletkenlik ve denge potansiyel değerleri.....	57

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
Na^{+1}	: Sodyum iyonu
K^{+1}	: Potasyum iyonu
Ca^{+2}	: Kalsiyum iyonu
Cl^{-}	: Klor iyonu
SiO_2	: Silisyum dioksit veya silika
I	: Akım
V	: Voltaj
σ	: İletkenlik
ΔS	: Entropi değişimi
ΔQ	: Isı değişimi
T	: Sıcaklık
S	: Entropi
k_B	: Boltzmann sabiti, $1.38 \cdot 10^{-23} \text{J/K}$
J	: Joule
K	: Kelvin
W	: Mikro durum sayısı
S_{BGS}	: Boltzmann–Gibbs–Shannon entropisi
ψ	: Dalgacık fonksiyonu
$S^{\text{inner}}(s)$: İner skalogram
$WS(p)$: Pencereli skalogram entropi
$W_{\text{scale},\tau}^i(t)$: Pencereli ölçek indeksi
λ	: Lyapunov üsteli
Ω	: Ohm
A	: Amper
pS	: Picosiemens, $10^{-12} \cdot \text{simens}$
$G\Omega$: Gigaohm, $10^9 \cdot \text{ohm}$
$M\Omega$: Megaohm, $10^6 \cdot \text{ohm}$
pA	: Picoamper, $10^{-12} \cdot \text{amper}$
m	: Metre

μm	: Micrometre, 10^{-6} .metre
mV	: Millivolt, 10^{-3} .volt
μg	: Microgram, 10^{-6} .gram
mL	: Millilitre, 10^{-3} .litre
mM	: Millimolar, 10^{-3} .molar
ms	: Millisaniye, 10^{-3} .saniye

Kısaltmalar	Açıklama
Ort.	: Ortalama deęer
Sd.	: Standart sapma
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
Eag	: ether-à-go-go
Cav	: Voltaj kapılı kalsiyum kanalları
BGS	: Boltzmann–Gibbs–Shannon
SampEn	: Örnek enyropi (sample entropy)
LYP	: Lyapunov Üsteli
EEG	: Elektroensefalografi
RPE	: Retinal Pigment Epithelial (Retina Pigment Epiteli)
ARPE-19	:İnsan Retinal Pigment Epiteli Hücre Hattı
TRP	: Transient Receptor Potential (Geçici Reseptör Potansiyeli)
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7 (Meme Kanseri Hücre Hattı)

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[TÜMÖR HÜCRESİ ÖZELLİKLERİNİN DOĞRUSAL OLMAYAN METODLAR İLE İNCELENMESİ]

[Mahmut AKILLI]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyofizik Anabilim Dalı

Biyofizik Programı

[Danışman : Prof. Dr.Handan TUNCEL]

[Bu tezde; tümör ve normal hücrelerden kaydı alınan membran iyonik akım sinyalleri bazı doğrusal olmayan yöntemler (Lyapunov üsteli, örnek entropi, skalogram entropi ve skalogram ölçek indeksi) ile incelendi. Bu yöntemlerin, hücrelerin elektriksel özelliklerini ve fizyolojik davranışlarını analiz etmede nasıl kullanılabileceği gösterildi. Hücrelerin membran iyonik akım sinyal kayıtları Whole-Cell Patch Clamp tekniği ile yapıldı. Tümör hücresi olarak insan Meme Kanseri Hücre Hattı (MCF-7) ve normal hücre olarak insan Retina Pigment Epiteli (ARPE-19) hücre hattı kullanıldı. Sonuç olarak, voltajla değişen hücre davranışları (veya dinamiği) doğrusal olmayan parametreler üzerinden izlenebilir. Ayrıca, tümör ile normal hücreler arasındaki davranış farklılıklarını tespit etmek için doğrusal olmayan yöntemler kullanılabilir.]

Aralık 2022, [94] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Doğrusal Olmayan Yöntemler, Whole-Cell Patch Clamp Tekniği, MCF-7 ve ARPE 19 Hücreler]

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF TUMOR CELL FEATURES BY NONLINEAR METHODS

Mahmut AKILLI

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Biophysics

Biophysics Program

Supervisor: Prof. Dr. Handan TUNCEL

In this thesis; Membrane ionic current signals recorded from tumor and normal cells were analyzed by some nonlinear methods (Lyapunov exponent, sample entropy, scalogram entropy and scalogram scale index). It was demonstrated how these methods can be used to analyze the electrical properties and physiological behavior of cells. Membrane ionic current signal recordings of cells were made by Whole-Cell Patch Clamp technique. Breast Cancer Cell Line (MCF-7) was used as tumor cell and Retina Pigment Epithelium (ARPE-19) cell line was used as normal cell. According to the results obtained, the behavior (or dynamics) of voltage-varying cells can be monitored through non-linear parameters. In addition, non-linear methods can be used to detect behavioral differences between tumor and normal cells.

December 2022, 94 pages.

Keywords: Nonlinear Methods, Whole-Cell Patch Clamp Technique, MCF-7 and ARPE-19 Cells

1. GİRİŞ

Modern bilim 'indirgemecilik' düşüncesine dayanır. İndirgemeci düşünce tarzı, problemleri öncelikle analitik olarak daha küçük doğrusal parçalara ayırır, sonrasında bu doğrusal parçaları mantıklı bir şekilde organize ederek çözmeye çalışır. Bu açıdan indirgemeci düşünceye 'doğrusal (linear) bilim' de denilebilir. [1].

Başlangıçta indirgemeci düşünce tarzı ile doğayı anlama zorluğuyla yüzleşmek mantıklı bir yoldur ve bu yöntem ile çok büyük başarılar elde edilmiştir. Evreni ve maddenin yapısını anlamamızı sağlayan Newton kanunları ve Kuantum mekaniği bu paradigmaya dayanır. Bu teorik çerçeveye dayanarak maddenin yapısını değiştirerek kontrollü nükleer enerji üretmek, yarı iletken cihazlar geliştirmek gibi bugün içinde yaşadığımız modern dünyayı şekillendiren birçok uygulama yapılabildi. Ancak, bu teorik çerçeve ile ilgili bariz bir paradoks bulunmaktadır. Her şey atomlardan oluşur: bir metal parçası, bir damla su, bir canlı hücre veya bir insan. O zaman şu soru sorulabilir: Her ikisi de tamamen aynı yapı taşlarından (atomlardan) oluşuyorsa, bir metal parçasının basit yapısı ile canlı bir hücrede karşılaşılan karmaşıklık nasıl ayırt edilebilir? Bu soruya sadece indirgemecilik yöntemi kullanılarak cevap verilemez. Çünkü indirgemecilik paradigmasına dayalı geliştirilen yöntemler ile kompleks (karmaşık) yapılar veya doğrusal olmayan (non-linear) dinamik sistemler analiz edilemez. [2].

Karmaşık 'basit' kelimesinin zıddıdır. Karmaşık bir sistem ise birçok parçadan oluşmuş ve bu parçaların kendi aralarındaki çoklu etkileşimlerin olduğu bir sistemi ifade eder. Bu nedenle, karmaşık sistemlere genellikle "parçalarının toplamından daha fazlası olan bütünler" denir. [3]. Bu açıdan baktığımızda, hücre birçok alt birimleri olan ve bu alt birimlerin kendi aralarındaki etkileşimlerin oluşturduğu karmaşık bir yapıdır. Başka bir ifadeyle, hücre birçok değişkenin etkileşiminden oluşmuş doğrusal davranmayan karmaşık bir sistemdir. Diğer yandan, hücre termodinamik denge dışında olması itibariyle çevresiyle sürekli etkileşime giren açık bir sistemdir. Bu açıdan hücreyi 'karmaşık denge dışı sistem (complex non-equilibrium system)' olarak tanımlanabilir.

Hücre temel fonksiyonlarını yerine getirebilmek için membran içi ve dışındaki iyonların dengede olmayan (non-equilibrium) dağılım durumlarını korur. Bu dengede olmayan iyonların dağılımı membran içi ve dışı arasında bir potansiyel fark oluşmasına neden olur.

Hücrenin istirahat membran potansiyeli iyonların denge dışı (non-equilibrium) dağılımından kaynaklanır. İyonların denge dışı durumu membranın içi ve dışı arasında elektrokimyasal gradyanları oluşturur. Hücre membran akımları da bu elektrokimyasal gradyanlar tarafından farklı anyon (-) ve katyon (+) iyonların yönlendirilmesi ile oluşur. [4]. Bu açıdan hücrenin elektriksel aktivitesini karmaşık dengede olmayan bir süreç (complex non-equilibrium process) olarak ifade edilebilir.

Hücre membranında iyon geçişleri ‘iyon kanalları’ aracılığıyla gerçekleşir. Bir hücrenin elektriksel aktivitesi iyon kanallarının sayısına, çeşitliğine ve iletkenliğine bağlıdır [4]. İyon kanallarındaki elektriksel iletkenlik bozukluklarının çeşitli hastalıklara neden olduğuna ilişkin birçok çalışmalar ortaya konulmuştur. Bu nedenle, iyon kanallarının iletkenlik ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, ‘iyon kanalının iletkenliği’ akım - voltaj oranında elde edilen sabit bir sayı olduğu için hücrenin elektriksel davranışları hakkında detaylı bilgi vermemektedir. Bu tezde, hücre davranışlarını (veya dinamiği) voltaj değişimleri üzerinden analiz etmek için zamana bağlı entropi ölçüm yöntemleri kullanılmıştır. Entropi ölçümü olasılık dağılımına dayalı bir hesaplama yöntemidir. Hücre membran akım sinyallerinin enerji dağılımından hücrenin entropisi hesaplanabilir. Hücrenin entropisi, zaman içinde, hücre içi ve dışındaki iyonların yük konsantrasyon dağılımlarının değişmesine bağlı olarak değişir. Dolayısıyla, voltaja bağlı değişen hücre davranışları entropi ölçümleri ile izlenebilir.

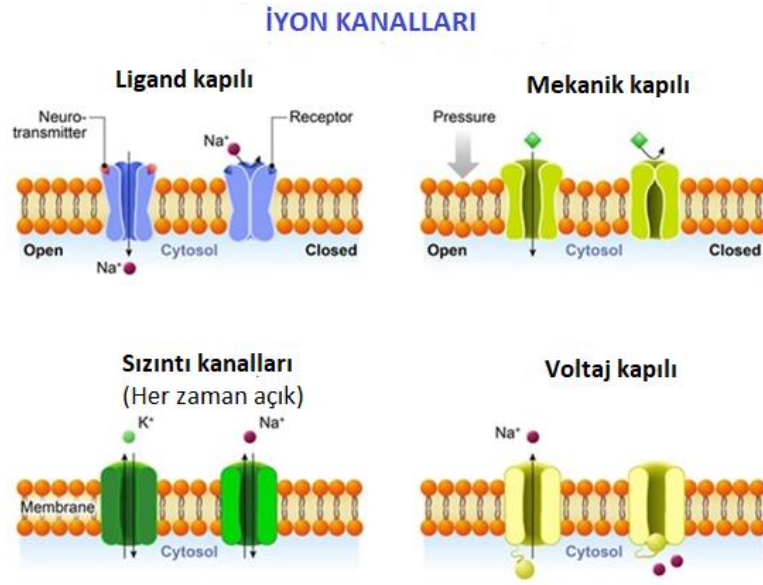
Bu tezde, Whole-Cell Patch Clamp tekniği [5] ile tümör ve normal hücre kültürlerinden kaydedilmiş membran iyonik akım sinyalleri ‘doğrusal olmayan (nonlinear) yöntemler’ ile analiz edilmiştir. Tümör hücresi olarak insan Meme Kanseri Hücre Hattı (MCF-7) ve normal hücre olarak insan Retina Pigment Epiteli (ARPE-19) hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7’de elde edilen sonuçlar ARPE-19 ve üzerinde ilaç uygulanmış ARPE-19 hücrelerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Entropi ölçümü olarak ‘Skalogram Entropi (scalogram entropy) [6], ‘Pencereli Skalogram Entropi (windowed scalogram entropy) [6]’ ve ‘Örnek Entropi (sample entropy) [7]’ yöntemleri kullanılmıştır. Entropi ile hücrenin karmaşıklık ve düzensizlik durumu ölçülmüştür. İyonik akım sinyallerinin aperiyoidiklik derecesi ‘Pencereli Ölçek İndeksi (Windowed Scale Index) [8]’ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. İyonik akım sinyallerinin ‘En Büyük Lyapunov Üstelleri [9]’ hesaplanarak hücrenin kaotiklik durumu incelenmiştir. Elde edilen tüm grafikler üzerinden tümör ile normal hücrelerin elektriksel özellikleri karşılaştırarak sonuçlar elde edilmiştir. Tezdeki bütün hesaplamalar ve çizimler "MATLAB" programı ile yapılmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. HÜCRENİN ELEKTRİKSEL AKTİVİTESİ VE İYON KANALLARI

Hücrelerdeki elektriksel aktivite sodyum (Na^{+1}), potasyum (K^{+1}), kalsiyum (Ca^{+2}) ve klor (Cl^{-1}) gibi iyonların varlığından kaynaklanır. İyon, bir veya birden fazla elektron kazanmış ya da kaybetmiş bir atomdan (veya bir molekülden) oluşmuş elektrik yüklü parçacık demektir. Hücre membranının (zarın) yapısını oluşturan lipit çift tabakası bu iyonlara karşı yalıtkan özelliğine sahiptir, yani iyonların geçişine izin vermezler. Bunun sonucu olarak, hücre membranının iç ve dış yüzeyinde iyonlar birikir. Burada, iyonların yüzeylerde farklı konsantrasyonlarda dağılımlarının sonucu olarak da bir potansiyel fark oluşur, buna 'hücre membran potansiyeli' denir. İyon geçişleri ise ancak 'iyon kanalları' adı verdikleri hücre membranının fosfolipid çift tabakasına gömülü integral proteinler aracı ile gerçekleşebilir. Hücre membran (zar) akımları ise elektrokimyasal gradyanlar tarafından yönlendirilen ve hücre membranı boyunca iyon kanallarından geçen iyonların hareketlerinden kaynaklanır [4, 10-12].

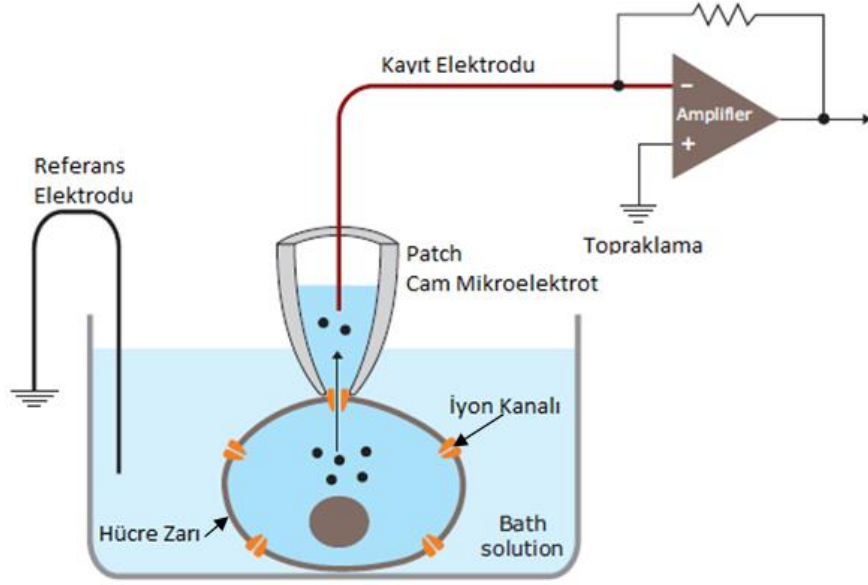
İyon kanalları yapısı gereği bir iyon türünün geçmesine izin verirken diğer başka bir iyonun türünün geçmesine izin vermezler, yani seçici geçirgendir. Bu yapısal ve işlevsel özelliklerinden dolayı şimdiye kadar hücre membranının içinde 400'ün üzerinde iyon kanal türü tespit edilmiştir. Genelde, kapısız (pasif) ve kapılı (aktif) iyon kanalları olarak iki ana gruba ayrılır. Kapısız iyon kanallarından iyonların geçişi sürekli sağlanır. Kapılı iyon kanallarından iyonların geçişi ise özel koşullara bağlıdır. İyon kanalların kapıları farklı uyarılara göre belli süreler içinde açılıp kapanır. Kapılı iyon kanallarını da uyarıya bağlı olarak 4'e ayrılır. Bunlar, sızıntı kanalları, voltaj kapılı kanallar, mekanik kapılı kanallar ve ligand kapılı kanallardır (Şekil 2.1). İyon kanalların en karakteristik fiziksel özelliği iletkenliğidir veya iyon geçişlerine karşı gösterdiği dirençtir. Kinetik özelliklerine bağlı olarak iyon kanallarının iletkenliği, 2-500 pS (pico Siemens), dirençleri ise 2-500 G Ω (gigaohm) aralığında değişebilir. Bu iyon kanallarından geçen akımların değerleri ise pA (picoamper) seviyesindedir [4, 10-12].



Şekil 2.1: İyon kanal türleri. Voltaj Kapılı, Ligand kapılı, Mekanik kapılı ve Daima açık iyon (sızıntı) kanalları. Resim: Designua / Shutterstock:<https://www.shutterstock.com/tr/image-illustration/types-ion-channel-classification-by-gating-514716034>

2.2. PATCH CLAMP TEKNİĞİ

Patch clamp tekniği, hücre membranının belirli bir bölgesindeki iyon kanallarından ya da tek bir iyon kanalından geçen iyonik akımların kaydedilmesi amacıyla geliştirilen bir elektro biyofiziksel ölçüm aracıdır [13-17]. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi çapı yaklaşık olarak 0,5-1 µm (micrometre) olan bir cam mikroelettrot (mikropipet) ucu ile hücre membranı arasında mühür (seal) diye tabir edilen sıkı bir kenetleme sağlanmasının ardından cam mikro elektrot ucu içerisinde kalan hücre membran yaması içerisinde bulunması muhtemel olan iyon kanal akımlarının ölçülmesine dayanmaktadır. Bu teknik hücre membran akımını ölçen 'Voltaj Clamp' [18] tekniğinin gelişmiş şeklidir. Voltaj clamp yöntemi, hücre membran potansiyelini sabit tutarak, bu sabit potansiyel koşullarında hücre membranından geçen iyonik akım değişimlerini kaydeder. Patch clamp yöntemi 1976 yılında Erwin Neher ve Bert Sarkmann tarafında geliştirildi. Amaçları, hocaları Katz tarafından ileri sürülen "hücre içine ve dışına iyon geçişleri membranın içine kuantsal (ayrık) olarak yerleşmiş olan iyon kanalları aracılığıyla sağlanır" fikrini desteklemek için sadece bir tek iyon kanalından geçen akımı ölçmek istediler. Bu temelde 'iyon kanalı' düşüncesini deneysel olarak ispat etmek istiyorlardı.

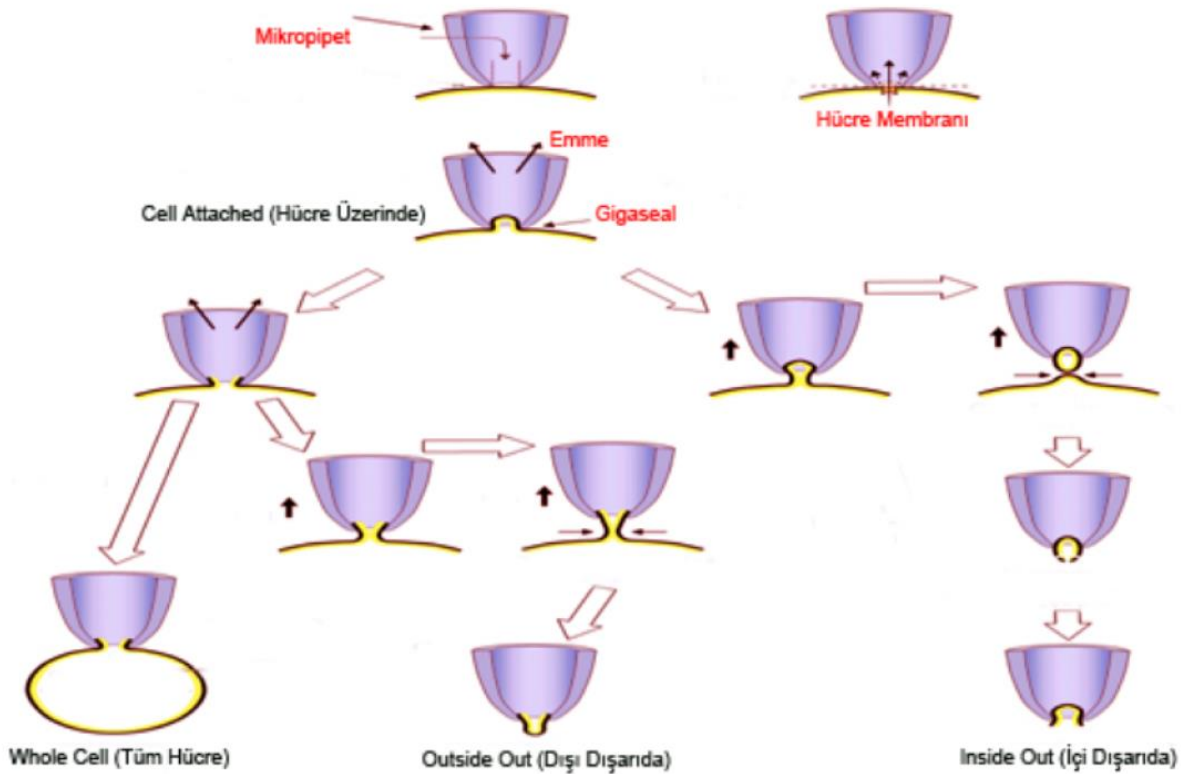


Şekil 2.2: Patch Clamp Kayıtlarının Genel Prensibi: Elektrolit solüsyonu içeren bir cam mikroelektrot hücre zarının yamasına sıkıca kenetlenir ve böylece zar yaması elektriksel olarak izole edilir. Dolayısıyla, bu yamadaki iyon kanallarından akan akımlar cam mikro elektrot pipete doğru akar ve bu oldukça hassas bir amplifikatör (diferansiyel yükselticiye) bağlı bir elektrot tarafından kaydedilir. Uygulanan kenetleme voltajları altında bu akımların kaydedilmesi, hücre iyon kanallarının iletkenliği hakkında sonuçlara varılmasını sağlar [17].

Neher ve Sakmann [14-15], ölçüm aracı olarak kullandıkları cam mikroelektrotu hücre membranına temas ettirdiler. Ancak, Şekil 2.3(a)'da gösterildiği gibi membran ile mikroelektrot kenarında meydana gelen akım sızıntısını engelleyemedikleri için gürültüden arındırılmış bir akım kaydı yapamıyorlardı. Bu teknik sorunu aşmak için, cam mikroelektrot içerisine negatif basınç uygulayarak, temas ettiği hücre membranını mikroelektroda doğru emilmesini sağladılar. Böylece mikroelektrot yüzeyi ile membran arasında kuvvetli bir kenetleme (kaynaşma) oluştu. Bu iki ayrı yüzeyler arasındaki kaynaşma Şekil 2.3(b)'da gösterildiği gibi $G\Omega$ seviyesinde olduğu için "gigaseal" adı verilen sıkı mühürleme sayesinde akım sızıntısını engellediler. "Patch Clamp Tekniği" olarak adlandırdıkları bu teknoloji ile ilk defa tek iyon kanalında geçen iyonik akımlarını başarılı bir şekilde kaydettiler. Bu çalışmaları ile 'iyon kanalı' hipotezini deneysel olarak ispatladıkları için 1991 yılı Nobel Tıp ödülü Neher ve Sakmann'a verildi. Patch clamp tekniğinin biyofiziksel şeması Şekil 2.4'de verilmiştir.

2.2.1. Patch-Clamp Uygulamaları

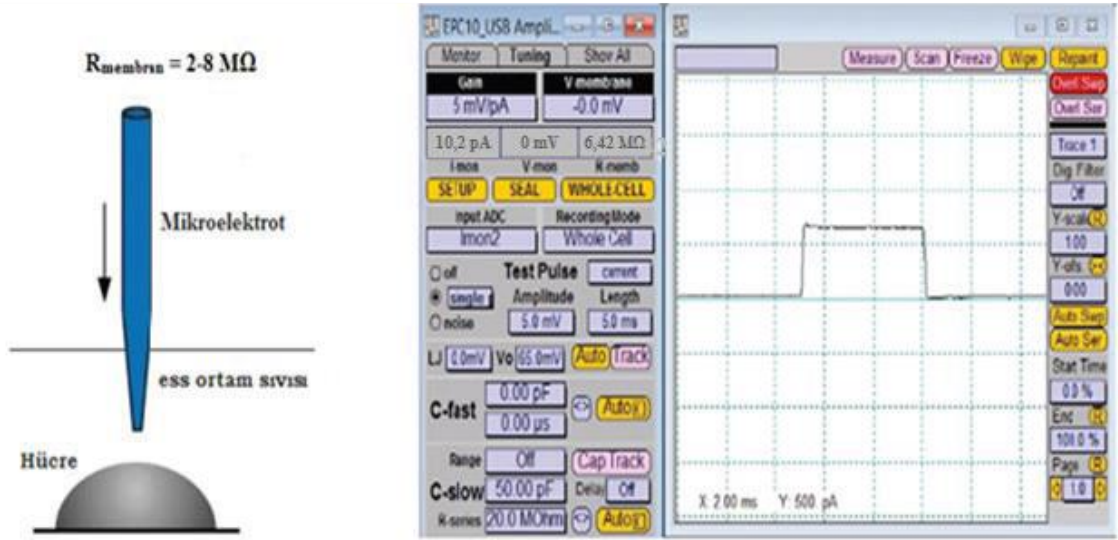
Patch clamp tekniğinin 4 farklı kayıt türü vardır. Bunlar, cell attached-on cell (hücre üzerinde), whole-cell (tüm hücre), inside-out (içi-dışarıda) ve outside-out (dışı-dışarıda) olarak adlandırılır (Şekil 2.5). Çalışmalarda amaca göre uygun bir kayıt türü seçilir. [14, 15, 19-23].



Şekil 2.5: Patch clamp tekniğinin kayıt türleri [21].

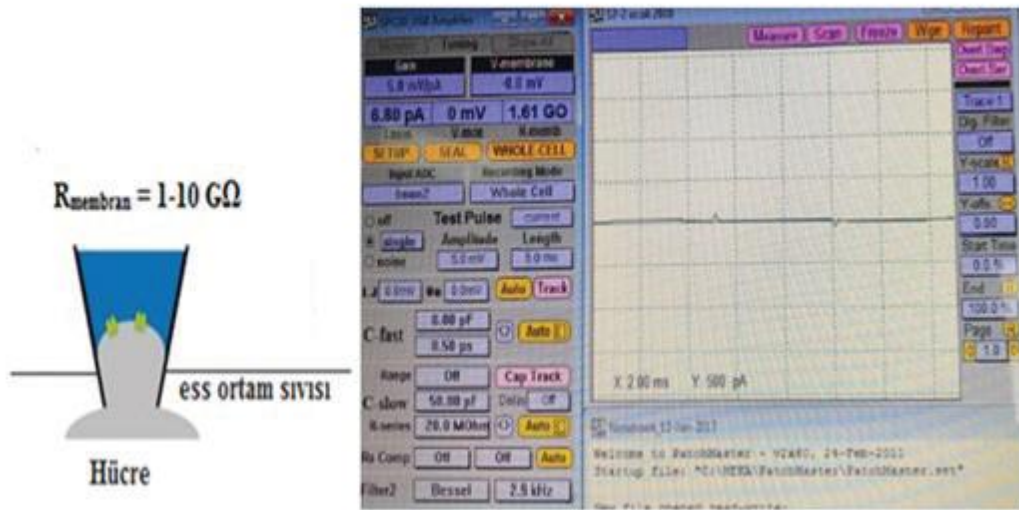
2.2.1.1. Hücre Üzerinde (Cell attached-on cell) Kayıt

Patch clamp kayıt tekniğinde, çapı genelde 1 μm civarında ve 2-10 $\text{M}\Omega$ (megaohm) direncine sahip cam mikroelektrotlar kullanılır. Cam mikroelektrota hücrenin ekstrasellüler ortam solüsyonu doldurulmalıdır. Ekstrasellüler ortam solüsyonu içinde cam mikroelektrot mikromanipülatör aracılığı ile hücre membrana doğru hareket ettiril. Bu duruma yanıt olarak Şekil 2.6'da gösterildiği gibi zamana bağlı akım grafiğinde kare dalga oluşumu gözlemlenir. Bu cam mikroelektrot hücre membranı ile temas ettirildiği ana kadar 2-8 $\text{M}\Omega$ arasında bir direnç oluşur.[14, 24-25].



Şekil 2.6: Hücresel dışı (ekstrasellüler) ortam sıvısı içinde mikroelettrotun hareketinden kaynaklı kare dalga oluşumu [20].

Bu temas durumu, mikroelettrot direnci % 50 oranında artış gösterene kadar mikroelettrot hücre membrana bastırılır. Ardından negatif basınç uygulanarak temaslı membran parçasının direnci ($R_{membran}$) 1-10 G Ω seviyesine ulaşana kadar cam mikroelettrotun içine doğru emilir. Bu tarzda ‘gigaseal’ adı verilen sıkı bir mühürleme gerçekleşir. Bununla, Şekil 2.7’de gösterildiği gibi Şekil 2.6’daki kare dalga kaybolur. [20-21].

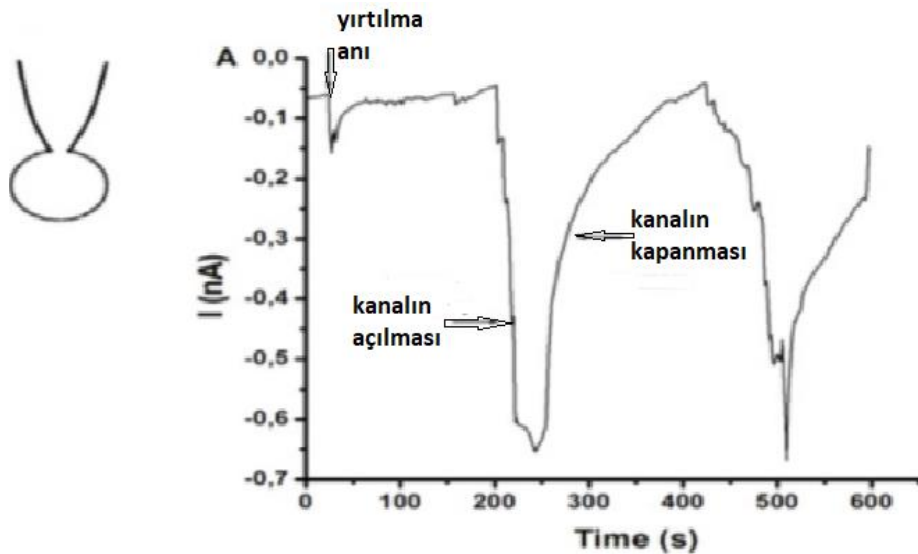


Şekil 2.7: ‘Gigaseal’ oluşumu [20].

