



TC.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**İN-VİTRO NÖRAL DEVRE ÇALIŞMALARI**

BETÜL POLAT BUDAK

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL- 2022

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (X)  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Betül POLAT BUDAK  
Tez Başlığı : İn-Vitro Nöral Devre Çalışmaları  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 10.01.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

### Kurumu

### İmza

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

### Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Lütfü HANOĞLU

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Muhammed İkbâl ALP

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç.Dr. Baha ZAFER

İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof.Dr. Halil Özcan GÜLÇÜR

Biruni Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun  
...../...../ ..... tarih ve ...../..... - ..... sayılı kararı ile şekil  
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Betül POLAT BUDAK

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince ve sonrasında desteğini eksik etmeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle cömertçe paylaşan, benim ve yüzlerce genç araştırmacının yetişmesine önayak olan tez danışmanım Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Bilimsel bakış açımı ve dağarcığımı zenginleştiren, çalışmalarımın yayına dönüşmesinde büyük emekleri olan, sabır ve sevgiyle gelişimimi takip eden hocam Prof. Dr. Halil Özcan Gülçür'e,

Ekip arkadaşlarım, gece gündüz demeden laboratuvarlarda, soğuk görüntüleme odalarında, evde, kafelerde, pandemide, karda, yağmurda kısacası her koşulda beraber çalıştığım F. Kemal Bayat ve Esra Nur Yiğit'e,

Beni hayatım boyunca dualarıyla, sözleriyle, sevgisiyle destekleyen, güçlendiren, besleyen her an yanımda olan anneciğim Ayten Polat'a

Her koşulda yanımda hissettiğim, bana güç veren, benimle beraber sabırla yürüyen, hayatıma anlam katan yol arkadaşım, eşim M.S. Buğrahan Budak'a sonsuz teşekkürlerimle...

## İTHAF

Canım oğlum, neşe kaynağımız, biricik Mustafa Gökbörü Budak'a ithafen...



## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU .....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İTHAF .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
<b>1. ÖZET .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>8</b>
4.1. Arka Kök Gangliyonu (AKG) Anatomisi .....	8
4.2. Primer Duysal Nöron (PDN).....	12
4.3. AKG Nöronların Nörokimyasal Özellikleri .....	13
4.4. AKG ve Ağrı Çalışmaları.....	16
4.5. AKG Destek Hücreleri: Satellitik Glial Hücreler.....	17
<b>5. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>23</b>
5.1. MEA Sistemi .....	23
5.1.1. Elektriksel kayıt sistemi .....	24
5.1.2. Elektriksel uyarı sistemi.....	25
5.2. Görüntüleme Sistemleri.....	25
5.2.1. Hoffman modülasyon kontrast mikroskobu.....	25
5.2.2. PALM inverted axio observer Z1 .....	25
5.2.3. Cell Observer Spinning-disk time-lapse mikroskobu .....	26

5.2.4.	LSM 780 Konfokal Mikroskop ve 793nm Kızılötesi lazer kaynağı ....	26
5.3.	Kullanılan Fare Hatları .....	27
5.3.1.	DNA izolasyonu ve genotipleme .....	27
5.4.	Hücre Kültürüne Hazırlık .....	29
5.4.1.	Hayatta kalım takibi için petri kaplarının hazırlanması .....	29
5.4.2.	Aktivite takibi için petri kaplarının hazırlanması.....	30
5.4.3.	MEA petri kaplarının hazırlanması .....	31
5.4.4.	Vasatların hazırlanması .....	32
5.5.	Hücre Kültürü.....	33
5.5.1.	AKG diseksiyonu .....	33
5.5.2.	AKG hücrelerinin elde edilmesi.....	34
5.5.3.	AKG hücrelerinin ekimi.....	35
5.6.	Ekim Yoğunluğuna Bağlı Aktivitenin Hayatta Kalmaya Etkisinin Araştırılması .....	36
5.6.1.	Ekim yoğunluğunun Hayatta Kalımla İlişkisinin Araştırılması.....	36
5.6.2.	Ekim Yoğunluğuna Bağlı Spontan Aktivitenin Araştırılması .....	37
	MEA ile spontan aktivite takibi .....	37
	Kalsiyum görüntüleme ile spontan aktivite takibi .....	38
5.6.3.	Görüntü analizi ve istatistik (1).....	40
5.7.	AKG Kültürlerinde Nöral Ağ Oluşumunun İncelenmesi.....	43
5.7.1.	Elektriksel uyarı protokolü.....	43
5.7.2.	Deney düzeneği.....	44
5.7.3.	Bağlantıların nörokimyasal olarak bloklanması.....	46
5.7.4.	İmmünohistokimya .....	47
5.7.5.	Görüntü analizi ve istatistik (2).....	47
5.8.	In-Vitro Nörit Transeksiyonuna SGH Hücrelerinin Akut Kalsiyum Yanıtı	49

5.8.1.	Deney düzeneği.....	49
5.8.2.	Gap junction ve P2X7R'lerin nörokimyasal olarak bloklanması .....	50
5.8.3.	İmaj analizi ve istatistik (3).....	50
5.9.	Malzeme Listesi .....	52
<b>6.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>53</b>
6.1.	Genotipleme Sonuçları .....	53
6.2.	Ekim Yoğunluğuna Dayalı Spontan Aktivitenin AKG Nöronlarının İn Vitro Hayatta Kalımına Etkisi .....	53
6.2.1.	Hayatta kalım ve aktivite takibi yapılacak örneklerde, hücreler yapıştı ve sağlıklı uzantılar gelişti .....	53
6.2.2.	Her ekim yoğunluğunda hayatta kalım zamanla azaldı. ....	56
6.2.3.	Ekim yoğunluğunun petride zamanla hayatta kalan hücre oranını etkilediği tespit edildi.....	58
6.2.4.	MEA takibi sonuçları .....	60
6.2.5.	Kalsiyum görüntüleme sonuçları .....	60
6.2.6.	Aktivitenin canlılıkla ilişkisi araştırıldı.....	65
6.3.	AKG Kültürlerinde Nöral Ağ Oluşumunun İncelenmesi.....	66
6.3.1.	Hücreler yapıştı, sağlıklı uzantılar oluşturdu ve gözlemlenecek yeterince GCaMP+ nöron elde edildi. ....	66
6.3.2.	Primer ve sekonder nöronlar tanımlandı .....	70
6.3.3.	Primer nöronların sekonder nöronların aktivitesini glutamaterjik bağlantılar yoluyla modüle ettiği gösterildi. ....	73
6.3.4.	Yüksek-dereceli (high-order) Sinaptik bağlantılar.....	76
6.3.5.	Sinapsların varlığı yapısal olarak doğrulandı.....	81
6.4.	In-Vitro Nörit Transeksiyonuna SGH Hücrelerinin Akut Kalsiyum Yanıtı	82
6.4.1.	Hücreler sağlıklı şekilde yapışıp akson uzattı.....	82



6.4.2.	Kalsiyum indikatörü yükleme işlemi sonrası nöron ve SGH hücreleri etkin bir şekilde boyandı.....	82
6.4.3.	Nörit transeksiyonuna hem nöral hem glial hücreler yanıt verdi.....	82
6.4.4.	SGH yanıtları kesilen nöronla kurdukları bağlar göz önünde bulundurularak tekrar değerlendirildi.....	88
<b>7.</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>94</b>
7.1.	Ekim Yoğunluğuna Dayalı Spontan Aktivitenin AKG Nöronlarının İn Vitro Hayatta Kalımına Etkisi.....	94
7.2.	AKG Kültürlerinde Nöral Ağ Oluşumunun İncelenmesi.....	97
7.3.	In-Vitro Nörit Transeksiyonuna SGH Hücrelerinin Kalsiyum Yanıtı.....	100
<b>8.</b>	<b>SONUÇ.....</b>	<b>105</b>
<b>9.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>107</b>
<b>10.</b>	<b>EKLER.....</b>	<b>117</b>
10.1.	Vasatların Hazırlanması.....	117
10.2.	Yeni Doğan Hipokampus Diseksiyonu.....	117
10.3.	Yeni Doğan Hipokampal Hücrelerin Elde Edilmesi.....	118
10.4.	Yeni Doğan Hipokampal Hücrelerin Ekimi.....	119
10.5.	Sonuçlar.....	120
10.5.1.	Hayatta kalım ve aktivite takibi yapılacak petrielerde, hücreler yapıştı ve sağlıklı uzantılar geliştirdi.....	120
10.5.2.	Her ekim yoğunluğunda hayatta kalım zamanla azaldı.....	123
10.5.3.	Ekim yoğunluğunun petride zamanla hayatta kalan hücre oranını etkilediği tespit edildi.....	124
10.5.4.	Aktivite takibi komplike sonuçlar verdi.....	125
10.5.5.	Aktivitenin canlılıkla ilişkisi araştırıldı.....	127
<b>11.</b>	<b>ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>129</b>
<b>12.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>131</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<b>AIS</b>	: Aksonal başlangıç segmenti
<b>AKG</b>	: Arka kök gangliyonun
<b>AP</b>	: Aksiyon potansiyeli
<b>BBG</b>	: Brilliant Blue-G
<b>BOS</b>	: Beyin omurilik sıvısı
<b>CBX</b>	: Karbenoksolon
<b>CGRP</b>	: Calcitonin gene-related peptide
<b>ÇSS</b>	: Çevresel sinir sistemi (Periferik sinir sistemi)
<b>GEC</b>	: Genetik olarak kodlanmış kalsiyum işaretçileri
<b>GJ</b>	: Oluklu bağlantılar (gap junction)
<b>IHC</b>	: İmmünohistokimya
<b>MEA</b>	: Mikro elektrot dizileri
<b>PDN</b>	: Primer duysal nöron
<b>PEI</b>	: Poly-etilen-amin
<b>PI</b>	: Propidium iodide
<b>PLL</b>	: Poly-l-lizin
<b>PZR</b>	: Polimer zincir reaksiyonu
<b>SGH</b>	: Satellit glial hücre
<b>MSS</b>	: Merkezi sinir sistemi
<b>TTX</b>	: Tetrodotoxin
<b>VGLUTs</b>	: Glutamaterjik nöronlarında, veziküler glutamate transporterleri
<b>SNR</b>	: Signal to noise ratio

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1: AKG'nin anatomik yerleşimi .....	10
Şekil 4.1.2: Pseudounipolar nöron tipi. ....	10
Şekil 4.1.3: AKG nöronlarının T-bağlantısı. ....	11
Şekil 4.1.4: Primer duysal nöron. ....	11
Şekil 4.5.1: Fonksiyonel nöron-SGH ünitesi. ....	19
Şekil 4.5.2: Hasara karşı in-vivo nöron-SGH yanıtının özeti. ....	22
Şekil 5.1.1: MEA sistemi ve bağlı olduğu bilgisayar. ....	24
Şekil 5.1.2: Mikro-elektrot dizilerini yerleşimi. ....	24
Şekil 5.4.1: Canlılık takibi yapılacak petri kaplarının hazırlanması. ....	30
Şekil 5.4.2: Aktivite takibi yapılacak petri kaplarının hazırlanması. ....	31
Şekil 5.4.3: MEA petri kaplarının hazırlanması. ....	32
Şekil 5.5.1: AKG diseksiyonu. ....	33
Şekil 5.6.1: Canlılık takibi için deney düzeneği. ....	37
Şekil 5.6.2: MEA kaydı deney düzeneği. ....	38
Şekil 5.6.3: Kalsiyum aktivite takibi için deney düzeneği. ....	40
Şekil 5.6.4: Ekim yoğunluğuna bağlı aktivitenin hayatta kalmaya etkisini inceleyen deneylerinin özeti. ....	42
Şekil 5.7.1: Tipik uyarı stratejisi. ....	44
Şekil 5.7.2: AKG kültürlerinde nöral ağ oluşumunun incelenmesi deneyi. ....	45
Şekil 5.7.3: Deney süreci ve örnek kayıtlar. ....	46
Şekil 5.8.1: AKG hücrelerinde hasara SGH yanıtı deneyi. ....	49
Şekil 6.1.1: Genotipleme Sonuçları. ....	53
Şekil 6.2.1: 40 h/mm <sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücreleri, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d). ....	54
Şekil 6.2.2: 20 h/mm <sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücreleri, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d). ....	55
Şekil 6.2.3: 10 h/mm <sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücreleri, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d). ....	56

<b>Şekil 6.2.4:</b> AKG kültürlerinde her yoğunluk grubu için sayılan toplam canlı nöronları günlere göre değişimi. ....	57
<b>Şekil 6.2.5:</b> AKG kültürlerinde grupların ortalama hayatta kalım oranı ve her yoğunlukta sayılan grupların (n=5) ortalama hayatta kalım oranının günlere göre değişimi. ....	57
<b>Şekil 6.2.6:</b> AKG kültürlerinde kümülatif canlılık oranlarının (n=5) tüm ekim yoğunlukları arasındaki fark. ....	58
<b>Şekil 6.2.7:</b> AKG kültürlerinde araştırılan örneklerde beş tekrardan üçünde (n=3, %60) tüm ekim yoğunlukları arasındaki fark. ....	59
<b>Şekil 6.2.8:</b> Aktivite takibi yapılan AKG hücrelerinde aktif hücre yüzdesinin zamana göre değişimi. ....	61
<b>Şekil 6.2.9:</b> 40 h/mm <sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücrelerin, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d) görülen aktiviteleri, $\Delta F/F$ . ....	62
<b>Şekil 6.2.10:</b> 20 h/mm <sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücrelerin, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d) görülen aktiviteleri, $\Delta F/F$ . ....	63
<b>Şekil 6.2.11:</b> 10 h/mm <sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücrelerin, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d) görülen aktiviteleri, $\Delta F/F$ . ....	64
<b>Şekil 6.2.12:</b> 40 h/mm <sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen AKG hücrelerinde aktivitenin canlılıkla ilişkisi. ....	65
<b>Şekil 6.2.13:</b> 20 h/mm <sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen AKG hücrelerinde aktivitenin canlılıkla ilişkisi. ....	65
<b>Şekil 6.2.14:</b> 10 h/mm <sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen AKG hücrelerinde aktivitenin canlılıkla ilişkisi. ....	66
<b>Şekil 6.3.1:</b> MEA üzerinde ki AKG kültürlerinin parlak-alan görüntüsü. ....	67
<b>Şekil 6.3.2:</b> Tipik bir kültür preparatının faz contrast (a) ve florasan (b) resmi. ....	67
<b>Şekil 6.3.3:</b> Deneysel aşamalar ve sonuçlar. ....	69
<b>Şekil 6.3.4:</b> $\epsilon$ -komşuluk alanı ve komplementer alan. ....	70
<b>Şekil 6.3.5:</b> c <sup>+</sup> primer nöronların yanıt profilleri. ....	72
<b>Şekil 6.3.6:</b> c <sup>-</sup> primer nöronların yanıt profilleri. ....	73
<b>Şekil 6.3.7:</b> c <sup>-</sup> nöron etkileşimleri. ....	74
<b>Şekil 6.3.8:</b> c <sup>+</sup> nöron etkileşimleri, sekonder nöron uyarı öncesinde sessiz. ....	75
<b>Şekil 6.3.9:</b> c <sup>+</sup> nöron etkileşimleri, sekonder nöron uyarı öncesinde aktif. ....	76

<b>Şekil 6.3.10:</b> Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI 1. ....	77
<b>Şekil 6.3.11:</b> Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI 4. ....	77
<b>Şekil 6.3.12:</b> Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI 5. ....	78
<b>Şekil 6.3.13:</b> Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI 9. ....	78
<b>Şekil 6.3.14:</b> Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI'lerin aktivitelerinin korelasyon analizine göre oluşturulmuş hiyerarşik ağaçlar (a). ....	79
<b>Şekil 6.3.15:</b> İmmünohistokimya. ....	81
<b>Şekil 6.4.1:</b> Kültürde 2. günde Fluo-4 yüklü AKG nöronu (N1) ve glialar (S1, S2). ....	82
<b>Şekil 6.4.2:</b> Tipik bir sham deneyi. ....	83
<b>Şekil 6.4.3:</b> Tipik bir nöron kesisi. ....	84
<b>Şekil 6.4.4:</b> Görüntüleme alanındaki tüm nöronların nörit kesisine kalsiyum yanıtı $\Delta F/F$ . ....	84
<b>Şekil 6.4.5:</b> Tipik bir nöron kesisine SGH yanıtı. ....	85
<b>Şekil 6.4.6:</b> GJ'ler bloklu durumdayken, nöron kesisine SGH yanıtı. ....	86
<b>Şekil 6.4.7:</b> P2X7'ler bloklu durumdayken, nöron kesisine SGH yanıtı. ....	86
<b>Şekil 6.4.8:</b> Nöron kesisine cevap veren tüm SGH'lerin aktivite oranı. ....	87
<b>Şekil 6.4.9:</b> Üst: SGH kategorilerinin kontrol ve blok durumlarında nörit kesisine yanıt oranı ve kontrol grubuna göre farklar. Alt: SGH kategorilerinin kalsiyum yanıtı. ....	89
<b>Şekil 6.4.10:</b> Deneyler esnasında gözlemlenen yapıların şematik gösterimi. ....	90
<b>Şekil 6.4.11:</b> SGH <sup>A</sup> + Neu <sup>w</sup> kategorisi. ....	91
<b>Şekil 6.4.12:</b> SGH <sup>D</sup> + Neu <sup>w</sup> kategorisi. ....	92
<b>Şekil 6.4.13:</b> SGH <sup>D</sup> + Neu <sup>w/o</sup> kategorisi. ....	93
<b>Şekil 10.2.1:</b> Hipokampus diseksiyonu. ....	118
<b>Şekil 10.5.1:</b> 2000 h/mm <sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş hipokampal hücreler, sırasıyla; kültürdeki 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 7.gün. ....	120
<b>Şekil 10.5.2:</b> 1000 h/mm <sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş hipokampal hücreler, sırasıyla; kültürdeki 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 7.gün. ....	121
<b>Şekil 10.5.3:</b> 500 h/mm <sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş hücreler, sırasıyla; kültürdeki 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 7.gün. ....	122
<b>Şekil 10.5.4:</b> Her grup için sayılan toplam canlı hipokampal nöronları günlere göre değişimi. ....	123

<b>Şekil 10.5.5:</b> Grupların ortalama hayatta kalım oranı ve her yoğunlukta sayılan grupların (n=3) ortalama hayatta kalım oranının günlere göre değişimi. ....	123
<b>Şekil 10.5.6:</b> Hipokampal kültürlerde kümülatif canlılık oranlarının (n=3) tüm ekim yoğunlukları arasındaki fark. ....	124
<b>Şekil 10.5.7:</b> Aktivite takibi yapılan hipokampal hücrelerde aktif hücre yüzdesinin zamana göre değişimi.....	125
<b>Şekil 10.5.8:</b> Aktivite takibi yapılan hipokampal hücrelerde aktif kanal yüzdesinin zamana göre değişimi.....	126
<b>Şekil 10.5.9:</b> 2000 h/mm <sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen hipokampal hücreler .....	127
<b>Şekil 10.5.10:</b> 1000 h/mm <sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen hipokampal hücreler. ....	127
<b>Şekil 10.5.11:</b> 500 h/mm <sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen hipokampal hücreler. ....	128

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 5.3.1:</b> Jackson Kirli DNA izolasyonu Protokolü .....	28
<b>Tablo 5.3.2:</b> GCaMP6s ve Cre ifadesinin kontrolü için kullanılan primer listesi.....	28
<b>Tablo 5.3.3:</b> Cre için kullanılan PZR reaksiyon bileşenleri .....	28
<b>Tablo 5.3.4:</b> GCaMP6s için kullanılan PZR reaksiyon bileşenleri .....	28
<b>Tablo 5.3.5:</b> Ortak PZR reaksiyonu protokolü.....	28
<b>Tablo 5.4.1:</b> AKG kültürleri için diseksiyon ve yaşam vasatları bileşenleri.....	32
<b>Tablo 5.5.1:</b> AKG hücrelerinin ekim yoğunlukları .....	35
<b>Tablo 5.5.2:</b> AKG hücrelerinde kaplama protokollerinin özeti. ....	35
<b>Tablo 5.6.1:</b> Tyrode's solüsyonu içeriği.....	39
<b>Tablo 5.6.2:</b> %20'lik pluronik asit hazırlanması için gerekenler .....	39
<b>Tablo 5.6.3:</b> 2,5 µM'lik, 1 ml boya yükleme solüsyonu .....	39
<b>Tablo 5.6.4:</b> 1 µM'lik, 1 ml boya yükleme solüsyonu .....	39
<b>Tablo 5.6.5:</b> Görüntüleme vasatı .....	39
<b>Tablo 5.7.1:</b> ICC solüsyonları .....	47
<b>Tablo 5.9.1:</b> Malzeme Listesi .....	52
<b>Tablo 6.2.1:</b> AKG kültürlerinde günlere göre hayatta kalan hücre sayısının farkı. Friedman istatistik testi. ....	59
<b>Tablo 6.2.2:</b> AKG hücre kültürlerinin MEA ile elektriksel aktivite ölçümü, aktif kanal yüzdelерinin günlere göre değişimi. ....	60
<b>Tablo 6.2.3:</b> Aktivite takibi yapılan AKG hücrelerinde aktif hücre yüzdesinin zamana göre değişimi.....	61
<b>Tablo 6.3.1:</b> Temel etkileşim profilleri .....	71
<b>Tablo 6.3.2:</b> Çok-katmanlı etkileşim profilleri .....	80
<b>Tablo 6.4.1:</b> SGH kategorilerinin kontrol ve blok durumlarında nörit kesisine yanıt oranı ve p değerleri.....	88
<b>Tablo 10.1.1:</b> Hipokampus kültürleri için diseksiyon, kültür ve yaşam vasatları bileşenleri .....	117
<b>Tablo 10.4.1:</b> Hipokampal hücrelerinin ekim yoğunlukları .....	119

<b>Tablo 10.5.1:</b> Hipokampüs kültürlerinde gün ve yoğunluklara bağlı Friedman skorları.....	124
<b>Tablo 10.5.2:</b> Aktivite takibi yapılan hipokampal hücrelerinde aktif hücre yüzdesinin zamana göre değişimi.....	125
<b>Tablo 10.5.3:</b> Hipokampal hücre kültürlerinin MEA ile elektriksel aktivite ölçümü, aktif kanal yüzdelерinin günlere göre değişimi.....	126





# 1. ÖZET

## İN-VİTRO NÖRAL DEVRE ÇALIŞMALARI

Çevresel sinir sistemi periferdeki doku organ ve uzuvlarla merkezi sinir sistemi arasında bir köprü oluşturur ve dokunma, basınç, ağrı, sıcaklık, kaşıntı, kas uzunluğu, organ hacmi gibi hissedilen çeşitli içsel ve çevresel ipuçları hakkında duyuları iletir. Arka kök gangliyonu belirli uyarılara yanıt vermek üzere özelleşmiş primer duyuşal nöronları içerir. Klasik olarak, periferel sistemin bir kablo gibi çevresel verileri ilettiği, bu esnada AKG gövdesinin yalnızca iletken aksonu destekleyen bir metabolik depo olarak hizmet ettiği düşünölmekteydi. Son yıllarda, gösterilen bulgular, kronik ağrıdaki rolü bilinen AKG dokusunun nöro-modölasyon tedavisi için uygun bir hedef olduğunu düşündörmektedir. Bu tez kapsamında görüntöleme, elektriksel uyarı, elektriksel kayıt, kalsiyum görüntöleme ve hasar modelleri kullanılarak nöral ve glial AKG hücrelerinin in-vitro devre özellikleri araştırıldı. Bu çalışma özetle, in-vitro şartlarda, AKG nöronlarının ekim yoğunluğunun nöral hayatta kalımı etkilediğini, AKG nöronlarının kültür ortamında glutamaterjik sinapslar yaptığını, ayrıca hasar yanıtının uzak bölgelere satellitik glial hücre ağı aracılığıyla taşındığını göstermiştir. AKG nöronları arasında daha önce tanımlanmamış yeni tipte bağlantılara dikkat çeken bu çalışma, nöropatilerden, fibromiyalji, hayalet uzuv ağrısı immün aracılı hiperalezi gibi periferik sinir sisteminin gizemli ağrı sendromlarına yaklaşımımıza yeni bir ışık tutabilir.

**Anahtar kelimeler:** Arka kök gangliyonu (AKG), ekim yoğunluğu, in-vitro nöral ağlar, kalsiyum görüntöleme, lokal elektriksel uyarı, nörit kesi hasarı, satellitik glial hücreler (SGH).

## 2. ABSTRACT

### IN-VITRO NEURAL CIRCUIT STUDIES

The peripheral nervous system forms a bridge between the peripheral tissue, organs, limbs, and the central nervous system and transmits sensations about various internal and environmental cues felt such as touch, pressure, pain, temperature, itching, muscle length and organ volume. The dorsal root ganglion contains primary sensory neurons specialized to respond to certain stimuli. Classically, it was thought that the peripheral system transmits environmental data like a cable, while the DRG soma was thought to serve only as a metabolic depot supporting the long conducting axon. Recent findings suggest that DRG tissue, is a suitable target for neuromodulation therapy. In this thesis, in-vitro circuit properties of neural and glial DRG cells were investigated using imaging, electrical stimulation, electrical recording, calcium imaging and injury models. In summary, this study showed that the plating density of DRG neurons affects survival under in vitro conditions, that DRG neurons make glutamatergic synapses in culture, and that the injury response is propagated to distant sites in-vitro, via a network of peripheral satellite glial cells. Highlighting new types of previously unidentified connections between DRG neurons, this study may shed new light on our approach to mysterious pain syndromes of the peripheral nervous system, such as neuropathies, fibromyalgia, phantom limb pain, immune-mediated hyperalgesia and many more.

**Keywords:** Calcium imaging, dorsal root ganglion (DRG), in-vitro neural networks, local electrical stimulation, neurite transection, plating density, satellite glial cells (SGCs).

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Çevresel sinir sistemi (Periferik sinir sistemi, ÇSS) beyin ve omurilik haricindeki sinir dokuları olan gangliyon ve sinirlerin oluşturduğu yapıdır. Temel işlevi, periferdeki doku organ ve uzuvlarla merkezi sinir sistemi (MSS) arasında bir köprü oluşturmaktır. Periferden gelen sinirlerin gövdeleri omuriliğin iki yanındaki gangliyonlarda toplanır. Duyusal gangliyonlardan sayıca en fazla olan Arka Kök Gangliyonu (AKG) primer duyusal nöronları içerir ve dokunma, basınç, ağrı, sıcaklık, kaşıntı, kas uzunluğu, organ hacmi gibi hissedilen çeşitli içsel ve çevresel ipuçları hakkında duyumları iletir ve bunlara yanıt verir. Çeşitli uyaran türleri arasında ayırım yapma yeteneği, belirli uyarılara yanıt vermek üzere özelleşmiş AKG nöronlarının varlığıyla mümkün olmaktadır. Duyusal nöronlar, bir T-bağlantısı ile birbirine bağlı iki uzun akson dalı olan yalancı tek kutuplu (psödo-unipolar) hücrelerdir. Dallardan biri periferik reseptörlere, diğeri ise omuriliğe uzanır [1].

AKG'nin kronik ağrıdaki rolü uzun zamandır bilinmektedir [2]. Son yıllarda, AKG dokusu, nöro-modülasyon tedavisi için uygun bir seçenek olarak göz önüne çıkmaktadır. Primer duysal nöron gövdesinin elektriksel uyarımı, kronik ağrının tedavisi için kullanılan modülasyon tedavilerinden biridir [3, 4]. Bu tez kapsamında çeşitli deneylerle nöral ve glial AKG hücrelerinin in-vitro devre özellikleri araştırıldı.

Nöral devrelerin morfolojik ve elektro fizyolojik değişiklikleri mikroskopik görüntüleme, kalsiyum görüntüleme ve tek veya çok bölgele elektro fizyolojik kayıtlar, yama kısıkaçı, mikro elektrot dizileri (MEA) gibi birçok yöntem ve araçla araştırılabilir. Primer nöron kültürü, normal ve patolojik hücresel süreçlerin incelenmesi için önemli bir araçtır. Kontrollü bir ortam olduğundan, nöronal ağ özellikleri üzerindeki çeşitli faktörlerin rolünü aydınlatmak için yaygın kullanılan, uygun bir yaklaşımdır. Nöronların aktivitesini araştırmak için yama kısıkaçı deneyleri gibi tek-hücre seviyesindeki elektro fizyolojik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler, maksimum derecede zamansal çözünürlükte elektriksel aktivite bilgisi vermesine rağmen, hücre zarının bütünlüğünün bozulmasını ve hücreye ölümcül zarar verilmesini gerektirir. Ayrıca, bu sistemle birden fazla hücre ile çalışmak için özel donanım setleri gerekmektedir. Nöronların elektro fizyolojik

analizi için başka bir araç olan mikro elektrot dizileri (MEA), hücrelere herhangi bir zarar vermeden, uzun süreler boyunca, nöron popülasyonlarının hem in-vivo hem de in vitro davranışları hakkında bilgi sağlar [5-7]. MEA platformları AKG kültür araştırmaları için kullanılmak istendiğinde bu kez başka sınırlamalar ortaya çıkar. Spontan AKG aktivitesinin çoğu eşik seviyesi altındadır, bu nedenle literatürdeki çalışmalar nöral popülasyonları duyarlı hale getirmek için sitokinlerin ve faktörlerin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir [8, 9]. Kalsiyum, hemen hemen tüm hücrel süreçlerde yaygın olarak yer alan bir ikincil habercidir. Kalsiyum olayları her zaman AP oluşumuyla sonuçlanmaz. Kalsiyum görüntüleme, hücrelerde eşik altı ve eşik üstü kalsiyum olayları hakkında ayrıntılı bilgi sağlar. Genetik olarak kodlanmış kalsiyum işaretçileri (GECI'ler), nöronal popülasyonların kalsiyum dinamiklerini teorik olarak sınırsız bir süre boyunca, yüksek SNR ile invaziv olmayan bir şekilde izlemeyi sağlar [10, 11]. GECI yapıları, spesifik hücre tiplerini hedeflemek için dizayn edilebilir ve elektroporasyon, viral vektör enjeksiyonu veya transgenik hayvan üretimi gibi birçok yöntemle hedef dokulara iletilebilir [12].

### **Ekim yoğunluğuna dayalı spontan aktivitenin AKG nöronlarının in vitro hayatta kalımına etkisi**

Gelişim sırasında beyindeki nöronlar arasındaki sinaptik bağlantı sayısı ve kuvveti, önemli ölçüde değişir. Bağlantısallıktaki farklılıklar çeşitli nöral devrelerin gelişimine ve sürdürülmesine katkıda bulunur [13, 14]. Kültüre alınmış nöronal ağların yapısal ve işlevsel özellikleri, hayvan modeli, doku kökeni, hücre yoğunluğu ve fiziksel ve biyokimyasal çevre dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Ayrıca, bu özellikler zamanla nöronal ağ olgunlaşma süreçlerini etkiler [15]. Hücre yoğunluğunun (birim alanda bulunan hücre sayısı) in vitro nöronal ağların olgunlaşma sürecini etkilediği bilinmektedir. Literatürdeki birçok çalışma farklı hücre yoğunluklarındaki nöronal kültürlerde, nöron başına yapılan sinaps sayısında, dendrit morfolojisinde ve ağ aktivitesinde farklılıklara neden olduğunu göstermektedir. Özellikle dendrit morfolojisinin ve sinaps sayısının değişimi nöronların temas bölgelerinin miktarı ve salgılanan faktörlerin konsantrasyonuna bağlanmıştır. Kortikal nöral ağların olgunlaşması esnasında nöron sayısı ile sinaps-nöron oranı arasında ters orantı olduğu gözlemlenmiştir [16, 17]. Fakat literatürde bu konudaki yayınların büyük çoğunluğunu

MSS kültürleri oluşturmuş, periferik sistem göz ardı edilmiştir. Nöral devreler çalışılırken başka dikkate alınacak bir konu ise spontan/kendiliğinden gelişen ağ aktivitesidir. Spontan ağ aktivitesi, sinir dokusunun olgunlaşmasında önemli bir rol oynar ve hem in-vivo hem de in vitro olarak incelenmiştir [18, 19]. Spontan ağ etkinliği kapsamlı olarak belgelenmesine rağmen, oluşumunu ve yayılmasını yöneten temel kuralları tanımlayan az sayıda çalışma vardır. Böyle bir çalışmada, ağ boyutunun fare omurilik nöronlarının kültürde (in-vitro) spontan ağ etkinliği üzerindeki rolü ve elektronik kuplajın (coupling) senkron aktivite jenerasyonuna etkisi yama kısıncı tekniğiyle incelenmiştir [20]. Çalışmada Hb9 ara nöronlarının bağlantısallığının senkron aktiviteye katkıda bulunduğu yönünde bulgulara erişilmiştir ancak bu tür bir etkinlik için bir tetikleyici bölge olup olmadığı ve bunun nasıl yayıldığı sistematik olarak incelenmemiştir [21].

Elektriksel aktivite, hasarlı ve sağlam nöronların hayatta kalmasını sağlamada önemli bir rol oynar. MSS ve ÇSS dokuları ile gerçekleştirilen in-vivo ve in-vitro çalışmalardan elde edilen bulgular, elektriksel aktivite kaybının aksine, endojen veya ekzojen elektriksel aktivitenin nöral hayatta kalıma katkıda bulunduğunu göstermektedir [22, 23]. Bu koruyucu etkinin araştırılmasında temel olarak aksonal rejenerasyonu, yani nörit büyümesini teşvik eden, nörotrofik etkilere odaklanılmıştır.

Bu tez çalışmasının ilk kısmında spontan ağ aktivitesi, nöronların hayatta kalımı ile ilişkilendirilmek istenmiştir. Kültür sistemlerinde, yüksek ve düşük yoğunluklu hücrelerin rölaf olarak düşük hayatta kalma oranı olduğu genel-geçer bir bilgidir. Yüksek yoğunlukta ekilen hücrelerde bu hücre ölümü, homeostazi sağlamak üzere gerçekleşen bir eliminasyona [24], veya metabolik olaylara bağlanabilmektedir. Fakat düşük yoğunlukta kaydedilen ölüm oranları için böyle bir açıklama mevcut değildir. Hipotezimize göre, ekim yoğunluğu, kültürün ilk günlerinde spontan aktivite üretme seviyesinde farklılığa yol açabilir ve bu da kültürlerdeki genel bağlantısallık seviyesine fayda sağlıyor olabilir. Bu sayede, düşük-yoğunluklu kültürlerdeki hayatta kalım azlığı, nöronal aktivite azlığına bağlanabilir. Literatürde merkezi sinir sisteminde yoğunluğa bağlı aktivite çalışılmış olmakla beraber, bunun hücrel hayatta kalımla ilişkisi mevcut olmadığı gibi, periferik sinir sisteminde bu konu hiç araştırılmamıştır. Bu eksiği gidermek ve periferik sistemin aktivite ve ağ yapma biçimlerine ışık tutmak

amacıyla bu çalışmanın ilk deney seti kapsamında çeşitli yoğunluklarda ekilen AKG nöronlarının hayatta kalımı ve aktivitesi araştırıldı. Spontan aktivite araştırması için hem kalsiyum görüntülemeye hem de MEA kayıtlarından faydalandı. Yöntemlerin literatürle kıyaslanabilmesi ve deneysel sistemin muhtemel eksiklerinin tespiti için benzer bir deney sistemi, hipokampal kültürlerde de tekrarlandı. Deneyler sonucunda hem merkezi hem periferik kültürlerde ekim yoğunluğuyla nöral hayatta kalım arasında istatistiksel bir ilişki saptandı ve literatürde ilk kez belgelendi.

### **AKG kültürlerinde nöral ağ oluşumunun incelenmesi**

Uzun yıllar boyunca AKG hücrelerinin gövdelerinin, aksonların hayatiyetini ve yoğun trafiğini devam ettirmek üzere sadece metabolik rolü üstlendiği ve afferent sinyallerin AKG hücre gövdesini atlayıp MSS'ye devam ettiği düşünülmüştür [25]. Fizyolojik koşullarda, in-vivo ortamda, AKG hücre gövdeleri nadiren depolarize olur [26]. Ayrıca, AKG nöronları satellit glial hücreler (SGH'ler) tarafından sarmalanır ve birbirinden fiziksel olarak ayrı durmaktadırlar [27]. Ancak son bulgular, AKG nöron gövdelerinin T-bağlantı bölgesinde (T-junction) hem in-vivo hem de in vitro olarak gösterilen aksonal başlangıç segmentlerine (AIS) sahip olduğunu göstermektedir. Patch-clamp çalışmalarına dayanarak bu segmentlerin, periferden gelen sinyaller için bazen bir bariyer, bazen bir iletici bazen ise bir filtre gibi davrandığı iddia edilmiştir [28]. Bununla beraber in vitro, AKG nöronları daha karmaşık sinirsel aktiviteler gösterir. Çoklu-modaliteli bir deneysel yaklaşım, AKG nöronlarının daha önce gözlemlenmemiş fonksiyonel özellikleri ortaya çıkarabilir. AKG sinir gövdeleri, fonksiyonel bağlantılar kurarak ağrı süreçlerini modüle ediyor olabilir. Nöronların görüntülenirken aynı zamanda manipüle edildiği basitleştirilmiş bir in vitro model bunu araştırmak için faydalı olabilir.

Bu çalışmanın ikinci kısmında, fizyolojik koşullarda bulunan AKG hücrelerinin in vitro bağlantılarını ve uyarıya yanıt örüntülerini nöral ağlar yaklaşımlarıyla incelemek üzere deneysel bir düzenek geliştirildi. Bu düzenekte, lokal elektriksel uyarı, kalsiyum görüntüleme ile beraber uygulandı. Glutamat, sinir sisteminde en yaygın uyarıcı nörotransmitterdir [29]. Glutamaterjik nöronlar veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUTs)1-3 ile işaretlenebilir [30]. Bu bilgiler ışığında, glutamaterjik nöronlarda GCaMP6s ifade eden bir transgenik fare hattı üretildi. Bu sayede mikroskop altında

glutamaterjik nöronların kalsiyum aktivitesinin yüksek hassasiyetle gözlemlenmesi hedeflendi. AKG nöron popülasyonları MEA petri kaplarına ekildi. Böylece elektrotlar aracılığıyla modalite-spesifik olmaksızın hücreler uyarılırken indüklenen kalsiyum aktivitesi mikroskop altında simultane olarak görüntüledi. Petri kaplarında yayılan aktivitenin sinaptik bağlantılar yoluyla gerçekleşip gerçekleşmediği de sinaptik blokörler kullanılarak test edildi. Deneyle sonuçunda in-vitro koşullarda AKG nöronlarının sinaptik bağlantılar kurduğu ve uyarılan nöronların ikincil derece nöronların aktivitesini indüklediği ve/veya modüle ettiği literatürde ilk kez gösterildi. Bulgular immünohistokimyasal yöntemle desteklendi.

### **In-vitro nörit transeksiyonuna SGH hücrelerinin akut kalsiyum yanıtı**

SGH'ler AKG nöronal hücre gövdelerini yalıtır ve iyi araştırılmış metabolik rollere sahiptirler. Ayrıca sinir yaralanmasını takiben yapısal ve kimyasal değişikliklere uğrarlar ve nöronların uyarılmasına cevaplar verdikleri bilinmektedir [31, 32]. Bununla birlikte, sinir hasarına akut tepkileri ve nöronlarla eş zamanlı etkileşimleri açıkça tanımlanmamıştır ve SGH'lerin aksonal yaralanmaya nasıl yanıt verdiği çok az bilinmektedir. Önceki çalışmalar daha çok nöronal uyarım (elektriksel, mekanik vb.) ve sistemik enflamasyon modellerini içermektedir. Bu çalışmanın son kısmı kapsamında, SGH'lerin doğrudan nöronal hasara yanıt verdiği varsayımında bulunuldu. Hasar sonrası gelişen ATP dalgalanmalarının bir sonucu olarak, pürinerjik reseptörlerin ve GJ'lerin katılımı ile gerçekleştirdiği ispatlanmak istendi. Bunu araştırmak için, zaman aralıklı (time-lapse)  $Ca^{2+}$  görüntülemesi esnasında lazer ile nörit transeksiyonu gerçekleştirildi. Tek-hücre düzeyinde nörit transeksiyon modeli, hassas şekilde odaklanmış bir kızılötesi lazer ile başarıldı. Akut yanıt gözlemlendikten sonra antagonistler eşliğinde deneyler tekrarlandı.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Arka Kök Gangliyonu (AKG) Anatomisi

İnsanlarda, omurganın iki yanında 31 çift sinir bulunmaktadır. Bunlardan 8 çift servikal, 12 çift torasik, 5 çift lumbar, 5 çift sakral ve son 2 tanesi de koksigeal olarak sınıflandırılır<sup>1</sup>. Bu sinirler, duysal veya motor (bazen de karışık) bilgiyi çevre ile MSS arasında taşımakla görevlidir. Omurgayı oluşturan her bir omurun arka kökünde (Dorsal root) duysal bilgi vücuttaki duysal yapılardan MSS'ye (afferent), ön kökünde (Ventral root) ise motor komutlar MSS'den kas ve eklemlere (efferent) taşınmaktadır. Arka kök siniri, nöral foramenden çıkarken, primer duysal nöronların (PDN) gövdelerinin bulunduğu AKG içinden geçer. [33]. Embriyolojik olarak AKG dokusu MSS'ye aittir. Gelişim süresinde, perifere göçer. AKG'ler dural örtü içinde bulunur ve az miktarda bir beyin omurilik sıvısı (BOS) ile çevrilidirler [34]. Bununla birlikte, AKG dokusu kan-beyin bariyerinin dışındadır. Fenestre kapillerler tarafından sulanır, böylece kanla taşınan moleküller, antijenler veya enfekte edici ajanlar ganglionlara kolayca girebilir [35]. İnsanda AKG, bulunduğu konumdaki (segment) uzuvları innerve eden yaklaşık 15.000 nöron gövdesi bulunmaktadır. Bu hücrelerin iki uzantısı mevcuttur ve bir grubu arka kolondan MSS'ye, ikinci grubu sinir uçlarına ve reseptörlere uzanır. (Şekil 4.1.1). AKG nöronları canlıda bulunan en büyük nöronlardandır ve canlı boyutuna göre aksonları 1,5 metre uzunluğa erişebilir [36].