Bu işlem sırasında cam mikroelettrot potansiyeli 0 mV seviyesinde, hücre membran potansiyeli ise istirahat potansiyelinde sabit tutulur. Ya da membran potansiyeli istenen değere kenetleyerek hücre membranından geçen iyonik akımların kaydı alınır. Bu kayıt yöntemi ile ekstrasellüler olarak uygulanan hormon veya kimyasal maddelerin iyonik akım üzerine etkileri araştırabilmektedir. [22-23].

2.2.1.2. Tüm Hücre (Whole cell) Kaydı

Whole-Cell (tüm hücre) Patch Clamp kaydında, önce cam mikroelettrot ile ‘Hücre Üzerinde (Cell attached-on cell) Kayıt’ şekli oluşturulur. Cam mikroelettrot içine intrasellüler ortam solüsyonu ile doldurulur ve mikroelettrot potansiyeli istirahat membran potansiyel değerine sabitlenir (kenetlenir). Bu işlemlerden sonra, vakum (negatif basınç) uygulayarak, yani kısa bir emme darbesi ile mikroelettrot içindeki hücre membran yaması fiziksel olarak yırtılır, dolayısıyla mikroelettrot hücre içi ile düşük dirençli erişim sağlar. Şekil 2.8’de gösterildiği gibi yırtılma anında akım değerinde ani bir düşüş yaşanır. Whole-Cell konfigürasyonu oluşturulduktan birkaç dakika sonra, cam mikroelettrot solüsyonu hücrenin sitoplazması ile dengelenecek ve zar boyunca yapay bir iyonik potansiyel empoze edecektir. Yani, cam mikroelettrot solüsyonu ile sitoplazmanın hücre içi perfüzyonu nedeniyle, bu diyalizin sabit bir duruma ulaştığından emin olmak için kayıt almadan önce birkaç dakika beklenilmesi gerekiyor. Cam mikroelettrot potansiyeli ile hücre içi potansiyel değerleri birbirine yakın olduğu zaman iyon akışı çok az olur, dolayısıyla akım değeri yaklaşık sıfır ($I \approx 0$) olarak okunur. Kayıt sırasında, mikroelettrotun hücre ile teması sürdüğü için hücre içi organeller ile iyon kanallarının birbirleriyle etkileşim durumları devam ederler. Whole-Cell patch clamp kaydında, komut voltaj pulsu uygulayarak, bu voltaj altında bir hücrenin tüm kanallarında geçen iyonik akımların kaydı alınır. Yani, zamana bağlı olarak bir hücrenin tüm kanallarında geçen toplam iyonik akım değişimleri ölçülür. Hücre dışı hormonların, farklı molekül ve parçacıkların bir plazma membranında bulunan tüm iyonik kanalları üzerindeki etkileri bu teknik ile araştırılabilir. [5, 26-31].



Şekil 2.8: Whole-Cell (tüm hücre) Patch Clamp kaydında zamana bağlı iyonik akım grafiği [21].

2.2.1.3. Dışı Dışarıda (Outside Out) Kayıt

Outside Out (dışı dışarda) Patch Clamp kaydında, önce ‘Tüm Hücre (Whole cell) Kayıt’ durumu oluşturulur. Cam mikroeletrotu hafifçe çekme sonucu mikroeletrot uçundaki yapışık membran parçası (yaması) hücreden kopartılır. Şekil 2.5’de gösterildiği gibi mikroeletrot ucunda kalan hücre membran yaması ters yönde tekrar birleşerek 'dışı dışarıda' kayıt yöntemi pozisyonu oluşur. Kopan membran yamasının hücre içi organeller ile bir ilişkisi kalmaz. Hücreden izole edilen bu küçük membran yamasında bulunan iyon kanallarının hormonlar ve kimyasal maddeler ile etkileşimi bu yöntem ile araştırılabilir. [15, 20, 21, 24].

2.2.1.4. İçi Dışarıda (Inside Out) Kayıt

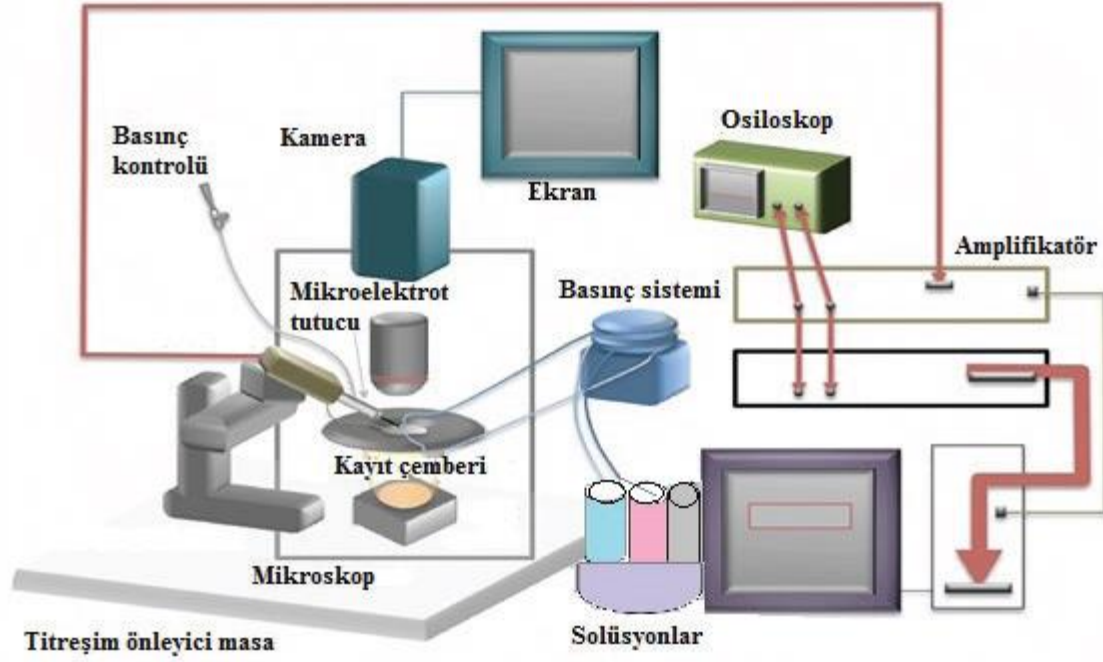
Inside out (içi dışarda) patch clamp kaydında, önce cam mikroeletrot ile ‘Hücre Üzerinde (Cell attached-on cell) Kayıt’ şekli oluşturulur. Cam mikroeletrotu hızlıca geri çekme sonucu mikroeletrot uçundaki yapışık membran yaması hücreden kopartılır. Şekil 2.5'de gösterildiği gibi, mikroeletrot ucundaki hücre membranının hücre içi tarafı ekstrasellüler ortam solüsyonuna bakacak şekilde, hücre membran parçası ters dönerek tekrar birleşir. Hücreden izole olmuş bu küçük membran yamasında bulunan tek iyon kanallarının intrasellüler faktörler ile etkileşimleri ‘içi dışarıda (inside out) kayıt’ yöntemi ile incelenebilir.[15, 20, 21, 24].

2.2.2. Patch-Clamp Kayıt Setini Oluşturan Temel Ekipmanlar

- 1- **İnverted Mikroskop:** Bu mikroskobun sağladığı görüntüleme imkânı sayesinde cam mikroeletrot ile hücre membranı arasında mühürleme işlemi yapılır. Normal mikroskoplardan farkı objektifler inverted mikroskop tablasının altında yer almasıdır.[16, 20, 21].
- 2- **Cam Mikroeletrotlar:** Silindir tüp şeklindedir ve içi boştur. Dirençleri 2 - 10 MΩ arasında değişir. Çapları küçüldükçe mikroeletrodun direnci de artar.[16, 20, 21, 32].
- 3- **Mikroeletrot Çekici (Puller):** Özel ısı ve çekme kuvveti ile cam silindir tüpleri sivrilterek cam mikroeletrotlar üreten cihazdır [16, 20, 21, 32].
- 4- **Titreşim Önleyici Masa:** Cam mikroeletrot ile hücre membranı arasında kenetleme işlemi çok hassas bir işlemdir. En küçük bir sarsıntı ile deney başarısızlıkla sonuçlanır. Çevre sarsıntılarını sıfırlamak için deney ekipmanları 'titreşim önleyici masa' üzerinde kurulur. [16, 20, 21].
- 5- **Mikromanipülatör:** Ekstrasellüler solüsyonu içinde cam mikroeletrotu hücre membrana doğru hareket ettirmek için 'mikromanipülatör' adı verilen bir araç

kullanılır. Bu mikromanipülatör ile cam mikroelektrotu her yöne hareket ettirebilir.[16, 20, 21, 32].

- 6- Perfüzyon Sistemi:** Deneyler esnasında hücrelerin yerleştirildiği ve çember (chamber) olarak adlandırılan bölümde soluyondan sıvı alış-verişinin yapıldığı veya ilaç, nörotransmitter vb. maddeler ilave edilmesini sağlayan sistemdir [16, 20, 21, 32].
- 7- Faraday Kafesi:** Yüzeyleri tamamen iletkenle kaplanmış bir hacimde elektrik alan sıfırdır. Elektrik alanı sıfır olan bir yerde elektrik yükleri hareket etmez. Dolayısıyla, elektrik yüklerin ivmeli hareketinden doğan elektromanyetik dalgalarda oluşmaz. Patch clamp kayıt sırasında, Faraday kafesi sayesinde dış ortamdaki elektromanyetik dalgalardan kaynaklı gürültüyü önlemiş oluruz. [16, 20, 21, 32].
- 8- Amplifikatör (Yükselteç):** Hücre iyon kanallarından geçen akımlar pA düzeyindedir. Bu kadar küçük akım değerlerini yükseltilecek ekrana yazdırmak için diferansiyel amplifikatörler kullanılır. [16, 20, 21].
- 9- Basınç sistemi:** İşlem sırasına göre cam mikroelektrota pozitif veya negatif basınç uygulanarak hücre membranında kenetleme işleminin gerçekleştirilmesinde kullanılır [16, 20, 21].
- 10- Bilgisayar Yazılımı:** Hücre iyonik akım ve potansiyel değerlerini bilgisayara kaydetmek için Patchmaster ve Fit master gibi yazılım programları kullanılır [16, 20, 21, 33].
- 11- Bilgisayar:** Patch clamp sisteminde kayıt ve görüntülemeyi sağlayan aygıttır [16, 20, 21, 33].
- 12- Kamera:** Bilgisayar ve invert mikroskoba bağlı olarak çalışır. Kamera aracılığı ile Patch clamp kayıt işlemlerinden alınan görüntüler bilgisayara aktarılabilir. [16, 20, 21, 33].

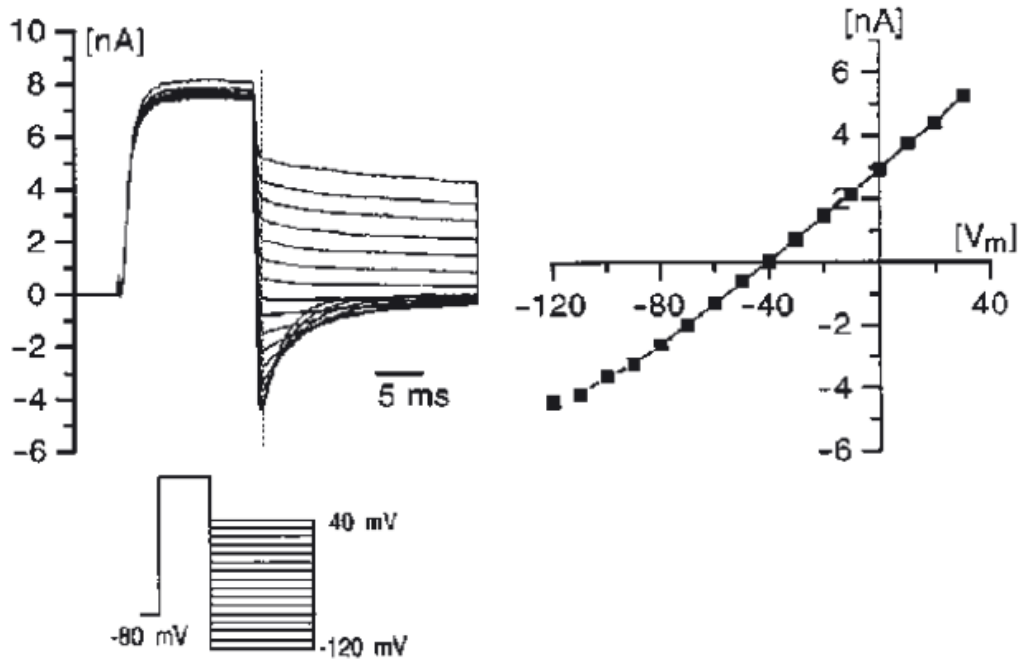


Şekil 2.9: Patch clamp sisteminin kayıt alma şeması [20].

2.3. İYON KANALLARIN ELEKTRİKSEL İLETKENLİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ

Elektriksel iletkenlik ve öz direnç birbirinin tersini ifade eden iki fiziksel kavramdır. Herhangi bir maddesel ortamın elektrik akımının geçişine gösterdiği kolaylığa 'elektriksel iletkenlik', elektrik akımının geçişine oluşturduğu zorluğa da 'öz direnç' diyoruz. Tek bir iyon kanalından geçen iyon miktarı kanalın elektriksel iletkenlik durumuna bağlıdır. İyon kanallarının biyolojik yapıları birbirinden farklıdır. Bu yapısal farklılıklardan dolayı her bir iyon kanalının elektriksel iletkenlik özelliği kendine özgüdür. Genelde, iyon kanallarının iletkenliği, 2-500 pS (picosiemens), dirençleri ise 2-500 GΩ (gigaohm) aralığında değişir. İyon kanallarının açık olduğu durumlarda kanal iletkenliği yaklaşık olarak 10^7 - 10^8 iyon geçişini sağlar. [4, 34, 35]. İyon kanallarında meydana gelen yapısal ve işlevsel bozukluklar kanalların elektriksel iletkenliklerini değiştirir, dolayısıyla iletkenlikteki dramatik değişimler patolojiye işaret eder [36-40].

Bir iyon kanalının elektriksel iletkenliğini ölçmek için, önce hücre potansiyeli sabitlenir, bu sabit potansiyel altında geçen akımın en büyük genlik değeri dikkate alınır. Bu işlem sabit potansiyel değeri değiştirilerek tekrarlanır. Yani, hücreye uygulanacak bir voltaj-kenetleme protokolü ile akım değerleri kaydedilir. Elde edilen veriler kullanılarak akım (I) – voltaj (V) grafiği çizilir. Ohm yasasından faydalanarak, grafikte ortaya çıkan doğrunun eğiminde ($\sigma = \Delta I / \Delta V$) kanalın elektriksel iletkenlik değeri hesaplanır (Şekil 2.10).[5, 34, 41].



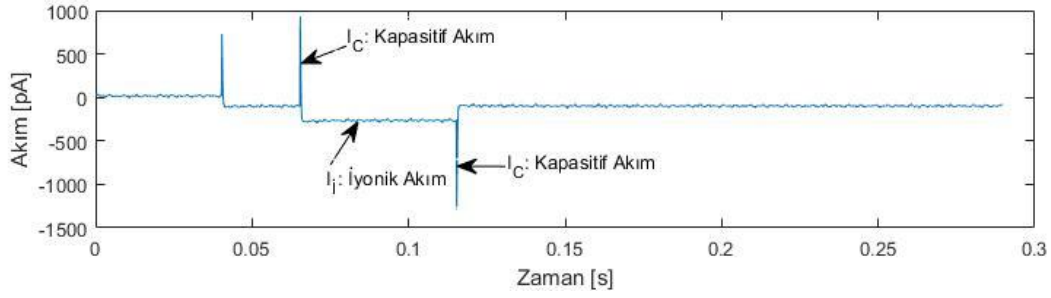
Şekil 2.10: Whole-Cell Patch Clamp yöntemi ile yapılan bir deneyde, -120 mV'dan +40 mV kadar voltaj-kenetleme protokolü uygulanıyor. Sol üst köşede bu kenetleme voltajları altında kaydedilen iyonik akımlarına $I(t)$ ilişkin zaman serileri görünüyor. Sol tarafta ise bu duruma ilişkin çizilmiş akım (I)-voltaj (V) grafiği.[5].

2.4. HÜCRE İYONİK AKIM SİNYALLERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Hücre membran akımı (I_M) iyonik (I_i) ve kapasitif (I_C) akımların toplamından oluşur.

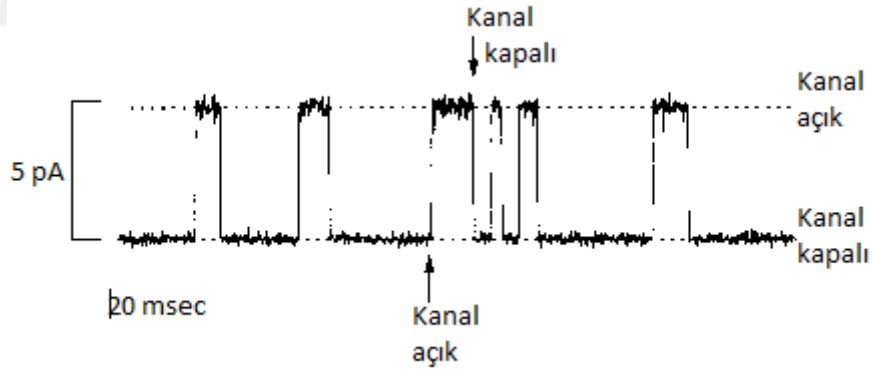
$$I_M = I_i + I_C \quad (2.1)$$

İyonik akım, hücre içi ve dışı arasında oluşan bir potansiyel fark altında, birim zaman aralığında membran yüzeyinden geçen iyon miktarıdır. Hücre membranın yalıtkan özelliğinden dolayı, membranın iç ve dış yüzeylerinde negatif ve pozitif iyon birikimi olur. Bu yapısından dolayı hücre membranı yük depolayan bir kondansatör görevi yapar. Bu depolanmış iyonlar çok kısa bir sürede boşalmak suretiyle kapasitif akımı meydana getirirler. Şekil 2.11'de Whole-Cell Patch Clamp yöntemi ile yapılan bir kayıta, iyonik akım ve kapasitif akım bileşenleri görülüyor. Geleneksel olarak iyonik akım değerinin negatif olması iyonların hücre içine doğru aktığını, akımın pozitif olması durumunda ise iyonların hücre dışına doğru aktığını gösterir.



Şekil 2.11: Whole-cell patch clamp yöntemi ile yapılan bir hücre membran akım kaydı [41].

Kapılı iyon kanallarının açık (A) ve kapalı (K) olmak üzere iki olanaklı durumları vardır. İyon kanalının kapısı kapalı durumda iken iyon geçişi olmaz, yani direnç sonsuzdur. İyon geçişi ancak kapının açılması ile sağlanır. Hücre kapılı iyon kanalları açma-kapama prensibi ile çalışır. İyon kanalı kapılarının hem ‘açık kalma’ hem de ‘kapalı kalma’ süreleri sürekli olarak birbirlerinden farklılık gösterir. Bu açıdan bir kapılı iyonik kanalda kaydedilen iyonik akım sinyalleri Şekil 2.12’de gösterildiği gibi aperiyoiktir. Sinyalin aperiyoikt olması, hücre iyonik akım sinyal analizlerinde nonlineer (doğrusal olmayan) yöntemlerin kullanılmasını gerektirir. Örneğin yöntem olarak, ‘Fourier Dönüşümü’ periyodik sinyallerin analizinde kullanılır iken, ‘Dalgacık Dönüşümü’ ise aperiyoikt sinyallerin analizinde kullanılır.



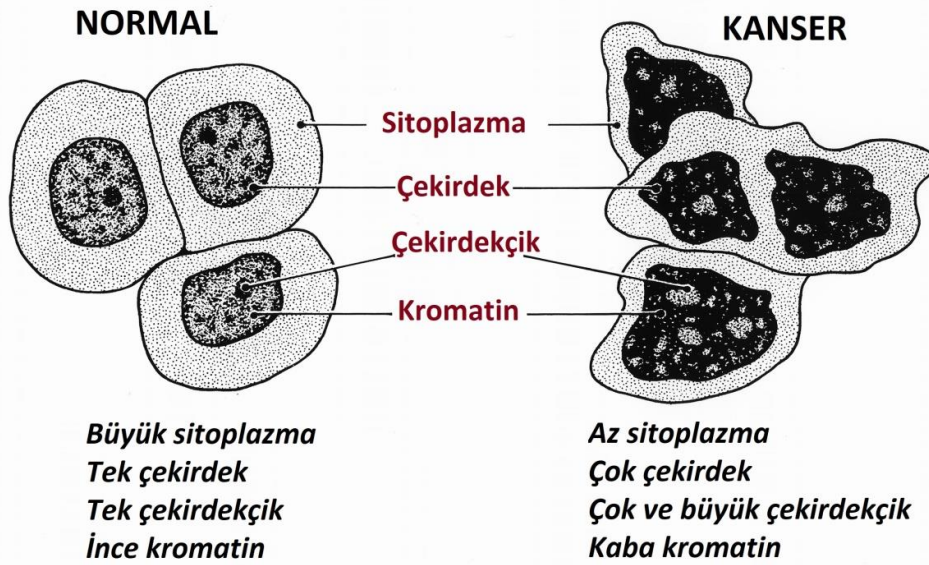
Şekil 2.12: Tek bir iyon kanalındaki iyonik akım sinyali [34].

2.5. KANSERLİ HÜCRELERİN ELEKTRİKSEL AKTİVİTESİ VE İYON KANALLARI

Bir organ veya dokudaki hücrelerin büyüme ve çoğalma durumları belli bir döngü (siklüsü) içinde gerçekleşir. Bu hücre siklüsü ise, hücre bölünmesi (mitoz) ve ara evre (interfaz) olarak iki ana bölüme ayrılır. Hücre siklüsü sürecinde hasar gören hücreler genellikle G0 fazına ayrıldıktan sonra apoptosis (programlı hücre ölümü) ile yok edilirler. Ancak, hücre DNA

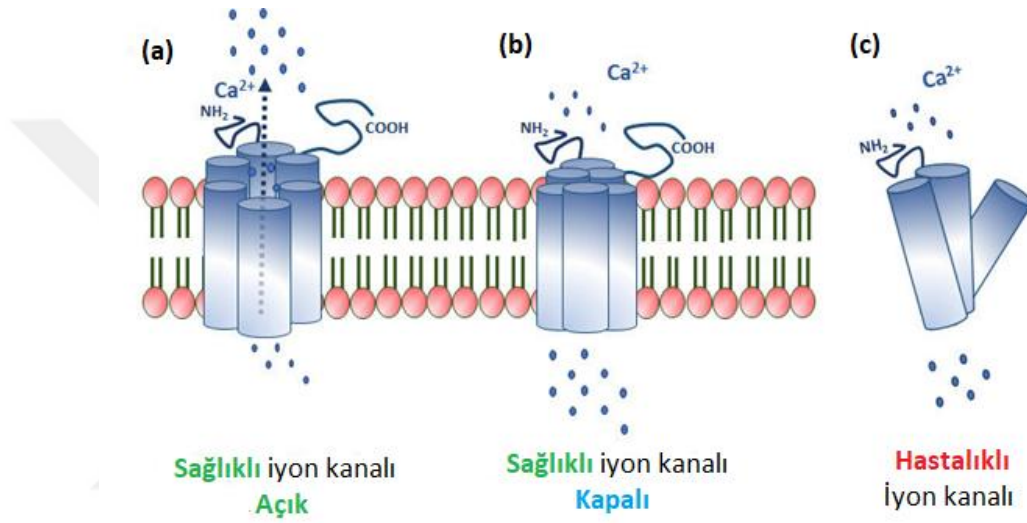
(Deoksiribo Nükleik Asit)'sında meydana gelen mutasyonlar sonucu bir hücre organizmanın denetiminden çıkıp bağımsız biçimde çoğalmaya başlayabilir. Transformasyon olarak tanımlanan bu olay, kanserin başlangıç noktasını oluşturur. Yani, DNA hasarı sonucu hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki denge bozulur. Kontrolsüz bir biçimde sürekli bölünüp çoğalan hücreler bulunduğu yerlerde tümörler oluştururlar ve sonradan besin ihtiyaçlarını karşılamak için normalde diğer hücreler için ayrılmış bölgeleri istila ederler ve orada koloniler (yeni tümörler) oluştururlar. İşte, vücudun diğer bölgelerine yayılarak metastaz oluşturan bu kötü huylu tümörlere 'kanser' diyoruz. Genel anlamda ise kanser ile oluşan 100'den fazla hastalık grubu vardır. [4, 10, 23, 42].

Kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla hem yapısal hem de işlevsel olarak farklı birçok özelliğe sahiptirler. Kanser hücreleri morfolojik olarak normal hücrelerden farklılaşırlar. Şekil 2.13'de görüldüğü gibi, normal hücreler büyük sitoplazma, tek çekirdek ve ince kromatin gibi özelliklere sahip iken, buna karşılık kanserli hücreler küçük sitoplazma, çok çekirdek ve kaba kromatine sahiptirler. Normal hücrelerin membranları birbirine temasa başladığında hücrelerin çoğalması durur. Buna karşılık kanserli hücrelerde temas durumundan bile hücrelerin çoğalması devam eder ve üst-üste tabakalar oluştururlar. Kanserli hücrelerde, glikoz taşınım ve tüketimi çok yüksektir. Diğer yandan kanser hücreleri minerallere, amino asitlere, vitaminlere, çeşitli besin ve faktörlerden oluşan bir ortama da gereksinim duymazlar. Kanserli hücreler normal hücrelere oranla daha uzun süre yaşarlar. [4, 10, 23, 42].



Şekil 2.13: Kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki farklar. <http://www.biyolojideferi.com/index.php/kontrolsuz-hucre-bolunmesi>

Kansere yol açan birçok sebep bulunmaktadır. Bu tezde kanserli hücrelerin elektriksel aktivitesini inceleyeceğiz. Hücrelerin elektriksel aktivitesi iyon kanalları aracılığı ile gerçekleşir. İyon kanallarının yapısal ve işlevsel bozuklukları hücrenin normal elektriksel aktivitesini değiştirir (Şekil 2.14), dolayısıyla hücrenin fizyolojik sisteminde değişikliklere yol açar. Yapılan çalışmalar, iyon kanallarının kanserler de dahil olmak üzere birçok hastalığın gelişiminde rol oynadığını gösterilmiştir [43]. Örneğin, kanser hücrelerinin büyümesi, çoğalması, göçü ve istilasında çeşitli iyon kanallarının rol oynadığını ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır [44-51].



Şekil 2.14: İyon kanalları; (a) Ca²⁺ iyonlarının akışına izin veren bir iyon kanalı açıktır, (b) İyonların akışını sınırlayan kapalı bir iyon kanalı, (c) Parçalanmış alt birimler nedeniyle membrana taşınmayan kesik (hastalıklı) bir iyon kanalı.[52].

İyon kanalları, geçit mekanizmalarına göre voltaj ve ligand kapılı olarak iki ana kategoriye ayrılabilir. Membran potansiyel değişiklikleri ile voltaj kapılı iyon kanalları açılıp kapanır. Ligand kapılı iyon kanalları ise, hücrenin içinde veya dışında ligand ismi verilen protein yapılı bir sinyal molekülün kanala yapışmasına yanıt olarak açılan ya da kapanan iyon kanallarıdır. Voltaj kapılı iyon kanalların seçiciliği yüksek iken, ligand kapılılar yüksek seçicilik olmadan katyonları veya anyonları ileten kanallardır.[44, 51].

Voltaj kapılı iyon kanalları uyarılabilir ve uyarılabilir olmayan hücrelerin çeşitli fizyolojik süreçlerinde önemli rollere sahiptirler. İyon seçiciliğine göre, voltaj kapılı potasyum, voltaj kapılı sodyum ve voltaj kapılı kalsiyum kanalları olarak üç ana tipe ayrılır. Bu iyon kanallarının yapısal ve işlevsel bozuklukları sonucu olarak kardiyak aritmiler, epilepsi, hiperkalemi ve bazı kalıtsal hastalıklar gibi bir dizi hastalıkların ortaya çıktığı bilinmektedir.

Ayrıca yapılan çalışmalarda, voltaj kapılı iyon kanallarının çeşitli kanser türlerinin başlangıcı, çoğalması, göçü ve hayatta kalmasında rol oynadığı gösterilmiştir. [45, 51].

Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları, nörotransmitter salınımı, nöronal uyarı, insülin salgılanması, kalp hızı, düz kas kasılması, epitelyal hücrelerde elektrolit transportu, hücre içi pH, sinyal iletimi, hücre döngüsü ve apoptozis gibi çok çeşitli süreçleri düzenleyen kanallardır. Ayrıca bazı çalışmalar, potasyum (K^{+1}) kanal bozukluklarının çeşitli kanserli hücrelerin oluşumunda ve göçünde yer aldıklarını göstermektedir. [53-54]. Kanser gelişimi ile ilişkili iyi çalışılmış voltaj kapılı potasyum kanallarından biri, insan eter-a-go-go potasyum (EAG1, KCNHI, Kv10.1) kanalıdır. Özellikle, EAG1'in hem hastalarda hem de hayvanlarda tümör gelişimi ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. [55-58].

Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları, hızlı sodyum (Na^{+1}) girişine izin vererek membran depolarizasyonu sağlayarak uyarılabilir dokularda aksiyon potansiyelini oluştururlar [59]. Ayrıca potasyum kanalları glia, fibroblastlar, endotel hücreleri ve T-lenfositler dahil olmak üzere uyarılmayan hücrelerin adezyonunda, göçünde ve çoğalmasında önemli roller oynarlar [60, 61]. Kanser metastaz aşamasında sodyum kanalların rolünü ortaya koyan bir dizi çalışmalar yapıldı [46, 62]. Örneğin, prostat kanseri [63, 64], meme kanseri [65, 66], lenfoma [67], küçük hücreli akciğer kanseri [68], küçük hücreli olmayan akciğer kanseri [69], mezotelyoma [70] ve rahim ağzı kanseri [71] dahil olmak üzere birkaç agresif karsinomda voltaj kapılı sodyum kanalların yüksek ekspresyon seviyeleri bulunmuştur. Bu nedenle, voltaj kapılı sodyum kanalları, metastatik kanserlerin tedavisinde önemli roller oynayabilir.

Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları, omurgalı ve omurgasız tüm kasların depolarizasyonunda sorumludurlar. Birçok kas, salgı hücresi ve sinir terminallerinde kalsiyum iyon (Ca^{+2}) konsantrasyonunu kontrol ederler. İkincil (sekonder) haberci oldukları için, kasların kasılmasında, endokrin hücre ve duyuşal nöronlardan transmitter salınımında rol oynarlar [72-74].

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları (Cav) bazı kanser hücrelerinde bulunurlar ve kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynarlar. Örneğin, insan prostat kanserinde T tipi Cav bulunmaktadır [75]. L-tipi kalsiyum kanalı alt birimi olan Cav 1.2 kolon kanseri hücrelerinde bulunmuştur [76]. Cav 1.2 ekspresyonu kolon hücrelerinin kanser hücrelerine farklılaşması ile artar. Küçük akciğer karsinomlarında P- ve L- tipi Cav bulunduğu gösterilmektedir [77].

Geçici Reseptör Potansiyeli (TRP) Kanalları, evrimsel olarak korunmuş bir integral membran protein sınıfından olan ligand kapılı iyon kanallarıdır. TRP kanalları, membran potansiyelini veya hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) konsantrasyonunu değiştirerek sinyal dönüştürücü görevi gören bir katyonik kanal sınıfıdır. TRP kanalları açıldığında, Ca^{+2} ve Na^{+1} iyonları hücre içine akar. Amino asit dizi homolojisine dayanarak, memeli TRP kanalları 7 alt aileye ayrılabilir. Bunlar TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP ve TRPV'dir. [78, 79].

Ca^{+2} hücre döngüsü ve proliferasyonu için temel bir düzenleyici olduğundan [80], TRP kanalları birçok fizyolojik süreçte önemli roller oynar. Ek olarak, tümör oluşumu ve metastaz dahil olmak üzere çeşitli patolojik süreçlerde yer aldıkları gösterilmiştir [81-83].

2.6. ENTROPİ VE CANLILIK

Entropi fiziksel bir kavramdır ve termodinamiğin ikinci yasası olarak bilinir. Evrende sistemler enerji kullanarak iş yaparlar. Sistemler kullandığı enerjinin tamamını işe dönüştüremezler. Ancak kullandığı enerjinin bir kısmını işe, geriye kalan büyük kısmını da ısı enerjisine dönüştürürler. Bu 'iş yapma yeteneği olmayan enerji' entropi olarak tanımlanır. Örneğin bir motoru çalıştırmak için enerji kaynağı olarak benzin kullanılır. Kullanılan enerjinin bir kısmı motoru çalıştırırken (yani mekanik iş yaparken), geriye kalan enerji de ısıya dönüşür. İşe dönüşmeyen (yani motorun çalıştırmasında kullanılmayan) bu 'ölü enerji' motor olarak ifade edilen sistemi nispeten bozar, yani sistemin düzensizliğini artırır. Başka bir ifadeyle, enerji-iş dönüşüm süreçlerinde ortaya çıkan 'ölü enerjinin' yol açtığı düzensizliklere entropi denir. Başka bir örnek üzerinde gidersek; buz, kristal bir kafes içinde birbirine bağlanmış su moleküllerinden oluşur. Buz dışarıdan ısı enerjisini aldıkça bu bağlar kopar ve serbest hale gelen bu su molekülleri rastgele hareket etmeye başlarlar. Dolayısıyla buz kristali ısındıkça düzensizliği yani entropisi de artmaya başlar. [84-88]

Bir sistemin toplam entropisindeki değişim miktarını (ΔS) ilk olarak matematiksel tanımını 1865 yılında Rudolf Clausius tarafından yapıldı.

$$\Delta S = \frac{\Delta Q}{T} \quad (2.2)$$

Burada, ΔQ sistemin ısı enerjisindeki değişim miktarıdır. T ise sistemin sıcaklığını gösterir.

Boltzmann, entropiyi sistemdeki mikro durumların olasılık dağılımı ile ilişkili olduğunu gösterdi. Boltzmann denklemi;

$$S = k_B \ln(W) \quad (2.3)$$

Burada, $k_B=1.38 \cdot 10^{-23} \text{J/K}$ 'dir, entropi ölçüm birimini temsil eder ve Boltzmann sabiti olarak bilinir. W bir sistemin durum sayısı veya mikro durum sayısını ifade eder. Boltzmann denklemi denge durumdaki bir sistemin maksimum entropisini ifade eder. Denge durumdaki bir sistemin mikro durumların bulunma (veya gerçekleşme) olasılıkları birbirine eşittir. Dolayısıyla bir sistemin i . mikro durumun olasılığı $p_i=1/W$ olarak yazılabilir. Bu ifade Boltzmann denklemine (2.3) yerleştirilirse;

$$S = k_B \ln\left(\frac{1}{p_i}\right) = -k_B \ln(p_i) = -k_B \langle \ln(p_i) \rangle \quad (2.4)$$

Dengede olmayan bir sistemin her mikro durumu farklı olasılıklara sahip olacağı için ortalama değeri veya beklenen değeri $\langle \ln(p_i) \rangle$ alınırsa;

$$\langle \ln(p_i) \rangle = \sum_{i=1}^W p_i \ln p_i \quad (2.5)$$

Bu ifade (2.5) denklem (2.4)'e yerleştirilirse; kesikli rastgele değişkenler için Boltzmann–Gibbs–Shannon (BGS) entropisi (2.6) elde edilir [87];

$$S_{BGS}(p) = -k \sum_{i=1}^W p_i \ln p_i \quad (2.6)$$

Burada $k_B=k$ olarak yazıldı. Çünkü bilgi teorisinde $k=1$ olarak alınır. Fizikte entropi bir sistemin düzensizliğinin veya rastgeleliğinin bir ölçüsü iken; bilgi teorisinde entropi belirsizliğin bir ölçütü olarak kullanılır [86-88].

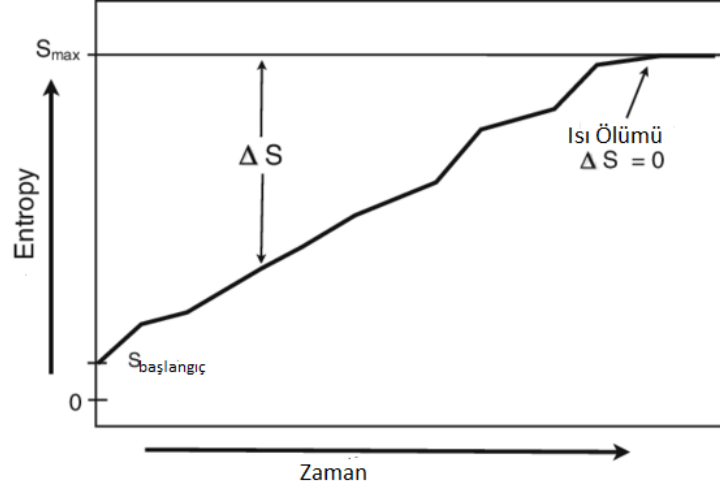
Örnek olarak; hücre membran içi ve dışındaki sodyum iyon (Na^+) konsantrasyonları için BGS entropisi hesaplanırsın. Burada hücre membran içi ve dışı olmak üzere iki durum sayısı ($W=2$) vardır. Hücre içi ve dışında toplamda 10 Na^+ olsun. Varsayalım dengesiz bir durumda hücre membran dışında 7 Na^+ , hücre membran içinde ise 3 Na^+ bulunsun. Hücre membran içi ve dışı Na^+ iyonların bulunma olasılıkları sırasıyla $p_1 = p_{dış} = 7/10$ ve $p_2 = p_{iç} = 3/10$ olur. Bu dengesiz durum için BGS entropisi hesaplanırsa;

$$S^1_{BGS}(p) = -\sum_{i=1}^2 p_i \ln p_i = -\frac{7}{10} \ln \frac{7}{10} - \frac{3}{10} \ln \frac{3}{10} = 0,610 \quad (2.7)$$

Hücre membran içi ve dışında Na^+ iyon konsantrasyonları birbirine eşit olur ise, hücre içi ve hücre dışı Na^+ iyonların bulunma olasılıkları da eşit olur; $p_1 = p_{dış} = p_2 = p_{iç} = 5/10 = 1/2$ olur. Bu denge durum için BGS entropisi hesaplanırsa;

$$S^2_{BGS}(p) = -\sum_{i=1}^2 p_i \ln p_i = -\frac{1}{2} \ln \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \ln \frac{1}{2} = 0,693 \quad (2.8)$$

Burada dengeli durumunda hesaplanan entropi dengesiz durumundakinden büyüktür, $S^2_{BGS}(p) > S^1_{BGS}(p)$. Bu beklenen bir durumdur, çünkü denge durumunda entropi maksimumdur.



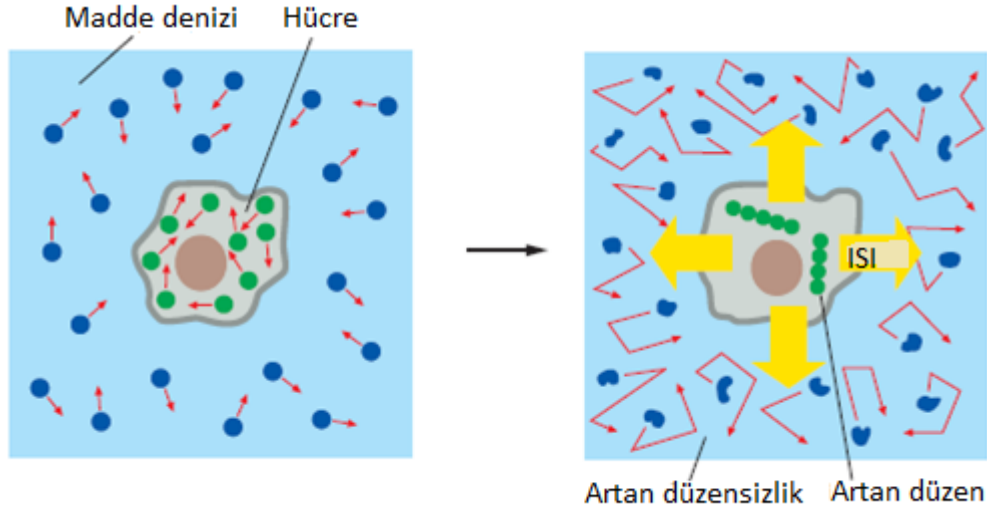
Şekil 2.15: Zamanın bir fonksiyonu olarak entropi. Sistem dengeye ulaştığından entropi maksimum (S_{max}) olur, artık entropi değişimi ($\Delta S=0$) yaşanmaz. [89].

2.6.1. Hücrenin Entropisi

Nobel ödüllü Avusturyalı fizikçi Erwin Schrödinger 1944'de 'What is Life (Hayat Nedir)?' isiminde yayınladığı kitabında canlı organizmalarda entropi yasasının nasıl işlediği üzerinde duruyordu. Canlı hücreler büyüyerek ve karmaşık organizmalar oluşturarak düzen oluşturuyor ve bu nedenle termodinamiğin ikinci yasasına meydan okuyor gibi görünebilir. Bu nasıl mümkün olabilir? Erwin Schrödinger göre; kapalı bir sisteme dışarıdan enerji verilmediği sürece entropi sürekli artar veya sabit kalabilir, ancak hücreler açık sistemlerdir ve çevresinde besin şeklinde veya güneşten fotonlar olarak enerji alırlar. Daha sonra bu enerjiyi kendi içinde düzen oluşturmak için kullanırlar. Canlı organizmaların entropisi çevresine göre daha düşüktür ve hayatta kalabilmek için dışarıdan enerji kullanarak düşük entropi durumlarını korurlar. Çünkü entropisi yüksek bir denge durumunda yaşamın ortaya çıkması ve canlı organizmaların yaşamlarını sürdürmeleri mümkün değildir. [90, 91].

Şekil 2.16'de evrenin geri kalanını temsil eden bir madde denizi ile çevrili bir hücre tasvir edilmiştir. Hücre yaşayıp büyüdükçe iç düzeni oluşturur. Ancak molekülleri sentezlerken ve onları hücre yapılarında birleştirirken sürekli olarak ısı enerjisi yayar. Isı, en düzensiz haliyle, moleküllerin rastgele itişip kakıştığını sağlayan enerjidir. Hücre madde denize ısı verdiğinde,

oradaki moleküler hareketlerini arttırırlar, böylece madde denizin rastgeleliğini veya düzensizliğini arttırır. Sonuç olarak, hücrenin entropisi azalırken buna karşılık madde denizi olarak ifade ettiğimiz çevrenin entropisi de artar. Hücre ve çevrede oluşan evrenin entropisi toplamda artacağı için termodinamiğin ikinci yasasının gerektirdiği gibi işler.[4].



Şekil 2.16: Canlı bir hücrenin basit bir termodinamik analizi. Soldaki diyagramda hem hücrenin hem de evrenin geri kalanının (madde denizi) molekülleri nispeten düzensiz bir halde gösterilmiştir. Sağdaki şemada hücre, besin moleküllerinden enerji almış ve hücrenin içerdiği molekülleri düzenleyen reaksiyonlarla ısı açığa çıkarmıştır. Serbest bırakılan ısı, hücrenin etrafındaki ortamdaki düzensizliği arttırır (pürüzlü oklar ve çarpık moleküller ile gösterilir, ısının neden olduğu artan moleküler hareketlere işaret eder). Sonuç olarak, termodinamiğin, evrendeki düzensizlik miktarının her zaman artması gerektiğini söyleyen ikinci yasası, hücre büyüdükçe ve bölündükçe yerine getirilir. [4].

2.7. BİYOLOJİK SİSTEMLER İÇİN DOĞRUSAL OLMAYAN ANALİZ YÖNTEMLERİ

Dinamik sistemleri lineer (doğrusal) ve nonlinear (doğrusal olmayan) sistemler olarak ikiye ayrılabilir. Bir sisteme uygulanan herhangi bir etki sistem üzerinde düzenli değişimlere yol açıyor ise sistem lineerdir (doğrusaldır); eğer bu etkilere karşı sistemdeki değişimler düzensizlik gösteriyor ise sistem nonlineerdir (doğrusal değildir). Özellikle 1980'lerden sonra, doğrusal olmayan dinamik sistemleri düzenli sistemlere indirgmeden, sistemi olduğu gibi çözmek amacıyla yeni birçok yöntemler ileri sürüldü ve bu yöntemler giderek artmaktadır. Biz bu yeni paradigmaya 'doğrusal olmayan bilim (nonlinear science)' diyoruz. Doğrusal olmayan yöntemler çok çeşitlidir, ama bunları 'Modelleme Yöntemleri [92]' (Dynamical systems modeling, Computational modeling, Agent based modeling, Network modeling, vb.) ve 'Zaman Serisi Analiz Yöntemleri [93, 94]' (Phase space reconstruction, Recurrence

quantification analysis, Fractal and multifractal methods, Lyapunov exponent, Entropy. vb) olarak iki ana başlık altında toplayabiliriz. [95].

Biyolojik sistemler açık sistemlerdir, yani çevresiyle sürekli olarak bir iletişim halindedir. Ancak fiziksel bir sistem gibi yalıtılıp üzerinde deney yapılamaz. Örneğin fiziksel bir sistemde, bir kabın içindeki gazın hacmini sabit tutarak sıcaklığa bağlı olarak gaz moleküllerin hareketleri incelenebilir. Bu indirgemeci yaklaşım biyolojik sistemlere uygulanamaz. Çünkü biyolojik sistemlerin karmaşık yapılarından dolayı bir parametrenin değişimi bile sistemde öngörülemez davranışlara yol açabilir. Günümüzde, teknik cihazlar ile biyolojik sistemlerden her türlü kayıt alınabilir. Bu kayıtların doğrusal olmayan analizi bilgisayar aracı ile yapılıyor. Bundan dolayı, doğrusal olmayan yöntemler ile biyolojik sistemleri analiz etmek giderek daha fazla kabul görmektedir [96-100].

Biyofizik, en basit ifade ile fiziksel ilke ve yöntemlerin biyolojik sistemlere uygulandığı bir bilim alanıdır. İndirgemeci düşünme tarzı ile biyofizik alanında da birçok gelişmeler sağlandı. Genelde biyolojik sistemlerin analizinde 'doğrusal istatistiksel yöntemler' yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik sistemlerden elde edilen verilerin Gauss normal dağılımına uyduğu varsayılarak özet istatistikler (ortalama, varyans, doğrusal kovaryans ilişkileri, frekans bileşenleri) kullanılmaktadır. Yani zamansal değişimleri göz ardı ederek, elde edilen ortalama değerler üzerinde karşılaştırmalar yapılır. Ancak, biyolojik sistemler Gauss normal dağılımdan ziyade 'q- Gauss dağılım istatistiğine [101, 102]' sahipler. Bundan dolayı, biyoloji gibi karmaşık sistemlerin dinamiğini ve iç süreçlerdeki değişimleri analiz etmek için doğrusal olmayan yöntemler kullanılmalıdır veya buna dönük yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekir.

3. YÖNTEM

Bu bölümde, Whole-Cell Patch Clamp tekniği ile kaydedilen hücre membran akım sinyallerin analizinde kullanılacak ‘doğrusal olmayan analiz yöntemleri’ tanıtılacaktır. Dalgacık dönüşümüne dayalı olarak geliştirilen ‘skalogram entropi’, ‘pencereli skalogram entropi (windowed scalogram entropy)’ ve ‘pencereli ölçek indeksi (windowed scale index)’ ile ‘sample (örnek) entropi’ ve ‘Lyapunov üstelleri’ yöntemleri ele alınacaktır. Ayrıca, 'Patch Clamp Deney Protokolü' de anlatılacaktır.

3.1. DALGACIK DÖNÜŞÜMÜN TEMEL KAVRAMLARI

Dalgacık dönüşümü hem periyodik (durağan) hem de aperiodyk (durağan olmayan) sinyallerin analizinde kullanılan doğrusal olmayan (nonlinear) bir yöntemdir [103]. Buna karşılık, Fourier dönüşümü sadece durağan yani periyodik sinyallerin analizinde kullanılan doğrusal (linear) bir yöntemdir.

Bir dalgacık fonksiyonu ψ sembolü ile gösterilir. ψ 'nin dalgacık fonksiyonu olması için, $L^2(\mathbb{R})$ uzayında dalgacık fonksiyonun ortalaması sıfır ($\int_{-\infty}^{+\infty} \psi(t) dt = 0$) ve normalizasyonu ise bire ($\|\psi\| = 1$) eşit olmalıdır. Dalgacık fonksiyonu aşağıdaki gibi yazılabilir [103, 104];

$$\psi_{j,k}(t) = \frac{1}{\sqrt{2^j}} \psi\left(\frac{t-2^j k}{2^j}\right) \quad (3.1)$$

Burada $j, k \in \mathbb{Z}$. (3.1) ifadeyi s ile ölçeklendirip u parametresi ile dönüştürerek bir zaman – frekans atomları sözlüğü elde edilir:

$$\psi_{u,s}(t) = \frac{1}{\sqrt{s}} \psi\left(\frac{t-u}{s}\right), \quad u \in \mathbb{R}, s > 0 \quad (3.2)$$

Bu zaman–frekans atomların normalizasyonu bire eşit olur, $\|\psi_{u,s}\| = 1$. Burada s genişletip daraltılabilen bir ölçeklendirme parametresidir. Yüksek frekansların incelemesinde s parametresi küçültülür, düşük frekanslarda ise s parametresi büyütülür. u zaman öteleme parametresidir, zaman boyunca dalgacık penceresinin yerini gösterir.

$f(t) \in L^2(\mathbb{R})$ olan bir sinyal veya bir zaman serisini temsil etsin. Verilen zaman ve ölçekte $f(t)$ sinyalin sürekli dalgacık dönüşümü (continuous wavelet transform: CWT) alınır;

$$Wf(u, s) = \langle f, \psi_{u,s} \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \psi_{u,s}^*(t) dt \quad (3.3)$$

Denklem (3.3) ifadesi s ölçeğine ve u zaman konumuna karşılık gelen $f(t)$ sinyalin frekans ayrıntılarını verir. Skalogram ise bir sinyalin s ölçeğinde elde edilen sürekli dalgacık dönüşümün enerjisini ifade eder. Ölçeğe bağlı olarak $f(t)$ sinyalin skalogramı aşağıdaki gibi tanımlanır [103, 104];

$$S(s) = \|Wf(u, s)\| = \left(\int_{-\infty}^{+\infty} |Wf(u, s)|^2 du \right)^{1/2} \quad (3.4)$$

Pratik uygulamada, $I = [a; b]$ gibi belirli bir zaman aralığında sınırlandırılmış bir f sinyalin skalogramı (3.4) 'inner skalogram' olarak yeniden tanımlanırsa;

$$S^{inner}(s) = \|Wf(u, s)\|_{J(s)} = \left(\int_{c(s)}^{d(s)} |Wf(u, s)|^2 du \right)^{1/2} \quad (3.5)$$

Burada, dalgacık fonksiyonu $\psi_{u,s}$ tüm $u \in J(s)$ 'leri desteklediği için, I 'daki maksimum alt aralık $J(s) = [c(s), d(s)] \subseteq I$ ile temsil edilir. $J(s)$ fonksiyonunun çok küçük veya boş olmaması için I zaman aralığı yeterince büyük olmalıdır, yani $b - a \gg sl$, burada l , ψ 'nin desteğinin uzunluğudur. [104].

3.2. DALGACIK DÖNÜŞÜMÜNE DAYALI ENTROPİ HESAPLAMA TEKNİĞİ

Entropi, sistemler için belirli bir sıcaklıktaki enerji dağılımlarının istatistiksel bir ölçüsünü verir. Bu nedenle, entropi ölçülerinin hesaplanmasının ana konsepti (2.6) olasılık dağılımına dayanmaktadır. Bir entropi ölçüsünün performansı, dinamik sistemlerin ölçülebilir süreçlerinde elde edilen zaman serilerinin olasılık dağılımının doğru çıkartılmasına bağlıdır [105]. Inner skalogram (3.5), tüm ölçeklerin (veya frekansların) sinyalin toplam enerjisine katkılarını tespit eder [104]. Buna dayanarak zaman serilerin olasılık dağılımları doğru bir şekilde elde edilebilir.

3.2.1. Skalogram Entropi

Skalogram Entropi [106] ile bir zaman serisinin *ortalama entropi* değeri hesaplanır. Burada önce inner skalogramı (3.5) normalize edilir. Çünkü inner skalogram zamana bağlı olarak tüm ölçeklerde (veya frekanslarda) sinyalin toplam enerjisine katkılarını tespit eder. Bundan dolayı, ölçekleri karşılaştırabilmek için zaman üzerinde ölçeklerin normalizasyonu yapılır. Böylelikle ölçeklerin zaman bilgisi ortadan kalkar. [104].

$$\bar{S}^{inner}(s) = \frac{S^{inner}(s)}{(d(s)-c(s))^{\frac{1}{2}}} \quad (3.6)$$

Sinyalin farklı ölçeklerdeki ortalama enerji yoğunlukları, normalize edilmiş inner skalogram (3.6) ile hesaplanır. Böylelikle, tüm s değerleri için enerji dağılımı elde edilir. Bu nedenle, $[s_0, s_1]$ ayrık ölçek aralığında bir f sinyalinin (veya zaman serisinin) normalize edilmiş inner skalogramının olasılık dağılımı şu şekilde tanımlanabilir [106]:

$$p_i = p_s = \frac{\bar{S}^{inner}(s)}{\sum_{s=s_0}^{s_1} \bar{S}^{inner}(s)} \quad (3.7)$$

Yani olasılık dağılımı, her bir $\bar{S}^{inner}(s)$ 'yi toplam enerjiye bölerek elde edilir. Bu olasılık dağılımların toplamı bire eşit olur.

$$\sum_{s=s_0}^{s_1} p_s = 1 \quad (3.8)$$

BGS entropisi (2.6), denklem (3.7)'daki olasılık dağılımı ile hesaplanır, aynı zamanda ayrık BGS entropisi şu şekilde de tanımlanabilir [106]:

$$S_{BGS}(p) = -k \sum_{s=s_0}^{s_1} p_s \ln p_s \quad (3.9)$$

3.2.2. Pencereli Skalogram Entropi

Normalize edilmiş inner skalogram kullanılarak hesaplanan BGS entropisi (3.9) yalnızca tüm zaman serisinin ortalama entropi değerini verir [106]. Ancak, doğrusal olmayan dinamik süreçler, davranışlarının önemli ölçüde değiştiği farklı aşamalardan geçebilir ve bu nedenle entropileri zaman içinde sabit olmayabilir. Bu durumlar için, davranışları zamanla önemli ölçüde değişen bir zaman serisinin entropisindeki zamansal değişimlerini ölçmek için ‘pencereli skalogram entropi (windowed scalogram entropy)’[6] yöntemi kullanılır. Bu yöntem pencereli skalograma (windowed scalogram) [107] dayalıdır.

Denklem (3.4)'den, $[t_0, t_1]$ gibi özel bir zaman aralığı için pencereli skalogram [107] aşağıdaki gibi tanımlanabilir;

$$S_{[t_0, t_1]}(s) = \left(\int_{t_0}^{t_1} |Wf(u, s)|^2 du \right)^{1/2} \quad (3.10)$$

Burada, $\tau = t_1 - t_0$, zaman yarıçapı olarak tanımlanır. τ zaman yarıçapı ile t zamanında merkezlenmiş bir f zaman serisinin pencereli skalogramı aşağıdaki gibi tanımlanır [8, 107];

$$WS_{\tau}(t, s) = \left(\int_{t-\tau}^{t+\tau} |Wf(u, s)|^2 du \right)^{1/2} \quad (3.11)$$

Pencereli skalogram (3.11) sadece $[t - \tau, t + \tau]$ sonlu bir zaman aralığı ile sınırlandırılmış olan skalogram (3.4)'dür. Diğer bir ifadeyle, verilen ölçekler için bir sinyalin 'normalize edilmiş pencereli skalogramlarını' ifade eder. Teknik olarak, önce τ zaman yarıçapı ile merkezleşmiş zaman penceresi belirlenir, sonra Δt kadar zamanı artışları ile elde edilmiş zaman pencereleri kullanarak pencereli skalogram (3.11) hesaplanır. [8, 107].

Denklem (3.11)'de, her ölçekte (s) ve her zaman (t) penceresinde ele edilen $WS_{\tau}(t, s)$ 'nin ayrık çözümleri bir matrisi oluşturur. t pencereleri merkezleyerek $WS_{\tau}(t, s)$ hesaplanmasında kullanılan merkezi zaman vektörüdür. s ölçeklerin vektörüdür. τ pencereler için zaman yarıçapıdır.

Normalize edilmiş pencereli skalogram, her bir zaman penceresi için zaman serisinin frekans bileşenlerine karşılık gelen tüm ölçeklerin enerji dağılımını verir. Buna göre, $[s_0, s_1]$ ölçek aralığında bir f zaman serisinin enerji dağılımlarının olasılıkları aşağıdaki gibi tanımlanabilir [6];

$$p_{s,\tau}(t) = \frac{WS_{\tau}(t,s)}{\sum_{s_0}^{s_1} WS_{\tau}(t,s)} \quad (3.12)$$

Burada, bir zaman penceresi için her ölçekteki olasılık dağılımı (3.12), $WS_{\tau}(t, s)$ 'nin zaman penceresinin toplam enerjisine bölünmesiyle elde edilir. Bir zaman penceresindeki (3.12) olasılık dağılımların toplamı bire eşit olmalıdır.

$$\sum_{s_0}^{s_1} p_{s,\tau}(t) = 1 \quad (3.13)$$

Denklem (2.6) ve denklem (3.12)'den hareketle, her zaman penceresi için BGS entropisi aşağıdaki gibi tanımlanabilir [6].

$$WS(p)_{BGS} = -k \sum_{s_0}^{s_1} p_{s,\tau}(t) \ln p_{s,\tau}(t) \quad (3.14)$$

Bir dinamik sisteme ait zamana bağlı entropi değişimlerini bu yöntem (3.14) ile ölçülebilir.

3.2.3. Pencereli Ölçek İndeksi

Pencereli ölçek indeksi [8], zamana bağlı olarak bir sinyalin aperiodyk durumunu $[0,1]$ aralığında derecelendirir. Buna göre periyodik sinyallerin ölçek indeksi sıfıra çok yakın olur, ölçek indeksi sıfırdan uzaklaştıkça sinyalin aperiodyk derecesi artar. Pencereli ölçek indeksi pencereli skalograma (3.11) dayalı geliştirilen bir yöntemdir.

τ zaman yarıçapı ile t zamanda merkezlenmiş ve $[s_0, s_1]$ ölçek aralığındaki bir zaman serisinin *pencereli ölçek indeksi* aşağıdaki gibi tanımlanır [8];

$$wi_{scale,\tau}(t) = \frac{WS_{\tau}(t,s_{min})}{WS_{\tau}(t,s_{max})} \quad (3.15)$$

Burada, tüm $s \in [s_0, s_1]$ için $WS_{\tau}(t,s) \leq WS_{\tau}(t,s_{max})$ olacak şekilde s_{max} en küçük ölçektir. Tüm $s \in [s_{max}, 2s_1]$ için $WS_{\tau}(t,s_{min}) \leq WS_{\tau}(t,s)$ koşulunu sağlayacak şekilde s_{min} en küçük ölçektir. Pencereli ölçek indeksi 0 ile 1 arasında değişir. Ve τ zaman yarıçapı ile belirli bir t zamanının komşuluğundaki sinyalin aperiyoidikliği hakkında bilgi sağlar [8].