AKG nöronları psödo-unipolar yapıya sahiptir; hücre gövdesinden tek bir akson çıkar ve T-bağlantısında çatallanır (Şekil 4.1.2). Periferik akson, afferent sinyalleşmeden sorumludur ve uzuvlara giden periferik siniri oluşturur. Aksonun proksimal kısmı merkezi sinir sistemine uzanır ve omurilikte ağrı yayan anatomik dermatomlarda önemli arborizasyonlar gösterir. AKG'deki yapısal değişiklikler, bir dizi istenmeyen hücre-hücre etkileşimleri ve moleküler sinyaller, nosiseptif yolakların duyarlılaşmasının temelini oluşturur. Bunlar, iyon kanallarındaki değişiklikler,

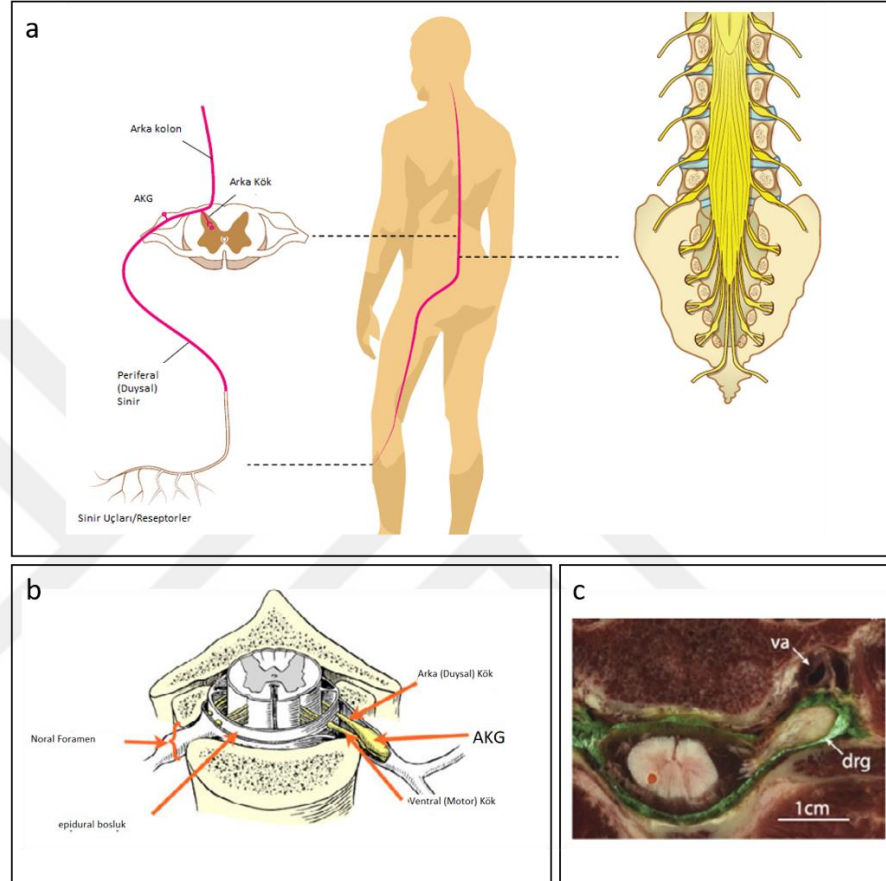
---

<sup>1</sup> Bu çalışmada kullanılan farelerde bu sayılar şöyle değişiklik göstermektedir: 13 çift torasik, 6 çift lumbar, 4 çift sacral.



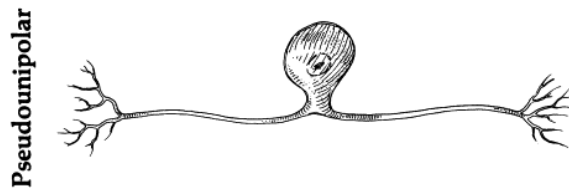
başıklık hücrelerinin aktivasyonu, glial araçların etkisini ve epigenetik düzenlemeleri içerebilir [35, 37]. AKG nöronlarının T-bağlantısı, elektriksel uyarıya bir engel olarak görev alabilir, iletinin yol almasına yardımcı olabilir veya elektriksel bir filtre gibi davranabilir (Şekil 4.1.3)[28]. AKG nöronlarının ve psödo-unipolar geometrisi ve T-bağlantısı, uyarıların çevreden, AKG'yi geçerek omuriliğe iletilmesi için potansiyel bir biyofiziksel engel oluşturur. Başlangıçta bunun periferik bilgilerin gerçeğe uygun şekilde aktarılması için bir tehdit oluşturduğu düşünülmekteydi [38, 39]. Son yıllarda ise, T-bağlantısının, hücre gövdesini aksondan elektriksel olarak uzaklaştırarak, ilerleyen uyarı AKG'yi geçerken empedans uyumsuzluğu ve kapasitif yüklenme nedeniyle yayılma hatası riskini azaltmayı amaçlayan bir tasarım olduğu fikri öne çıkmıştır [40-42]. Bununla birlikte, T-bağlantısı bölgesi yakınında aksonal çap diğer bölgelere göre azdır. Çatallanma bölgesinin yakınında her iki akson dalında da internodlar kısa, nodlar birbirine daha yakındır, ayrıca çatallanma bölgesi geniş bir nod alanıdır [43, 44]. Bu nedenlerle, uzun yıllar AKG nöron gövdesinin ileti dışında bırakıldığı ve doğrudan elektriksel iletimde yer almadığı düşünülmüştür. In-vivo şartlarda, AKG'de hemen hemen hiç sinaps yoktur ve AKG hücreleri arasında hiçbir sinaptik işlem gerçekleşmez. Klasik olarak, AKG gövdesinin yalnızca iletken aksonu destekleyen bir metabolik depo olarak hizmet ettiği düşünülmekteydi. Bununla birlikte, soma zarı aslında elektriksel olarak uyarılabilir bir yapıdır ve aksonda ilerleyen iletilerin gövde aksonuna girdiği ve nöron gövdesini uyardığı bilinmektedir. AKG nöron gövdesinin uyarılabilirliği önemli metabolik maliyetler taşıdığından, bu durum duyuşal nörona önemli işlevsel fayda(lar) sağlamalıdır. Gövdenin uyarılması, voltaja duyarlı iyon kanallarının sentezini ve sürekli transportunu gerektirir ve bu büyük nöronların nispeten küçük bir yüzey-hacim oranına sahip olmasına rağmen, kararlı bir transmembran potansiyelini korumak için ekstra iyon pompalaması gerekir. Ayrıca, gövdenin uyarılabilirliği, bazı AKG nöronlarının spontan (kendiliğinden) ateşlenmesine izin verir [45], bu durum duyuşal sinyalleri bozan, bir durumdur ve duyuşal bilginin korunamamasına, kronik nöropatik ağrıya ve yaygın klinik ağrı sendromlarına neden olduğu düşünülmüştür [45-47].

Primer duysal nöron, periferdeki reseptif alanda başlar. Burası bir reseptör, özelleşmiş bir organ veya açık bir sinir ucu olabilir. Uyarı, nöronu aktive eder ve periferel uç boyunca iletilerek omuriliğin arka boynuzuna getirilir (dorsal horn) [48] (Şekil 4.1.4).

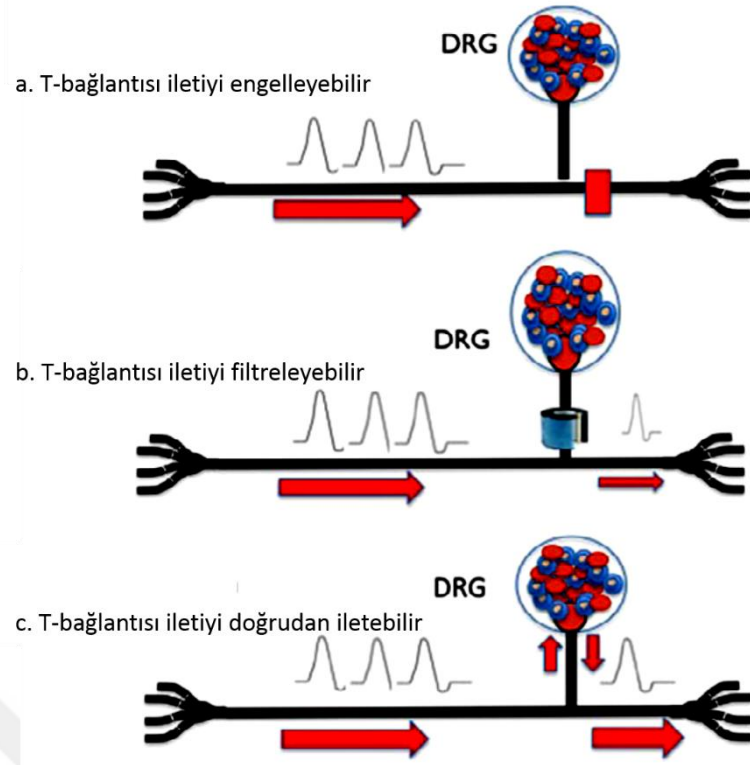


**Şekil 4.1.1:** AKG'nin anatomik yerleşimi

(a). Omur kemiğinin içinde AKG'nin konumu İllüstrasyon (b), renklendirilmiş kesit (c). [1, 37]

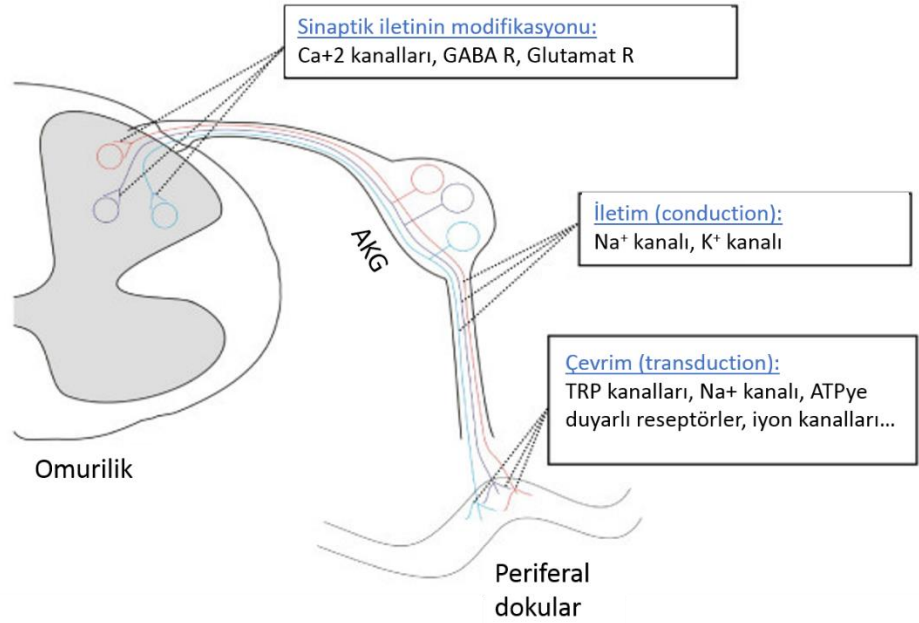


**Şekil 4.1.2:** Pseudounipolar nöron tipi [49].



**Şekil 4.1.3:** AKG nöronlarının T-bağlantısı.

a. aksiyon potansiyelinin omuriliğin arka boynuzundaki bağlantı noktasına geçişini engelleyen bir direnç, b. aksiyon potansiyelini modifiye eden bir alçak-geçirgen filtre veya c. iletiyi direk geçiren aktif bir devre elemanı gibi davranabilir [1].



**Şekil 4.1.4:** Primer duysal nöron.

Periferel dokularda reseptif alanda, TRP kanalları, sodyum kanalları iyon kanalları gibi özelleşmiş araçlarla başlar. Burası bir reseptör, özelleşmiş bir organ veya açık bir sinir ucu olabilir. Uyarı, nöronu aktive eder ve periferel uç boyunca iletilerek omuriliğin arka boynuzuna getirilir. Sinir gövdeleri arka kök gangliyonda bulunur. [48]

#### **4.2. Primer Duysal Nöron (PDN)**

AKG'ler, primer duysal nöronların gövdelerinin toplandığı gangliyonlardır [50]. Bu nöronların hücre gövdesi 20-150 µm arasında değişir. Boyutlarından başka bir de boyama sonucu ortaya çıkan çeşitli neurofilament yoğunluklarına sahiptirler. Buna göre de büyük-açık (A tipi, "large-light") ve küçük -koyu (C tipi, "small-dark") olarak kategorize edilirler. C tipi nöronlar temelde ağrı hissiyle ilgili uyarıları iletirken, A tipi olanlar geri kalan uyarılarla ilgili bilgiyi iletir [50]. Bu nöronların aksonları, birleşerek çeşitli uyarı eşiklerine sahip sinir lif ve kökleri oluşturur. Bunları özetlemek gerekirse, düşük-eşikli mekanosensör lifler, yüksek-eşikli Aβ nosiseptör lifler, Aδ lifler ve C lifler olarak kategorize edilir. Aδ lifler miyelinlidir ve yüksek hızda ileti taşırlar. C liflerinde miyelin bulunmaz ve ileti hızı daha yavaştır [51]. Küçük, miyelinsiz, nosiseptif C lifler termo-mekanik uyarıların algılanmasında görev alır ve CGRP (calcitonin gene-related peptide) içerir. A lifleri ise uyarı eşikleri daha düşük mekano-reseptörlerdir [52].

AKG nöronları pasif sinyal yolları olmanın çok ötesinde, periferdeki değişikliklere cevap veren ve MSS yanıtlarını şekillendirecek sinyali oluşturan moleküler yolları başlatarak yanıtı modüle eden hücrelerdir. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda AKG hücrelerinin akut ve kronik ağrı oluşumundaki rolü önem kazanmıştır [45].

AKG nöronlarının özel membran karakteristikleri vardır. Belirtildiği üzere, aralarında glial hücre katmanı bulunur. Neredeyse tüm AKG nöronları, diğer hücre gövdelerinin aktivasyonu sırasında eşik altı uyarıya maruz kalır. Bu olaya "çapraz depolarizasyon" (veya "çapraz uyarım") denmektedir. Aynı gangliyonu paylaşan komşu bir AKG nöronunun aksonuna uyarı uygulandığında komşu nöronlarının yaklaşık %90'ının depolarizasyona uğradığı gözlemlenmiştir [53, 54].

### 4.3. AKG Nöronların Nörokimyasal Özellikleri

Arka kök ganglionları, farklı işlevleri olan ve farklı hedefleri innerve eden karmaşık bir dizi duyuşal nöron hücre gövdesi içerir. Kanal proteinleri ve birçok protein, nöron fonksiyonu ile ilişkilidir. İmmünohistokimya (IHC), karmaşık dokularda protein lokalizasyonunu yüksek çözünürlükle olarak tanımlayabilen bir yöntemdir. Normal, yaralanmamış AKG dokusunun nörokimyasal özellikleri genel haliyle bu bölümde bulunabilir.

#### Ortak Nöronal İşaretleyiciler

**Nörofilament (NF):** NF'ler, yaklaşık 56 ila 200 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip hücre iskeleti ara filamentleridir. Yapısal destek sağlarlar ve akson çapını düzenlerler. AKG dahil tüm nöronlarda bulunurlar. Kemirgenlerde, 200 kDa'lık bir nörofilament olan NF200, daha büyük, miyelinli A-lif nöronlarının bir popülasyonunu işaretlemekte kullanılır.

**PGP9.5:** PGP9.5, bir ubikuitin C-terminal hidrolazdır. Tüm nöronlarda bulunur ve bir pan-nöronal işaretleyicidir ve AKG'deki nöronal ve nöronal olmayan yapıları ayırt etmek için kullanılır [55, 56].

**Tuj1 (Beta3 Tübülin, TUBB3):** Tuj1 (beta3 tübülin, TUBB3), sağlıklı dokularda ağırlıklı olarak nöronlarda ve testislerde bulunan tübülin ailesinden, mikrotübül elementlerinin bir parçasıdır ve AKG nöronlarının gövde ve uzantılarında bulunur [55, 57, 58].

**Periferin:** Periferin, küçük AKG nöronları gibi periferik sinir sisteminin nöronlarında ve motor nöronlar gibi periferik hedefleri innerve eden merkezi nöronlarda eksprese edilen bir ara filaman proteinidir [59].

**Brn3a:** Duyuşal nöron belirteci olan Brn3a, duyu nöronlarının gen ekspresyonunu ve farklılaşmasını düzenleyen bir POU homo-domain transkripsiyon faktörüdür. Hayvan çalışmalarında, neredeyse tüm duyuşal AKG nöronlarından eksprese edildiği gösterilmiştir [60].

**NeuN:** ağırlıklı olarak nöronal çekirdeklerde bulunan bir RNA bağlayıcı protein ve post-mitotik (olgun) nöronların büyük çoğunluğunda bulunan bir başka yaygın nöronal biyo-belirteçtir [61].

## **Nosiseptörlere Özgü Moleküller**

### **İyon Kanalları**

İyon kanalları, aksiyon potansiyellerinin üretilmesine ve iletilmesine yol açan nöronal uyarılabilirliğin düzenlenmesi için esastır ve bu nedenle duysal nöron fonksiyonu için kritik öneme sahiptir. Nosiseptörlerde içe doğru membran akımlarının üretilmesi için önemli kanal proteinleri; voltaj kapılı sodyum (NaV) ve kalsiyum (CaV) kanalları ve ayrıca geçici reseptör potansiyeli (Transient Receptor Potential: TRP) kanalları gruplarına aittir [62]. AKG'nin duysal doğası ve kronik ağrı durumlarının gelişimindeki rolü göz önüne alındığında, nöronlarda kanal proteinlerinin tespiti ile ilgili çalışmaların ağırlıklı olarak nosisepsiyon ile ilgili kanallara odaklanması şaşırtıcı değildir. AKG nöronları, transdüksiyon, transmisyon ve modülasyon fonksiyonlarını ifa eden çeşitli iyon kanalları ve reseptörlere sahiptir. Özellikle hasar sonrası AKG hücrelerinin uyarılabilirliği artar ve ektojik aktivite gösterirler [63, 64]. AKG nöronlarının periferel uçlarında bulunan ve duysal bilgiyi elektriksel uyarıya çeviren iyon kanalları ve reseptörlere örnek olarak, sodyum kanalları, aside-duyarlı iyon kanalları ve ATP'ye duyarlı reseptörler bulunur. Özellikle sodyum ve potasyum kanalları, iletinin aksiyon potansiyeli (AP) yoluyla yayılmasında etkilidir. Sinaptik iletinin nörotransmitterler yoluyla yayılmasında ise voltaj-kapılı kalsiyum kanalları öne çıkmaktadır [65].

**Voltaja duyarlı Sodyum kanalları (NaV):** Voltaja duyarlı sodyum kanalları, AKG nöronlarında aksiyon potansiyeli oluşumunun temel bileşenleridir. Dokuz çeşit NaV alt türünden NaV 1.7, 1.8 ve 1.9, ağrı sinyal olaylarının temel bileşenleridir [62, 66, 67]. IHC çalışmaları voltaj kapılı sodyum kanalı NaV1.7'in tüm AKG nöronlarının yaklaşık yarısında mevcut olduğunu göstermiştir [68-70]. AKG hücreleri, elektro fizyolojik yöntemlerle gösterilen birden fazla değişik Na<sup>+</sup> akım kinetiği ve voltaj duyarlılığı gösterir [71]. Ayrıca çeşitli AKG hücreleri Na<sup>+</sup> kanal blokörü Tetrodotoxin'e (TTX) farklı seviyelerde duyarlılık gösterir [72]. Bu bulgular AKG

nöronlarının çeşitli Na<sup>+</sup> kanallarını farklı oranlarda ekspres ettiğini göstermektedir. Na<sup>+</sup> kanallarının bir kısmının hasar sonrası hiper-uyarılabirlik kazandığı bilinmektedir. Na<sup>+</sup> kanallarının özellikle de TTX-e duyarlı NA<sup>+</sup> kanallarının (TTX-S) sayıca artması (up-regulation), AKG dokularında hiper-uyarılabirliği indükler ve bu kanalları bloke eden, modifiye eden veya fenotipik olarak değıştiren kimyasal etkilere daha duyarlı hale getirir.