3.3. SAMPLE (ÖRNEK) ENTROPİ

JS Richman ve JR Moorman ‘yaklaşık entropi (approximate entropy)’ yönteminin yetersizliklerini gidermek amacıyla ‘örnek entropi (sample entropy)’ yöntemini önerdiler [7]. Sample Entropi (SampEn), canlı organizmaların ölçülebilir süreçlerde kaydedilen fizyolojik zaman serilerinin karmaşıklığı ve düzensizliği nicel olarak ölçmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir [108, 109]. İstatistik olarak $SampEn(m,r,N)$ üç parametreye bağlıdır. Burada, m karşılaştırılan her veri bölümünün uzunluğudur, r benzerlik ölçüsüdür ve N verilerin tam uzunluğudur. SampEn, m noktaya yakın aynı uzunlukta A ve B gibi iki veri noktası kümesinin koşullu olasılığın negatif doğal logaritması olarak tanımlanır. Bundan dolayı, SampEn, zaman serilerindeki öz-benzerlik düzeyini ölçer. SampEn, çoğunlukla veri uzunluğundan etkilenmez ve EEG (Elektroensefalografi) gibi durağan olmayan zaman serilerinde etkilidir [7].

SampEn hesaplaması için, birbiriyle eşleşen r toleransı içindeki nokta dizileri hiçbir eşleşme elde edilemeden gerçekleştirilir. Aynı zamanda, m 'den r 'ye kadar tüm uzunluklar için şablon eşleşmelerinin sayısı A ve B'ye kaydedilir. SampEn aşağıdaki gibi formüle edilir:

$$SampEn(m,r,N) = -\ln\left(\frac{A}{B}\right) \quad (3.16)$$

Burada, m yerleştirme boyutudur; r toleransı yani benzerlik ölçüsü genelde zaman serisinin standart sapmasını (std) 0.2 ile çapılarak bulunur, $0.2*std$. N ise zaman serisinin veri sayısıdır A ve B şu şekilde ifade edilir;

$$A = \left\{ \frac{(N-m-1)(N-m)}{2} \right\} A^m(r), \quad B = \left\{ \frac{(N-m-1)(N-m)}{2} \right\} B^m(r) \quad (3.17)$$

Burada, $A^m(r)$ $m+1$ nokta verileri için iki dizinin eşleşme olasılığını temsil eder. $B^m(r)$ ise m nokta için iki diziyi eşleştirme olasılığını temsil eder.

3.4. EN BÜYÜK LYAPUNOV ÜSTELLERİ

Lyapunov üstelleri teknik olarak, bir sistemin faz uzayında başlangıçta sonsuz derecede yakın olan yörüngelerin zamanla birbirlerinden ayrılma oranını (veya uzaklaşma hızını) ölçer. Bu aynı zamanda, kaotik sistemlerin en temel özelliği olan ‘başlangıç koşullarına olan duyarlılığın’ matematiksel bir ölçüsüdür. En büyük Lyapunov üstelli ($\lambda > 0$) sıfırdan büyükse dinamik sistem kaotik özelliğe sahiptir, yani süreç içinde sistemin davranışlarını önceden tahmin etmek çok zordur. En büyük Lyapunov üstelli ($\lambda < 0$) sıfırdan küçük ise sistem periyodiktir, yani doğrusal bir sistemdir ve sistemin davranışları önceden tahmin edilir. Eğer en büyük Lyapunov üstelli ($\lambda \approx 0$) sıfıra çok yakın ise dinamik sistem ‘kaos sırtı’ aşamasındadır, yani periyodik durumdan kaotik duruma geçiş aşamasındadır.[110, 111].

Deneysel olarak dinamik sistemlerin ölçülebilir süreçlerinde kaydedilmiş ayrık zaman serilerinin ($X_i, i = 0, 1, 2, \dots, n$) ‘En Büyük Lyapunov Üstellini’ hesaplamak için genelde ‘Wolf Algoritması [9]’ kullanılır. Burada, faz uzayı yeniden oluşturma tekniği kullanarak ayrık ölçümlerden elde edilen birinci derece türevlerin mutlak değerlerinin doğal logaritmlarının ortalaması alınarak ‘en büyük Lyapunov üstelli’ hesaplanır. Matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilir;

$$\lambda = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \sum_{i=0}^{n-1} \ln |f'(X_n)| \quad (3.18)$$

3.5. PATCH CLAMP DENEY PROTOKOLÜ

3.5.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, deneylerde kullanılmak üzere laboratuvar (invitro) ortamından hazırlanan özel koşullar altında primer kültürler veya hücre hatları tekniğini kullanarak hücrelerin yetiştirilmesi olayıdır. Bu çalışmada kullanılan hücre hatları ticari olarak satın alındı. Bu nedenle çalışmak için etik kurul iznine gerek duyulmadı. Tümör hücresi olarak insan Meme Kanseri Hücre Hattı (MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7) ve normal hücre olarak da insan Retinal Pigment Epitelyum (ARPE-19) hücre hattı kullanıldı.

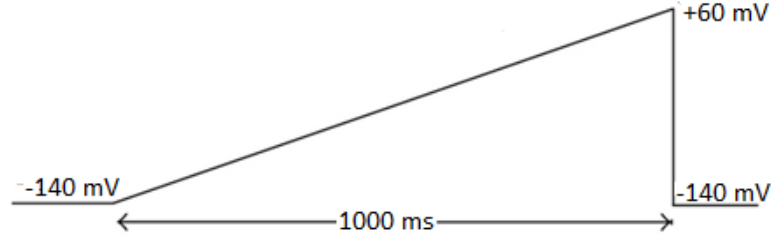
MCF-7 üzerinde ilaç uygulanması yapılmadı. Normal ARPE-19 hücre hattı üzerinde SiO_2 nano parçacıkları uygulandı. Ticari olarak satın alınan SiO_2 nano parçacıkları (Sigma Aldrich,

katalog no: 637246, S Louis, MO, ABD) üreticinin katalog bilgisine göre %99,5 saflıkta ve toz halindeydi. Paçacıkların yüzey alanları $590-690 \text{ m}^2/\text{g}$, boyutları ise 5-15 nm aralığındaydı. [112]. Bu çalışmada, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre SiO_2 nano parçacıklarının konsantrasyonu 50 ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlendi.

3.5.2. Patch Clamp Kaydı

MCF-7 hücre zarı üzerindeki sadece tüm EAG1 (ether-à-go-go 1) potasyum iyon kanallarından geçen akımları kaydetmek için ‘whole cell patch-clamp’ tekniği kullanıldı [113]. Hücrelerden iyon akım sinyallerini sağlıklı bir biçimde kaydetmek için 144 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES ve 5.6 mM D-glukoz oluşan bir banyo çözeltisi hazırlandı. 5 mM NaCl, 145 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 ve 10 mM HEPES ile hazırlanan çözelti ise cam pipetlerin içine dolduruldu. Hücrenin ve EAG1 potasyum iyon kanalının iletkenlik karakterinden dolayı ‘kenetleme protokolü (Şekil 2.10)’ uygulandı [5, 23]. Protokolde başlangıç potansiyeli -175 mV olarak seçildi, belirli bir süre içinde belirlenen potansiyel altında akım kaydı alındıktan sonra potansiyel değeri artırarak +95 mV ulaşana kadar işlemler 13 defa tekrarlandı. Burada sadece 1-10 G Ω aralığında mühürleme direncine sahip hücrelerden alınan kayıtları değerlendirmeye alındı.

ARPE-19 hücre zarı üzerindeki tüm TRP (Transient Receptor Potential) iyon kanallarının akımlarını kaydetmek için de ‘whole cell patch-clamp’ tekniği kullanıldı [113]. Hücrelerden iyon akım sinyallerini sağlıklı bir biçimde kaydetmek için 130 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 5 mM CsCl, 2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES ve 5 mM glukozdan oluşan bir banyo çözeltisi hazırlandı, (Çözeltinin pH'ı NaOH ile 7.3'e ayarlandı). 140 mM CsCl, 2.5 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , ve 10 mM HEPES ile hazırlanan çözelti ise cam pipetlerin içine dolduruldu, (Çözeltinin pH'ı CsOH ile 7.3'e ayarlandı). Hücrenin ve TRP iyon kanalının iletkenlik karakterinden dolayı ‘rampa potansiyel protokolü’ uygulandı [114]. Rampa potansiyeli protokolü, eş zamanlı aralıklar ile voltaj değerini değiştirerek hücrenin uyarılması durumudur. Burada da hücre ve pipet arasında 1-10 G Ω sızdırmazlık direnci elde edildikten sonra, membran potansiyeli -40 mV'a kenetlendi. Şekil 3.1’de gösterildiği gibi, 1000 ms'lik süresi içinde, çok küçük zaman aralığında düzenli olarak artan rampa potansiyeli -140 mV'dan +60 mV'a kadar yükselttilerek akım kaydı yapıldı. Bu işlemler ARPE-19 hücre hattına uygulanan SiO_2 nano parçacıklarının 50 ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonları için de tekrarlandı.



Şekil 3.1: 1000 ms boyunca -140 mV'dan +60 mV'a kadar yükseltile rampa potansiyelin şematik şekli.

Kullandığımız hücre membran akım kayıtları Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarından yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Hücre membran akım kayıtların alındığı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarı ve patch-clamp kayıt teknik ekipmanları

4. BULGULAR

Bu çalışmada kullanılan, tümör hücresi olarak 5 tane MCF-7, kontrol grubu için 3 tane normal ARPE-19 ve SiO₂ nano parçacıklarının uygulandığı 4 tane ARPE-19 hücrelerin kayıt numaraları Tablo 4.1’de gösterildi.

Tablo 4.1: MCF-7’deki EAG1 potasyum ve ARPE-19’daki TRP iyon akım sinyallerin kayıt numaraları

Hücre Grupları ve Sayısı	Kayıt No	Kayıt Protokolü	Kayıt Tekniği
MCF-7 Hücreleri	22122004	Voltaj-kenetleme protokolü [-175 mV, +95 mV]	Whole Cell Patch-Clamp
	22122005		
	22122006		
	22122008		
	22122009		
Kontrol Grubu ARPE-19	208070040	Rampa voltaj protokolü [-140 mV, +60 mV]	
	208070160		
	208110680		
50 µg/mL SiO ₂ ARPE-19	208121090		
	208123630		
100 µg/mL SiO ₂ ARPE-19	208120110		
	208120350		

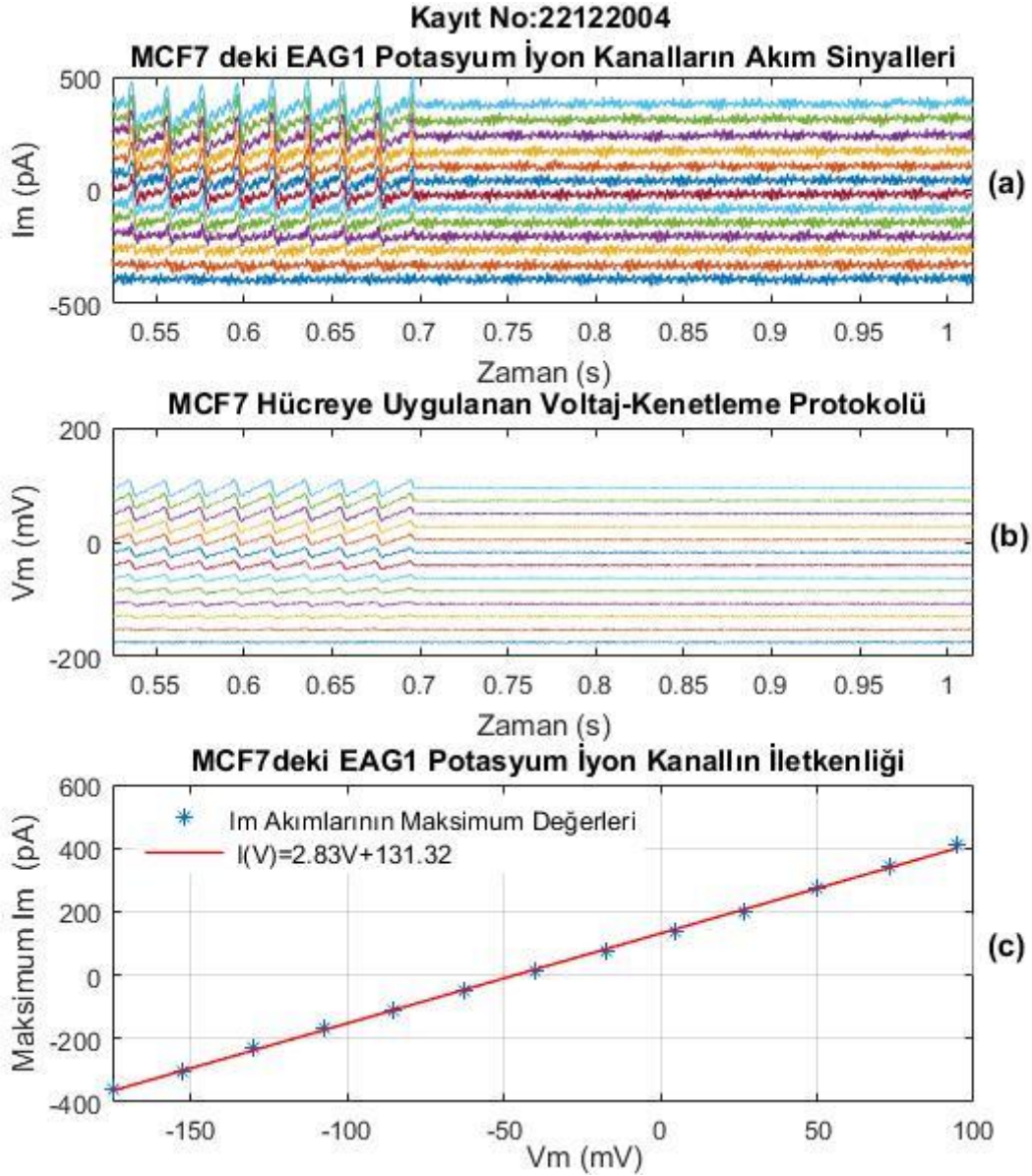
4.1. Tümör Hücresi Olarak MCF-7’de Elde Edilen Sonuçlar

MCF-7 hücre zarı üzerindeki EAG1 potasyum iyon kanallarından geçen akım sinyallerini ‘whole cell patch-clamp’ tekniği kullanarak kayıt yapıldı. Şekil 4.1.1(b), 3(b), 5(b), 7(b) ve 9(b)’de gösterildiği gibi; hücre kayıtlarında ‘kenetleme protokolü’ uygulandı. Deneyde -175 mV ile +95 mV aralığında belli voltaj artışları ile hücreler uyarıldı. Şekil 4.1.1(a), 3(a), 5(a), 7(a) ve 9(a)’da gösterildiği gibi; 175, -152, -130, -107, -85, -63, -40, -18, 5, 27, 50, 72 ve 95 mV voltaj değerleri altında EAG1 potasyum iyon akım değişimlerinin kayıtları alındı. Burada her hücre için 13 akım zaman serisi oluşturuldu. Her bir zaman serisi için bir hesaplama yapıldı.

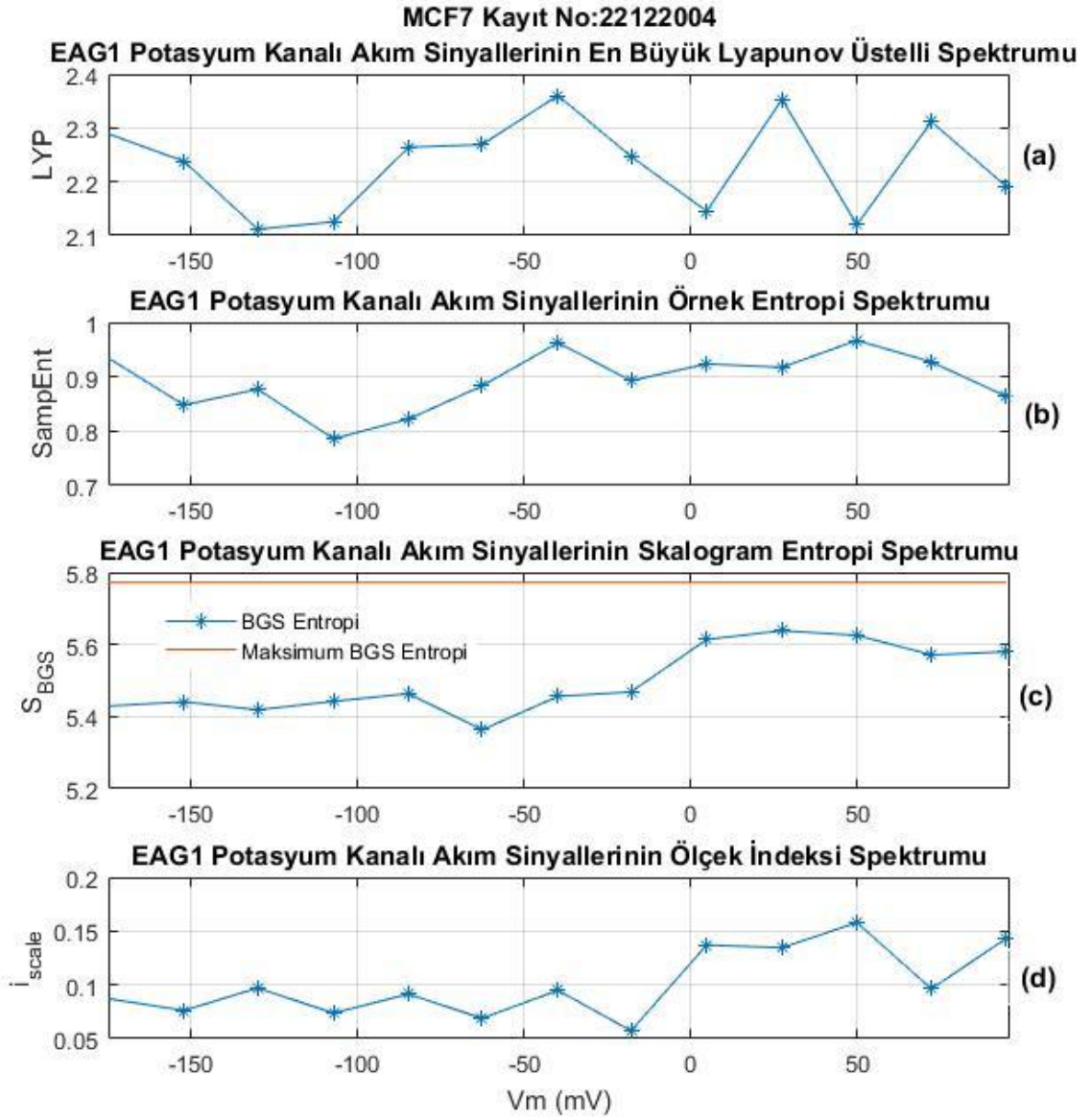
Şekil 4.1.1(c), 3(c), 5(c), 7(c) ve 9(c)’de çizilen doğru denklemlerin eğiminden MCF-7’deki EAG1 potasyum iyon kanallarının elektriksel iletkenlikleri ve I=0’daki denge potansiyelleri hesaplandı.

'Lyapunov üsteli' ve 'örnek entropiyi' hesaplamak için 0.7-0.725 saniye aralığındaki (501 data) kayıtlar kullanıldı. Voltaja göre Lyapunov üsteli ve entropi değişimlerini gösteren grafikler çizildi. Uygulanan voltaj-kenetleme protokolüne göre; Şekil 4.1.2(a), 4(a), 6(a), 8(a) ve 10(a) hesaplanan EAG1 potasyum iyon akımlarının en büyük Lyapunov üsteli spektrumlarını gösteriyor. Şekil 4.1.2(b), 4(b), 6(b), 8(b) ve 10(b) hesaplanan EAG1 potasyum iyon akımlarının örnek entropi spektrumlarını gösteriyor.

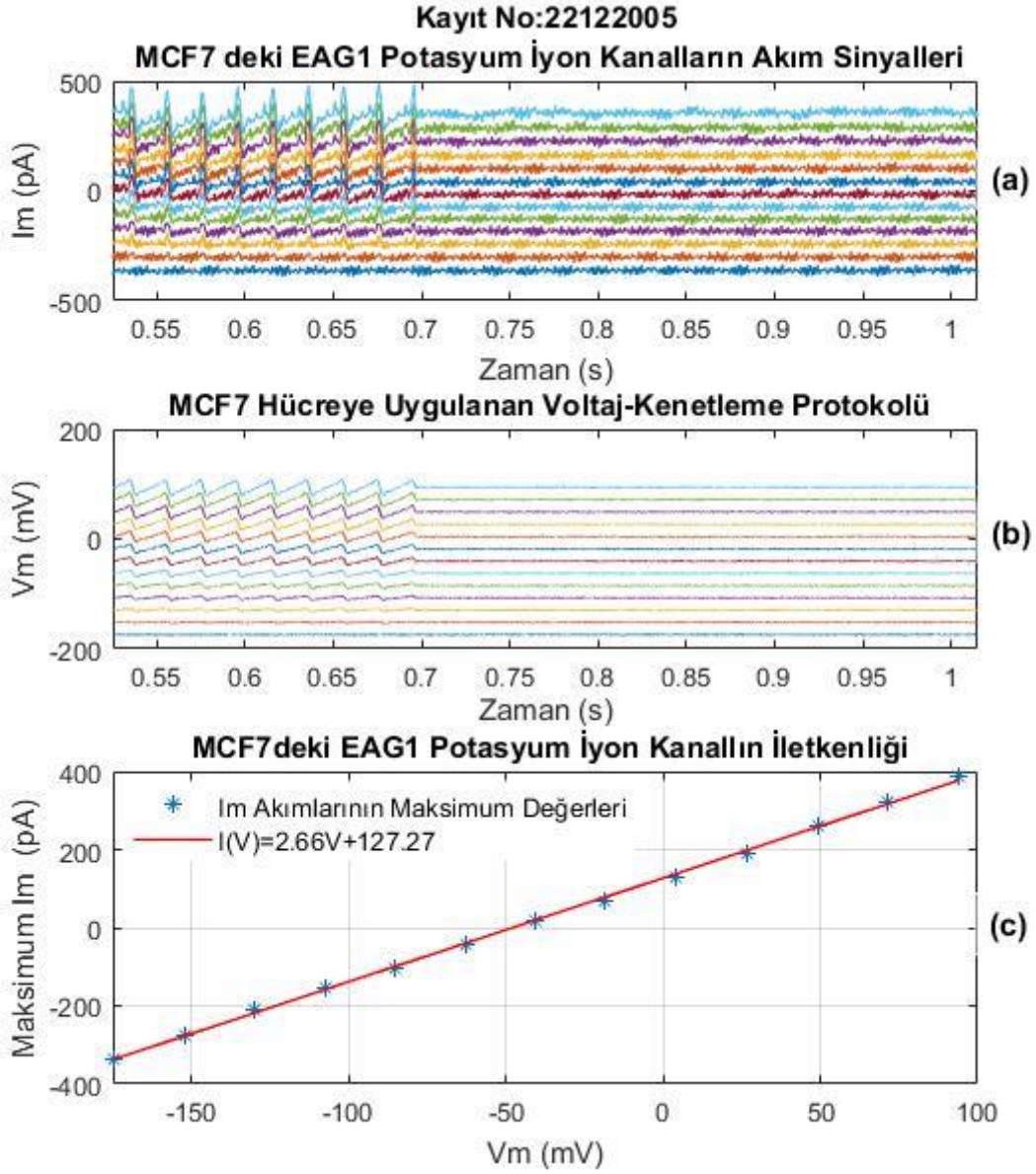
Hücre zar akım sinyallerin (veya zaman serilerinin) 'normalize skalogram'larını hesaplamak için 0.7-0.8 saniye aralığındaki (2001 data) kayıtları kullandık. Burada, 'Morlet' dalgacık fonksiyonu seçtik ve ölçek aralığını da $s_0=1$ ve $s_1=321$ olarak ayarladık. Elde edilen normaize skalogramların sonuçlarından 'skalogram entropisi (3.9)' ve 'ölçek indeksi' değerleri hesaplandı. Uygulanan voltaj-kenetleme protokolüne göre; Şekil 4.1.2(c), 4(c), 6(c), 8(c) ve 10(c) hesaplanan EAG1 potasyum iyon akımlarının skalogram entropi spektrumlarını gösteriyor. Şekil 4.1.2(d), 4(d), 6(d), 8(d) ve 10(d) hesaplanan EAG1 potasyum iyon akımlarının ölçek indeksi spektrumunlarını gösteriyor.



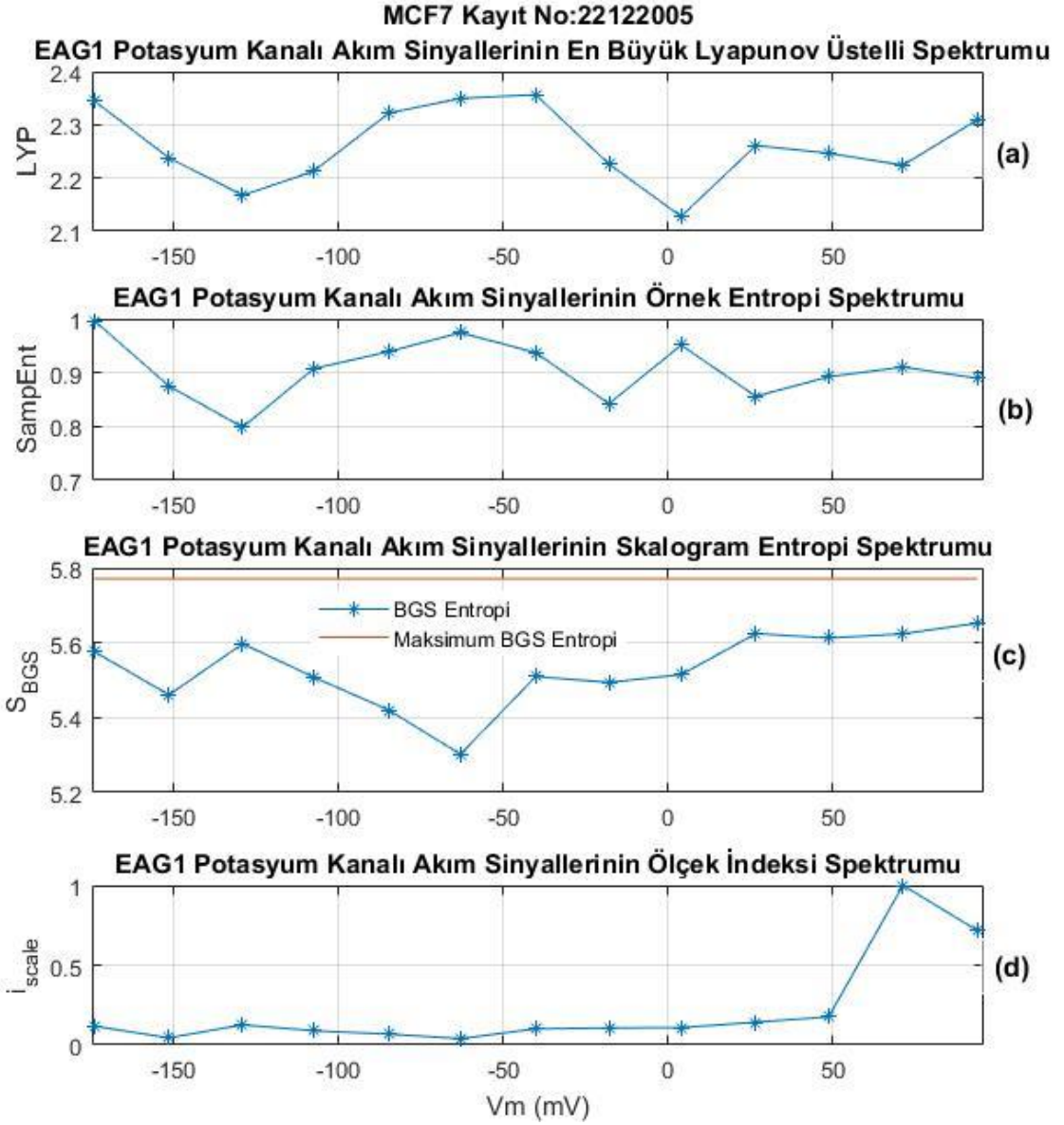
Şekil 4.1.1: (a) Whole cell patch-clamp kayıt tekniği ile meme kanseri hücre hattı (MCF-7) zarındaki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri. (b) -175 mV'dan belli aralıklarla yükselterek +95 mV kadar uygulanan voltaj-kenetleme protokolü. (c) MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=2.83$ nS=2830 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -46.40 mV.



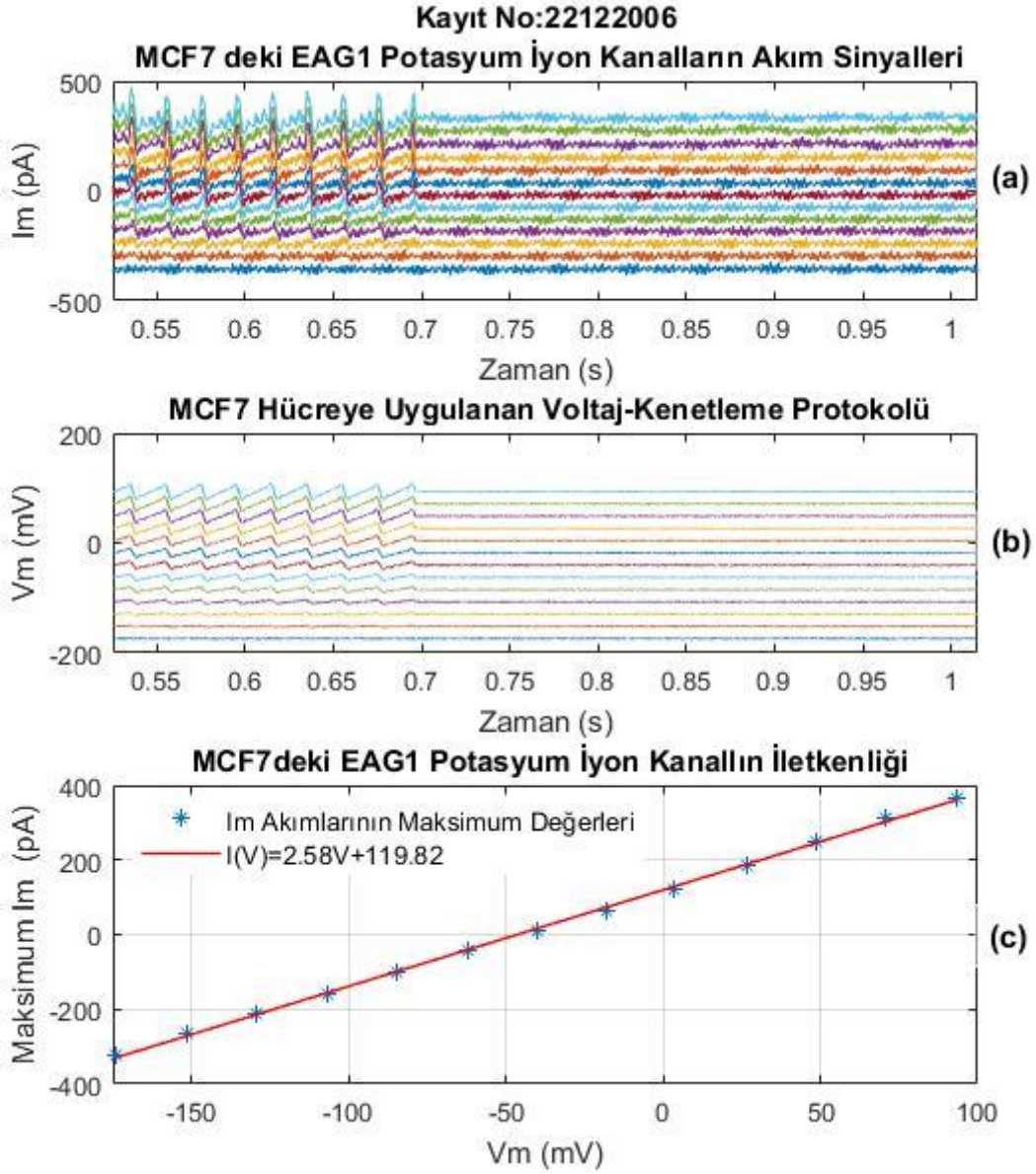
Şekil 4.1.2: Uygulanan voltaj-kenetleme protokolüne göre MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri; (a) 'En Büyük Lyapunov Üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre kaydedilen akım sinyallerinin kaotiklik derecelerini gösterir. (b) 'Örnek Entropi' spektrumu. (c) 'Skalogram Entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (d) 'Ölçek İndeksi' spektrumu. Ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin aperiyojiklik derecelerini gösterir.



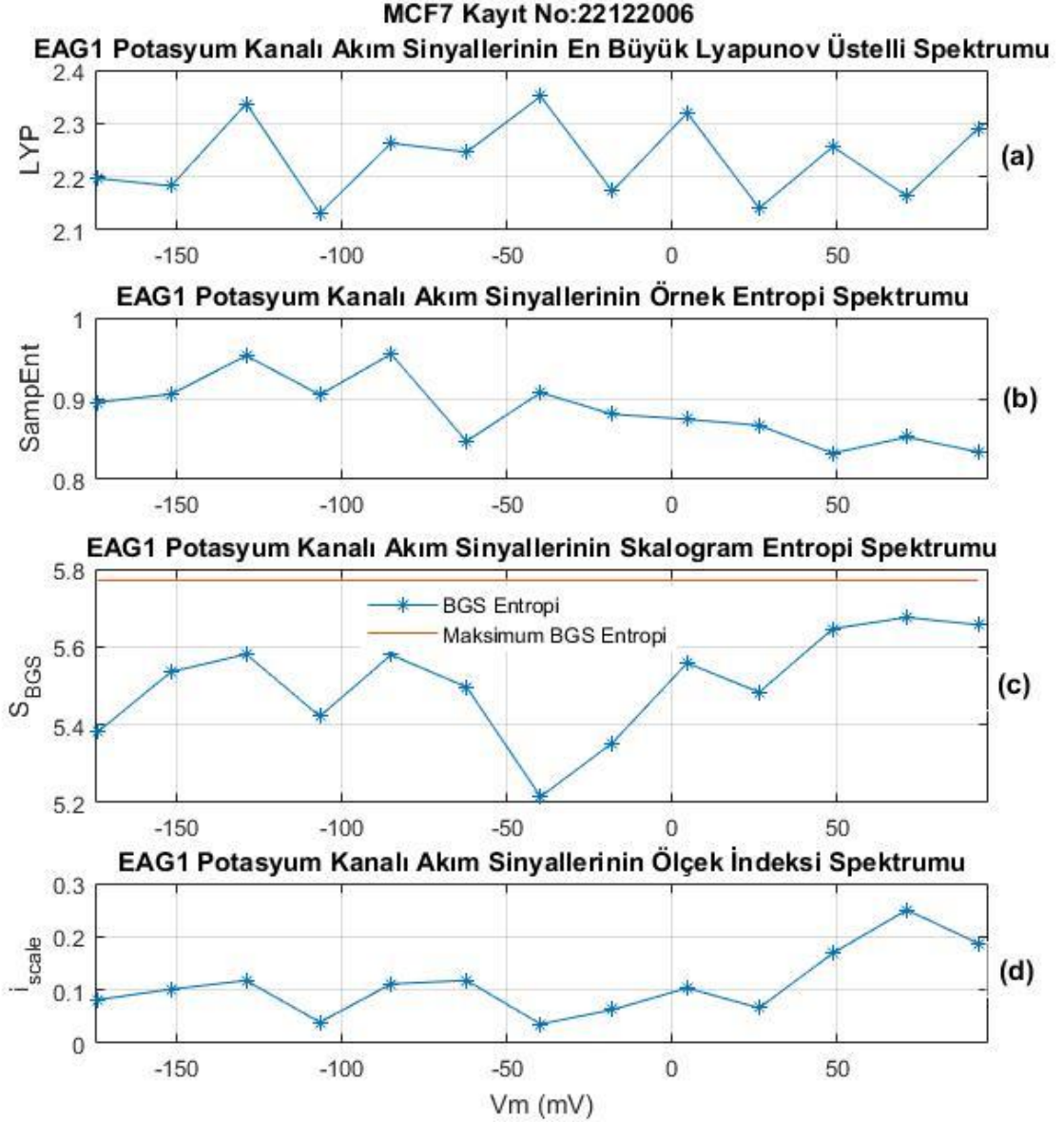
Şekil 4.1.3: (a) Whole cell patch-clamp kayıt tekniği ile meme kanseri hücre hattı (MCF-7) zarındaki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri. (b) -175 mV'dan belli aralıklarla yükselterek +95 mV kadar uygulanan voltaj-kenetleme protokolü. (c) MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=2.66$ nS=2660 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -47.85 mV.



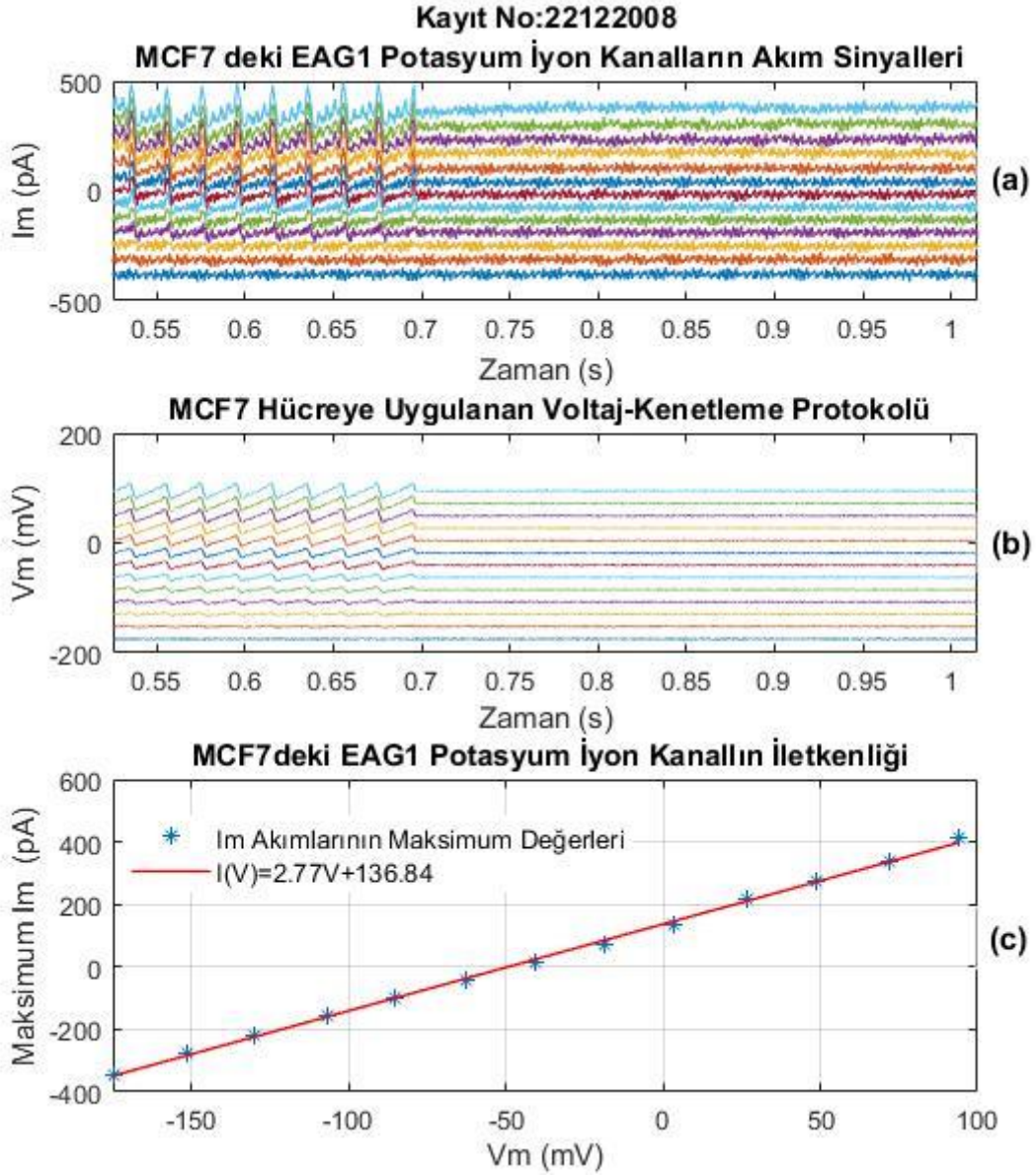
Şekil 4.1.4: Uygulanan voltaj-kenetleme protokolüne göre MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri; (a) 'En Büyük Lyapunov Üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre kaydedilen akım sinyallerinin kaotiklik derecelerini gösterir. (b) 'Örnek Entropi' spektrumu. (c) 'Skalogram Entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (d) 'Ölçek İndeksi' spektrumu. Ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin aperiyojiklik derecelerini gösterir.



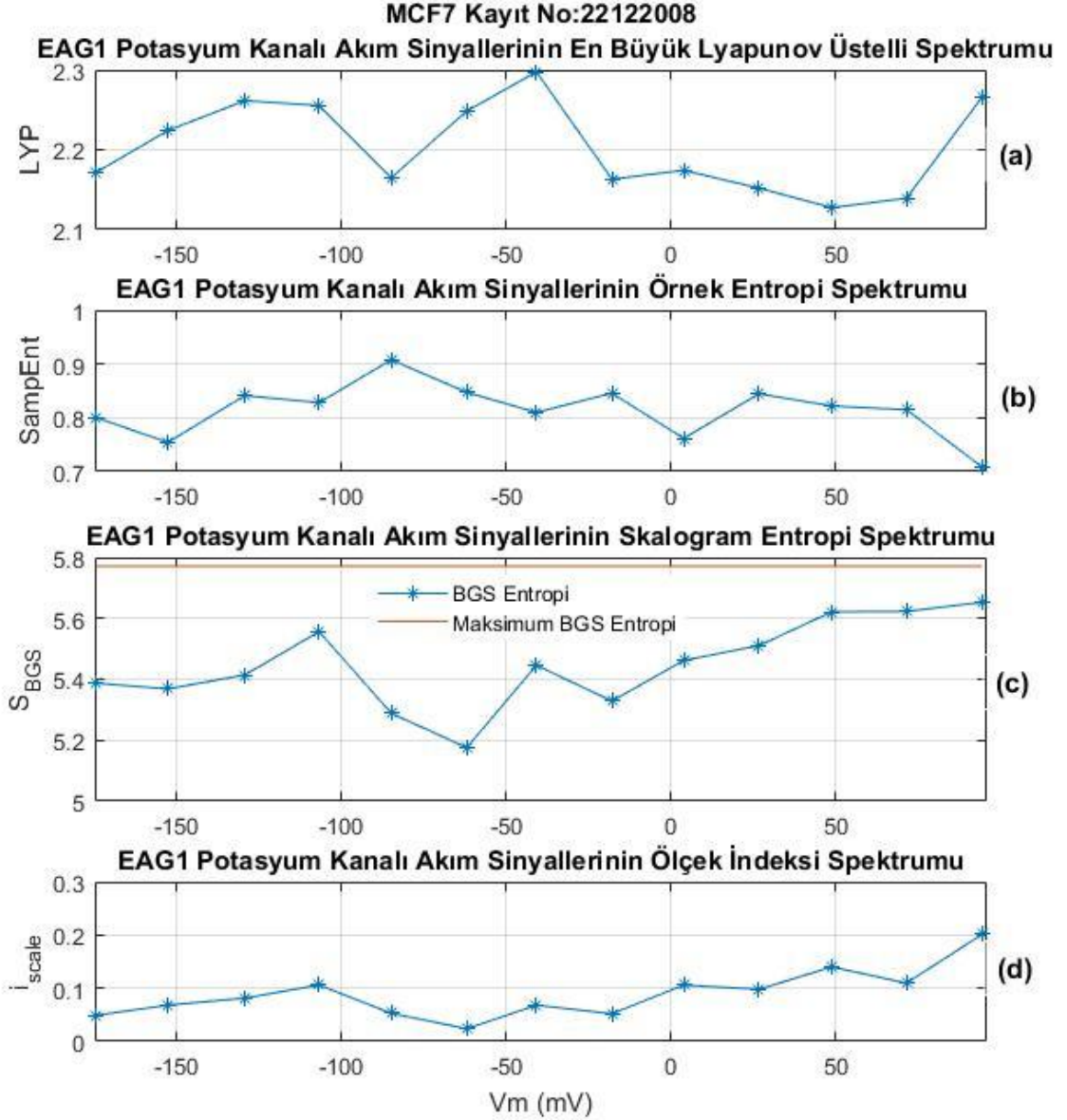
Şekil 4.1.5: (a) Whole cell patch-clamp kayıt tekniği ile meme kanseri hücre hattı (MCF-7) zarındaki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri. (b) -175 mV'dan belli aralıklarla yükselterek +95 mV kadar uygulanan voltaj-kenetleme protokolü. (c) MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=2.58$ nS=2580 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -46.44 mV.



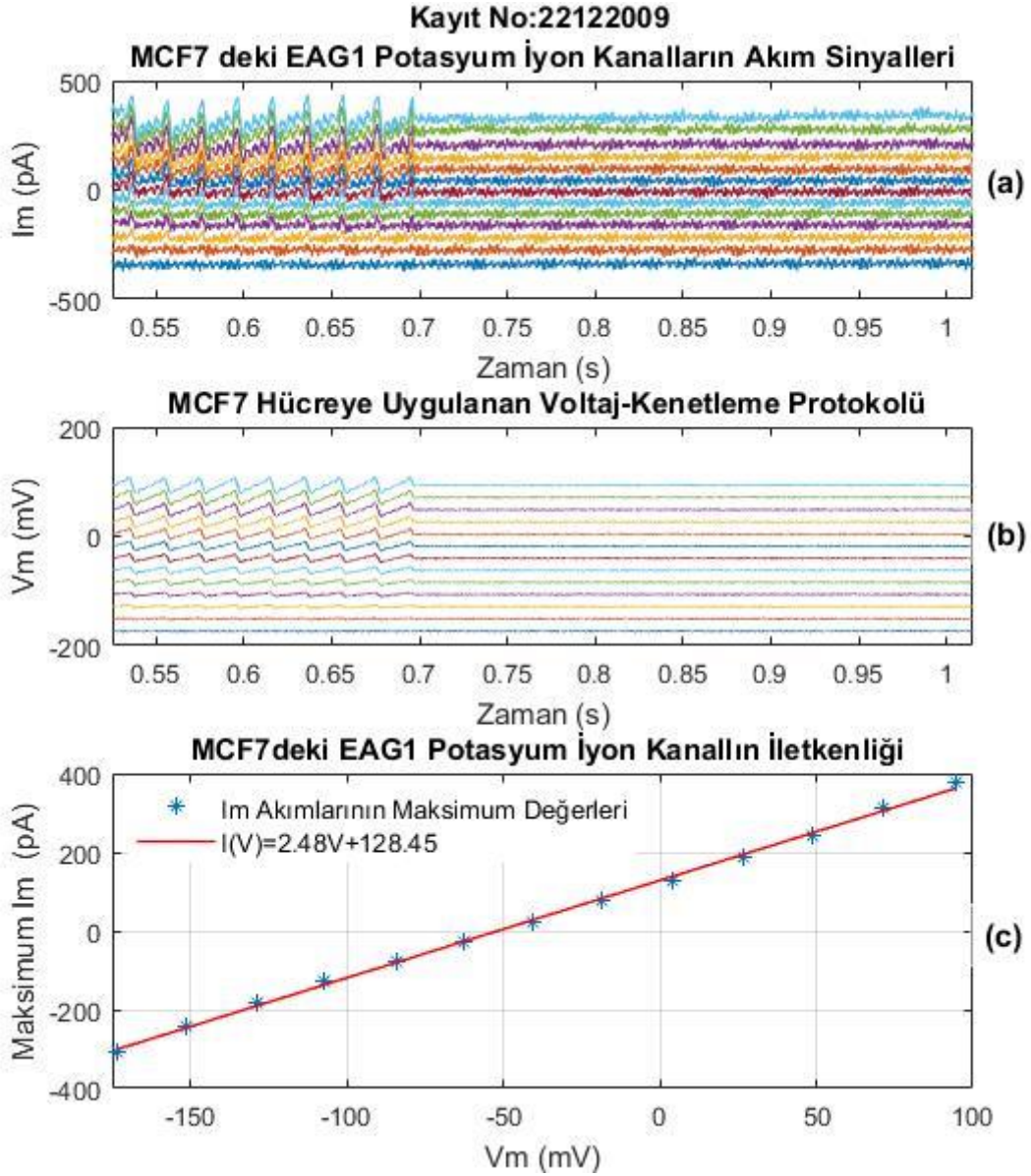
Şekil 4.1.6: Uygulanan voltaj-kenetleme protokolüne göre MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri; (a) 'En Büyük Lyapunov Üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre kaydedilen akım sinyallerinin kaotiklik derecelerini gösterir. (b) 'Örnek Entropi' spektrumu. (c) 'Skalogram Entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (d) 'Ölçek İndeksi' spektrumu. Ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin aperiyojiklik derecelerini gösterir.



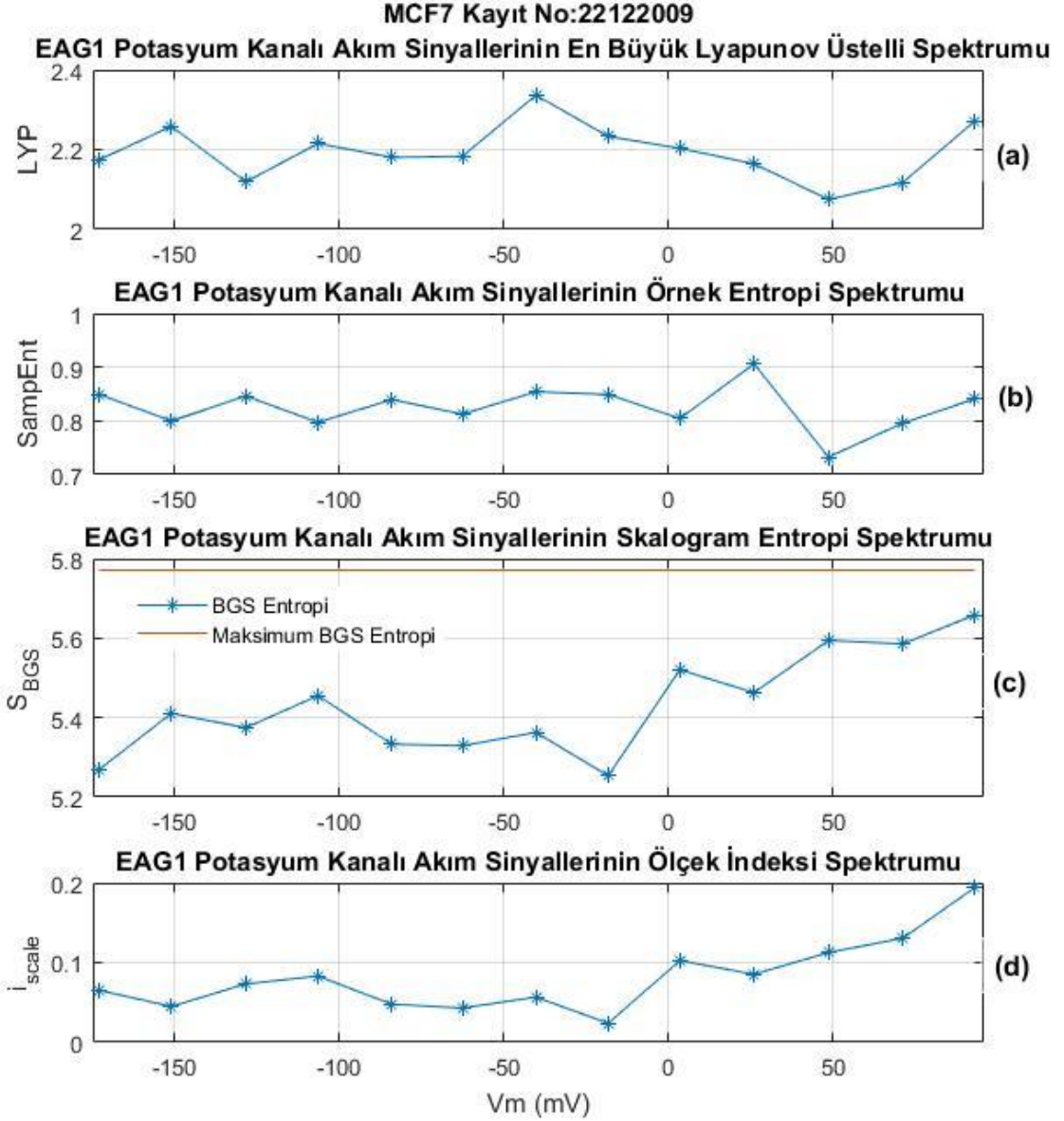
Şekil 4.1.7: (a) Whole cell patch-clamp kayıt tekniği ile meme kanseri hücre hattı (MCF-7) zarındaki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri. (b) -175 mV'dan belli aralıklarla yükselterek +95 mV kadar uygulanan voltaj-kenetleme protokolü. (c) MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=2.77$ nS=2770 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -49.40 mV.



Şekil 4.1.8: Uygulanan voltaj-kenetleme protokolüne göre MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri; (a) 'En Büyük Lyapunov Üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre kaydedilen akım sinyallerinin kaotiklik derecelerini gösterir. (b) 'Örnek Entropi' spektrumu. (c) 'Skalogram Entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (d) 'Ölçek İndeksi' spektrumu. Ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin aperiyojiklik derecelerini gösterir.



Şekil 4.1.9: (a) Whole cell patch-clamp kayıt tekniği ile meme kanseri hücre hattı (MCF-7) zarındaki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri. (b) -175 mV'dan belli aralıklarla yükselterek +95 mV kadar uygulanan voltaj-kenetleme protokolü. (c) MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=2.48$ nS=2480 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -51.79 mV.



Şekil 4.1.10: Uygulanan voltaj-kenetleme protokolüne göre MCF-7'deki EAG1 potasyum iyon kanallarından kaydedilen akım sinyalleri; (a) 'En Büyük Lyapunov Üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre kaydedilen akım sinyallerinin kaotiklik derecelerini gösterir. (b) 'Örnek Entropi' spektrumu. (c) 'Skalogram Entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (d) 'Ölçek İndeksi' spektrumu. Ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyallerinin aperiyojiklik derecelerini gösterir.

4.2. Normal Hücre Olarak ARPE-19’da Elde Edilen Sonuçlar

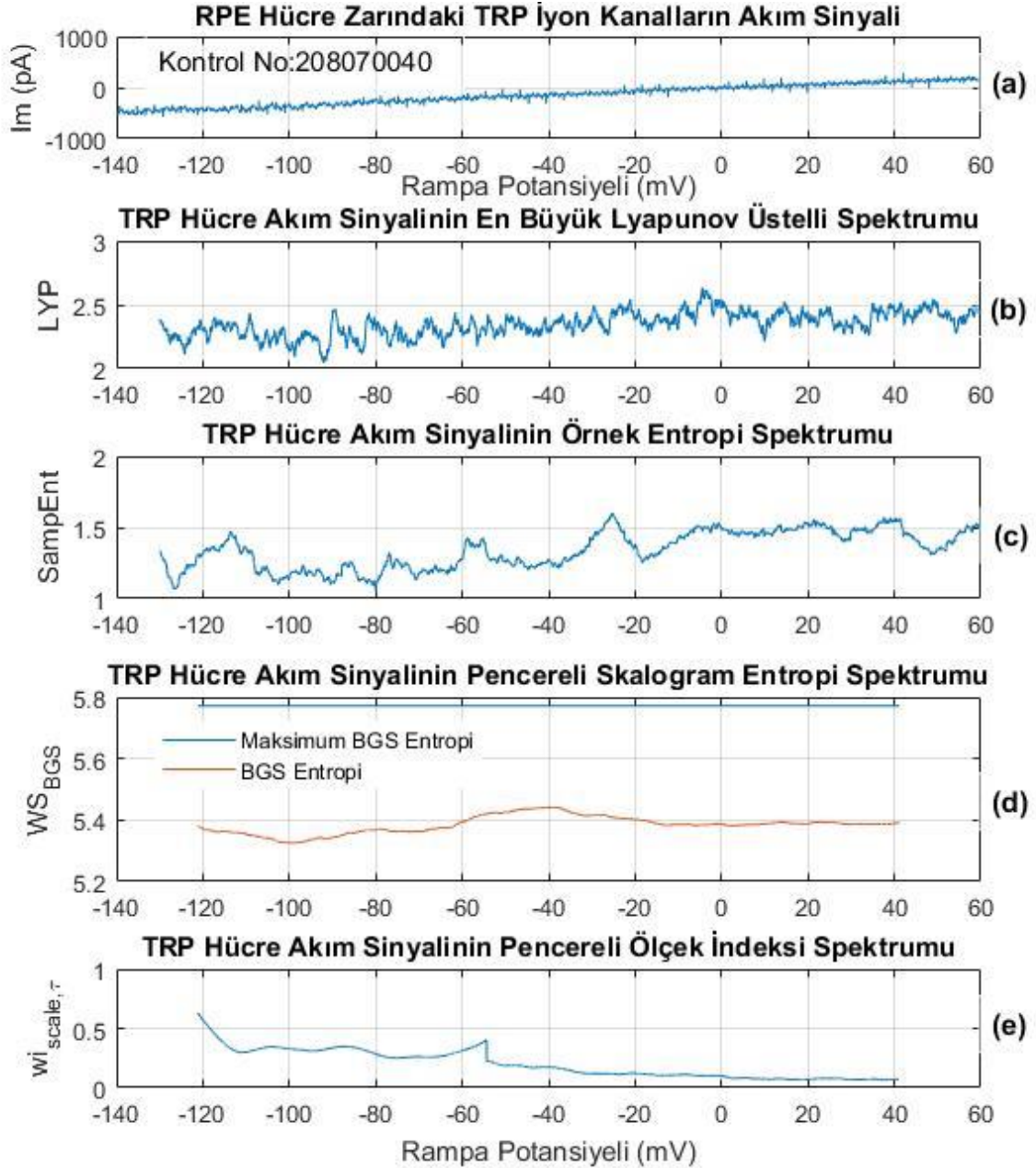
İnsan Retinal Pigment Epithelial (ARPE-19) hücre zarındaki Transient Receptor Potential (TRP) iyon kanallarından akım sinyallerini ‘whole cell patch-clamp’ tekniği kullanarak kayıt yapıldı. Hücre kayıtlarında rampa potansiyeli protokolü uygulandı. Deneyde 1000 ms içinde -140 mV’dan +60 mV’a kadar zamana bağlı düzenli voltaj artışları ile hücre uyarıldı. Yani, zamana bağlı değişen voltaja göre hücre zar akım değişimlerin kayıtları alındı.

Zamana bağlı değişen voltaj değerlerine göre ‘Lyapunov üsteli’ ve ‘örnek entropiyi’ hesaplamak için 500 data adımlık bir pencere genişliği oluşturuldu. Zaman serilerin ilk 500 data için ‘Lyapunov üsteli’ ve ‘örnek entropi’ hesaplandı. Sonra bu pencereyi bir adım kaydırarak hesaplamalar tekrar yapıldı. Bu işlem tüm zaman serisi boyunca tekrarlandı. Sonuç olarak voltaja göre Lyapunov üsteli ve entropi değişimlerini gösteren grafikler çizildi.