**Voltaj kapılı kalsiyum kanalları (CaV):** CaV'ler, duyuşal nöron fonksiyonunun temel bileşenleridir. Bu kanalların aktivasyonu, sinaptik uçlarda nörotransmitter dolu veziküllerin ekzositozuna katkıda bulunur. Voltaj kapılı kalsiyum kanalları; yüksek voltajla aktive olan ve düşük voltajla aktive olan şeklinde (HVA, LVA), a1 alt biriminin benzerliğine göre (CaV1, CaV2, CaV3) veya farmakolojik inhibitörlere duyarlılıklarına göre (L, N, P/Q, R, T) alt bölümlere ayrılır [73, 74]. AKG nöronlarında hem voltaja duyarlı hem de ligand kapılı Ca<sup>2+</sup> kanalları mevcuttur [75]. L-tipi, P/Q-tipi, N-tipi, R-tipi ve T-tipi olmak üzere beş çeşit Ca<sup>++</sup> kanalı bilinmektedir. P/Q ve N tipleri genelde voltaja duyarlı, nörotransmitter salınımında görevli kanallardır. T-tipi kardiyak, -tipi ise kas hücrelerini fonksiyonunda görevlidir.

**Kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları (KCa):** KCa, NMDA tipi glutamat reseptör aktivasyonu ile modüle edilebilen ve bu şekilde nosiseptif sinyalleşmeye katkıda bulunan kanallardır [76, 77]. Voltajdan bağımsız KCa2.1 (SK1) ve KCa3.1 (IK1) kanalları, nöron boyutundan bağımsız olarak hemen hemen tüm (%87 ile %95 arasında) duyuşal AKG nöronlarında gösterilmiştir [78]. K<sup>+</sup> kanalları bütün canlı organizmalarda bulunurlar. Dört ana K<sup>+</sup> kanal çeşidi mevcuttur. Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup> kanalı, Ca<sup>2+</sup> iyonlarının varlığında açılır. İçeriye doğru düzeltici K<sup>+</sup> kanalları (Kir) pozitif akımın hücreye girişinde görevlidir. Voltaj-kapılı K<sup>+</sup> kanalları, trans-membran voltajın değışmesiyle açılıp kapanır ve son olarak K<sup>+</sup> sızıntı kanalı, nöronların dinlenme evresine (resting state) dönüşüne katkı sağlar [79]. TNF- $\alpha^2$ , K<sup>+</sup> iyon akımını artırarak hiper-uyarılabirliği indükler. TNF- $\alpha$ 'nın nöropatik ağrıya katkısının K<sup>+</sup> kanalları üzerinden olduğı düşünölmektedir [79].

---

<sup>2</sup> Sistemik enflamasyonda rol oynayan bir sitokin olan Doku Nekroz Faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), TNF-TNF-Reseptör-Süper Aile Proteinleri olarak adlandırılan bir reseptör proteinleri ailesine aittir. Temel görevleri immune system için olsa da sinir sisteminde de önemli, roller mevcuttur.

**Pürinerjik reseptör (P2X):** Pürinerjik reseptörler, P2X2 ve P2X3; ATP tarafından aktive edilen homo veya heterotrimerik ligand-kapılı iyon kanallarıdır. Kanallar, nosisepsiyon dahil olmak üzere çeşitli nöronal sinyal yollarının bir parçasıdır. Kemirgenlerde yapılan çalışmalar, P2X2 ve P2X3 kanallarının AKG nöronlarında eksprese edildiğini ve P2X3 alt biriminin ağırlıklı olarak peptiderjik olmayan, GDNF'ye bağımlı ancak NGF'den bağımsız nosiseptörlerde eksprese edildiğini ortaya koymuştur [80].

**Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı alt ailesi V üyesi 1 (TRPV1):** TRPV1, acı biberlerin bir bileşeni olan vanilloid kapsaisin tarafından düşük pH ve ısı ile aktive edilen bir kanal proteindir [81]. TRPV1, seçici olmayan bir katyon kanalıdır ve nosiseptif sinyalleşmenin önemli bir bileşenidir [81]. Kapsaisin ağrıyı indükler, fakat aynı zamanda TRPV1 kanallarının duyarsızlaşmasını sağlayarak nosiseptör fonksiyonunu modüle eder [82]. Topikal kapsaisin uygulaması, şu anda postherpetik nevralji gibi ağrı durumlarının tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır [83].

**Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı ankirin 1 (TRPA1):** TRPA1, hardal yağı ve sinamaldehit tarafından aktive edilen bir kanal proteindir ve ekspresyonu AKG nöronlarında nosiseptif sinyalleşmede önemli bir rol oynar [84].

#### 4.4. AKG ve Ağrı Çalışmaları

AKG hücrelerinin, nöropatik ağrının<sup>3</sup> gelişimi ve sürmesinde rol oynadığı bilinmektedir [1]. Hasar sonrası AKG dokuları fenotipik ve işlevsel olarak dramatik değişikliklere uğrar ve bu değişiklikler, AKG'yi, MSS'ye giden ağrı sinyallerinin kaynak bölgesi haline getirebilir [85]. Periferik afferent sinir hasarından sonra, AKG dokularında immün ve glial hücreleri içeren bir immün kaskad başlatılır [1]. Glial hücreler ayrıca inflamatuvar öncülleri (mediatör) çoğaltarak ve serbest bırakarak periferik bir sinirin yaralanmasına yanıt verir [86]. Periferik aksotomi, AKG'deki duyu nöron hücre gövdelerini çevreleyen satellit glial hücrelerde (SGH) nörotrofik

---

<sup>3</sup> Sinir sisteminin direk veya dolaylı yoldan zarar görmesi veya etkilenmesi ile oluşan, sinir kaynaklı ağrı.



faktörlerin ekspresyonunun artmasına neden olur. AKG içindeki bu nörotrofinler, kalıcı bir mekanik allodiniyi tetikler ve periferik sinir yaralanmasından sonra nöropatik ağrıya neden olabilir [1, 87]. Duyusal nöronlardaki anormal elektriksel aktivitenin patolojik ağrı ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır [88, 89]. Örneğin, insanlarda hayalet uzuv ağrısının esas olarak anormal içsel AKG aktivitesi tarafından yönlendirildiği gösterilmiştir [90]. Normal AKG nöronları, voltaja duyarlı mekanizmalar aracılığıyla sinüzoidal salınım dalgaları oluşturur. Bu salınımların frekansının, hasar sonrasında arttığı gözlemlenmiştir. Bu salınımlar eşik değerini aştığında, aksiyon potansiyeli üretilir [91]. Periferik sinir hasarını takiben, AKG nöronlarında spontan ektoptik aksiyon potansiyelleri gözlenir, spontan aktiviteye rastlanır ve uyarı için gereken eşik değeri düşer [92].

AKG, omurilik seviyesinden önceki somatotopi<sup>4</sup> basamağıdır [93]. Bu nedenle, klasik yaklaşımla ağrının giderilmesi için omuriliğe müdahale gerekliliğini ortadan kaldırmak için kullanılabilir. AKG uyarımı, bir AKG'de bulunan birincil duyu nöronlarının yalnızca bir alt kümesini hedefleyerek uygulanabileceğinden, uyarıda yüksek spesifisite elde edilebilir. Ayrıca, ağrı oluşumundan sorumlu nöronlar daha düşük aktivasyon eşiklerine sahip olabilir ve uygun uyaran ile seçici olarak aktive edilebilir [94-96]. Bu nedenlerle AKG dokularının uyarılabilirliği ve komputasyon yetenekleri daha detaylı incelenmelidir.

#### **4.5. AKG Destek Hücreleri: Satellitik Glial Hücreler**

Her AKG'de nöronlardan yaklaşık sekiz kat fazla glial hücre bulunur [51]. AKG nöron gövdeleri arasında fiziksel temas yoktur. Bunun yerine ince satellitik glial hücre (SGH) katmanı bulunur. SGH'ler yalnızca periferik gangliyonlarda bulunur. SGH'ler ve AKG nöronları arasında (sinaptik boşluğa çok benzer şekilde) yaklaşık 20 nm bir boşluk bulunur. Bu organizasyon nöron/glia (N/G) arasında ciddi bir etkileşim olduğunu göstermektedir [86]. Bu yapılar sandviç sinaps (SS) veya N/G ünitesi olarak

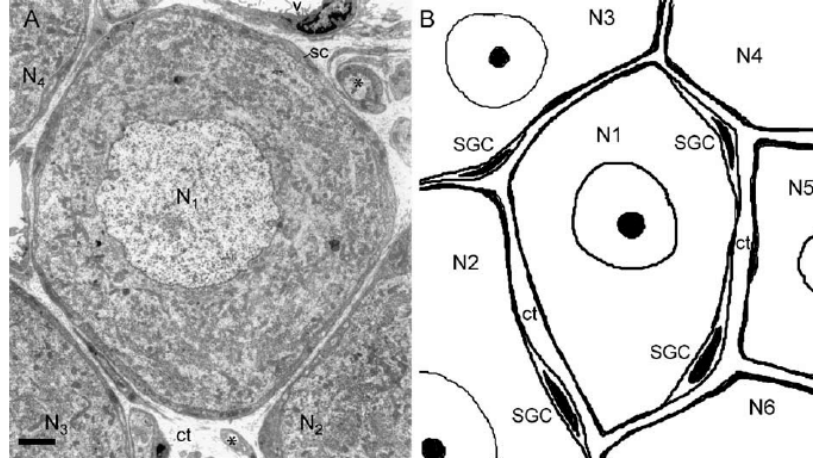
---

<sup>4</sup> Somatotopi, vücudun bir bölgesinin, merkezi sinir sistemi üzerindeki belirli bir bölgeye birebir karşılık gelmesidir. Vücudun alanı, birincil somatosensoryel korteks (postcentral girus) üzerindeki bir noktaya karşılık gelir. Innervasyon ne denli çoksa kortikal bölge de o kadar genişir.

adlandırılmıştır [97]. (Şekil 4.5.1) SGH'ler, MSS'deki karşıtları olan astrositlere benzetilmektedir. Her astrosit birden fazla sayıda nöronla temas halindedir ve astrositler birbiriyle çakışmayan bölgeler oluşturmaktadır. Bunun aksine, bir nöronun etrafında birden fazla SGH bulunur ve bunlar birbiriyle yoğun etkileşim halindedir. Bununla beraber farklı nöronların SGH'leri arasında sınırlı bir etkileşim mevcuttur.

SGH'ler önceden yalnızca metabolik artıkları toplayan ve besin alışverişinden sorumlu hücreler olarak düşünülmüştür. Fakat yeni çalışmalar SGH'lerin enflamasyon, ağrı ve hasar durumlarına çeşitli yanıtlar veren fonksiyonel bir ünite olduklarını göstermiştir. AKG hücrelerini uyaran sinyallerin, SGH'lerde de gecikmeli başlayan ve uzun süren bir cevap indüklediği gözlemlenmiştir [98]. Çoğunlukla, her bir AKG nöronu birden fazla SGH ile ayrı ayrı sarılır, nöronların küçük bir oranının (türe bağlı olarak %4-9) ortak bir glial zarfı paylaştığına ve bir "küme" oluşturduğuna dair kanıtlar vardır [31].

Glial hücreler, sağlık ve hastalık durumlarında nöronlarla çift yönlü iletişimi sürdürür ve MSS'nin işlevinde önemli roller oynar [99]. Glial hücreler, nöronlardan salınan maddelere, özellikle de ATP'ye, pürinerjik P2R'ler üzerinden cevap verir [100, 101]. Glial hücreler ayrıca ATP, glutamat ve tümör nekroz faktörü (TNF), IL-1 $\beta$  ve fraktalkin [99, 102] gibi sitokinler de dahil olmak üzere biyo-aktif maddeleri salgırlar ve kendi aralarında ve komşu nöronlarla iletişim kurar. Ağrı üzerine yapılan çalışmaların çoğu ve ağrı tedavisinin çoğu nöronlara odaklanmıştır. Fakat son zamanlarda gliaların rolü ön plana çıkmıştır.



**Şekil 4.5.1:** Fonksiyonel nöron-SGH ünitesi.

Sağda; elektron mikrografı, solda: şematik diyagram. Şekilde nöronlar (N) ve etrafındaki ince SGH hücre katmanı (SGH) görülmektedir. Aradaki bağdoku katmanı (ct) gözlemlenebilir. [86]

Sinir hasarı veya enflamasyonunun duyu ganglionlarında SGH'leri aktive ettiği gösterilmiştir. Bu aktiviteler, glial fibriller asidik proteinin (GFAP) ekspresyonunun artışı [103], SGH'ler arasında bağlanma gücünün artışı (coupling) [32, 89], SGH'lerde Kir4.1 kanallarının azalması [104, 105] ve SGH'lerin ATP'ye artan duyarlılığı gibi örneklenebilir [32, 106]. Aktive olan SGH'ler, nöronları aktive eden ve uyarılabilirliğini artıran pro-inflamatuar sitokinler IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF $\alpha$  salgılar [97, 107]. SGH'ler sırayla nöronal hipereksitebilitate ve ağrıya yol açan bileşikler serbest bırakır. Hücreler arası kalsiyum dalgaları bu kaskadda önemli bir rol oynar.

### SGH'lerin Kimyasal Özellikleri

**İyon kanalları:** SGH'lerin voltaja bağlı sodyum veya kalsiyum kanalları yoktur ve bu nedenle aksiyon potansiyelleri iletemezler [108]. SGH'lerdeki ana potasyum kanalı Kir4.1'dir [105]. Hasar durumu, SGH'lerde Kir4.1 fonksiyonunu baskılar, bu durumun ağrı bozukluklarına neden olabileceği düşünülmektedir [104, 107]. Azalan Kir4.1 geçirgenliği, SGH'leri depolarize ederek, nöronları aktive edebilen ATP gibi uyarıcı araçları serbest bırakmalarına neden olur. Trigeminal gangliyonunda (TG'de) Kir4.1 etkinliğinin baskılanması ağrı davranışına yol açmıştır [105].

**SGH'lerde oluklu bağlantılar (gap junction, GJ):** Oluklu bağlantılar, çok sayıda hayvan hücresi türünde bulunan özel bir hücreler arası bağlantıdır. Çeşitli

moleküllerin, iyonların ve elektriksel uyarıların hücreler arasındaki düzenlenmiş bir kapıdan doğrudan geçmesine izin verecek şekilde iki hücrenin sitoplazmasını doğrudan birbirine bağlarlar. Hem MSS'deki hem de periferdeki glial hücreler, hücreler arasında iyonların ve küçük moleküllerin difüzyonu için bir yol sağlayan GJ kanallarını ekspres eder. Bir GJ kanalı, hücreler arası boşluk boyunca bağlanan iki konneksandan (veya yarı kanaldan; hemi-channel) oluşur. Her bir konneksan, 6 adet konneksin proteininin özel bir konfigürasyonla birleşmesiyle oluşur. Fare AKG dokularında en çok miktarda bulunan konneksinler (Cx), Cx43 ve Cx32'dir<sup>5</sup>. Normal koşullar altında, SGH'ler Cx43 [109, 110] içerir. Cx43 ekspresyonu, sinir yaralanması veya enflamasyonu takiben AKG'de artar [105, 109, 111, 112]. Bu artış, siyatik sinir kesisi [113, 114], kolonik obstrüksiyon ve enflamasyon [27], arka patiye tam Freund adjuvan enjeksiyonu [115], kemoterapinin neden olduğu nöropati [116] gibi birçok ağrı modelinde gözlemlenmiştir.

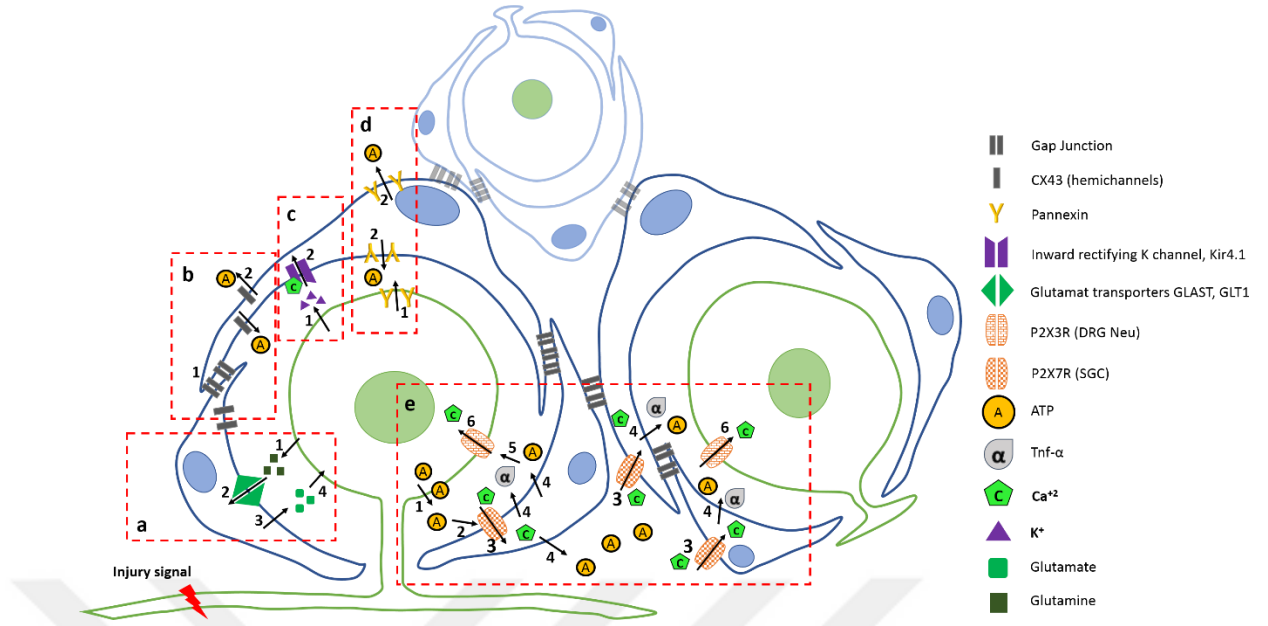
Boyanın hücreden hücreye difüzyonu, "dye-coupling" olarak adlandırılır, ancak yalnızca elektriksel olarak bağlı olduğu bilinen hücreler arasında GJ gibi kanallar yoluyla gerçekleşir. SGH'ler arasındaki dye-coupling, yalnızca tek tek nöronları çevreleyen kılıflarda artmakla kalmayıp, bitişik nöronları çevreleyen SGH'ler arasında da yayıldığı gözlemlenmiştir [117, 118]. Oluklu bağlantıların bloke edilmesinin analjezik bir etkiye sahip olabileceği öne sürülmüştür ve bu çok sayıda kronik ağrı modelinde doğrulanmıştır [115, 119]. Karbenoksolon (CBX) ile oluklu bağlantılarının bloke edilmesi ağrı reaksiyonlarını azaltarak, akut ağrıda SGH'lerin rolünü desteklemektedir. Özetle, SGH'ler arasındaki artan eşleşme ve ayrıca SGH/nöron ve nöron/nöron eşleşmesi, ağrı modellerinde yaygın bir özelliktir ve kronik ağrıya katkıda bulunduğu görülmektedir.

**SGH'lerde Panneksinler:** Panneksinler ağırlıklı olarak hücre içi ve hücre dışı boşluğu bağlayan ve bu bölmeler arasında iyonların ve küçük moleküllerin geçişine izin veren büyük transmembran kanallardır. Panx1, Cx'ler gibi oluklu bağlantılar oluşturmasa da, ATP'nin salınmasına izin veren membran kanalları oluşturur [120, 121]. AKG'de siyatik sinir ligasyonunu takiben Panx1 ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir [122].

---

<sup>5</sup> Bunu Cx30.2, Cx37, Cx26, Cx30, Cx45 ve Cx36 takip eder (39)

**Reseptörler:** SGH farmakolojisine ilişkin bilgiler hala sınırlıdır ve bu konudaki bilgilerin çoğu pürinerjik iletim ile ilgilidir. ATP, nöron-glia etkileşimlerinde [101] ve ağrı yollarında [123] önemli bir habercidir. Hücreler, veziküler veya P2X7R veya Panx1 kanalları gibi kanal aracılı mekanizmalarla ATP'yi salınımı yaparlar. Ekto-ATPazlar, ATP'yi ADP'ye ve pürinlere ayrıştırır. AKG'de ekto-ATPazlar, Schwann hücrelerinde ve SGH'lerde bulunur, ancak nöronlarda bulunmaz [124]. Bu durum, glial hücrelerin gangliyondaki ATP seviyesini düzenlediğine dair kanıt oluşturmaktadır. Kalsiyum görüntüleme kullanılarak, SGH'lerin fonksiyonel P2YR'leri ekspres ettiği tespit edilmiştir [125]. ATP'nin duyuusal nöronlar tarafından salınması, nöron/SGH iletişimi için bir mekanizma sağlayarak, SGH'lerde P2R'leri aktive eder [126-128]. Farelerde uygulanan bir sistemik inflamatuvar ağrı modelinde, AKG SGH'lerinde ATP'ye artan tepkiler gözlemlendi [32]. P2R ekspresyonundaki artış, hasar sonrasında gözlemlenen SGH aktivasyonunun bir parçasıdır. Bu değişiklikler, patolojik koşullar altında duyu nöronlarının ATP'ye artan duyarlılığı ile birlikte düşünüldüğünde [127], P2R'ler yoluyla artan hücreler arası iletişimin, ağrı durumlarında nöronal hipereksitabiliteye katkıda bulunmasının muhtemel olduğunu gösterir. SGH'leri hasar durumunda aktive ettiği bilinen bazı yolların bir özeti Şekil 4.5.2'de görülmektedir.