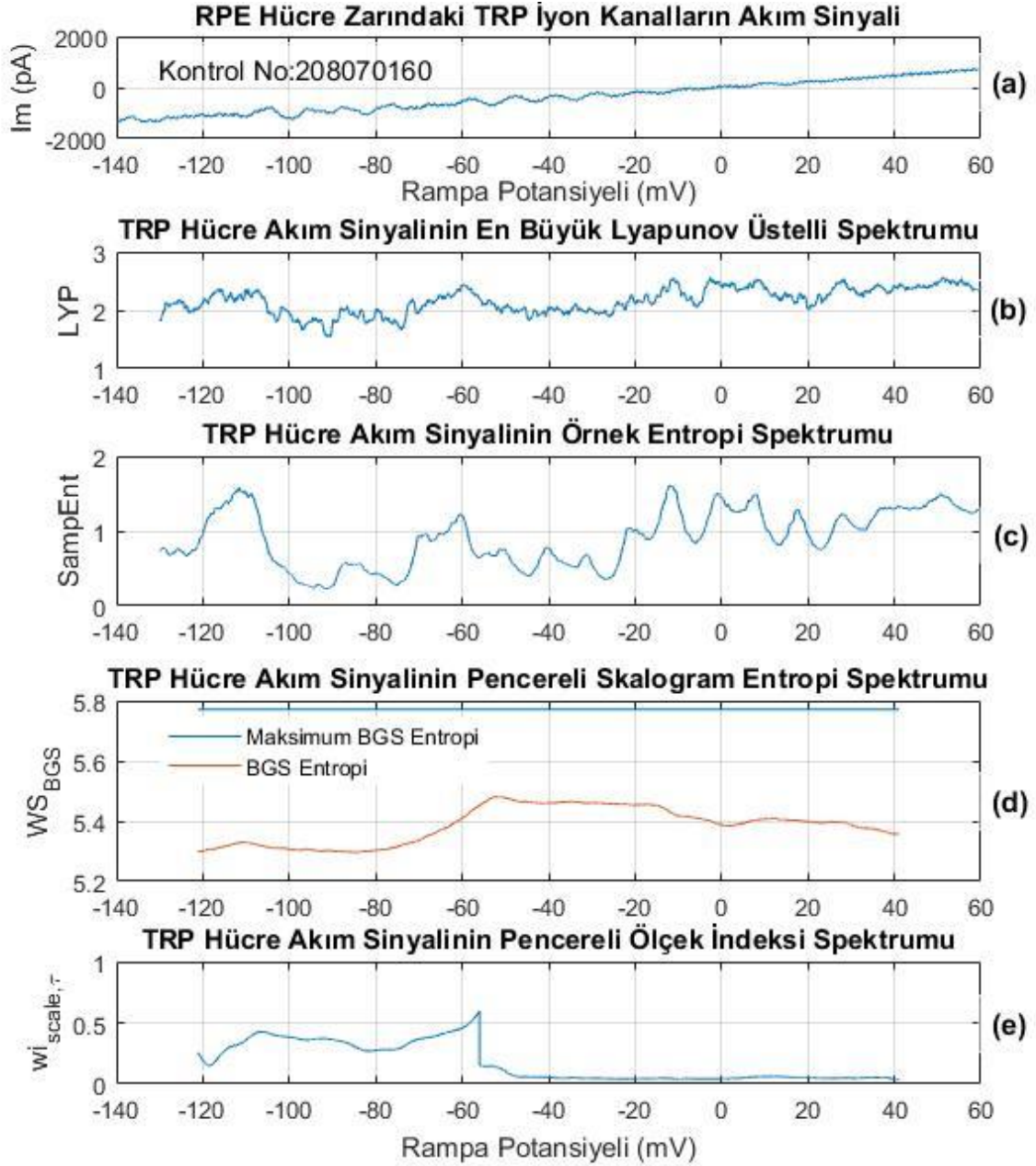
Hücre zar akım sinyallerin (veya zaman serilerinin) ‘pencereli skalogram’ları hesaplanması için, 'Morlet' dalgacık fonksiyonu seçildi. Zaman yarıçapı $\tau=600$ ve ölçek ise $s_0=8$ ve $s_1=256$ aralığına ayarlandı, burada maksimum ölçek $s=321$ olur. Elde edilen pencereli skalogramların sonuçlarından ‘pencereli skalogram entropisi (3.14)’ ve ‘pencereli ölçek indeksi (3.15)’ hesaplandı.

Kontrol grubu için; Şekil 4.2.1 (a), 4.2.2 (a) ve 4.2.3 (a) normal ARPE-19 hücre zarındaki TRP iyon kanallarından kaydedilen akım sinyallerini gösteriyor. Bu şekiller, uygulanan rampa potansiyeline göre TRP hücre akım sinyallerin değişimlerini veriyor. Şekil 4.2.1 (b), 4.2.2 (b) ve 4.2.3 (b) TRP iyon kanalların akım sinyallerinin ‘en büyük Lyapunov üsteli’ spektrumlarını gösteriyor. Şekil 4.2.1 (c), 4.2.2 (c) ve 4.2.3 (c) TRP iyon kanalların akım sinyallerinin ‘örnek entropi’ spektrumlarını gösteriyor. Şekil 4.2.1 (d), 4.2.2 (d) ve 4.2.3 (d) TRP iyon kanalların akım sinyallerinin ‘pencereli skalogram entropi’ spektrumlarını gösteriyor. Şekil 4.2.1 (e), 4.2.2 (e) ve 4.2.3 (e) TRP iyon kanalların akım sinyallerinin ‘pencereli ölçek indeksi’ spektrumlarını gösteriyor.

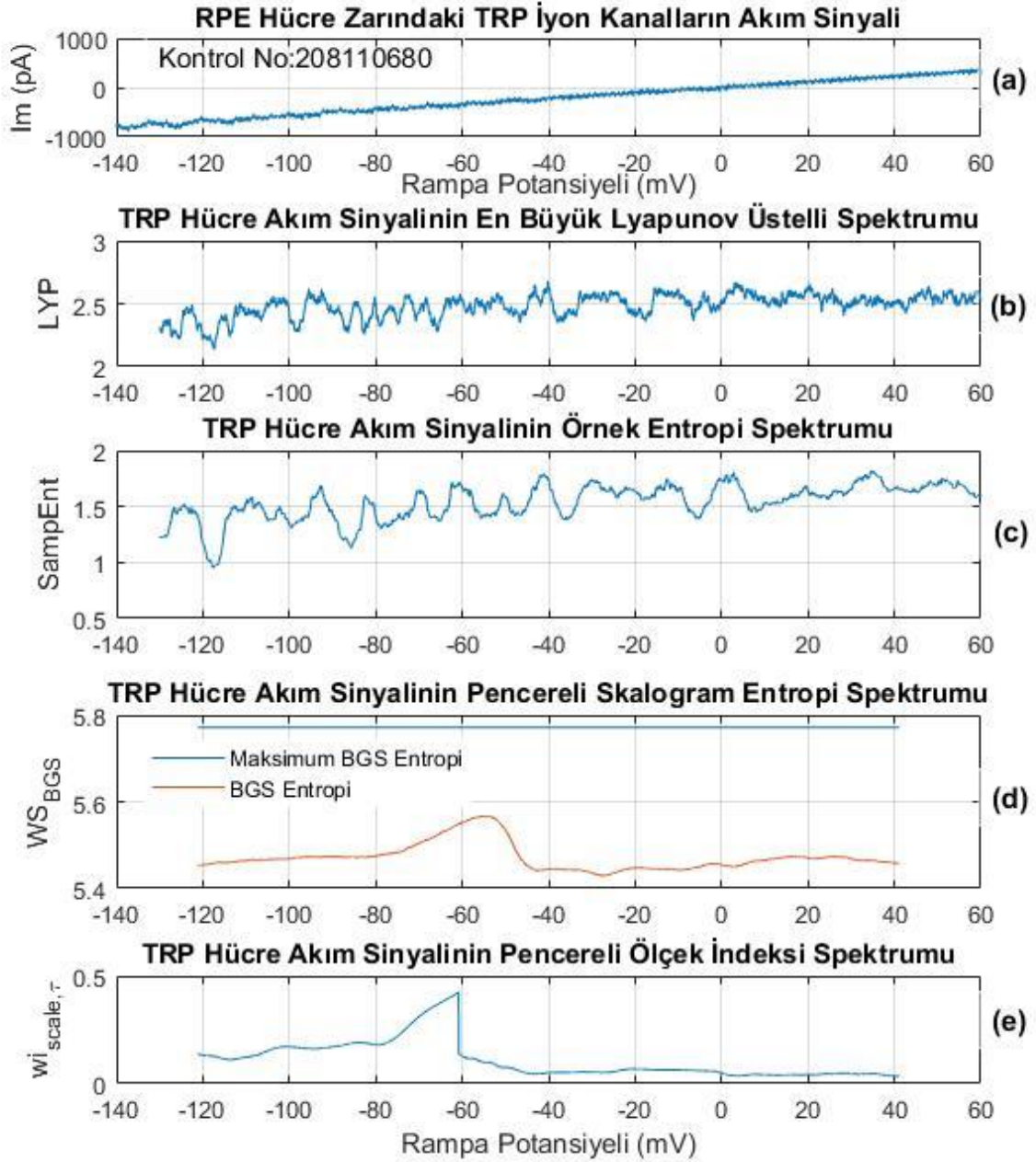
50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlara sahip SiO_2 nano parçacıklarının ARPE-19 hücresi üzerindeki etkisini ölçmek için yapılan kayıtlar ve hesaplamalar Şekil 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6 ve 4.2.7’de gösteriyor. Şekil 4.2.8, 4.2.9 ve 4.2.10’da çizilen doğru denklemlerin eğiminden ARPE-19’daki TRP iyon kanallarının elektriksel iletkenlikleri ve $I=0$ ’daki denge potansiyelleri hesaplandı.



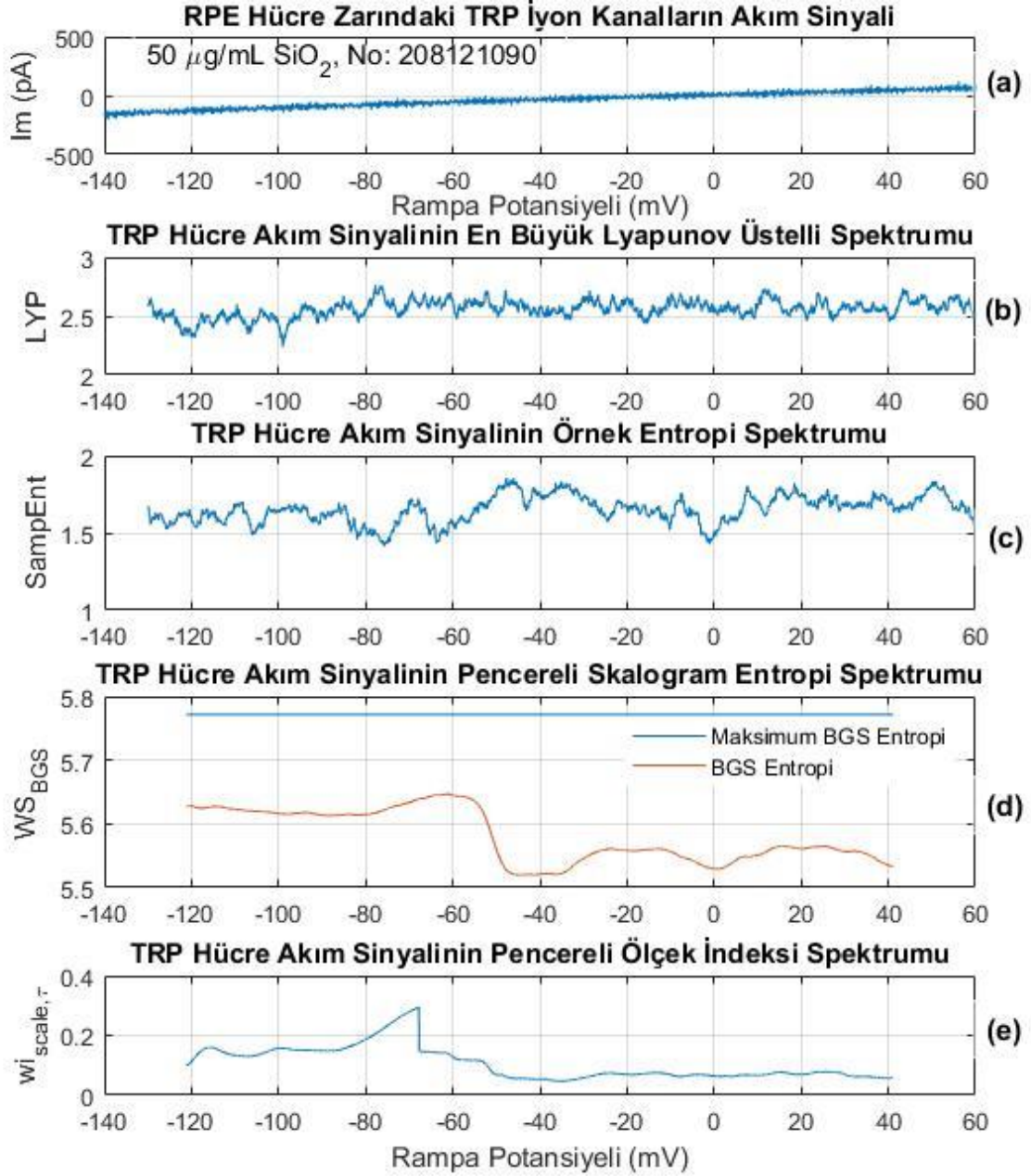
Şekil 4.2.1: 1000 ms süresi içinde, -140 mV'dan +60 mV'a kadar düzenli olarak yükseltlen bir rampa potansiyeli ile insan RPE (ARPE-19) hücresi uyarıldı. (a) İnsan RPE hücre zarındaki TRP (Transient Receptor Potential) iyon kanallarından kaydedilen akım sinyali. (b) TRP hücre akım sinyalinin 'en büyük Lyapunov üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin kaotiklik derecesini gösterir. (c) TRP hücre akım sinyalinin 'örnek entropi' spektrumu. (d) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereleli skalogram entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (e) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereleli ölçek indeksi' spektrumu. Pencereleli ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyalin aperiyojiklik derecesini gösterir.



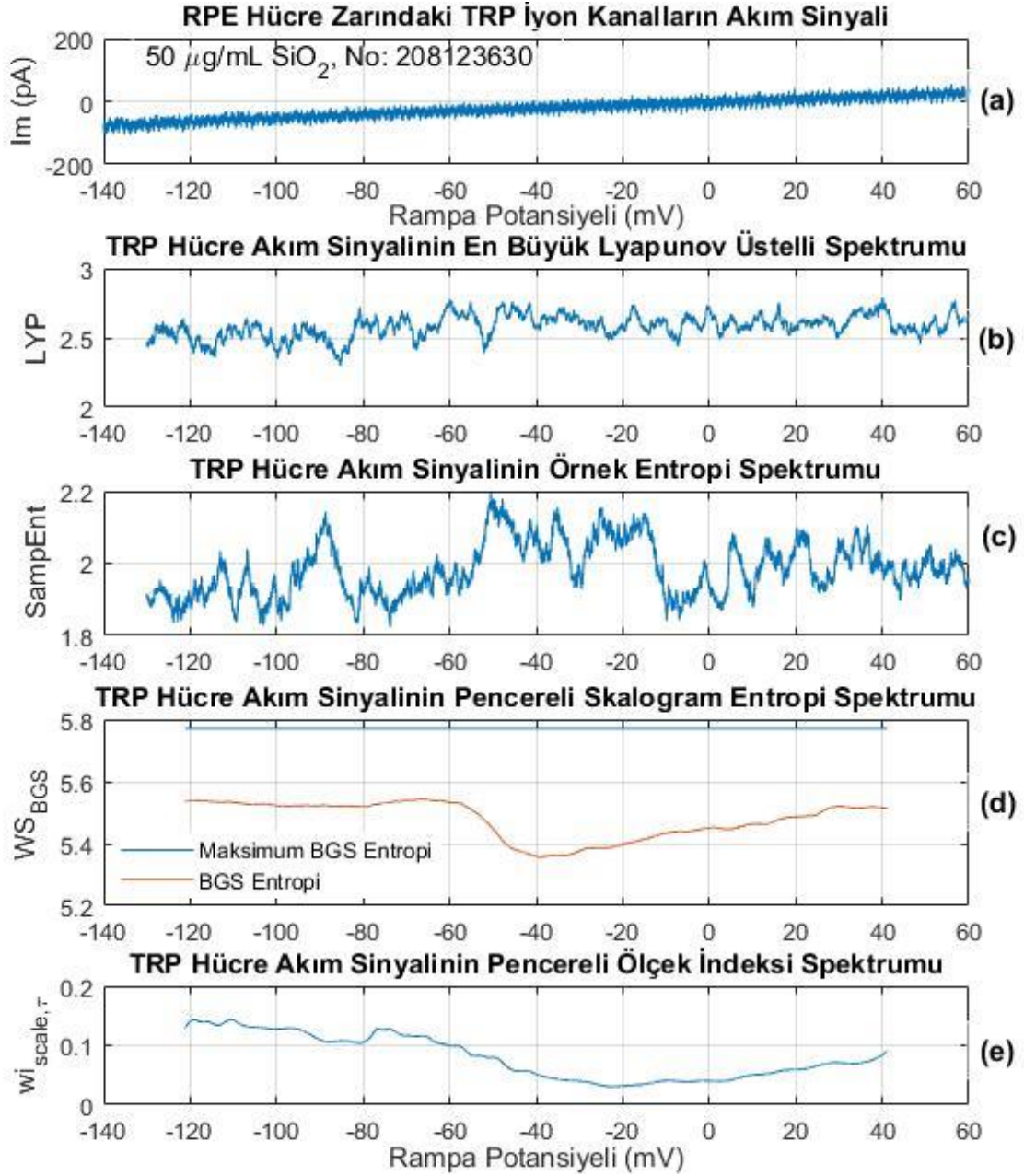
Şekil 4.2.2: 1000 ms süresi içinde, -140 mV'dan +60 mV'a kadar düzenli olarak yükseltilen bir rampa potansiyeli ile insan RPE (ARPE-19) hücresi uyarıldı. **(a)** İnsan RPE hücre zarındaki TRP (Transient Receptor Potential) iyon kanallarından kaydedilen akım sinyali. **(b)** TRP hücre akım sinyalinin 'en büyük Lyapunov üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin kaotiklik derecesini gösterir. **(c)** TRP hücre akım sinyalinin 'örnek entropi' spektrumu. **(d)** TRP hücre akım sinyalinin 'pencereli skalogram entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 **(e)** TRP hücre akım sinyalinin 'pencereli ölçek indeksi' spektrumu. Pencereli ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyalin aperiodyklik derecesini gösterir.



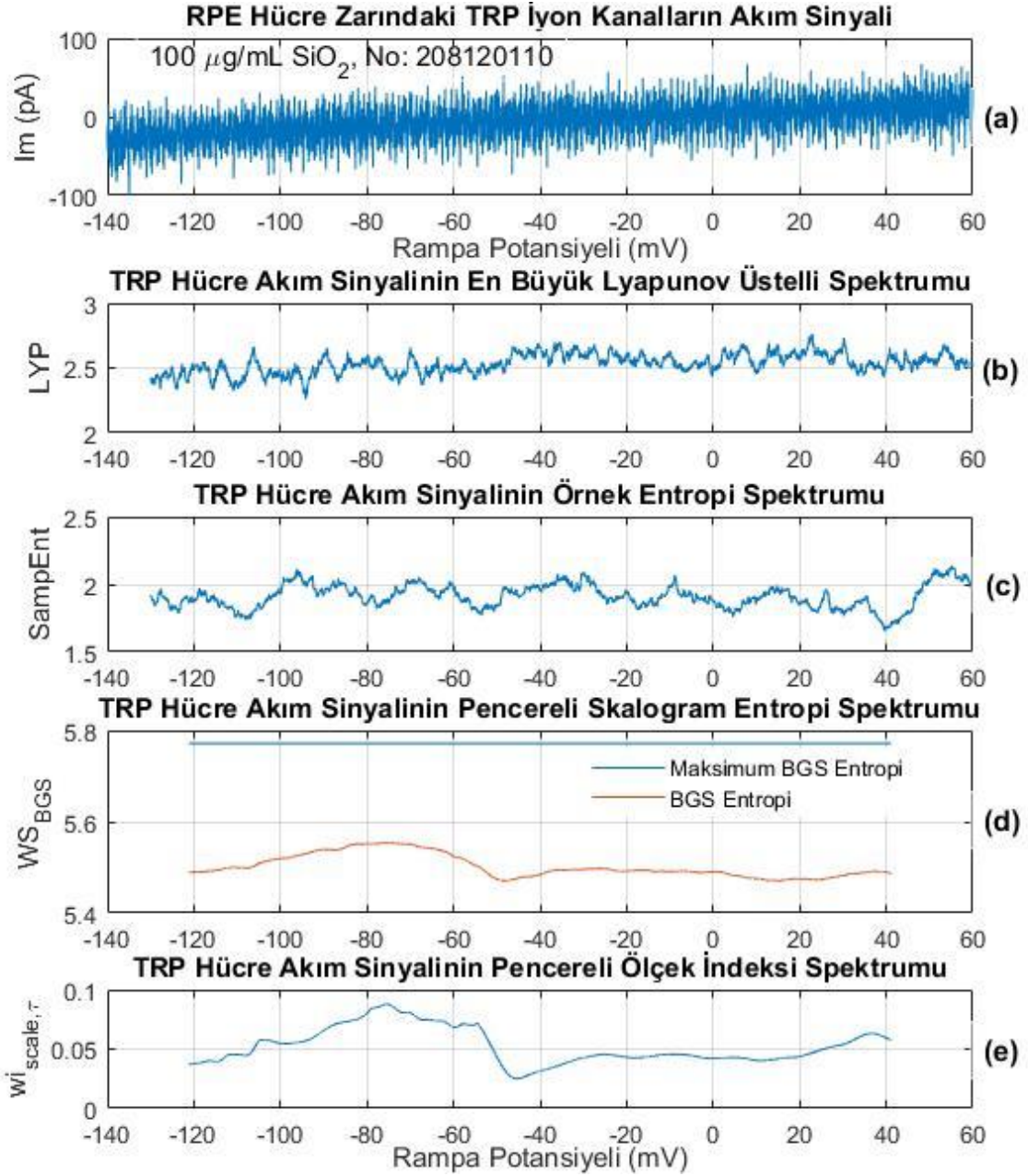
Şekil 4.2.3: 1000 ms süresi içinde, -140 mV'dan +60 mV'a kadar düzenli olarak yükseltile bir rampa potansiyeli ile insan RPE (ARPE-19) hücresi uyarıldı. (a) İnsan RPE hücre zarındaki TRP (Transient Receptor Potential) iyon kanallarından kaydedilen akım sinyali. (b) TRP hücre akım sinyalinin 'en büyük Lyapunov üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin kaotiklik derecesini gösterir. (c) TRP hücre akım sinyalinin 'örnek entropi' spektrumu. (d) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereyi skalogram entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (e) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereyi ölçek indeksi' spektrumu. Pencereyi ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyalin aperiyojiklik derecesini gösterir.



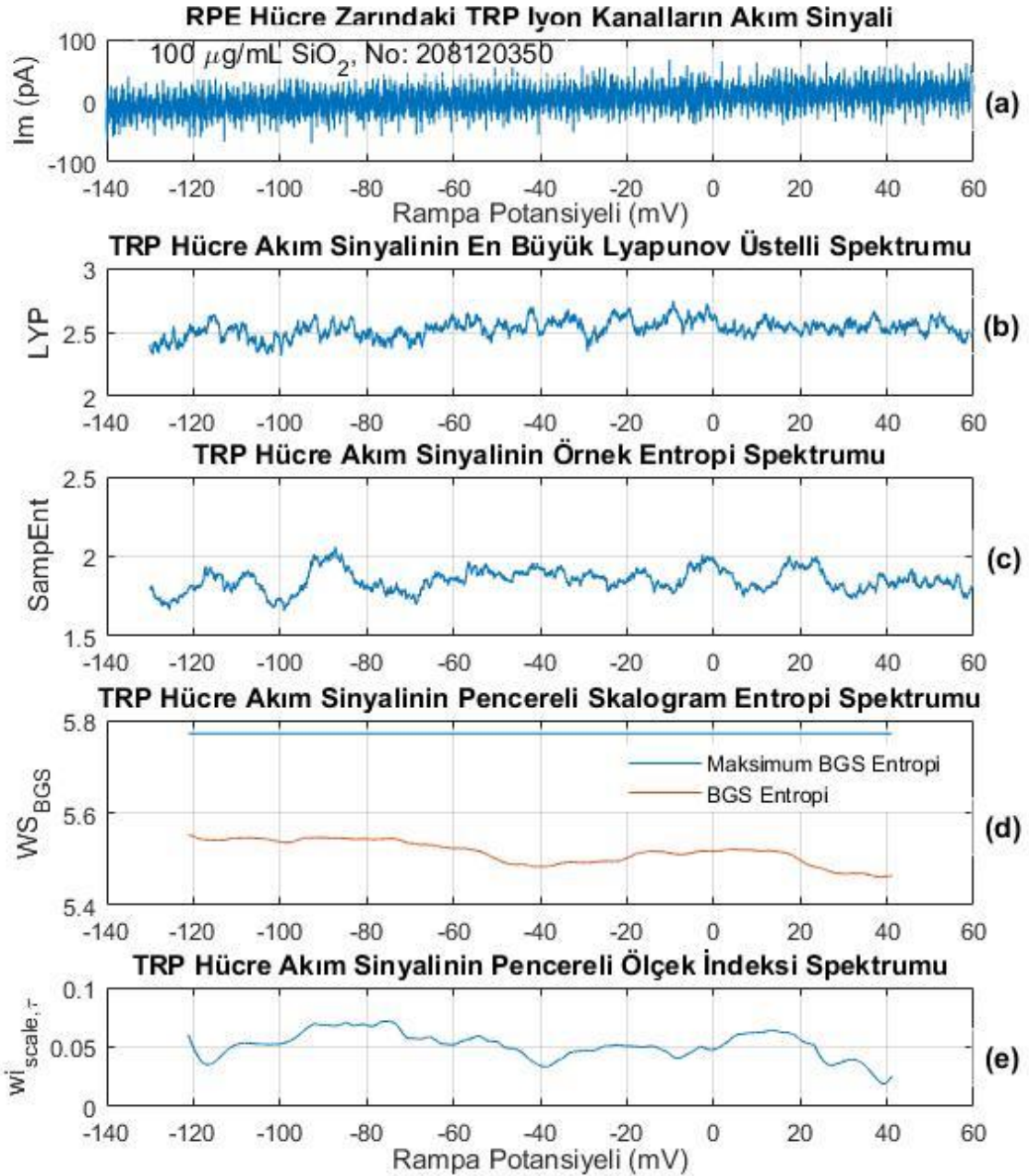
Şekil 4.2.4: 50 µg/mL SiO₂ dozu için; 1000 ms süresi içinde, -140 mV'dan +60 mV'a kadar düzenli olarak yükseltilen bir rampa potansiyeli ile insan RPE (ARPE-19) hücresi uyarıldı. (a) İnsan RPE hücre zarındaki TRP (Transient Receptor Potential) iyon kanallarından kaydedilen akım sinyali. (b) TRP hücre akım sinyalinin 'en büyük Lyapunov üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin kaotiklik derecesini gösterir. (c) TRP hücre akım sinyalinin 'örnek entropi' spektrumu. (d) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereli skalogram entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (e) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereli ölçek indeksi' spektrumu. Pencereli ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyalin aperiyojiklik derecesini gösterir.



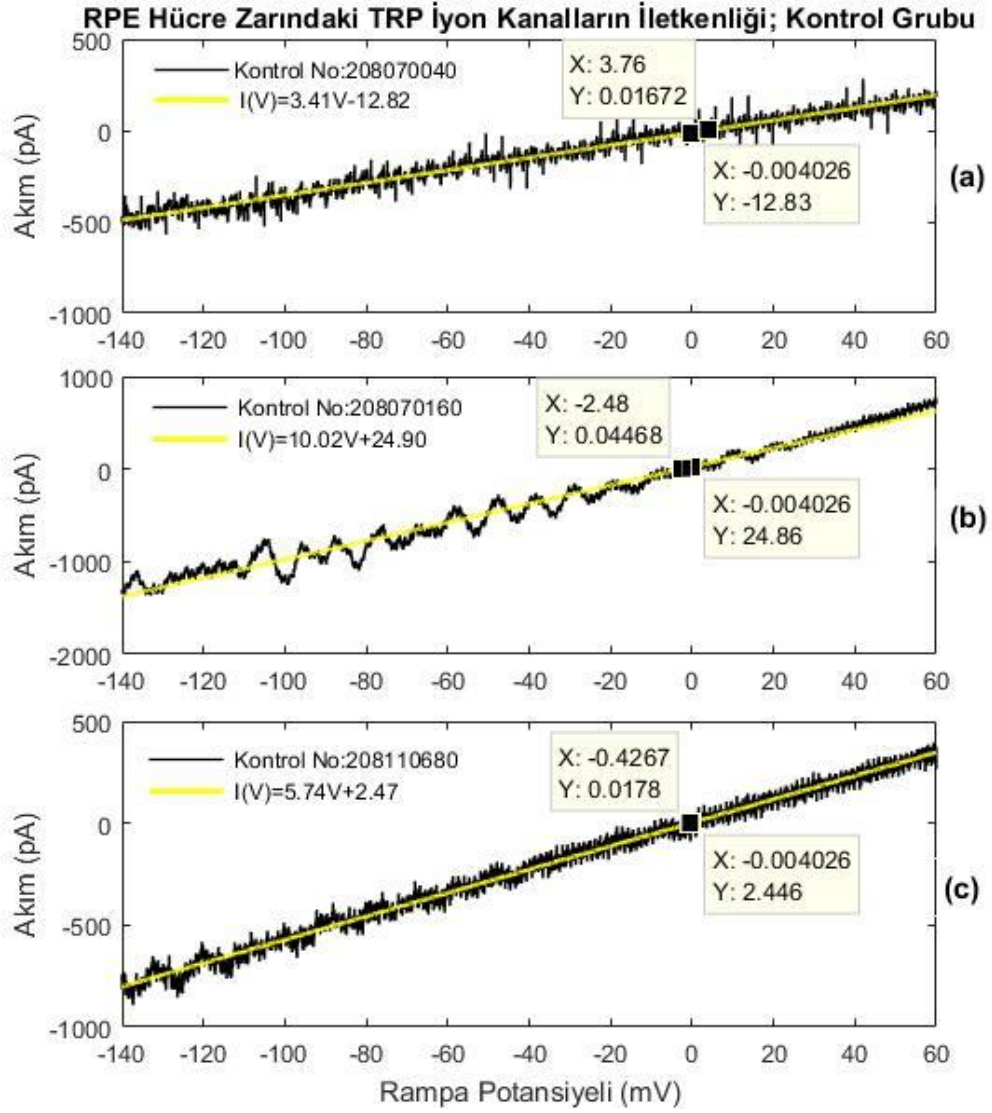
Şekil 4.2.5: 50 µg/mL SiO₂ dozu için; 1000 ms süresi içinde, -140 mV'dan +60 mV'a kadar düzenli olarak yükseltilen bir rampa potansiyeli ile insan RPE (ARPE-19) hücresi uyarıldı. (a) İnsan RPE hücre zarındaki TRP (Transient Receptor Potential) iyon kanallarından kaydedilen akım sinyali. (b) TRP hücre akım sinyalinin 'en büyük Lyapunov üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin kaotiklik derecesini gösterir. (c) TRP hücre akım sinyalinin 'örnek entropi' spektrumu. (d) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereveli skalogram entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (e) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereveli ölçek indeksi' spektrumu. Pencereveli ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyalin aperiyojiklik derecesini gösterir.



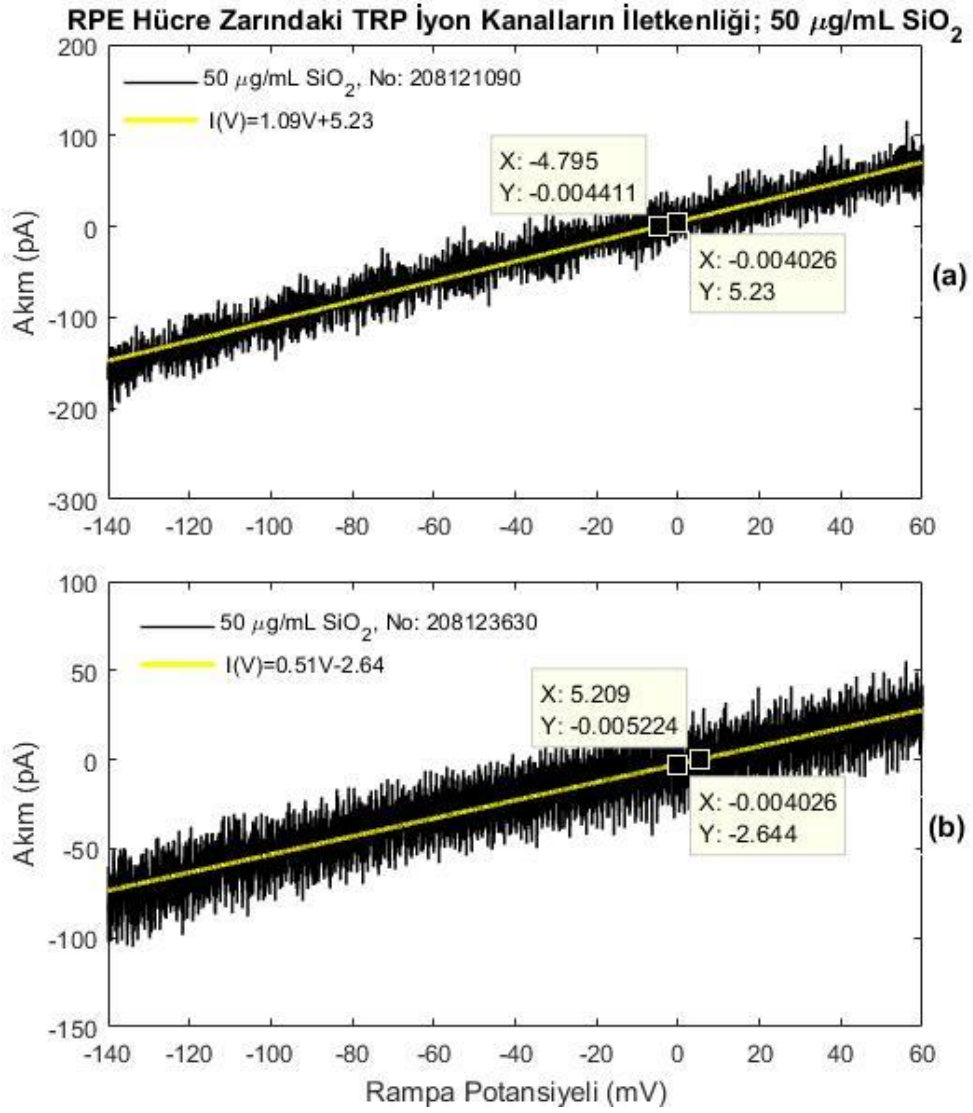
Şekil 4.2.6: 100 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 dozu için; 1000 ms süresi içinde, -140 mV'dan +60 mV'a kadar düzenli olarak yükseltilen bir rampa potansiyeli ile insan RPE (ARPE-19) hücresi uyarıldı. (a) İnsan RPE hücre zarındaki TRP (Transient Receptor Potential) iyon kanallarından kaydedilen akım sinyali. (b) TRP hücre akım sinyalinin 'en büyük Lyapunov üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin kaotiklik derecesini gösterir. (c) TRP hücre akım sinyalinin 'örnek entropi' spektrumu. (d) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereleli skalogram entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (e) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereleli ölçek indeksi' spektrumu. Pencereleli ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyalin aperiyoğiklik derecesini gösterir.



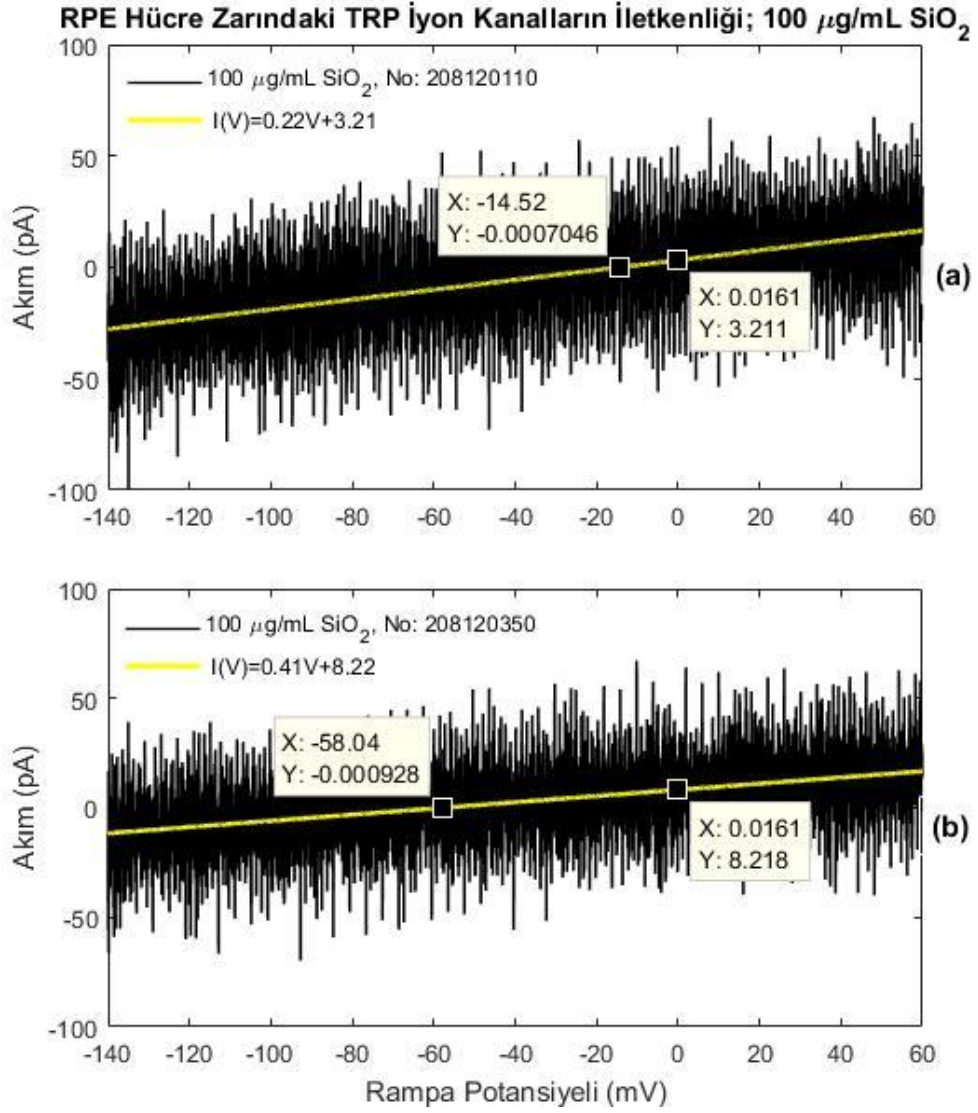
Şekil 4.2.7: 100 µg/mL SiO₂ dozu için; 1000 ms süresi içinde, -140 mV'dan +60 mV'a kadar düzenli olarak yükseltilen bir rampa potansiyeli ile insan RPE (ARPE-19) hücresi uyarıldı. (a) RPE hücre zarındaki TRP (Transient Receptor Potential) iyon kanallarından kaydedilen akım sinyali. (b) TRP hücre akım sinyalinin 'en büyük Lyapunov üsteli' spektrumu. Lyapunov üsteli spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin kaotiklik derecesini gösterir. (c) TRP hücre akım sinyalinin 'örnek entropi' spektrumu. (d) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereli skalogram entropi' spektrumu. Entropi spektrumu, voltaja göre akım sinyalinin karmaşıklık ve düzensizlik ölçüsünü verir. Maksimum entropi=5.771 (e) TRP hücre akım sinyalinin 'pencereli ölçek indeksi' spektrumu. Pencereli ölçek indeksi spektrumu, voltaja göre akım sinyalin aperiyoğiklik derecesini gösterir.



Şekil 4.2.8: Kontrol grubu için; **(a)** 208070040 kayıtlı insan RPE (ARPE-19) hücre zarındaki TRP iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=3.41$ nS=3410 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli 3.76 mV. **(b)** 208070160 kayıtlı insan RPE hücre zarındaki TRP iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=10.02$ nS=10020 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -2.49 mV. **(c)** 208110680 kayıtlı insan RPE hücre zarındaki TRP iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=5.74$ nS=5740 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -0.43 mV.



Şekil 4.2.9: 50 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 dozu için; (a) 208121090 kayıtlı insan RPE (ARPE-19) hücre zarındaki TRP iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=1.09$ nS=1090 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -4.80 mV. (b) 208123630 kayıtlı insan RPE hücre zarındaki TRP iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=0.51$ nS=510 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli 5.18 mV.



Şekil 4.2.10: 100 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 dozu için; **(a)** 208120110 kayıtlı insan RPE (ARPE-19) hücre zarındaki TRP iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=0.22$ nS= 220 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -14.59 mV. **(b)** 208120350 kayıtlı insan RPE hücre zarındaki TRP iyon kanallarının iletkenliğini hesaplamak için çizilen doğru; iletkenlik= $\sigma=0.41$ nS= 410 pS. $I=0$ 'daki denge potansiyeli -58.71 mV.

4.3. MCF-7 ve ARPE-19 Hücrelerden Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

Tümör (MCF-7) ve normal (ARPE-19) hücrelerde elde edilen grafikleri karşılaştırmak amacıyla Tablo'lar oluşturuldu. Grafiklerde hesaplanan ortalama değerler ve belirlenen bazı voltaj değerleri Tablo'lar üzerinden karşılaştırıldı. Burada MCF-7'ye uygulanan voltaj-kenetleme protokolündeki 13 tane voltaj değerleri arasından rastgele seçilen -85, -63, -40, -18, 5 ve 27 mV değerleri karşılaştırmalarda referans olarak alındı.

Şekil 4.1.2(a)-10(a) ve Şekil 4.2.1(b)-7(b) grafikleri için Lyapunov üstellerin ortalamaları (ort.) ile standart sapma (sd.) değerlerini ve belli voltajlarda Lyapunov üstellerin aldığı değerleri Tablo 4.3.1 ve Tablo 4.3.2 üzerinden gösterildi. Şekil 4.1.2(b)-10(b) ve Şekil 4.2.1(c)-7(c) grafikleri için örnek entropilerin ortalamaları (ort.) ile standart sapma (sd.) değerlerini ve belli voltajlarda örnek entropilerin aldığı değerleri Tablo 4.3.3 ve Tablo 4.3.4 üzerinden gösterildi. Şekil 4.1.2(c)-10(c) ve Şekil 4.2.1(d)-7(d) grafikleri için pencereci skalogram entropilerin ortalamaları (ort.) ile standart sapma (sd.) değerlerini ve belli voltajlarda pencereci skalogram entropilerin aldığı değerleri Tablo 4.3.5 ve Tablo 4.3.6 üzerinden gösterildi. Şekil 4.1.2(d)-10(d) ve Şekil 4.2.1(e)-7(e) grafikleri için pencereci ölçek indekslerinin ortalamaları (ort.) ile standart sapma (sd.) değerlerini ve belli voltajlarda pencereci ölçek indekslerinin aldığı değerleri Tablo 4.3.7 ve Tablo 4.3.8 üzerinden gösterildi. Tablo 4.3.9'de ise Şekil 4.1.1-9 ve Şekil 4.2.8-10'deki grafikler için hesaplanan elektriksel iletkenlik değerlerini gösteriyor, ayrıca grafiklerde çizilen doğrunun denklemlerinde hücrelerin denge ($I=0$ 'daki) potansiyeli hesaplandı.

Tablo 4.3.1: Şekil 4.1 ve 4.2'ler için; MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon akım sinyallerinin en büyük Lyapunov üstellerin ortalamaları (ort.) ve standart sapma (sd.) değerleri. Ayrıca belli voltajlarda en büyük Lyapunov üstellerin aldığı değerler.

En Büyük Lyapunov Üsteli	Ort. \pm Sd	-85 mV	-63 mV	-40 mV	-18 mV	5 mV	27 mV	
MCF-7 Hücreleri	22122004	2.233 \pm 0.087	2.264	2.269	2.236	2.247	2.145	2.353
	22122005	2.260 \pm 0.072	2.322	2.350	2.357	2.226	2.128	2.261
	22122006	2.235 \pm 0.075	2.263	2.246	2.351	2.173	2.320	2.141
	22122008	2.204 \pm 0.057	2.165	2.248	2.298	2.163	2.174	2.152
	22122009	2.195 \pm 0.071	2.181	2.183	2.233	2.233	2.203	2.165
Kontrol Grubu ARPE-19	208070040	2.348 \pm 0.095	2.209	2.273	2.323	2.368	2.472	2.351
	208070160	2.163 \pm 0.218	1.940	2.276	2.060	2.158	2.361	2.450
	208110680	2.483 \pm 0.092	2.486	2.521	2.611	2.395	2.630	2.513
50 μ g/mL SiO ₂ ARPE-19	208121090	2.561 \pm 0.074	2.647	2.653	2.581	2.548	2.556	2.515
	208123630	2.583 \pm 0.082	2.341	2.561	2.578	2.708	2.663	2.640
100 μ g/mL SiO ₂ ARPE-19	208120110	2.533 \pm 0.076	2.498	2.425	2.656	2.511	2.551	2.527
	208120350	2.528 \pm 0.070	2.518	2.542	2.502	2.527	2.518	2.538

Tablo 4.3.2: En büyük Lyapunov üstel değerlerinin (Tablo 4.3.1) genel özeti

LYP Üsteli	Genel Ort. (Ort. ±Sd)	-85 mV (Ort. ±Sd)	-63 mV (Ort. ±Sd)	-40 mV (Ort. ±Sd)	-18 mV (Ort. ±Sd)	5 mV (Ort. ±Sd)	27 mV (Ort. ±Sd)
MCF-7	2.225±0.07	2.236±0.065	2.259±0.06	2.295±0.06	2.208±0.037	2.194±0.076	2.214±0.09
Kontrol ARPE-19	2.331±0.135	2.211±0.273	2.356±0.142	2.331±0.275	2.307±0.13	2.487±0.135	2.438±0.082
SiO ₂ ARPE-19	2.551±0.075	2.501±0.125	2.545±0.093	2.579±0.063	2.574±0.091	2.572±0.063	2.555±0.057

Tablo 4.3.3: Şekil 4.1 ve 4.2'ler için; MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon akım sinyallerinin örnek entropilerinin ortalamaları (ort.) ve standart sapma (sd.) değerleri. Ayrıca belli voltajlarda örnek entropilerinin aldığı değerler.

Örnek Entropi	Ort. ±Sd	-85 mV	-63 mV	-40 mV	-18 mV	5 mV	27 mV	
MCF-7 Hücreleri	22122004	0.892±0.054	0.822	0.883	0.963	0.893	0.924	0.917
	22122005	0.905±0.055	0.939	0.974	0.937	0.842	0.951	0.856
	22122006	0.885±0.040	0.955	0.847	0.907	0.881	0.874	0.867
	22122008	0.814±0.051	0.908	0.847	0.810	0.846	0.762	0.846
	22122009	0.825±0.042	0.840	0.813	0.854	0.849	0.805	0.906
Kontrol Grubu ARPE-19	208070040	1.342±0.131	1.214	1.185	1.277	1.270	1.474	1.447
	208070160	0.906±0.372	0.555	1.023	0.762	0.927	1.282	1.174
	208110680	1.537±0.158	1.192	1.510	1.736	1.568	1.643	1.633
50 µg/mL SiO ₂ ARPE-19	208121090	1.651±0.087	1.668	1.486	1.755	1.689	1.606	1.699
	208123630	1.982±0.037	1.943	2.002	2.079	2.108	2.040	1.933
100 µg/mL SiO ₂ ARPE-19	208120110	1.911±0.87	1.998	1.931	1.956	1.844	1.797	1.937
	208120350	1.849±0.071	1.937	1.874	1.918	1.895	1.828	1.830

Tablo 4.3.4: Örnek entropi değerlerinin (Tablo 4.3.3) genel özeti

Örnek Entropi	Genel Ort. (Ort. ±Sd)	-85 mV (Ort. ±Sd)	-63 mV (Ort. ±Sd)	-40 mV (Ort. ±Sd)	-18 mV (Ort. ±Sd)	5 mV (Ort. ±Sd)	27 mV (Ort. ±Sd)
MCF-7	0.844±0.242	0.893±0.059	0.873±0.062	0.894±0.062	0.862±0.023	0.863±0.079	0.878±0.031
Kontrol ARPE-19	1.261±0.220	0.987±0.374	1.239±0.248	1.258±0.487	1.255±0.321	1.466±0.181	1.418±0.231
SiO ₂ ARPE-19	1.848±0.266	1.887±0.142	1.823±0.231	1.927±0.134	1.884±0.173	1.818±0.178	1.850±0.112

Tablo 4.3.5: Şekil 4.1 ve 4.2'ler için; MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon akım sinyallerinin pencereleli skalogram entropilerinin ortalamaları (ort.) ve standart sapma (sd.) değerleri. Ayrıca belli voltajlarda pencereleli skalogram entropilerinin aldığı değerler.

Pencereleli Skalogram Entropi		Ort. \pm Sd	-85 mV	-63 mV	-40 mV	-18 mV	5 mV	27 mV
MCF-7 Hücreleri	22122004	5.501 \pm 0.092	5.464	5.363	5.456	5.468	5.614	5.638
	22122005	5.531 \pm 0.099	5.420	5.302	5.509	5.494	5.515	5.625
	22122006	5.507 \pm 0.135	5.579	5.496	5.215	5.353	5.558	5.483
	22122008	5.449 \pm 0.143	5.289	5.176	5.446	5.329	5.462	5.511
	22122009	5.432 \pm 0.128	5.333	5.329	5.363	5.253	5.520	5.463
Kontrol Grubu ARPE-19	208070040	5.384 \pm 0.028	5.358	5.347	5.441	5.399	5.384	5.391
	208070160	5.386 \pm 0.060	5.297	5.383	5.460	5.455	5.393	5.396
	208110680	5.472 \pm 0.031	5.472	5.537	5.444	5.447	5.455	5.473
50 μ g/mL SiO ₂ ARPE-19	208121090	5.581 \pm 0.041	5.614	5.645	5.521	5.558	5.543	5.562
	208123630	5.477 \pm 0.037	5.521	5.539	5.360	5.404	5.447	5.510
100 μ g/mL SiO ₂ ARPE-19	208120110	5.502 \pm 0.025	5.544	5.537	5.484	5.493	5.482	5.477
	208120350	5.515 \pm 0.025	5.545	5.527	5.483	5.511	5.521	5.473

Tablo 4.3.6: Pencereleli skalogram (WS) entropi değerlerinin (Tablo 4.3.5) genel özeti

WS Entropi	Genel Ort. (Ort. \pm Sd)	-85 mV (Ort. \pm Sd)	-63 mV (Ort. \pm Sd)	-40 mV (Ort. \pm Sd)	-18 mV (Ort. \pm Sd)	5 mV (Ort. \pm Sd)	27 mV (Ort. \pm Sd)
MCF-7	5.484 \pm 0.119	5.417 \pm 0.114	5.333 \pm 0.115	5.398 \pm 0.115	5.38 \pm 0.1	5.534 \pm 0.056	5.544 \pm 0.081
Kontrol ARPE-19	5.414 \pm 0.04	5.376 \pm 0.089	5.422 \pm 0.1	5.448 \pm 0.01	5.434 \pm 0.03	5.411 \pm 0.039	5.42 \pm 0.046
SiO ₂ ARPE-19	5.518 \pm 0.032	5.556 \pm 0.04	5.562 \pm 0.055	5.462 \pm 0.07	5.492 \pm 0.064	5.498 \pm 0.042	5.505 \pm 0.041

Tablo 4.3.7: Şekil 4.1 ve 4.2'ler için; MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon akım sinyallerinin pencereleli ölçek indekslerinin ortalamaları (ort.) ve standart sapma (sd.) değerleri. Ayrıca belli voltajlarda pencereleli ölçek indekslerinin aldığı değerler.

Pencereleli Ölçek İndeksi		Ort. \pm Sd	-85 mV	-63 mV	-40 mV	-18 mV	5 mV	27 mV
MCF-7 Hücreleri	22122004	0.101 \pm 0.032	0.091	0.069	0.095	0.057	0.137	0.135
	22122005	0.218 \pm 0.292	0.068	0.040	0.101	0.107	0.109	0.143
	22122006	0.111 \pm 0.061	0.113	0.118	0.036	0.063	0.104	0.066
	22122008	0.089 \pm 0.046	0.053	0.024	0.068	0.052	0.106	0.098
	22122009	0.082 \pm 0.045	0.047	0.043	0.056	0.024	0.102	0.085
Kontrol Grubu ARPE-19	208070040	0.199 \pm 0.118	0.340	0.2806	0.173	0.116	0.084	0.078
	208070160	0.173 \pm 0.154	0.309	0.426	0.055	0.043	0.049	0.047
	208110680	0.110 \pm 0.087	0.190	0.398	0.051	0.067	0.037	0.047
50 μ g/mL SiO ₂ ARPE-19	208121090	0.106 \pm 0.055	0.156	0.142	0.054	0.069	0.064	0.078
	208123630	0.080 \pm 0.037	0.108	0.105	0.051	0.033	0.042	0.069
100 μ g/mL SiO ₂ ARPE-19	208120110	0.052 \pm 0.015	0.073	0.074	0.031	0.043	0.043	0.052
	208120350	0.052 \pm 0.011	0.071	0.053	0.034	0.050	0.060	0.035

Tablo 4.3.8: Pencereleli ölçek indeks değerlerinin (Tablo 4.3.7) genel özeti

Ölçek İndeksi	Genel Ort. (Ort. \pm Sd)	-85 mV (Ort. \pm Sd)	-63 mV (Ort. \pm Sd)	-40 mV (Ort. \pm Sd)	-18 mV (Ort. \pm Sd)	5 mV (Ort. \pm Sd)	27 mV (Ort. \pm Sd)
MCF-7	0.120 \pm 0.095	0.074 \pm 0.027	0.059 \pm 0.037	0.071 \pm 0.027	0.061 \pm 0.03	0.112 \pm 0.014	0.105 \pm 0.033
Kontrol ARPE-19	0.161 \pm 0.12	0.280 \pm 0.027	0.368 \pm 0.077	0.093 \pm 0.069	0.075 \pm 0.037	0.057 \pm 0.024	0.057 \pm 0.018
SiO ₂ ARPE-19	0.072 \pm 0.029	0.102 \pm 0.04	0.094 \pm 0.039	0.043 \pm 0.012	0.049 \pm 0.015	0.052 \pm 0.011	0.059 \pm 0.019

Tablo 4.3.9: MCF-7'deki EAG1 potasyum ve ARPE-19'daki TRP iyon kanallarının elektriksel iletkenlik ve denge potansiyel değerleri.

MCF-7 EAG1 Potasyum ve RPE-TRP İyon Kanalları	Kanal İletkenliği (pS) ($\sigma = \Delta I / \Delta V$)	Doğru Denklemi I(V)= σ V+c	Hücresinin I=0'daki Denge Potansiyeli (mV)	
MCF-7 Hücreleri	22122004	2830	I(V)=2.83V+131.32	-46.40
	22122005	2660	I(V)=2.66V+127.27	-47.85
	22122006	2580	I(V)=2.58V+119.82	-46.44
	22122008	2770	I(V)=2.77V+136.84	-49.40
	22122009	2480	I(V)=2.48V+128.45	-51.79
Kontrol Grubu ARPE-19	208070040	3410	I(V)=3.41V-12.82	3.76
	208070160	10020	I(V)=10.02V+24.90	-2.49
	208110680	5740	I(V)=5.74V+2.47	-0.43
50 μ g/mL SiO ₂ ARPE-19	208121090	1090	I(V)=1.09V+5.23	-4.80
	208123630	510	I(V)=0.51V-2.64	5.18
100 μ g/mL SiO ₂ ARPE-19	208120110	220	I(V)=0.22V+3.21	-14.59
	208120350	140	I(V)=0.14V+8.22	-58.71

5. TARTIŞMA

Hücre zarındaki iyon kanallarının işlevlerini ve karakteristik özelliklerini değerlendirmek için klasik olarak kullanılan yöntem iyon kanallarının elektriksel iletkenliğini ölçmektir. Kavramsal çerçeve kısmında belirtildiği gibi iyon kanallarının elektriksel iletkenlik kaybının (veya artışının) patolojik duruma işaret etmesi, bu yöntemin yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Ancak bu yöntem ile potansiyel değişimlerine göre hücrenin fizyolojik davranışları hakkında bilgi elde edilemiyor. Çünkü hücre içi ve dışındaki iyonların konsantrasyon dağılımları süreç içinde potansiyel değişimlerine bağlı olarak değişir.[4, 34]. Dolayısıyla, elektriksel iletkenlik ölçümü ile hücredeki potansiyel değişimlerine göre bu iyonların konsantrasyon dağılımları takip edilemez.

Bu çalışmada tümör ve normal hücrelerin elektriksel özelliklerini analiz etmek ve hücrenin fizyolojik davranışlarını izlemek için bazı doğrusal olmayan yöntemleri kullanıldı. Bu yöntemler en büyük Lyapunov üsteli, entropi (örnek entropi ve skalogram entropi) ve skalogram ölçek indeksidir. Whole cell patch-clamp tekniği ile farklı potansiyel değerler için kaydedilmiş hücre zarı akım sinyallerinin Lyapunov üstelleri, entropi ve ölçek indeks değerleri bulgular kısmında hesaplandı. Tümör ve normal hücreleri karşılaştırılmasını yapmak için de bu hesaplamalar aynı aralık ve ölçek içinde yapıldı.

En büyük Lyapunov üsteli ile bir sistemin ‘başlangıç koşullarına olan duyarlılığı’ veya ‘kaotik durumu’ ölçülür. Bulgular kısmındaki Lyapunov üsteli spektrumları, potansiyel değişimlerin hücrenin kaotik durumu üzerindeki etkisini gösteriyor. Şekil 4.1-4.2 ve Tablo 4.3.1-2’de gösterildiği gibi; tümör ve normal hücreler için hesaplanan *en büyük Lyapunov üstelleri* sıfırdan çok büyük değerlere sahipler. Bu da sistemin kaotik olduğunu dolayısıyla hücrelerin davranışlarını önceden kestirmenin çok güç olduğunu söylüyor. MCF-7 ve ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda olanları hemen hemen aynı kaotik derecelere sahipler. Ancak, 50 ve 100 µg/mL SiO₂ nano parçacık konsantrasyonların uygulandığı ARPE-19 hücreler için hesaplanan en büyük Lyapunov üstellerinin ise arttığını grafiklerde ve Tablo 4.3.1-2’de görülmüyor. Bu sonuçlara göre, genel anlamda şöyle bir eşitsizlik yazılabilir: $(LYP)_{MCF-7} \approx (LYP)_{ARPE-19} < (LYP)_{SiO_2-ARPE-19}$.

Entropi bir sistemin karmaşıklık ve düzensizlik durumunu ölçer. Kavramsal çerçeve kısmında da anlatıldığı gibi entropi olasılık dağılımına dayalı bir hesaplama yöntemidir. Hücredeki iyonların konsantrasyon dağılımları potansiyel değişimlerine bağlı olarak değişir. Bu nedenle, potansiyele bağlı entropi ölçüm grafikleri hücrenin fizyolojik davranışı hakkında bilgi almamıza yardımcı olabilir. Bulgular kısmında iki farklı entropi hesaplama yöntemini kullanıldı.

MCF-7 EAG1 potasyum iyon akımları için çizilen Şekil 4.1.2(b), 4(b), 6(b), 8(b) ve 10(b)'deki grafikler potansiyele göre çizilmiş *örnek entropi* spektrumlarını gösteriyor. Tablo 4.3.3-4'de ise bu grafiklerde hesaplanan 'ortalama örnek entropi' değerlerine yer verildi. Tüm bu sonuçlar hata payı içinde örnek entropi değerlerinin birbirlerine yakın olduğunu gösteriyor. Tümör hücreleri için elde edilen bu sonuçları, normal ARPE-19 kontrol grubu için çizilmiş Şekil 4.2.1(c)-3(c)'deki TRP iyon kanallarının akım sinyallerinin 'örnek entropi' değerleri ile karşılaştırıldığında ise düşük görünüyorlar. Buna karşılık, kontrol ARPE-19 grubuna göre, ARPE-19 hücrelerine uygulanan SiO₂ nano parçacıklarının 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonları için hesaplanan örnek entropi değerlerinin de arttığını Şekil 4.2.4(c)-7(c) ve Tablo 4.3.3-4'de görülüyor. Örnek entropi sonuçlarını, genel anlamda şöyle bir eşitsizlik ile ifade edilebilir: $(SampEn)_{MCF-7} < (SampEn)_{ARPE-19} < (SampEn)_{SiO_2-ARPE-19}$.

MCF-7 EAG1 potasyum iyon akımları için çizilen Şekil 4.1.2(c), 4(c), 6(c), 8(c) ve 10(c)'deki grafikler potansiyele göre çizilmiş *skalogram entropi* spektrumlarını gösteriyor. Bu grafiklerde -20 mV'dan küçük potansiyelerde skalogram entropi değerlerinin belirli bir seviyede seyrederken -20 mV'dan sonra arttığı görülüyor. -20 mV'dan sonraki bu entropi değerlerini ARPE-19 kontrol grubu için çizilmiş Şekil 4.2.1(d)-3(d)'deki 'pencereli skalogram entropi' ile karşılaştırıldığında ise değerler yüksek görünüyor. Bu sonuçlara göre, MCF-7 hücrelerinin -20 mV'dan büyük potansiyelerde ARPE-19 kontrol grubundaki hücelere göre farklı tepki vermeye başladığı söylenebilir. Tablo 4.3.5-6'da ise, MCF-7 grafiklerde hesaplanan 'ortalama skalogram entropi' değerlerini gösteriyor. Bu ortalamaların hata payları yüksek olduğu için ARPE-19 hücrelerinin ortalama sonuçları ile karşılaştırılması yapılmadı. *Sonuç olarak*; pozitif potansiyelerde tümör hücrelerinin (MCF-7) entropisi yüksek görülüyor ve bu entropi değerlerinden fazla bir düşüş yaşanmıyor. Oysa pozitif potansiyelerde normal hücrelerin (ARPE-19 kontrol grubun) entropisi yükselse bile düşebiliyor, normal hücreler bu entropi yükselişlerine tepki veriyor. Skalogram entropisine göre, pozitif potansiyelerde tümör hücrelerinin normal hücreye göre daha fazla düzensiz olduğu görülüyor. Genel anlamda elde

edilen sonuçları şöyle özetleyebiliriz. Negatif potansiyelerde skalogram entropi için, $(WS)_{MCF-7} \approx (WS)_{ARPE-19} < (WS)_{SiO_2-ARPE-19}$ bir eşitsizlik yazılabilir. Bu sonuçlar Lyapunov üsteli ve örnek entropi sonuçları ile uyumludur. Pozitif potansiyelerde skalogram entropi için ise de, $(WS)_{ARPE-19} < (WS)_{SiO_2-ARPE-19} < (WS)_{MCF-7}$ bir eşitsizlik yazılabilir.