**Şekil 4.5.2:** Hasara karşı in-vivo nöron-SGH yanıtının özeti.

AKG'nin basitleştirilmiş bir kesiti gösterilmiştir. Hasar, glutamatin nöronlardan hücre dışı ortama salınmasıyla sonuçlanır. Bu uyarıcı nörotransmitter, SGH'ler tarafından algılanır ve temizlenir. (a) SGH'ler Panx1 ve Cx43 yarı kanallarını ekspres eder ve GJ'ler aracılığıyla bağlanırlar. Hasar durumunda, Panx1 ve Cx43 ekspresyonu artar, bu da ATP deşarjının artmasına neden olur ve bu da uyarıcı hücre dışı bir molekül görevi görür [129] (b ve d). SGH'ler hücre dışı  $K^+$ 'yı  $Ca^{2+}$  yoluyla temizleyen Kir4.1 kanallarını ekspres eder [130] (c). Son olarak, yaralanma kaynaklı nöronal ATP deşarjı, SGH P2X7 kanallarını aktive eder. Bu kanalların açılışı,  $Ca^{2+}$ 'nın içeri akışını indükler. Pürinerjik kanallar yoluyla aktive edildiğinde, SGH'ler  $TNF\alpha$  salgılar.  $TNF\alpha$  ise nöronal pürinerjik P2X3 reseptörlerini aktive ederek hasar görmeyen nöronların da aktif olmasına yol açar [131, 132] (e). Bunlar, hasar durumunda sağlıklı bir AKG'deki nöronlar arasında SGH yoluyla oluşturulan bazı uyarıcı döngüleri kısaca özetlemektedir.

## 5. MATERYAL VE METOT

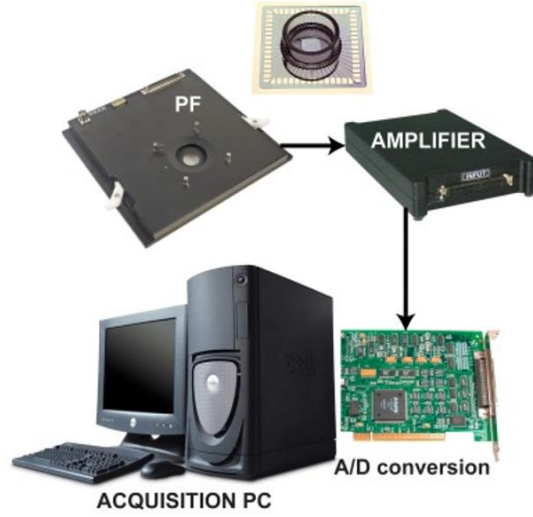
### Etik Beyannamesi ve Hayvan Hizmetleri

Transgenik ve diğer fare suşları İstanbul Medipol Üniversitesi Deneş Hayvanları Merkezinde yetiştirildi. Tüm hayvanlar, AB direktif kodunda (86/609/CEE) yayınlanan hayvan bakımı ve kullanımına yönelik yönergelere sıkı sıkıya bağlı kalınarak muamele edildi. İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneşleri Etik Kurulu (İMUHADYEK) tüm prosedürleri onayladı. Hayvan deneşleri öncesinde gerekli izin, sertifika ve eğitimler alındı (Bölüm 11).

### 5.1. MEA Sistemi

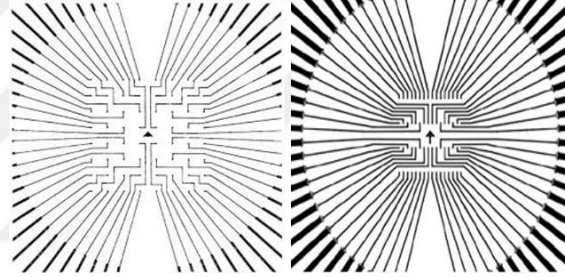
Bu tez kapsamında hücre kültürlerinden elektriksel sinyal alıp işlemek ve lokal elektriksel uyarı uygulamak için MEA'lerden faydalanıldı. Deneşler için Boğaziçi Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Enstitüsü'nden F. Kemal Bayat'ın kurduğu MEA sistemi kullanıldı (Şekil 5.1.1).

Cam MEA levhaların üzerine 8x8 düzeniyle yerleştireilmiş 64 adet düzlemsel mikro elektrot bulunmaktadır. Elektrotlar elektriksel olarak iletken, optik olarak saydam indiyum tin oksit (ITO) maddesinden üretilir ve çeşitli desenlerde cama işlenir. Standart tip elektrotlarda, elektrot boyları 24 µm, elektrotlar arası aralık ise 150 µm olacak şekilde dizilim göstermektedir. Bunun dışında altıgen şeklinde işlenen yoğun dizilerde ise (High-Density MEA, HDMEA) her bir elektrot 18 µm olup, aralarındaki aralık 40 µm kadar daraltılmıştır (Şekil 5.1.2) [133].



**Şekil 5.1.1:** MEA sistemi ve bağlı olduğu bilgisayar.

64 kanallı MEA petrisi görülebilir [134]



**Şekil 5.1.2:** Mikro-elektrot dizilerini yerleşimi.

Düşük yoğunluklu yerleşim (Sol) ve yüksek yoğunluklu yerleşim (Sağ). Kaynak: <http://cnns.unt.edu/>

### 5.1.1. Elektriksel kayıt sistemi

64 kanallı mikro-elektrot dizisi, sıcaklığı fizyolojik seviyede tutabilmek için 37°C'deki ısıtıcı tabla üzerine yerleştirilmektedir. Matris düzleminin her iki yanında 32'şer adet kanalın bağlantı uçları bulunmaktadır. İki adet 32'şer kanal girişli veri alma kartı ile saniyede 25000 (25 kHz) örnek alınabilmektedir. Buradan alınan veri çıktısı sinyal yükselticinin ön kısmına (head stage) girer. Sinyal, yükseltilmesinin ardından bir analog-dijital çevirici üzerinden bilgisayara aktarılır. Aktivite sinyali yükselticide 40 kat, analog dönüştürücüde ise 1000 kat olmak üzere toplam 40000 kat artırılmış olarak veri görüntüleme sistemine ulaşır. 64 kanala ait veri MATLAB yazılım paketi ile görüntülenir.



### **5.1.2. Elektriksel uyarı sistemi**

Elektriksel uyarı düzeneği için aynı sistem sinyali ters yönde iletecek şekilde kullanılmaktadır. Bilgisayar aracılığıyla üretilen dijital stimülasyon sinyali, 5kHz örnekleme oranıyla analog voltaja dönüştürülür, bu sistem özel yazılmış bir MATLAB kodu ile kontrol edilir. Kullanılan uyarı sinyalleri voltaj kontrollü olarak seçilmiş, böylece stimülasyon parametreleri voltaj ve uygulama süresi olarak belirlenmiştir [135, 136].

## **5.2. Görüntüleme Sistemleri**

Bu tez kapsamında, hücrelerin yapışma, sağlık ve hayatta kalım durumu, boya alımları, GECl ekspresyonları ve kalsiyum indikatörü ile yüklenme sonrasında anlık kalsiyum değişimleri çeşitli görüntüleme sistemleri ile takip edildi. Deneilerin doğasına, ilgilenilen bilginin detayına göre görüntüleme sistemleri seçilip optimize edildi.

### **5.2.1. Hoffman modülasyon kontrast mikroskobu**

Hücrelerin kültür sonundaki sayımı, ekim anı görüntülenmesi, yapışma kontrolü, yıkama öncesi ve sonrası kontrolleri, genel günlük görüntülemeler invert Hoffman modülasyon kontrast mikroskobuyla, çeşitli büyütmelelerde gerçekleştirildi.

### **5.2.2. PALM inverted axio observer Z1**

*Ekim yoğunluğuna dayalı spontan aktivitenin AKG nöronlarının in vitro hayatta kalımına etkisi deneylerinde*, hayatta kalım belli aralıklarla Palm axio observer Z1 mikroskobu kullanılarak takip edildi. Işık kaynağı olarak Halojen lamba, floresan ışık kaynağı olarak Illuminator HXP 120V, 580nm filtre ile kullanıldı. Yüksek hızda poz elde edilebilen AxioCam MRm kamere kullanıldı. Parlak alan görüntüleme için 76ms, floresan için 50 ms pozlama süresi kullanıldı. Hayatta kalım analizleri esnasında hücrelerin biçimini, çeşidini ve uzantılarını seçebilmek amacıyla 20X objektiften yararlanıldı (LD Plan Neofluor 20X, 0,4 Korr M27). Petri kaplarında her gün aynı

alanın çekilebilmesi hedeflendi, bu sebeple görüntüleme sisteminin otomatik tablasından faydalanıldı. Petri kabının ortasına alt yüzeye lazerle çizilen (+) şekli görüntüleme alanının ortasına getirilerek tabla konumu (0,0)'a ayarlandı, 0'ı merkezde tutarak 8x8 kare görüntü alındı.

### **5.2.3. Cell Observer Spinning-disk time-lapse mikroskobu**

*Ekim yoğunluğuna dayalı spontan aktivitenin AKG nöronlarının in vitro hayatta kalımına etkisi deneylerinde*, hücresel aktivite, işaretli kalsiyum indikatörleriyle görüntüledi. Aktivitenin günlük kontrolü için zaman serisi çekimleri gerçekleştirildi. Floresan işaretli hücrelerin sağlığı düşünülerek foto-toksisitenin minimumda tutulması kaydıyla maksimum data elde edilmesi hedeflendi. Bunun için REMER İleri Mikroskopi Laboratuvarında bulunan Cell Observer SD Time Lapse mikroskop kullanıldı. Işık kaynağı olarak AOTF Lazer kaynağı kullanıldı (488nm).

Görüntüleme için Elektron-çoğaltıcı CCD kameralardan faydalanıldı. Bu sayede yaklaşık 1000 kat EM kazancı sağlandı, pozlama süresi yaklaşık 30ms'ye düşürüldü, böylece hücrelere verilen muhtemel zarar minimuma düşürülürken hız korunarak saniyede yaklaşık 3 kare (frame) hıza ulaşıldı. 20X objektif kullanılarak 8 ila 10 alan görüntüledi (Plan-Apochromat 20X 0,8 Ph 2M27), görüntüleme mikroskop tablasına yerleştirilen mini-inkübatörde, fizyolojik şartlarda gerçekleştirildi.

### **5.2.4. LSM 780 Konfokal Mikroskop ve 793nm Kızılötesi lazer kaynağı**

*In-vitro nörit transeksiyonuna SGH hücrelerinin akut kalsiyum yanıtı deneyleri için*, akson hasarının uygulanabileceği Multi-foton ve konfokal görüntüleme sistemlerini birleştiren LSM780 mikroskobu kullanıldı. Bu mikroskopta ışık yoluna eklenebilecek ekstra kızılötesi lazer kaynağından ve konfokaliteye bağlı yüksek odaklama gücünden faydalanıldı. Görüntüleme için 2 kanal kullanıldı, bir yandan 488 nm floresan görüntüleme, bir yandan parlak alan görüntüleme filtreleri devredeyken, 793 nm'lik kızılötesi lazer kullanılarak 20X objektif ile nörit hasarı gerçekleştirildi (Plan-Apochromat 20X 0,8 Ph 2M27). Deneyler mikroskop tablasında bulunan mini-inkübatörde, fizyolojik şartlarda gerçekleştirildi.

*AKG kültürlerinde nöral ağ oluşumunun incelenmesi için yapılan deneylerde MEAların görüntülenmesi aynı mikroskobun LED-Module lazeri ve HRM kamerası kullanılarak yapıldı. Daha geniş bir alan gözlemleyebilmek için 10X objektiften faydalanıldı (Plann-Apochromat 10X 0,45 Ph 1M27). Bu nedenle lazer gücü yükseltildi ve yüksek pozlama süresi ile (320 ms) saniyede yaklaşık 3,5 kare (frame) görüntüledi, deney düzeneğine bağlı olarak yaklaşık 300 saniyelik zaman serisi çekimleri, mikroskop tablasına yerleştirilen mini-inkübatörde, fizyolojik şartlarda gerçekleştirildi.*

### **5.3. Kullanılan Fare Hatları**

Periferik sinir kültürleri için 6-8 haftalık erkek Balb/c farelerden izole edilen Arka Kök Gangliyon (AKG) hücreleri kullanıldı.

*AKG kültürlerinde nöral ağ oluşumunun incelenmesi çalışmaları için ise Jackson Laboratuvarı'ndan getirilen fare hatları çaprazlanarak kullanıldı. Glutamaterjik nöron gövdelerine yönelik kre-rekombinaz enzimi bulunan "Vglut-ires-cre" knock-in hat ile, kre'ye bağımlı floresan kalsiyum indikatör kodu taşıyan "Ai96(RCL-GCaMP6s)" hattı çiftleştirildi. Gerçekleşen kre-karşılaşması sonucu oluşan yeni çift-transgenik hattın eksitator glutamaterjik nöronlarında GCaMP6s ifade edildi. Bu ifadenin gerçekleşip gerçekleşmediği genotipleme ile test edildi.*

#### **5.3.1. DNA izolasyonu ve genotipleme**

Genotipleme için 1 aylık farelerin kulaklarından doku örneği alındı. Dokular Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) tüplerindeki 75 µl 25 mM NaOH / 0.2 mM EDTA'dan oluşan lizis solüsyonu içine alındı. DNA elde etmek için dokular Thermocycler cihazına yerleştirildi ve Jackson Laboratuvarı'nın önerdiği kirli DNA izolasyon protokolü kullanıldı (Tablo 5.3.1). Thermocycler cihazından alınan tüplere 75 µl 40mM Tris /HCl (pH:5.5) eklenip lizis solüsyonunun nötralizasyonu sağlandı. Örnekler 4000g de 5 dakika santrifüjlendi, süpernatant kısmından 100 µl alındı PZR yapılarına kadar +4 °C de saklandı. PZR reaksiyonunda Jackson'ın önermiş olduğu

primerler kullanıldı. Her örnek için iki ayrı PZR karışımı (Cre ve GcaMP) hazırlandı. Sadece cre veya sadece GCaMP reaksiyonlarında pozitif bant görülen fareler üretim için ayrılırken her iki reaksiyonda da pozitif bandın görüldüğü ikili transgenik fareler kalsiyum deneyleri için saklandı. Primer listeleri, PZR reaksiyon bileşenleri ve protokolü tablo 5.3.1-5’de görülebilir.

**Tablo 5.3.1:** Jackson Kirli DNA izolasyonu Protokolü

Sıcaklık (C)	Süre (dk)
98	60
15	∞

**Tablo 5.3.2:** GCaMP6s ve Cre ifadesinin kontrolü için kullanılan primer listesi

Protein:	Primer Kodu	Primer dizisi
GCaMP6s	19908 (mutant ileri primer)	ACG AGT CGG ATC TCC CTT TG
GCaMP6s	oIMR9021 (geri primer)	CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC
Cre	13126 (ileri primer)	CGG TAC CAC CAA ATC TTA CGG
Cre	11642 (mutant geri primer)	ATC GAC CGG TAA TGC AGG CAA

**Tablo 5.3.3:** Cre için kullanılan PZR reaksiyon bileşenleri

PCR Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µl)
Quickload Master Mix (2x)	5
13126	0.5
11642	0.5
ddH2O	3
DNA	1

**Tablo 5.3.4:** GCaMP6s için kullanılan PZR reaksiyon bileşenleri

PCR Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µl)
Quickload Master Mix (2x)	6
19908	0.5
oIMR9021	0.5
oIMR9020	0.3
ddH2O	3.7
DNA	1

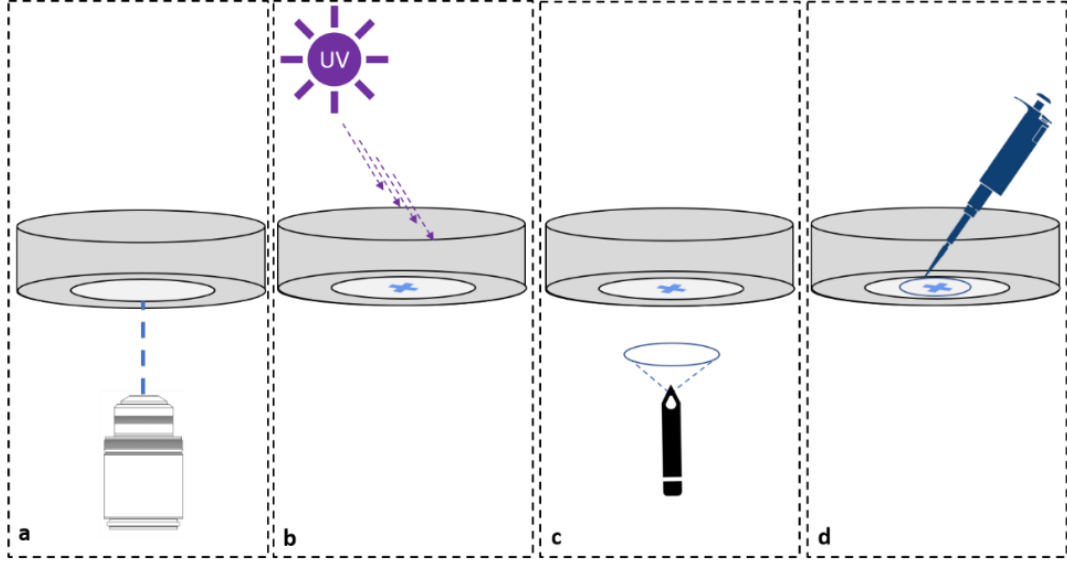
**Tablo 5.3.5:** Ortak PZR reaksiyonu protokolü

Sıcaklık	Süre
95 C	1:00
95 C	0:25
60 C	0:20
68 C	0:35
2. adıma dön (35x)	
72 C	3:0

## 5.4. Hücre Kültürüne Hazırlık

### 5.4.1. Hayatta kalım takibi için petri kaplarının hazırlanması

- Standart 35-mm cam tabanlı petri kapları kullanıldı.
- Petri kaplarının alt yüzeyleri PALM mikro-diseksiyon cihazının UV lazeri ile aşındırılarak (+) sembolü çizildi (Şekil 5.4.1-a).
- Petri kapları ve kapakları %70 etanol ile sterilize edilip steril distile su ile 2-3 kez durulandı. Laminar akış kabini içine yerleştirilip UV ışıkta 2 saat bekletilerek UV-sterilizasyon gerçekleştirildi. (Şekil 5.4.1 -b).
- Saat 12 yönü kalıcı kalemle dış yüzeye işaretlendi, her ekim yoğunluğu için farklı yarıçapta daireler cam petri kaplarının altına kalıcı marker ile işaretlendi. (Şekil 5.4.1-c)
- Periferik sinir kültürleri için:  $d_1:10-15 \text{ h/mm}^2$ ,  $d_2:20-25 \text{ h/mm}^2$ ,  $d_3:40-45 \text{ h/mm}^2$  yoğunlukları için,  $r_1:10\text{mm}$ ,  $r_2:7\text{mm}$ ,  $r_3:5\text{mm}$ , yarıçaplarında daireler çizildi.
- Yalnızca işaretlenen alanlar %1 poly-l-lizin (PLL:dH<sub>2</sub>O) ile kaplandı (RT, 2 saat)
- PLL uzaklaştırılarak petri kapları 2 kez steril distile su ile yıkandı.
- Yalnızca işaretlenen alanlar %1 laminin (laminin:dH<sub>2</sub>O) ile kaplandı (37°C,12 saat)
- Laminin uzaklaştırılarak petri kapları 2 kez steril distile su ile yıkandı.
- Ekim öncesi kurumaya bırakıldı.

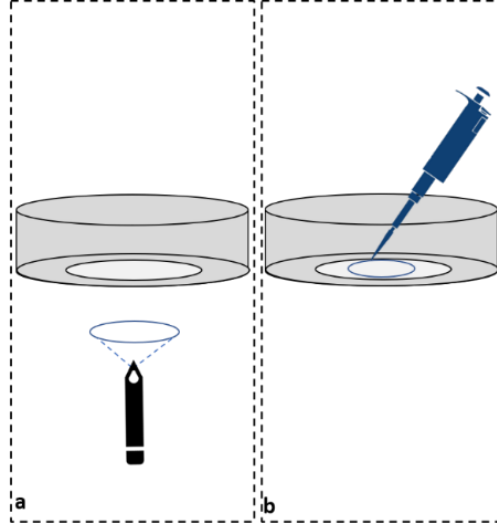


**Şekil 5.4.1:** Canlılık takibi yapılacak petri kaplarının hazırlanması.

Petri kaplarının tabanlarına lazerle işaretleme yapıldı (a), petri kapları sterilizasyona tabi tutuldu (b), kalıcı kalemle ekim alanı petri kabı tabanına işaretlendi (c), petri kabı iç yüzeyinde yalnızca çizili, alan yüzey aktif maddelerle kaplandı (d).

#### 5.4.2. Aktivite takibi için petri kaplarının hazırlanması

- Standart 35-mm cam tabanlı petri kapları kullanıldı.
- Her ekim yoğunluğu için farklı yarıçapta daireler cam petri kaplarının altına kalıcı marker ile işaretlendi. Periferik sinir kültürleri için:  $r_1$ :10mm,  $r_2$ :7mm,  $r_3$ :5mm, yarıçaplarında daireler çizildi (Şekil 5.4.2-a)
- Yalnızca işaretlenen alanlar %1 poly-1-lizin (PLL:dH<sub>2</sub>O) ile kaplandı (RT, 2 saat)
- PLL uzaklaştırılarak petri kapları 2 kez steril distile su ile yıkandı.
- Yalnızca işaretlenen alanlar %1 laminin (laminin:dH<sub>2</sub>O) ile kaplandı (37°C,12 saat)
- Laminin uzaklaştırılarak 2 kez steril distile su ile yıkandı.
- Ekim öncesi kurumaya bırakıldı (Şekil 5.4.2)



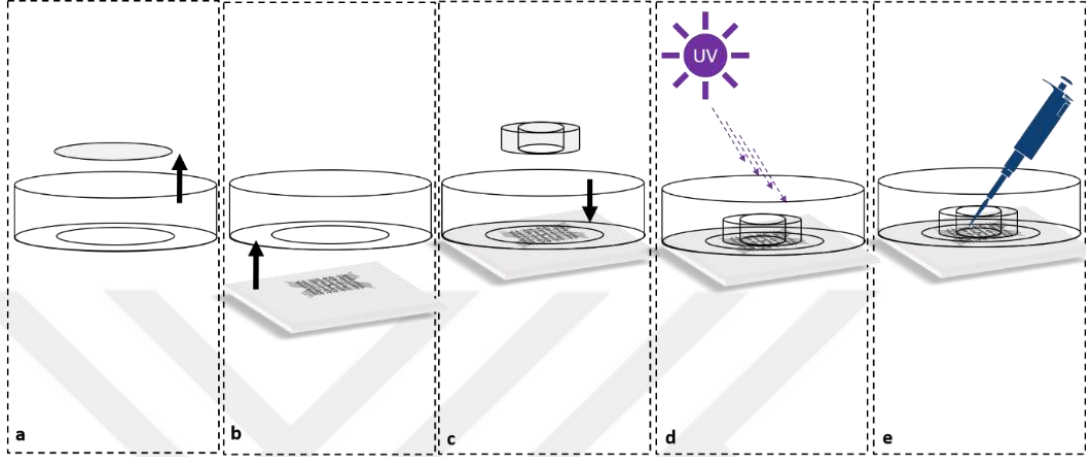
**Şekil 5.4.2:** Aktivite takibi yapılacak petri kaplarının hazırlanması.

Kalıcı kalemle ekim alanı petri kabı tabanına işaretlendi (a), petri kabı iç yüzeyinde yalnızca çizili, alan yüzey aktif maddelerle kaplandı (b).

#### 5.4.3. MEA petri kaplarının hazırlanması

- Mikro elektrot dizileri 5x5 cm genişliğinde, 1,1 mm kalınlığında bir cam parçasının ortasına gömülü şekilde bulunmaktadır.
- Standart 35-mm cam tabanlı petri kaplarının cam kısımları çıkarılıp polistiren halka elde edildi (Şekil 5.4.3-a)
- Elektrot dizisi merkezde kalacak şekilde biyo-uyumlu toksik olmayan yapıştırıcı ile cam kısım, dizilerin bulunduğu cama tutturuldu (Şekil 5.4.3-b).
- Yapıştırıcının kuruması için bir gece beklendi.
- Silikon elastomerden farklı yarıçapta halkalar döküldü ve MEAlara yerleştirildi,  $r_1$ :10mm,  $r_2$ :7mm,  $r_3$ :5mm, yarıçaplarında halkalar hazırlandı. (Şekil 5.4.3-c).
- MEAlar %70 etanol ile sterilize edilip steril distile su ile 2-3 kez durulandı, Laminar akış kabini içine yerleştirilip UV ışıktaki 2 saat bekletilerek UV-sterilizasyon gerçekleştirildi (Şekil 5.4.3-d).
- Mea petripleri %1 polyetilenamin (PEI) ile kaplandı (RT, 12 saat)
- PEI uzaklaştırılarak 2 kez steril distile su ile yıkandı.

- %2 laminin (laminin:dH<sub>2</sub>O) ile kaplandı (37°C,12 saat)
- Laminin uzaklaştırılarak 2 kez steril distile su ile yıkandı.
- Ekim öncesi kurumaya bırakıldı.



**Şekil 5.4.3:** MEA petri kaplarının hazırlanması.

35mm'lik cam tabanlı petri kaplarının cam alt yüzeyleri çıkarıldı (a), MEA dizilerini bulunduran camlara tutturuldu (b). Ekim alanını oluşturmak üzere hazırlanan biyo-uyumlu silikon elastomer halkalar MEA üzerine tutturuldu (c), MEA petri petri sterilizasyona tabi tutuldu (d), halkaların içleri yüzey aktif maddelerle kaplandı (e).

#### 5.4.4. Vasatların hazırlanması

Vasatlar kültür ve vasat değiştirme öncesinde taze olarak hazırlandı. Hücre vasatı değiştirilmeden önce hazırlanan taze vasat etüvde 37°C'ye getirildi. Vasatların içeriğine tablo 5.4.1'de görülebilir.

**Tablo 5.4.1:** AKG kültürleri için diseksiyon ve yaşam vasatları bileşenleri

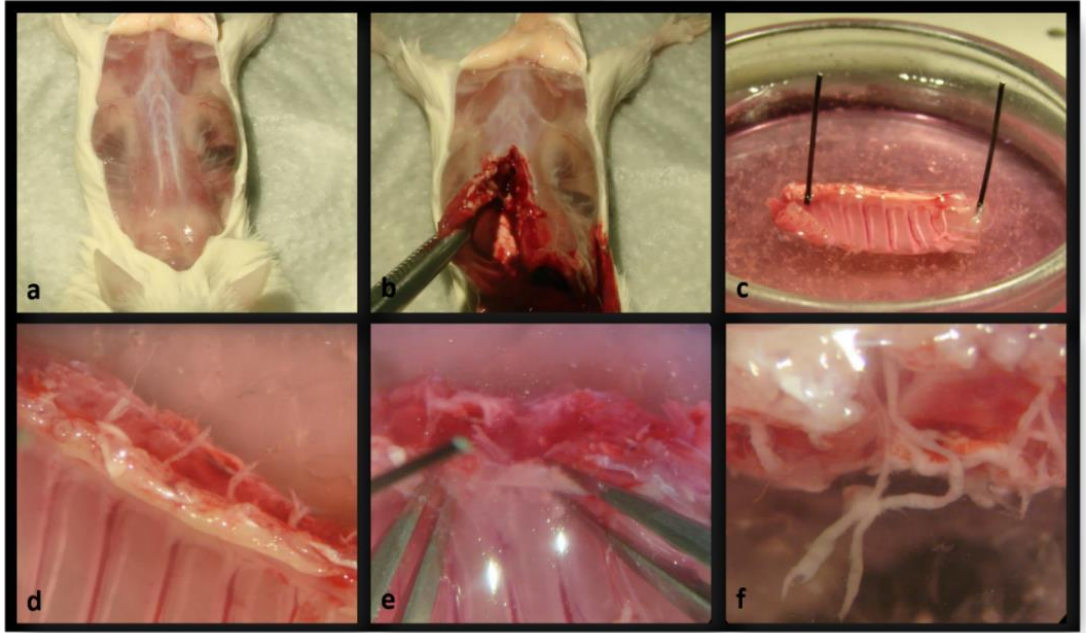
Diseksiyon vasatı		Kültür vasatı		Yaşam Vasatı	
RPMI 1640	%1 Antibiyotik	Neurobasal A	%1 Antibiyotik	Neurobasal A	%1 Antibiyotik
	%1 GlutaMAX		%1 GlutaMAX		%1 GlutaMAX
			%2 B27		%2 B27
		%5 Horse Serum			



## 5.5. Hücre Kültürü

### 5.5.1. AKG diseksiyonu

Balb/c fareler CO<sub>2</sub> solutma yöntemi ile sakrifiye edildi. Fare 70% EtOH ile yıkandıktan sonra sırt derisi açılarak kostalar disekte edilip soğuk tabla üzerindeki diseksiyon vasatı içerisine alındı. Diseksiyon vasatı birkaç kez tazelenerek eritrositler uzaklaştırıldı. Hızlı bir şekilde kostaların omurgaya bağlandığı noktalarda gömülü olan AKG'ler, kaburga uçları forseps ile ayrılarak 0,5X stereo mikroskop altında toplandı. 35 ila 45 adet AKG çıkarılıp diseksiyon vasatı içinde periferik ve santral uzantıları budanarak temizlendi (Şekil 5.5.1)



**Şekil 5.5.1:** AKG diseksiyonu.

CO<sub>2</sub> solutma yöntemi ile sakrifiye edilen fareler 70% EtOH ile yıkandıktan sonra sırt derisi stereo mikroskop altında açıldı (a), dekapitasyon sonrasında kaburgaların kosta kemikleri omurgaya bağlandığı yerden ayrılarak (b) diseksiyon vasatına alındı (c). AKG'lerin merkezi sinir sistemine uzanan sinirleri açığa çıkacak şekilde temizlendi (d), kosta kemikleri ayrılarak AKG'ler forseps yardımıyla çıkarıldı (e, f).

### 5.5.2. AKG hücrelerinin elde edilmesi

- 15-20 AKG 1 ml birinci enzim solüsyonuna alındı (Kollajenaz tip1, 100 U/ml, kültür vasatı içinde)
- 45 dakika inkübe edildi (37°C, %5CO<sub>2</sub>)
- Enzim solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Dokular HBSS ile yıkandı (1m X3)
- Dokular 1ml'lik ikinci enzim solüsyonuna alındı (Tripsin 1mg/ml, kültür vasatı içinde)
- 15 dakika inkübe edildi (37°C, %5CO<sub>2</sub>)
- Tripsin ortamdayken dokulara DNase eklendi (50 lg/mL)
- Dokular gittikçe daralan pipet uçlarından ve son olarak 26G insülin iğnesinden geçirilerek nazikçe triture edildi
- Bir kez daha DNase eklenerek (50 lg/mL) 30 dakika inkübe edildi (37°C, %5CO<sub>2</sub>)
- Hücreler inkübasyon sonunda 800 RPM'de 3 dakika santrifüjlendi (4°C)
- Enzim içeren süpernatant atıldı
- Pellete enzim durdurma solüsyonu eklendi (%10 FBS ve 700lg/mL Tripsin inhibitörü, kültür vasatı içinde)
- 3-seviyeli Percoll gradiyenti oluşturuldu. (Yukarıdan aşağıya Percoll yüzdesi: %10, %35, %60, kültür vasatı içinde)
- Enzim durdurma solüsyonundaki hücreler yavaşça gradiyentin üstüne bırakıldı.
- Gradiyent 1700 RPM'de 20 dakika santrifüjlendi (4°C)
- %35'lik Percoll tabakasından hücreler toplandı ve 3 ml kültür vasatı içine alındı
- 800 RPM'de 3 dakika santrifüjlendi.
- Temiz nöronlardan oluşan pellete yaşam vasatı eklendi.

### 5.5.3. AKG hücrelerinin ekimi

AKG nöronları çeşitli yarıçaplarda ekim alanlarına  $\text{mm}^2$ 'ye yaklaşık 40, 20 ve 10 hücre gelecek şekilde ekildi. Hücre ekim yoğunluğu değiştirilirken petri kabı başına düşen toplam hücre sayısının ve toplam yaşam vasatının tüm örneklerde aynı olmasına dikkat edildi. Böylece hayatta kalımı veya aktiviteyi etkileyebilecek olası hümmoral olayların her petri kabında aynı olması planlandı. (Tablo 5.5.1)

**Tablo 5.5.1:** AKG hücrelerinin ekim yoğunlukları

Nominal yoğunluk (hücre/ $\text{mm}^2$ ):	40-45 h/ $\text{mm}^2$	20-25 h/ $\text{mm}^2$	10-15 h/ $\text{mm}^2$
Kültür sayısı:	9	9	9
Ekilen hücre sayısı:	3000	3000	3000
Ekim alanı( $\text{mm}^2$ )	75 $\text{mm}^2$	147 $\text{mm}^2$	300 $\text{mm}^2$
Ekim alanı yarıçapı (mm)	r=5mm	r=7mm	r=10mm

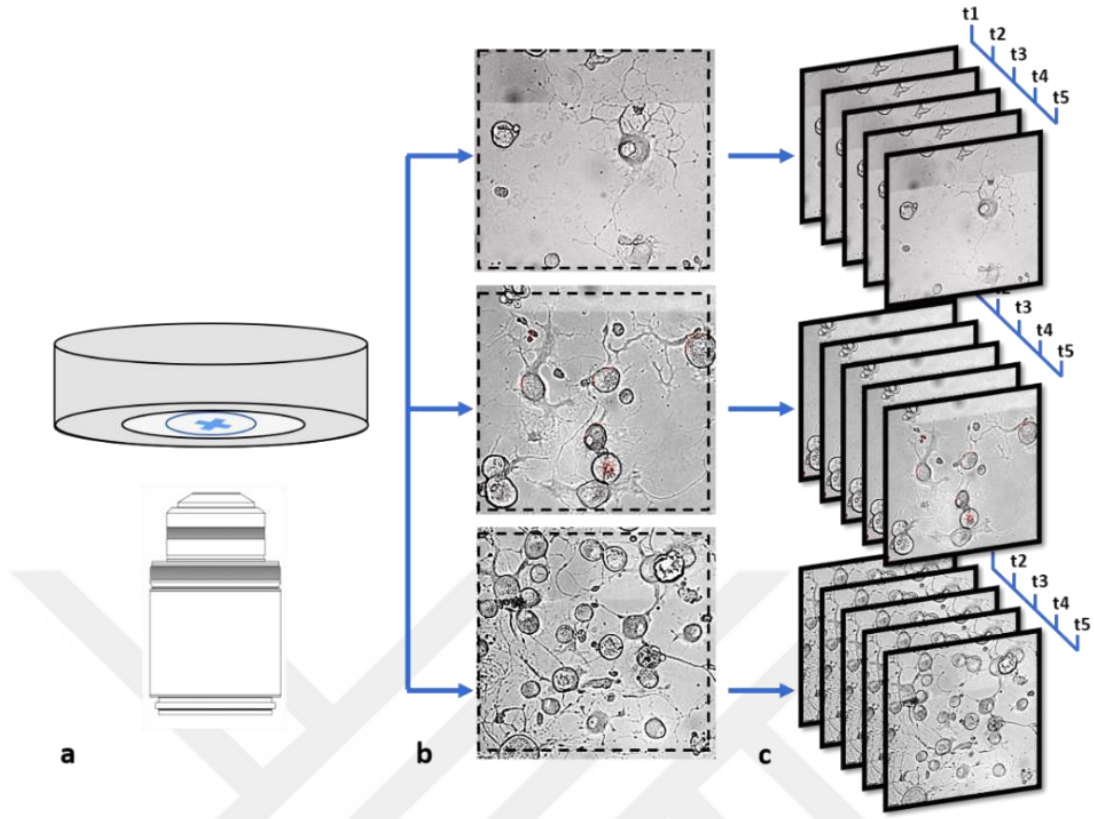
**Tablo 5.5.2:** AKG hücrelerinde kaplama protokollerinin özeti.

Deney:	Petri kabı:	İşaretleme/çizim:	Kaplama:	Yoğunluk:
Ekim yoğunluğunun hayatta kalıma etkisinin araştırılması	35-mm cam tabanlı	Lazer işaretleme (+) ve Halka çizimi	%1 PLL, %1Laminin	<b>Tablo 5.5.1</b>
Ekim yoğunluğunun aktiviteye etkisinin kalsiyum görüntüleme ile araştırılması	35-mm cam tabanlı	Halka çizimi	%1 PLL, %1Laminin	<b>Tablo 5.5.1</b>
Ekim yoğunluğunun aktiviteye etkisinin MEA ile araştırılması	MEA petri kabı	Silikon halka havuzları	Alev, %1PEI, %2Laminin	<b>Tablo 5.5.1</b>
Periferik sinir hücrelerinde uyarılabilirlik çalışmaları	35-mm cam tabanlı	-	%1PLL, %1Laminin	20-25 h/ $\text{mm}^2$
AKG kültürlerinde nöral ağ oluşumu	MEA petri kabı	4,7 mm çapında klonlama halkası	Alev, %1PEI, %2Laminin	80-100 h/ $\text{mm}^2$
AKG kültürlerinde hasara SGC yanıtı	35-mm cam tabanlı	-	%1PLL, %1Laminin	10-15 h/ $\text{mm}^2$

## **5.6. Ekim Yoğunluğuna Bağlı Aktivitenin Hayatta Kalmaya Etkisinin Araştırılması**

### **5.6.1. Ekim yoğunluğunun Hayatta Kalımla İlişkisinin Araştırılması**

Hayatta kalım takibi için hücreler kültürdeki birinci günden itibaren ölü hücre çekirdeklerini boyayan Propidyum iyodür (PI) ile muamele edildi (%5 nihai konsantrasyon). Hayatta kalım aralıklarla takip edildi. Parlak alan görüntüleme için 76ms, floresan için 35 ms poz (exposure) süresi kullanıldı. Hayatta kalım analizleri için hücrelerin biçimini, çeşidini ve uzantılarını seçebilmek amacıyla 20X objektiften yararlanıldı (LD Plan Neofluor 20X, 0,4 Korr M27). Her gün aynı alanın çekilmesi hedeflendi, petri kabı ortasına alt yüzeyden bu sebeple çizilen (+) şekli görüntüleme alanının ortasına getirilerek tabla konumu 0'a ayarlandı, 0'ı merkezde tutarak 8x8 alandan görüntü alındı. Kırmızı floresan kanalında ölen hücrelerin çekirdekleri görüntülendi, parlak alan görüntüleme sayesinde yapısal özellikleri çok belirgin olan nöronların sayım esnasında glialardan görsel olarak ayırt edilebilmesi hedeflendi. Görüntüleme kültürdeki 1,3,5,7,9 ve 11.günlerde gerçekleştirildi. Böylece aynı hücrelerin zaman içindeki değişimleri ve hayatta kalımları takip edildi (Şekil 5.6.1)



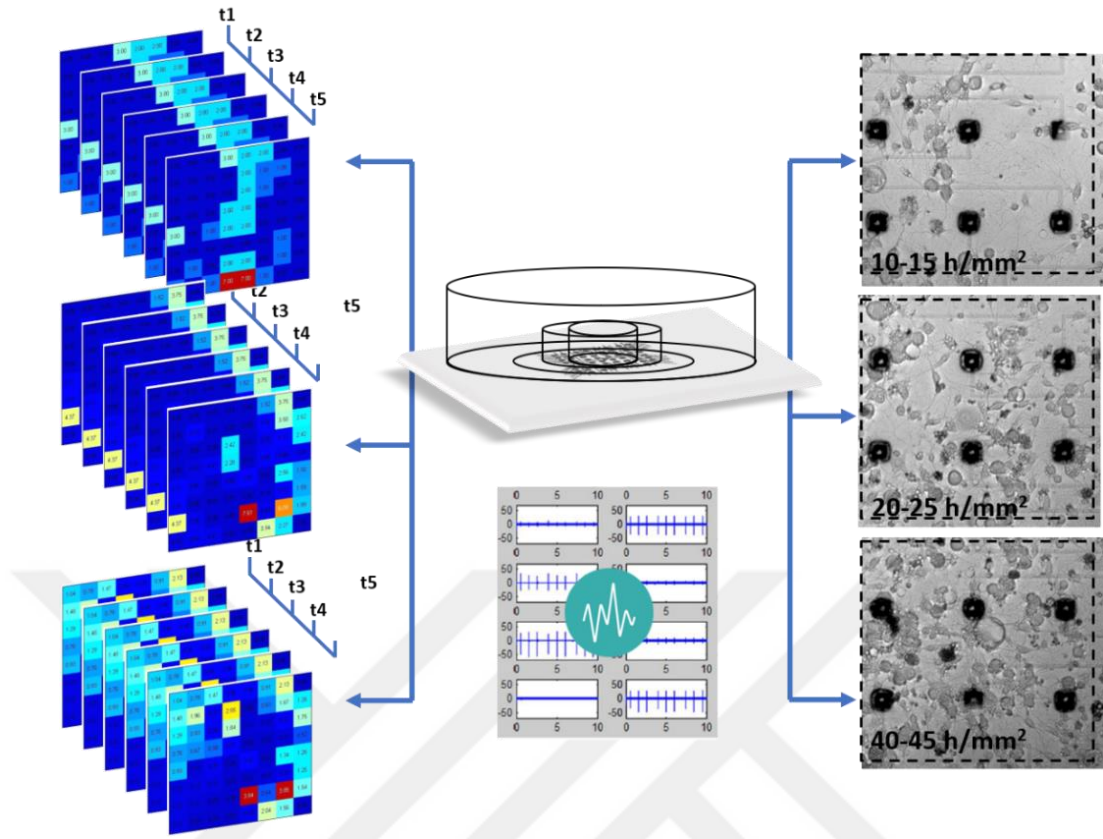
**Şekil 5.6.1:** Canlılık takibi için deney düzeneği.