RPE kontrol grubu için *pencereli skalogram entropi* değerlerinin -40 mV'dan büyük potansiyelerde arttığı Şekil 4.2.1(d)-3(d)'de görülüyor. RPE hücrelere uygulanan SiO₂ nano parçacıklarının 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında ise, -40 mV'dan küçük potansiyelerdeki pencereli skalogram entropi değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ve -40 mV'dan sonra ise bu entropi değerlerinin azaldığı Şekil 4.2.4(d)-7(d)'de görülüyor. Tablo 4.3.5-6'da ise kontrol grubuna göre SiO₂ nano parçacıklara maruz kalan RPE hücrelerinin pencereli skalogram entropi değerlerinin arttığı söylenebilir. Böylelikle SiO₂ nano parçacıklara maruz kalan RPE hücrelerin kontrol grubuna göre farklı davranabildiğini pencereli skalogram entropi yöntemi ile tahmin edilebilir. *Voltaj < -40 mV* değerler için, $(WS)_{ARPE-19} < (WS)_{SiO_2-ARPE-19}$ bir eşitsizlik yazılabilir.

Yapılan bir deneysel çalışmada [114], SiO₂ nano parçacıklara maruz bırakılan ARPE-19 hücrelerde apoptoza giren hücre oranının arttırdığı tespit edilmiştir. SiO₂ nano parçacıkların ARPE-19 hücrelerin entropisini (düzensizliğini) artırması bu deneysel sonuçlar [114] ile uyumludur. Çünkü canlılar yaşamlarını sürdürebilmeleri için düşük entropi durumlarını korumak zorundalar [90, 91]. Bu nedenle, düşük entropi durumunu koruyamayan hücrelerin apoptoza yönelmesi beklenen bir durumdur.

Pencereli ölçek indeksi zamana bağlı olarak sinyalin aperiodyklik derecesini ölçer. Bulgular kısmında gösterilen ölçek indeks spektrumları ve Tablo 4.3.7-8 incelendiğinde elde edilen sonuçlar pencereli skalogram entropi sonuçları bazı yönler ile paralel olduğu görülüyor.

Tablo 4.3.9'e göre, tümör hücresi MCF-7 EAG1 Potasyum iyon kanallarının iletkenlik ortalaması 2664 ± 141 pS değerindedir. Elde edilen doğru denklemden faydalanarak MCF-7 EAG1 Potasyum iyon denge ($I=0$ 'daki) potansiyellerin ortalaması -48.38 ± 2.27 mV olarak hesaplandı. Herhangi bir normal hücre potasyum (K⁺) iyon için hesaplan Nernst denge potansiyeli ise -96 ile -84 mV aralığındadır [4, 34]. Sonuç olarak, ikisinin de iyon denge potansiyelleri arasında büyük bir fark olduğu görülüyor. Denge potansiyelin değişmesi

durumu, normal hücreye göre kanser hücredeki iyonlarının konsantrasyon dağılımlarının bozulduğunu gösterir. Ayrıca, hücre iyon potansiyel dengesi ile iyon kanallarının sağlıklı çalışıp çalışmadığı kontrol edilebilir. Diğer yandan, Tablo 4.3.9'da, ARPE-19 kontrol grubuna göre SiO₂ nano parçacıklara maruz kalan ARPE-19 hücrelerin denge potansiyeli değiştiği görülüyor. Bu sonuçlar hücrelerin denge potansiyellerinin ayırt edici bir özellik olarak kullanılabileceğini gösteriyor.

Bu tezde, verilerin Gauss normal dağılımına uyduğu varsayılarak yapılan özet istatistikler (ortalama, varyans, doğrusal kovaryans ilişkileri, frekans bileşenleri) yöntemleri kullanılmadı. Çünkü biyolojik sistemler Gauss normal dağılımdan çok 'q- Gauss dağılım istatistiğine uyarlar [101, 102]. Bu nedenle, iyon akım sinyallerin normal dağılımları üzerinden karşılaştırmalar yapılmadı. Diğer yandan, özet istatistikler ile biyolojik dinamik sistemlerin süreç analizi yapılamamaktadır. Bundan dolayı, dinamik sistemlerin süreç analizinde kullanılmak üzere geliştirilen doğrusal olmayan parametreler bu çalışmada tercih edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Whole cell patch-clamp tekniği ile tümör hücresi MCF-7 ve normal ARPE-19 hücre kültürlerinden kaydedilmiş membran iyonik akım sinyallerinin analizlerinden elde edilen sonuçlara göre;

- 1) Tümör ve normal hücreler için hesaplanan *en büyük Lyapunov üstelleri (LYP)* sıfır değerinden çok büyükler. Bu da hücre yapılarının kaotik olduğunu ve dolayısıyla hücre davranışlarını önceden kestirmenin çok güç olduğunu gösteriyor. Lyapunov sonuçlarını, genel anlamda bir eşitsizlik ile özetlenebilir: $(LYP)_{MCF-7} \approx (LYP)_{ARPE-19} < (LYP)_{SiO_2-ARPE-19}$.
- 2) Örnek entropi (*SampEn*) sonuçları Lyapunov üstelleri ile benzer sonuçlar veriyor. Örnek entropi sonuçlarını, genel anlamda bir eşitsizlik ile özetlenebilir: $(SampEn)_{MCF-7} < (SampEn)_{ARPE-19} < (SampEn)_{SiO_2-ARPE-19}$.
- 3) Skalogram entropi (*WS*) sonuçlarını genel anlamda özetlersek: Negatif potansiyellerde, $(WS)_{MCF-7} \approx (WS)_{ARPE-19} < (WS)_{SiO_2-ARPE-19}$ bir eşitsizlik yazılabilir. Bu eşitsizlik Lyapunov üsteli ve örnek entropi sonuçları ile uyumludur. Positif potansiyellerde ise de, $(WS)_{ARPE-19} < (WS)_{SiO_2-ARPE-19} < (WS)_{MCF-7}$ bir eşitsizlik yazılabilir. Kontrol ARPE-19 ve SiO₂ nano parçacıklara maruz kalan ARPE-19 hücrelerden elde edilen sonuçlarda; *Voltaj* < -40 mV değerler içi, $(WS)_{ARPE-19} < (WS)_{SiO_2-ARPE-19}$ bir eşitsizlik yazılabilir.
- 4) Bu analizde, *pencereli skalogram entropi* yönteminin *örnek entropiye* göre daha iyi çalıştığı görülüyor. Ayrıca, skalogram entropi yönteminden elde edilen sonuçlar maksimum entropi ile karşılaştırılabilir. Bilindiği gibi, canlıların entropisi çevrelerine göre daha düşüktür [90, 91]. Çünkü canlılar yaşamlarını sürdürebilmeleri için düşük entropi durumlarını korumak zorundalar. Maksimum entropi ile karşılaştırılan grafiksel sonuçlar bu genel varsayımı doğruluyor. Grafikler incelendiğinde, voltaj değerlerinin düzenli olarak artırılmasına rağmen normal ARPE-19 hücrelerin entropi artışlarının belli bir seviyeden sonra düşürdüğünü görüyoruz. Ancak tümör hücresi MCF-7 pozitif voltaj değerlerindeki entropi artışlarını düşüremiyor ve bu entropi

değerleri normal ARPE-19'a göre de yüksek görünüyor, dolayısıyla MCF-7 normal ARPE-19 hücresinin verdiği tepkiyi gösteremiyor.

- 5) Akım-potansiyel grafiğinde elde edilecek doğru denkleminde, hücrelerin iyon denge potansiyeli hesaplanabilir. Hesaplanan MCF-7 EAG1 potasyum iyon dengesi ($\approx -50 \text{ mV}$) herhangi bir normal hücre Nernst potasyum iyon dengesine ($[-96 \text{ mV}, -84 \text{ mV}]$) göre çok farklı görülüyor. Nernst denge potansiyelin değişmesi durumu, normal hücreye göre kanser hücresindeki iyonların konsantrasyon dağılımlarının bozulduğunu gösterir. Ayrıca, potansiyel iyon dengesi ile iyon kanallarının sağlıklı çalışıp çalışmadığını kontrol etmeyi sağlayabilir. Diğer yandan, ARPE-19 kontrol grubu göre, $100 \mu\text{g/mL}$ SiO_2 nano parçacıklara maruz kalan ARPE-19 hücrelerin denge potansiyelinin de değiştiği görülmektedir. Bu durum ilaçların hücre üzerindeki etkilerinin denge potansiyeli üzerinden de kontrol edilebileceğini gösteriyor.

Genel anlamda ise aşağıdaki sonuç ve öneriler çıkarılabilir;

- a) Potansiyel değişimlerinin neden olduğu hücre davranışları (veya dinamiği) nonlineer yöntemler ile izlenebilir.
- b) Tümör ile normal hücreler arasındaki davranış farklılıkları tespit etmek için nonlineer yöntemler kullanılabilir.
- c) İlaçların hücre üzerindeki etkilerini araştırmak için zamana bağlı nonlineer yöntemlerden faydalanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] K. Gediz Akdeniz, 2019. *Bilim Felsefesi Ders Notları*. İstanbul Üniversitesi Fizik Bölümü. <https://www.gedizakdeniz.com> (Ziyaret tarihi: 17.08.2022)
- [2] Mateos, J. L., 2009. *Complex systems and non-linear dynamics*. Fundamentals of Physics -Volume I, 356.
- [3] Gell-Mann, M., 2002. *What is complexity?* In Complexity and industrial clusters. Physica-Verlag HD. pp. 13-24.
- [4] Bruce Alberts, et al. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. 6th edn. Garland Science, New York. ISBN:978-0-8153-4432-2.
- [5] Sontheimer, H. 1995. *Whole-cell patch-clamp recordings*. In Patch-clamp applications and protocols (pp. 37-73). Humana Press, Totowa, NJ. ISBN:978-0-89603-311-5
- [6] Akıllı, M., & Yılmaz, N., 2021. *Windowed scalogram entropy: wavelet-based tool to analyze the temporal change of entropy of a time series*. The European Physical Journal Plus, 136(11), 1-14.
- [7] Richman, J. S., & Moorman, J. R., 2000. *Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 278(6), H2039-H2049.
- [8] Bolos, V. J., Benitez, R., & Ferrer, R., 2020. *A new wavelet tool to quantify non-periodicity of non-stationary economic time series*. Mathematics, 8(5), 844.
- [9] Wolf, A., Swift, J. B., Swinney, H. L., & Vastano, J. A., 1985. *Determining Lyapunov exponents from a time series*. Physica D: nonlinear phenomena, 16(3), 285-317.
- [10] Sperelakis, N. 2001. *Cell physiology source book: a molecular approach*. 6th edn. Academic Press, London.
- [11] Wright, S. H. 2004. *Generation of resting membran epotential*. Advances in physiology education, 28(4), 139-142.
- [12] Franco, R., Bortner, C. D., & Cidlowski, J. A. 2006. *Potential roles of electro genic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis*. The Journal of membrane biology, 209(1), 43-58.

- [13] Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. 1981. *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflügers Archiv, 391(2), 85-100.
- [14] Sakmann, B., & Neher, E. 1984. *Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes*. Annual review of physiology, 46, 455-472.
- [15] Neher, E., & Sakmann, B. 1992. *The patch clamp technique*. Scientific American, 266(3), 44-51.
- [16] Molleman, A. 2003. *Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology*. John Wiley & Sons. ISBN: 0 471 48685 X.
- [17] Pranav Kumar, 2021. *Biophysics and Molecular Biology*, 4th edn. (pp. 129-133). Pathfinder Publication, New Delhi, India. ISBN: 978-93-80473-15-4
- [18] Hodgkin, A., Huxley, A. 1952. *Current carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo*. J. Physiol. (Lond.) 116, 449-472.
- [19] Saygın, M., Nazıroğlu, M., & Çalışkan, S. 2009. *Patch-Clamp'in elektrofizyolojik uygulamalarında son gelişmeler*. Journal of Experimental and Clinical Medicine, 26(4), 148-152.
- [20] Düzgün Ergün, D. & Dursun, Ş. (2018). *Patch Clamp Yönteminin Biyofiziksel Prensipleri ve Tıpta Kullanımı*. Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi, 1 (1), 93-108.
- [21] Yener Yazgan. 2016. *Ovariyektomize sıçan arka kök ganglion TRPV1 kanalları üzerinde östrojenin etkisinin patch-clamp tekniği ile araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik A.D., Isparta.
- [22] Ömer Çelik. 2011. *Oksidatif stresle aktive edilen TRPM2 katyon kanallarının inaktivasyonunda melatoninin etkisinin patch-clamp sistemi ile araştırılması*. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik A.D., Isparta.
- [23] Fatma Söğüt. 2014. *İmipramine'in Prostat Kanseri Potasyum Kanal Kinetikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması*. Doktora Tezi. Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik A.D., Mersin.
- [24] Davie, J. T., Kole, M. H., Letzkus, J. J., Rancz, E. A., Spruston, N., Stuart, G. J., & Häusser, M., 2006. *Dendritic patch-clamp recording*. Nature protocols, 1(3), 1235-1247.

- [25] Chen, K., Featherstone, D. E., & Broadie, K., 2009. *Electrophysiological recording in the Drosophila embryo*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (27), e1348.
- [26] Oliva, C., Cohen, I. S., & Mathias, R. T., 1988. *Calculation of time constants for intracellular diffusion in whole cell patch clamp configuration*. Biophysical journal, 54(5), 791-799.
- [27] Mathias, R. T., Cohen, I. S., & Oliva, C., 1990. *Limitations of the whole cell patch clamp technique in the control of intracellular concentrations*. Biophysical Journal, 58(3), 759-770.
- [28] Covey, E., Kauer, J. A., & Casseday, J. H., 1996. *Whole-cell patch-clamp recording reveals subthreshold sound-evoked postsynaptic currents in the inferior colliculus of awake bats*. Journal of Neuroscience, 16(9), 3009-3018.
- [29] Kirichok, Y., Navarro, B., & Clapham, D. E., 2006. *Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel*. Nature, 439(7077), 737-740.
- [30] Karmažinová, M., & Lacinová, L., 2010. *Measurement of Cellular Excitability by Whole Cell Patch Clamp*. Physiol. Res, 59(1), S1-S7.
- [31] Noguchi, A., Ikegaya, Y., & Matsumoto, N., 2021. *In Vivo Whole-Cell Patch-Clamp Methods: Recent Technical Progress and Future Perspectives*. Sensors, 21(4), 1448.
- [32] Sakmann, B., & Neher, E. 1983. *Geometric parameters of pipettes and membrane patches. In Single-channel recording*. Springer, (pp. 37-51). Boston, MA. ISBN : 978-1-4615-7860-4.
- [33] *pCLAMP 10 Data Acquisition and Analysis Software User Guide*. 2016. Molecular Devices, LLC. California, USA.
- [34] Ferit Pehlivan. 2019. *Biyofizik Kitabı*, 10. Baskı. Pelikan Kitabevi. Ankara. ISBN:978-605-5529-45-1
- [35] Choi, B. G., Hong, J., Park, Y. C., Jung, D. H., Hong, W. H., Hammond, P. T., & Park, H., 2011. *Innovative polymer nanocomposite electrolytes: nanoscale manipulation of ion channels by functionalized graphenes*. ACS nano, 5(6), 5167-5174.
- [36] Ashcroft, F. M., 1999. *Ion channels and disease*. Academic Press. London. ISBN:0-12-065310-9

- [37] Lehmann-Horn, F., & Jurkat-Rott, K., 1999. *Voltage-gated ion channels and hereditary disease*. *Physiological reviews*, 79(4), 1317-1372.
- [38] Kasianowicz, J. J., 2012. *Introduction to ion channels and disease*. *Chemical Reviews*, 112(12), 6215-6217.
- [39] Amin, A. S., Tan, H. L., & Wilde, A. A., 2010. *Cardiac ion channels in health and disease*. *Heart Rhythm*, 7(1), 117-126.
- [40] Lin, H. A. I., Bhatia, R., & Lal, R., 2001. *Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology*. *The FASEB Journal*, 15(13), 2433-2444.
- [41] Sögüt, F., Çömelekoğlu, Ü., Dervişoğlu, H., Eroğlu, P., Yalin, S., & Yılmaz, N. Ş., 2022. *Effect of imipramine on ether α -go-go potassium channel (Kv1. 10) expression in DU145 prostate cancer cells*. *Andrologia*, 54(1), e14291.
- [42] İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, 1990. *Biyofizik Ders Notları*, ikinci baskı. İstanbul.
- [43] Lehmann-Horn, F., & Jurkat-Rott, K., 1999. *Voltage-gated ion channels and hereditary disease*. *Physiological reviews*, 79(4), 1317-1372.
- [44] Jean-Yves, L. G., Halima, O. A., Olivier, S., Pierre, B., Ahmed, A., & Christophe, V., 2007. *Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research*. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 2(3), 189-202.
- [45] Fiske, J. L., Fomin, V. P., Brown, M. L., Duncan, R. L., & Sikes, R. A., 2006. *Voltage-sensitive ion channels and cancer*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), 493-500.
- [46] Roger, S., Potier, M., Vandier, C., Besson, P., & Le Guennec, J. Y., 2006. *Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy?* *Current pharmaceutical design*, 12(28), 3681-3695.
- [47] Pardo, L. A., & Stühmer, W., 2008. *Eag1: an emerging oncological target*. *Cancer research*, 68(6), 1611-1613.
- [48] Pardo, L. A., Contreras-Jurado, C., Zientkowska, M., Alves, F., & Stühmer, W., 2005. *Role of voltage-gated potassium channels in cancer*. *The Journal of membrane biology*, 205(3), 115-124.

- [49] Kunzelmann, K., 2005. *Ion channels and cancer*. The Journal of membrane biology, 205(3), 159-173.
- [50] Bödding, M., 2007. *TRP proteins and cancer*. Cellular signalling, 19(3), 617-624.
- [51] Li, M., & Xiong, Z. G. (2011). *Ion channels as targets for cancer therapy*. International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology, 3(2), 156.
- [52] Kabra, M., & Pattnaik, B. R., 2020. *Sensing through non-sensing ocular ion channels*. International Journal of Molecular Sciences, 21(18), 6925.
- [53] Emre M., 2020. *Potasyum İyon Kanallarının Yapısı ve Genel Özellikleri*. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 29(4): 276-290.
- [54] Villalonga, N., Ferrere, J. C., Argiles, J. M., Condom, E., & Felipe, A., 2007. *Potassium channels are a new target field in anticancer drug design*. Recent patents on anti-cancer drug discovery, 2(3), 212-223.
- [55] Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, Stuhmer W., 1999. *Oncogenic potential of EAG K(+) channels*. EMBO J. 18:5540–5547.
- [56] Pardo LA., 2004. *Voltage-gated potassium channels in cell proliferation*. Physiology (Bethesda). 19:285–292.
- [57] Stuhmer W, Alves F, Hartung F, Zientkowska M, Pardo LA., 2006. *Potassium channels as tumour markers*. FEBS Lett. 580:2850–2852.
- [58] Wadhwa S, Wadhwa P, Dinda AK, Gupta NP., 2009. *Differential expression of potassium ion channels in human renal cell carcinoma*. Int Urol Nephrol. 41:251–257.
- [59] Lehmann-Horn, F., & Jurkat-Rott, K., 1999. *Voltage-gated ion channels and hereditary disease*. Physiological reviews, 79(4), 1317-1372.
- [60] De Coursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S., & Cahalan, M. D., 1985. *Voltage-dependent ion channels in T-lymphocytes*. Journal of neuroimmunology, 10(1), 71-95.
- [61] Diss, J. K. J., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. B. A., 2004. *Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects*. European Biophysics Journal, 33(3), 180-193.

- [62] Fraser, S. P., Diss, J. K., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., ... & Djamgoz, M. B., 2005. *Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis*. *Clinical cancer research*, 11(15), 5381-5389.
- [63] Wingo, Phyllis A., et al., 1996. *Cancer statistics for African Americans, 1996*. CA: a cancer journal for clinicians 46.2, 113-125.
- [64] Brackenbury WJ, Djamgoz MB., 2006. *Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line*. *J Physiol*. 573:343–356.
- [65] Fraser, S. P., Diss, J. K., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., ... & Djamgoz, M. B., 2005. *Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis*. *Clinical cancer research*, 11(15), 5381-5389.
- [66] Roger, S., Besson, P., & Le Guennec, J. Y., 2003. *Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1616(2), 107-111.
- [67] Fraser, S. P., Diss, J. K., Lloyd, L. J., Pani, F., Chioni, A. M., George, A. J., & Djamgoz, M. B., 2004. *T-lymphocyte invasiveness: Control by voltage-gated Na⁺ channel activity*. *FEBS letters*, 569(1-3), 191-194.
- [68] Blandino, J. K. W., Viglione, M. P., Bradley, W. A., Oie, H. K., & Kim, Y. I., 1995. *Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG*. *The Journal of membrane biology*, 143(2), 153-163.
- [69] Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P. I., Iochmann, S., ... & Le Guennec, J. Y., 2007. *Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(4), 774-786.
- [70] Fulgenzi, G., Graciotti, L., Faronato, M., Soldovieri, M. V., Miceli, F., Amoroso, S., ... & Tagliatela, M., 2006. *Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(7), 1146-1159.

- [71] Diaz, D., Delgadillo, D. M., Hernández-Gallegos, E., Ramírez-Domínguez, M. E., Hinojosa, L. M., Ortiz, C. S., ... & Gomora, J. C., 2007. *Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer*. Journal of cellular physiology, 210(2), 469-478.
- [72] Emre M., 2018. *Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları ve Moleküller Özellikleri*. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 27(1): 1-17.
- [73] Bezanilla, F. (2000). *The voltage sensor in voltage-dependent ion channels*. Physiological reviews, 80(2), 555-592.
- [74] Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J., 2005. *Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated calcium channels*. International union of pharmacology. XLVIII. Pharmacol Rev, 57(4), 411-425.
- [75] Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevée, N., Rossier, M. F., & Prevarskaya, N., 2002. *Overexpression of an $\alpha 1H$ ($CaV3. 2$) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells*. Journal of Biological Chemistry, 277(13), 10824-10833.
- [76] Wang, X. T., Nagaba, Y., Cross, H. S., Wrba, F., Zhang, L., & Guggino, S. E., 2000. *The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon*. The American Journal of Pathology, 157(5), 1549-1562.
- [77] Qgura, M., Griesmann, G. E., Wieben, E. D., Slaymaker, S. J., Snutch, T. P., & Lennon, V. A., 1992. *Molecular diversity of neuronal-type calcium channels identified in small cell lung carcinoma*. In Mayo Clinic Proceedings, 67(12), pp. 1150-1159.
- [78] Samanta, A., Hughes, T. E., & Moiseenkova-Bell, V. Y., 2018. *Transient receptor potential (TRP) channels*. Membrane protein complexes: Structure and function, 141-165.
- [79] Clapham, D. E., 2003. *TRP channels as cellular sensors*. Nature, 426(6966), 517-524.
- [80] Means, A. R., 1994. *Calcium, calmodulin and cell cycle regulation*. FEBS letters, 347(1), 1-4.
- [81] Jiang, J., Li, M. H., Inoue, K., Chu, X. P., Seeds, J., & Xiong, Z. G., 2007. *Transient receptor potential melastatin 7–like current in human head and neck carcinoma cells: role in cell proliferation*. Cancer Research, 67(22), 10929-10938.

- [82] Prevarskaya, N., Zhang, L., & Barritt, G., 2007. *TRP channels in cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. Molecular Basis of Disease, 1772(8), 937-946.
- [83] Zhang, L., & Barritt, G. J., 2006. *TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function?* Endocrine-related cancer, 13(1), 27-38.
- [84] Gibbs, J. W., 1902. *Elementary principles in statistical mechanics: developed with especial reference to the rational foundations of thermodynamics*. C. Scribner's sons.
- [85] Penrose, O., 2005. *Foundations of statistical mechanics: a deductive treatment*. Courier Corporation.
- [86] Gray, R. M., 2011. *Entropy and information theory*. Springer Science & Business Media.
- [87] Shannon, C. E., 1948. *A mathematical theory of communication*. The Bell system technical journal, 27(3), 379-423.
- [88] Jaynes, E. T., 1957. *Information theory and statistical mechanics*. Physical review, 106(4), 620.
- [89] Lineweaver, C. H., 2014. *The entropy of the universe and the maximum entropy production principle*. In Beyond the Second Law (pp. 415-427). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [90] Schroedinger, E., 1967. *What is life? (1944)*. SI: Cambridge UnivPress.
- [91] Himeoka, Y., & Kaneko, K., 2014. *Entropy production of a steady-growth cell with catalytic reactions*. Physical Review E, 90(4), 042714.
- [92] Kreeger, P. K., & Lauffenburger, D. A., 2010. *Cancer systems biology: a network modeling perspective*. Carcinogenesis, 31(1), 2-8.
- [93] Yalçın, G.Ç., 2005. *Kaotik Fiziksel Sistemler ve Acayip Çekiciler*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [94] Akıllı, M., 2009. *Kaotik bir fiziksel sistemde Lyapunov üstelleri ve q-istatistik*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [95] Haykin, S. (Ed.), 2006. *Nonlinear methods of spectral analysis* (Vol. 34). Springer Science & Business Media.
- [96] Chen, Weiting, et al., 2007. *Characterization of surface EMG signal based on fuzzy entropy*. IEEE Transactions on neural systems and rehabilitation engineering 15.2, 266-272.

- [97] Rosso, Osvaldo A., et al., 2001 *Wavelet entropy: a new tool for analysis of short duration brain electrical signals*. Journal of neuroscience methods 105.1, 65-75.
- [98] Lin, Shao-Zhen, et al., 2020. *Universal statistical laws for the velocities of collective migrating cells*. Advanced Biosystems 4.8, 2000065.
- [99] Dinicola, Simona, et al., 2011. *A systems biology approach to cancer: fractals, attractors, and nonlinear dynamics*. Omics: a journal of integrative biology 15.3, 93-104.
- [100] Donzé, Alexandre, Gilles Clermont, and Christopher J. Langmead., 2010. *Parameter synthesis in nonlinear dynamical systems: Application to systems biology*. Journal of Computational Biology 17.3
- [101] Tsallis, C., 1988. *Possible generalization of Boltzmann-Gibbs statistics*. Journal of statistical physics, 52(1), 479-487.
- [102] Beck, C., & Cohen, E. G. (2003). *Superstatistics*. Physica A: Statistical mechanics and its applications, 322, 267-275.
- [103] S. Mallat, 1999. *A wavelet tour of signal processing*. Academic Press, London.
- [104] Benítez, R., Bolós, V. J., & Ramírez, M. E., 2010. *A wavelet-based tool for studying non-periodicity*. Computers & Mathematics with Applications, 60(3), 634-641.
- [105] Xiong, W., Faes, L., & Ivanov, P. C., 2017. *Entropy measures, entropy estimators, and their performance in quantifying complex dynamics: Effects of artifacts, nonstationarity, and long-range correlations*. Physical Review E, 95(6), 062114.
- [106] Akilli, M., Yilmaz, N., & Akdeniz, K. G., 2019. *Study of the q-Gaussian distribution with the scale index and calculating entropy by normalized inner scalogram*. Physics Letters A, 383(11), 1099-1104.
- [107] Bolós, V. J., Benítez, R., Ferrer, R., & Jammazi, R., 2017. *The windowed scalogram difference: a novel wavelet tool for comparing time series*. Applied Mathematics and Computation, 312, 49-65.
- [108] Yentes, J. M., Hunt, N., Schmid, K. K., Kaipust, J. P., McGrath, D., & Stergiou, N., 2013. *The appropriate use of approximate entropy and sample entropy with short data sets*. Annals of biomedical engineering, 41(2), 349-365.

- [109] Delgado-Bonal, A., & Marshak, A., 2019. *Approximate entropy and sample entropy: A comprehensive tutorial*. Entropy, 21(6), 541.
- [110] Sandri, M., 1996. *Numerical calculation of Lyapunov exponents*. Mathematica Journal, 6(3), 78-84.
- [111] Dingwell, J. B., 2006. *Lyapunov exponents*. Wiley encyclopedia of biomedical engineering.
- [112] Stefanowicz-Hajduk J& Ochocka JR., 2020. *Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: Usefulness and comparison with tetrazolium salt assays*. Toxicol Rep 7, 335-344.
- [113] Wimmers S. and Strauss O., 2007. *Basal calcium entry in retinal pigment epithelial cells is mediated by TRPC channels*. Invest Opht Vis Sci 48: 5767-5772.
- [114] Ayşe Hümeyra Kaynar 2021. *Silisyum Dioksit Nanoparçacıklarının İnsan Retinal Pigment Epitel Hücreleri Üzerine Etkisinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik A.D., Mersin.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TÜMÖR HÜCRESİ ÖZELLİKLERİNİN DOĞRUSAL OLMAYAN METODLAR İLE İNCELENME

ORJİNALLİK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**0**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

TÜM KAYNAKLARI EŞLEŞTİR (SADECE SEÇİLİ OLAN KAYNAĞI YAZDIR)

%2

★ Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart üzerinde

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Bu çalışmada kullandığımız MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) ve RPE (Retinal Pigment Epithelial) hücre hatları ticari olarak satın alındı. Bu nedenle çalışmak için etik kurul izni gerekmemektedir.

- Etik Kurul izni gerekmektedir.
- Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Mahmut AKILLI



KURUM İZİNİ YAZILARI

Bu çalışmada kullandığımız MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) ve RPE (Retinal Pigment Epithelial) hücre hatları ticari olarak satın alındı. Bu nedenle çalışmak için kurum izni gerekmemektedir

Kurum izni gerekmektedir.

Kurum izni gerekmemektedir.

Mahmut AKILLI