Belirli aralıklarla petri kaplarının altındaki (+) işareti (0,0) konumuna getirilerek aynı alanlar görüntülendi(a). Çeşitli ekim yoğunluğundaki hücreler (b), çeşitli günlerde alınmış görüntüleri (c)

## 5.6.2. Ekim Yoğunluğuna Bağlı Spontan Aktivitenin Araştırılması

### MEA ile spontan aktivite takibi

Nöron kültürlerinde spontan aktivitenin zamanla değişimini takip etmek amacıyla öncelikle MEAlara üç ayrı yoğunlukta ekilmiş nöron kültürlerinden, herhangi bir boyamaya ihtiyaç duyulmadan aralıklarla 37°C fizyolojik sıcaklıkta elektriksel kayıt alındı. Kayıt sonucunda 64 elektrottan kaydedilen elektriksel aktivite, 8X8 matrisler halinde elde edildi (Şekil 5.6.2)



**Şekil 5.6.2:** MEA kaydı deney düzeneği.

Çeşitli yoğunluklarda ekilen hücrelerden (sağ) çeşitli aralıklarla kayıt alındı (sol)

### **Kalsiyum görüntüleme ile spontan aktivite takibi**

Nöron kültürlerinde spontan aktivitenin zamanla değişimini takip etme amacıyla Fluo-4 kalsiyum görüntüleme metodundan faydalanıldı. Bunun için hücre tipine göre fluo-4 miktarı optimize edildi. 10-15 h/mm<sup>2</sup>, 20-25 h/mm<sup>2</sup>, 40-45 h/mm<sup>2</sup> yoğunluklarında ekilmiş AKG nöronlarına 2,5 µM/ml Fluo-4, yüklendi yüklendi ve spontan olarak görüntüledi aralıklı günlerde görüntü kaydedildi. (Şekil 5.6.3)

### **Fluo-4 Yükleme Protokolü**

Laminar akım kabininin içinde, hücrelerin içinde bulunduğu yaşam vasatı pipetlenerek hücreler oda sıcaklığındaki HBSS ile 1 kez, Tyrode's solüsyonu ile 1 kez yıkandıktan sonra 1ml'lik boya yükleme solüsyonu eklendi (Tablo 5.6.1-4). Pipetlemeler esnasında

hücrelerin kalkmaması için nazik davranıldı ve normalde +4°C’de saklanan solüsyonların oda sıcaklığında olmasına özen gösterildi. İnkübasyon oda sıcaklığı civarında gerçekleştiği için 37°C’lik memeli etüvü yerine 25°C’lik %5 CO<sub>2</sub> içeren amfibi etüvünde 30 dakika bekletildi. 30 dakika sonunda boyama solüsyonu çekilerek 1 kez Tyrode’s solüsyonu ile yıkama yapıldı. Hücreler görüntüleme vasatına alındı (Tablo 5.6.5). Fizyolojik şartlara dönebilmeleri için 37°C’lik %5 CO<sub>2</sub> içeren memeli etüvüne kaldırıldı. 10 dakika sonra görüntülemeye geçildi.

**Tablo 5.6.1:** Tyrode’s solüsyonu içeriği

Kimyasallar:	1mM	50 ml için gerekli miktar (gr)
KCl	5	0,0187
NaCl	140	0,4
Hepes	5	2,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	0,0071
MgCl <sub>2</sub>	1	0,004
CaCl <sub>2</sub>	1,8	0,013
Glukoz	10	0,09

**Tablo 5.6.2:** %20’lik pluronik asit hazırlanması için gerekenler

Pluronic Asit:	dH <sub>2</sub> O
0,05gram	5ml

**Tablo 5.6.3:** 2,5 µM’lik, 1 ml boya yükleme solüsyonu

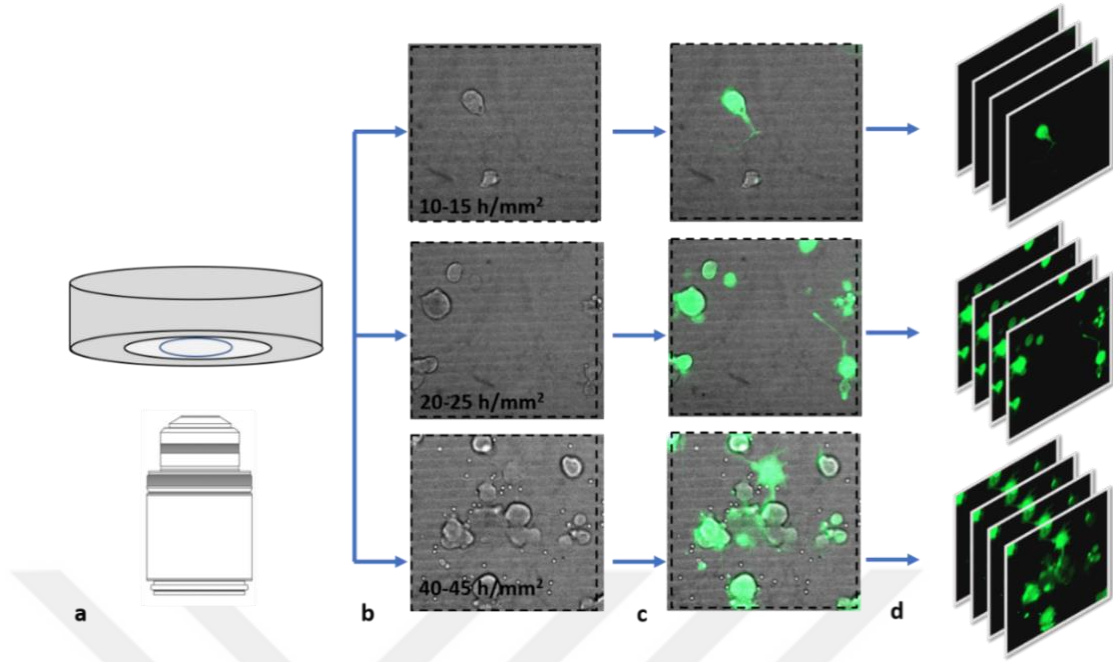
Solüsyonlar:	Eklenecek miktar
Tyrode’s solüsyonu	992,5 µl
Pluronic asit çözeltisi (%20’lik)	5 µl
Fluo-4 (1nM’lik stoktan)	2,5 µl

**Tablo 5.6.4:** 1 µM’lik, 1 ml boya yükleme solüsyonu

Solüsyonlar:	Eklenecek miktar
Tyrode’s solüsyonu	994 µl
Pluronic asit çözeltisi (%20’lik)	5 µl
Fluo-4 (1nM’lik stoktan)	1 µl

**Tablo 5.6.5:** Görüntüleme vasatı

Görüntüleme Vasatı	
Fenol kırmızı’sız Neurobasal A	% 1 antibiyotik
	% 1 glutamax
	% 1 B27



**Şekil 5.6.3:** Kalsiyum aktivite takibi için deney düzeneği.

Belirli aralıklarla çeşitli yoğunluklarda ekilmiş hücreler (b), Fluo-4 kalsiyum indikatörü ile yüklendi (c), her gün 50-200 arasında ardarda hızlı çekim yapıldı (d)

### 5.6.3. Görüntü analizi ve istatistik (1)

Deneysel sonucu .dzi formatında görüntüler kaydedildi. Hücre sayımı, ilgilenilen bölgelerin seçimi ve piksel datalarının numerik diziler halinde kaydedilmesi ve format değişimi için FIJI uygulamasından faydalanıldı [137].

*Ekim yoğunluğunun hayatta kalmaya etkisinin araştırılması için hayatta kalım takibi sonucu kaydedilen parlak alan+PI görüntülerinden günlük ölü ve canlı hücreler sayımı yapıldı (Şekil 5.6.4-a,d). Hücre sayıları Office Excel programında tablo haline getirildi. Her gün için, canlı hücrelerin ölü ve canlı hücrelerin toplamına oranlandığı “canlılık1” ve canlı hücrelerin kültürdeki 1.gün canlı olan toplam hücrelere oranlandığı “canlılık 2” değerleri hesaplandı. Ölü hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılan PI ölen tüm hücrelerin çekirdeklerini işaretlediği ve kültürlerde glia ölümleri de olduğu için “canlılık1” değerinde istenmeyen pertürbasyonlar oluştu. Bu yüzden canlılık takibi için “canlılık2” oranından faydalanıldı. Her gün aynı alanlar görüntülediği için “canlılık2” oranı her bir petri kabındaki canlılık değişimini sağlıklı şekilde ifade etmekteydi. Fakat her görüntüleme alanında bulunan hücre sayısı, petri*



kabındaki hücre yoğunluğunu rakamsal olarak temsil etmedi. Bu nedenle verilerin görselleştirilmesi için oranlar her yoğunluk için önceden belirlenen bir div1 canlı hücre sayısı ile optimize edildi. Canlılığın zamanla değişimi grafiklerinin hazırlanması için Excel ve Graphpad Prism7 'den faydalanıldı. Yoğunluğun hayatta kalım oranına etkisinin araştırılması için Kaplan Meier hayatta kalım eğrileri (survival curve) çizildi. İki hayatta kalım eğrisinin kıyaslanması için “log rank testi” kullanıldı. Sıfır hipotezi olarak incelenen hücre popülasyonlarının ölüm oranları arasında hiçbir fark olmadığı kabul edildi. Test için (1.1)'den faydalanıldı.

$$x^2(\log rank) = \frac{(O_1 - E_1)^2}{E_1} + \frac{(O_2 - E_2)^2}{E_2} \quad (1.1)$$

$O_1$  ve  $O_2$  grup (popülasyon) 1 ve 2'deki gözlemlenen olaylar,  $E_1$  ve  $E_2$  ise aynı gruplardaki beklenen olayları ifade eder. Sıfır hipotezine göre, ölüm riski (ölüm olaylarının sayısı / hayatta kalanların sayısı) bir grup için hesaplanıp bu durumun diğer gruba uygun olup olmadığı kontrol edilir. Bir grup için toplam beklenen olay sayısı (1.2) ile hesaplanır:

$$E_2 = \sum_{i=1}^k \frac{d_i}{r_i} r_{2i} \quad (1.2)$$

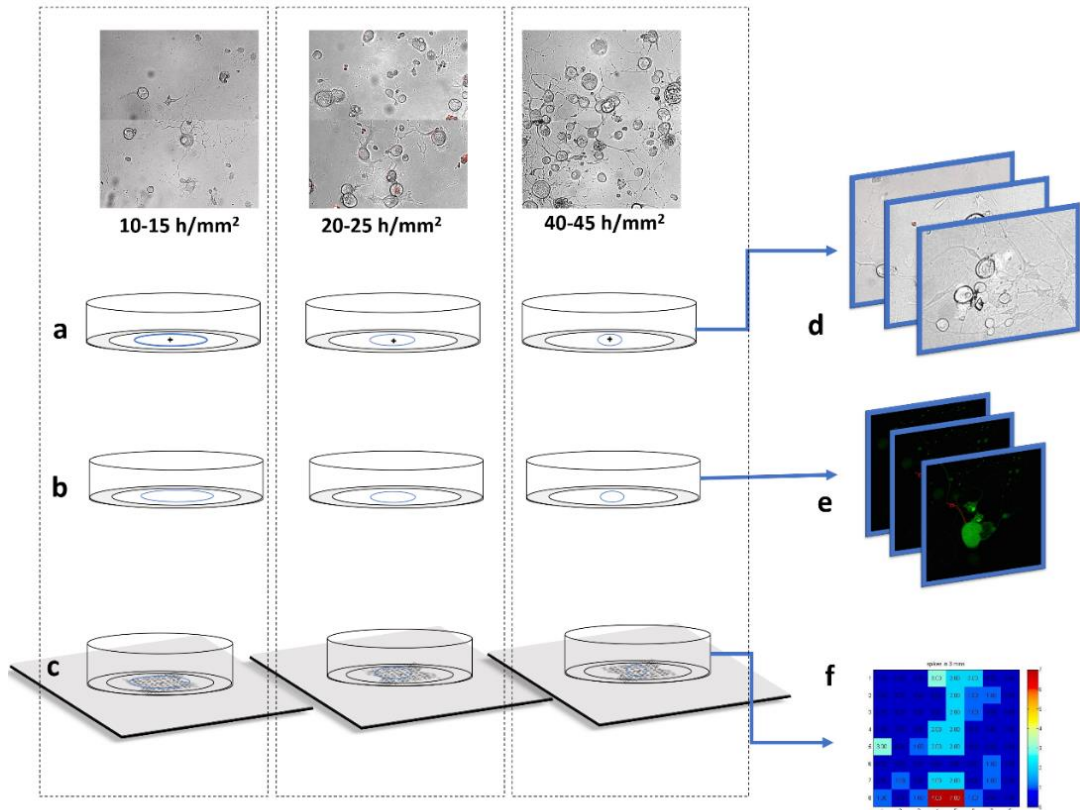
$r_{2i}$ ,  $i$  olayı esnasında, grup 2'nin hayatta kalan popülasyonunu temsil eder. Her olay için,  $n$  toplam olay sayısı olmak üzere,  $E_1 = n - E_2$  formülünden bulunabilir. Eğriler, her olay için kıyaslanarak bir  $p$  değeri bulunur.

*Ekim yoğunluğunun aktiviteye etkisinin araştırılması amacıyla spontan aktivite takibi için iki ayrı data elde edildi. Bunlardan ilki olarak Fluo-4 yüklemesi ve görüntüleme sonucu ele edilen zaman serisi görüntüleri incelendi (Şekil 5.6.4-b,e). Her gün için elde edilen serilerden hücre gövdeleri ROI olarak seçildi. Her bir frame için arkaplan florasan gürültüsü ROI'lerden çıkarılarak kalsiyum datası temizlendi. Her ROI için  $\Delta F = F_i - F_0$  hesaplandı ve  $R = \Delta F / F_i$  değeri grafiğe döküldü. Her data serisi için ( $N = \text{Max}R - \text{Min}R$ ) değeri hesaplandı. Kalsiyum değişimi için  $N = 0,015$  limiti belirlendi. Hatalı-pozitif (False-positive) değerlerin elenmesi için yoğun solma olan ve tüm hücrelerde aynı keskin değişimin gözlemlendiği görüntü serileri sayıma dahil*

edilmedi. Hızlı ve yavaş kalsiyum değişimi gösteren hücrelerin tamamı aktif olarak kabul edildi. Bu aktiviteyi indükleyecek herhangi bir uyarı olmadığı için aktivitenin spontan olduğu düşünüldü. Kalsiyum aktivitesi gösteren hücrelerin sayısı, görüntülenen toplam hücrelere oranlanarak “**aktivite**” değeri elde edildi.

İkinci data serisi de MEA kayıtlarından elde edildi (Şekil 5.6.4-c,f). Ölçüm yapılan her gün için aktivite görülen kanalların sayısı toplam kanal sayısına oranlanarak “**aktivite**” değeri elde edildi.

Aktivite/zaman grafiklerinin hazırlanması için Excel ve Graphpad Prism7 ‘den faydalanıldı. Aktivitenin ekim yoğunluğuna göre değişim gösterip göstermediği Kruskal Wallis testi ile, ekim günleri arasındaki fark ise Friedman istatistik testi ile araştırıldı.

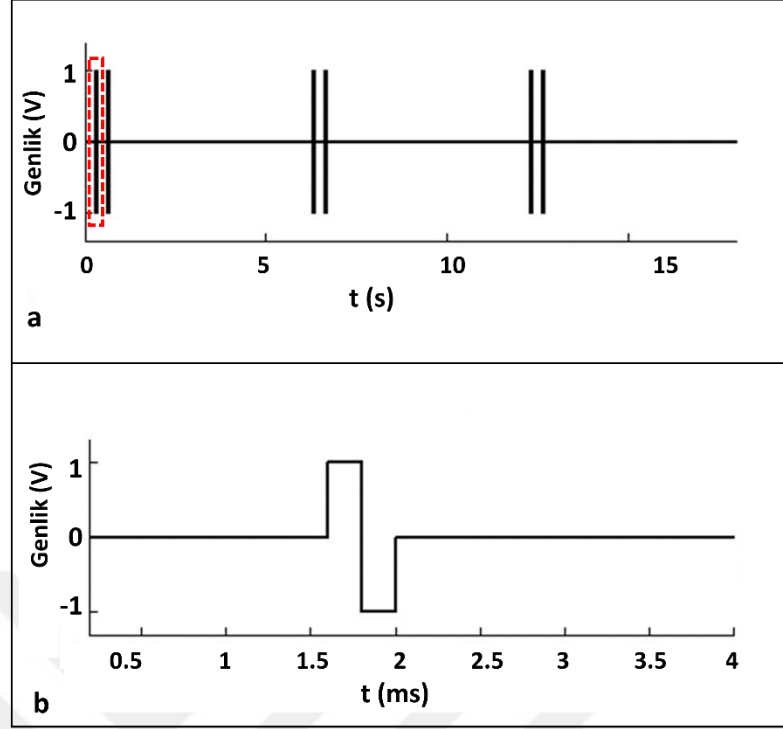


**Şekil 5.6.4:** Ekim yoğunluğuna bağlı aktivitenin hayatta kalmaya etkisini inceleyen deneylerinin özeti.

## 5.7. AKG Kùltürlerinde Nöral Ağ Oluşumunun İncelenmesi

### 5.7.1. Elektriksel uyarı protokolü

Deneyleerde kullanılan elektriksel uyarı donanımı, MEA, headstage, dijital-analog çevirici, router circuitry ve kontrol ünitesinden (PC) oluşur. Dijital uyarı sinyalleri, 5 kHz örnekleme hızında National Instruments (NI) 6001 kartı kullanılarak analog voltajlara dönüştürüldü. Analoga dönüştürme ve yönlendirici devresi (router circuitry), MATLAB'da, Data Acquisition Toolbox (Mathworks Inc.) ile yazılmış özel bir kod ile kontrol edildi. Uyarı sinyalleri voltaj kontrollü iki-fazlı darbeler olarak uygulandı. (Şekil 5.7.1) Uyarım parametreleri önceki çalışmalardan uyarlanmıştıır [135, 136, 138]. Darbe süreleri (pulse duration) ve genlikleri, stabil ve tekrarlanabilir cevapları indüklemek için ampirik olarak 100-500 µs ve 1-3 V aralıklarında ayarlandı [139]. Önce uyarılmış nöral yanıt görülene dek voltaj genlik ayarlaması yapıldı. Belli bir genlikte nihai yanıt görüldükten sonra bir alt basamağa tekrar inilerek yanıtın uyarılmış olduğuna dair kontrol verisi kaydedildi. Stimülasyon periyodu esnasında 2 atış yapılarak uyarımın etkinliğı optimize edildi. Bireysel kalsiyum yanıtlarını net bir şekilde gözlemlemek için stimülasyon süresi 6s olarak seçilmiştir [138, 139].



**Şekil 5.7.1:** Tipik uyarı stratejisi.

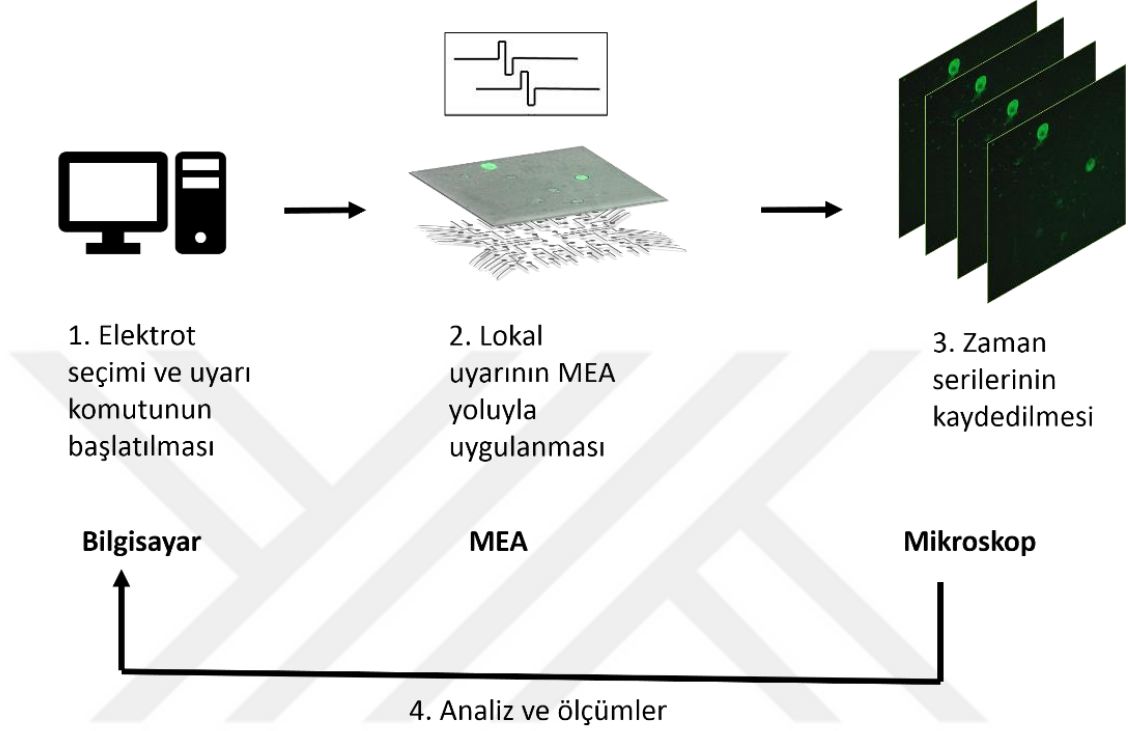
Bir uyarı sinyali, 0,5 saniyede tekrarlanan, 400 $\mu$ s süreli iki bifazik darbeden oluşur (kırmızı çerçeve içinde, b) . Bu sinyal 6 saniyelik periyotlarda tekrarlanır.

### 5.7.2. Deney düzeneği

Deney süresince MEA'lar, özel olarak üretilmiş ısıtıcılarla konfokal mikroskop tablasına yerleştirildi [140]. Kültürün belirli günlerinde, uyarı için aday elektrotlar mikroskop altında belirlendi. Bunun için tüm elektrotlara sırayla uyarı verilerek en çok cevap indükleyen bölgeler gözlemlendi ve kaydedildi. Deney esnasında seçilen elektrotlardan elektriksel uyarı gönderilirken eş zamanlı olarak time-lapse görüntü alındı. Geniş elektrot alanının tümünü görüntülemek için 10X Plan Apochromat objektif, 488 nm eksitasyon ve 500-550 nm emisyon filtreleri kullanıldı. Saniyede üç poz (fps) kaydedildi. Bu pozlama GCaMP6s dinamiklerini görüntülemek için oldukça yeterlidir [138]. Deneyin basitleştirilmiş bir diyagramı Şekil 5.7.2'de görülebilir.

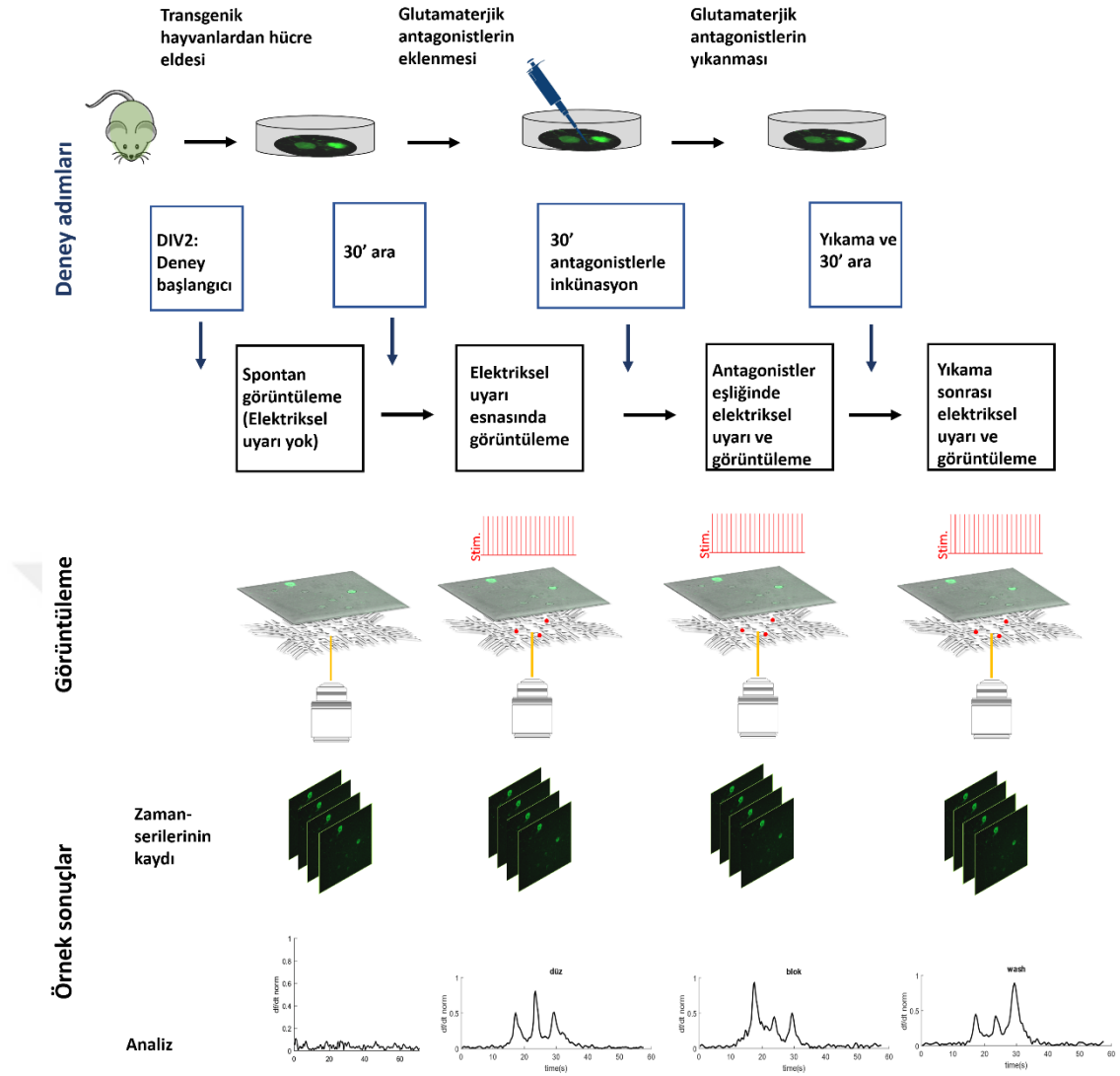
Tüm deneyler yukarıda anlatılan şartlarda ve aynı uyarı stratejisiyle gerçekleştirildi. Her deney için elektrot bölgesinde önce spontan görüntüleme gerçekleştirildi. Yarım saat aranın seçilen elektrotlara uyarı gönderilerek deney protokolü uygulandı. Ardından reseptör antagonistleri eşliğinde deney protokolü tekrarlandı [141]. Son faz

olarak antagonistler yıkanarak aynı uyarı protokolleri tekrarlandı. Deney süreci ve örnek kayıtlar Şekil 5.7.3’de görülebilir.



**Şekil 5.7.2:** AKG kültürlerinde nöral ağ oluşumunun incelenmesi deneyi.

Bilgisayar ortamından, MATLAB ara-yüzü kullanılarak belirli bir elektroda uyarı sinyali gönderilir, MEA sisteminden elektriksel uyarı elektroda iletilir (a), aynı zamanda glutamaterjik nöronlarında GCaMP6s ifade eden nöronlar görüntülenir ve zaman serileri kaydedilir (b). Son olarak elde edilen görüntülerden uyarıdan etkilenen tüm alanlar belirlenir ve analiz edilir (c).



**Şekil 5.7.3:** Deneysel süreci ve örnek kayıtlar.

Her deneysel adım için elektrot bölgesinde önce spontan bir görüntüleme gerçekleştirildi. Yarım saat aranın seçilen elektrotlara uyarı gönderilerek deneysel protokolü uygulandı. Ardından NMDA, AMPA ve Kainate reseptör antagonistleri eşliğinde deneysel protokolü tekrarlandı. Son faz olarak antagonistler yıkanarak aynı uyarı protokolleri tekrarlandı. Her grup tamamlandığında elde edilen zaman-serileri analiz edilerek grafiğe döküldü.

### 5.7.3. Bağlantıların nörokimyasal olarak bloklanması

Glutamaterjik yolların muhtemel bağlantılara etkisini incelemek amacıyla iki nörokimyasal blokör (reseptör antagonisti) kullanıldı. NMDA kanallarının bloklanması için AP5, AMPA ve kainate kanallarının bloklanması için ise CNQX kullanıldı [141]. AKG nöronları 30 dakika, 0,5µM CNQX, 100µM AP5 ile bloklanarak uyarı protokolü tekrarlandı.

#### 5.7.4. İmmünohistokimya

MEAlardan biri (Petri kabı 8) deney günü %4 paraformaldehit (PFA, pH~6.9) ile fikse edildi ve fosfat buffer ile nazikçe yıkandı (PBS). Bloklama ve geçirgenliğin artırılması bloklama solüsyonu ile yapıldı (Tablo 5.7.1). PBS ile ikinci yıkama ardından primer antikorlar ve sulandırma solüsyonu ile 1 gece 4°C’de inkübasyon gerçekleştirildi. Primer antikor olarak 1:200 oranında Anti  $\beta$ -III Tübülin (Abcam) ve 1:50 oranında Anti-Synaptophysin (Santa Cruz) kullanıldı. Primerlerin yıkanmasının ardından 633 nm ve 488 nm dalga boylarında sekonderler eklendi (Sırasıyla 1:100 ve 1:400). Boyama DAPI (1mg/ml) eklenmesiyle tamamlandı ve konfokal görüntülemeye dek örnekler 1:1000 PBS-Azit içinde muhafaza edildi.

**Tablo 5.7.1:** ICC solüsyonları

Bloklama solüsyonu:	Sulandırma solüsyonu:
<b>3% bovine serum albumin (BSA, Sigma),</b>	3% BSA
<b>1% goat serum (Sigma)</b>	1% goat serum
<b>0.3% sodium azide (Sigma)</b>	0.1% Triton-X (Sigma)
<b>PBS, Sigma</b>	PBS

#### 5.7.5. Görüntü analizi ve istatistik (2)

Deneyle sonucunda elde edilen görüntüler Fiji yazılımı ile işlendi [137]. ROI’ler olarak nöron gövdeleri, elle seçildi. Seçilmiş bir grup ROI ve karşılık gelen stimülasyon elektrotu, bireysel bir deney seti olarak atandı. Bir ROI’nin kapsadığı her pikselin, eşit olarak dağılmış ışık yoğunluğu varyasyonuna sahip olduğu varsayıldı ve her nöronal birimin kalsiyum aktivitesi, ortalama alınarak hesaplandı. Ardından, arkaplan değerleri çıkarıldıktan sonra her bir ROI için ışık yoğunluğunun göreceli değişimi;  $\Delta F/F(t)$  hesaplandı [142]. Gürültüyü ortadan kaldırmak ve aralık dışı frekans bileşenlerini (out-of-range frequency components) ortadan kaldırmak için her bir zaman serisine hareketli ortalama filtresi uygulandı [143].

Seçilen ROI'lerin yanıtları arasındaki benzerliği değerlendirmek için, her bir zaman serisi çiftine çapraz korelasyon ve çapraz kovaryans analizi (2.1 ve 2.2);

$$\sigma_{xy}(T) = \frac{1}{N-1} \sum_{t=1}^N (x_{t-T} - \mu_x)(y_t - \mu_y) \quad (2.1)$$

$$r_{xy}(T) = \frac{\sigma_{xy}(T)}{\sqrt{\sigma_{xx}(0)\sigma_{yy}(0)}} , \quad (2.2)$$

uygulandı.  $N$ ; uzunluk,  $\mu_x$  ve  $\mu_y$  sırasıyla  $x$  ve  $y$  zaman serilerinin ortalama değerleridir.

Stimülasyon periyodunda en uzun gecikmeye izin verecek şekilde çapraz korelasyon sinyallerinin maksimum değerleri belirlendi. Daha sonra gecikme-telafili çapraz korelasyon sonuçları kullanılarak, Pearson korelasyon katsayılarını bulmak üzere, denklem (2.3) ile sonuçlar incelendi;

$$c_{xy} = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[N \sum x^2 - (\sum x)^2] [N \sum y^2 - (\sum y)^2]}} \quad (2.3)$$

Bağıntısallık analizlerinde, seçilen bir eşik değerinin üzerindeki korelasyon katsayıları kullanıldı ve istatistiki anlamlılık (2.4) kullanılarak hesaplanan p-değeri istatistikleri ile belirlendi.

$$p_{xy} = c_{xy} \sqrt{\frac{N-2}{1-c_{xy}^2}} \quad (2.4)$$

Kalsiyum yanıtlarını hiyerarşik olarak gruplamak için city-block ve tam bağlantı kümeleme algoritmaları (complete link clustering algorithms) kullanıldı. Faz senkronizasyon indeksine ek olarak ilişkili kalsiyum tepkilerinin faz-eşleşme gücünü (phase coupling strength) belirlemek için *Ortalama Faz Tutarlılığı (Mean Phase Coherence MPC)*, değerleri hesaplandı [144]. MPC değerlerini hesaplamak için zaman serilerinin anlık faz farklarından (2.5) yararlanılmıştır,

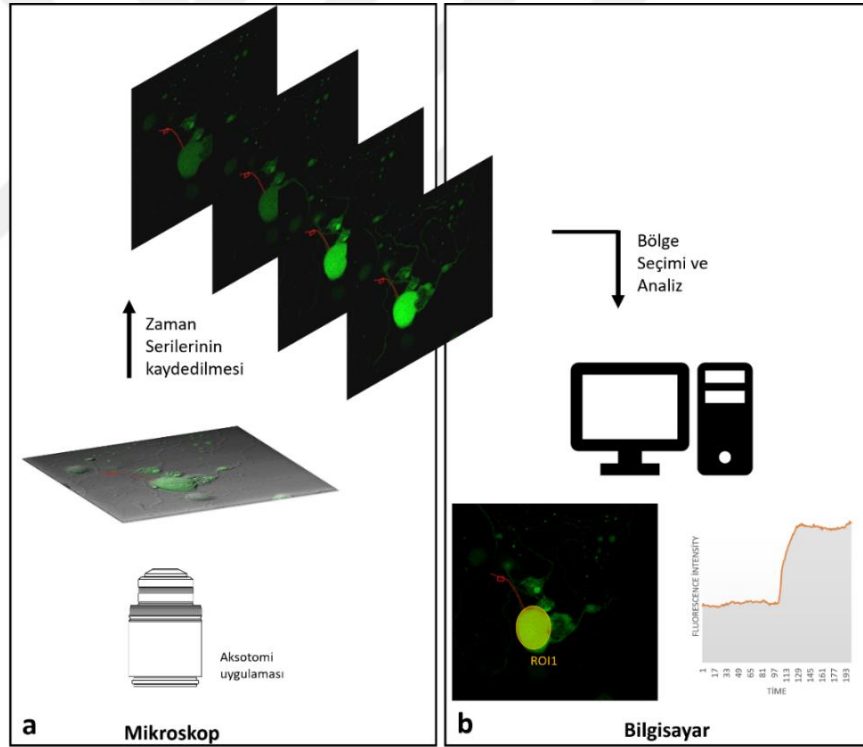
$$MPC_{xy} = \left| \frac{1}{N} \sum_{j=0}^{N-1} e^{i\varphi_{x,y}(j\Delta t)} \right| \quad (2.5)$$



## 5.8. In-Vitro Nörit Transeksiyonuna SGH Hücrelerinin Akut Kalsiyum Yanıtı

### 5.8.1. Deney düzeneği

35-mm cam tabanlı petri kaplarına 10-15 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğunda ekilmiş hücelere, Satellit glial hücrelerin nöron somalarından ayrılmaya başladığı kültürdeki 48-72 saat aralığında 2,5 µM/ml Fluo-4, yüklendi. Hücelere multi-foton ve konfokal görüntüleme sistemlerini birleştiren LSM780 mikroskobu kullanılarak hücre gövdesinde 50-100 µm uzaklıktan nörit kesisi yapıldı. Nöron ve SGH hücrelerinin hasara verdiği kalsiyum yanıtı akut olarak görüntülendi. Kızılötesi lazerin ortamda oluşturabileceği kalsiyum dalgalanması test edilmek üzere kesim kriterine uygun boşa (sham) atışlar yapıldı. Deneyin basitleştirilmiş bir diyagramı Şekil 5.8.1’de görülebilir.



Şekil 5.8.1: AKG hücrelerinde hasara SGH yanıtı deneyi.

Fluo-4 yüklenmiş hücelere mikroskop altında görüntülenirken belirlenen aksonlara IR lazerle akson hasarı yapıldı ve nöron ve glialardaki kalsiyum yanıtı zaman serileri olarak kaydedildi (a). Aksotomiden etkilenen bölgeler seçilerek analiz edildi (b)

### 5.8.2. Gap junction ve P2X7R'lerin nörokimyasal olarak bloklanması

Akson hasarı esnasında gerçekleşen kalsiyum hareketinin, glialar arasında kurulmuş gap-junction yapılarından olabileceği ihtimalini test etmek üzere gap-junction blokörü varlığında deneyler tekrarlandı. Bunun için hücreler 20 dakika 50 µM Carbenoxolone (CBX) içinde inkübe edildi ve CBX henüz ortamdayken akson hasarı protokolü aynı şekilde tekrarlandı [145].

Nöral akson hasarının SGH'lerde indüklediği kalsiyum hareketinde pürinerjik reseptör yollarının ve ATP'nin etkilerini araştırmak için deneyler 1µM P2X7 antagonisti Brilliant Blue G (BBG) varlığında tekrarlandı [146].

### 5.8.3. İmaj analizi ve istatistik (3)

Deneyler sonucu hücrelerin nörit kesisi sonrası zamansal kalsiyum değişimini gösteren zaman serileri elde edildi. Kesi yapılan nöron gövdeleri, kesi yapılan nörona bitişik SGH hücreleri ve ayrı SGH ağı FIJI yazılımı ile işaretlenerek 2 boyutlu parlaklık değişimi serilerine dönüştürüldü [137]. Seçilen alanların içerdiği her bir pikselin eşit oranda dağılım gösteren ışık şiddetine sahip olduğu farz edildi. Her bir nöronal ünite içindeki ışık değişiminden kalsiyum değişimiyle ifade edilen aktivite (3.1) ile hesaplandı.

$$F(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N f_i(t) \quad (3.1)$$

N: piksel sayısı olarak belirlendi.

Her (t) için seçilen alanlardan arkaplan sinyali çıkarılarak normalize edildi ve sinyal yoğunluğunun göreceli değişimi (3.2) kullanılarak belirlendi

$$\Delta F/F = \frac{F(t) - F_0}{F_0} \quad (3.2)$$

Bu uzaysal ortalama ardından ışık şiddetindeki rölatif değişiklik olan  $\Delta F/F(t)$ , her bir (t) için belirlendi ve grafiğe döküldü. Her bir alan için  $\Delta F/F(t)$  serileri kesi öncesi ve sonrası olarak ayrıldı ve bağımlı örneklem t-testi ile karşılaştırıldı. Kesim öncesi ve

sonrasındaki değerde anlamlı fark görülen alanların kesi sonucunda yükselen kalsiyum yanıtı verdiği düşünöldü. Son olarak kesimden etkilenen alanların birbiriyle ilişkisi Pearson korelasyon analizi ile araştırıldı. Antagonistlerin yanıt veren hücreler üzerindeki etkisi Fisher'in exact testi kullanılarak karşılaştırıldı.



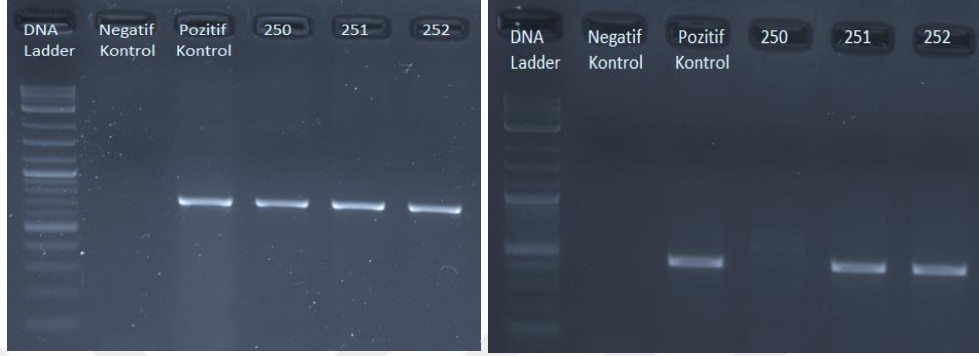
## 5.9. Malzeme Listesi

Tablo 5.9.1: Malzeme Listesi

Malzeme	Firma – Katalog No
Poly L Lysine	Sigma-P6282
Laminin	Sigma-L2020
Biyo-uyumlu yapıştırıcı	Hollister-7730
RPMI 1640	Sigma-R0883
Neurobasal - A	Gibco-A10888-022
Antibiyotik – Antimikotik	Sigma-A5955
GlutaMAX	Gibco-35050061
B27	Gibco-17504044
Kolajenaz	Sigma-C7657
Tripsin-EDTA	Sigma-59418C
DNaz	Sigma-D4513
Hanks Balanced Salt Solution	Sigma-H9269
Percoll	Sigma-P4937
FBS	Sigma-F4135
Horse Serum	Sigma-H0146
Tripsin inhibitörü	Sigma-T6522
NGF	Sigma- N6009
Pluronik asit	Sigma-P2443
Fluo-4	Thermo Fisher F14201
Fenol kırmızı'sız Neurobasal A	Gibco-12348
Ap5	Sigma-A5282
CNQX	Sigma-C293
CBX	Sigma-C4790
Trizma base	Sigma-T1503
HCl	Sigma-H1758
NaOH	Sigma-221465
EDTA	Sigma-E9884
Propidyum iyodür	Sigma-P4170

## 6. BULGULAR

### 6.1. Genotipleme Sonuçları



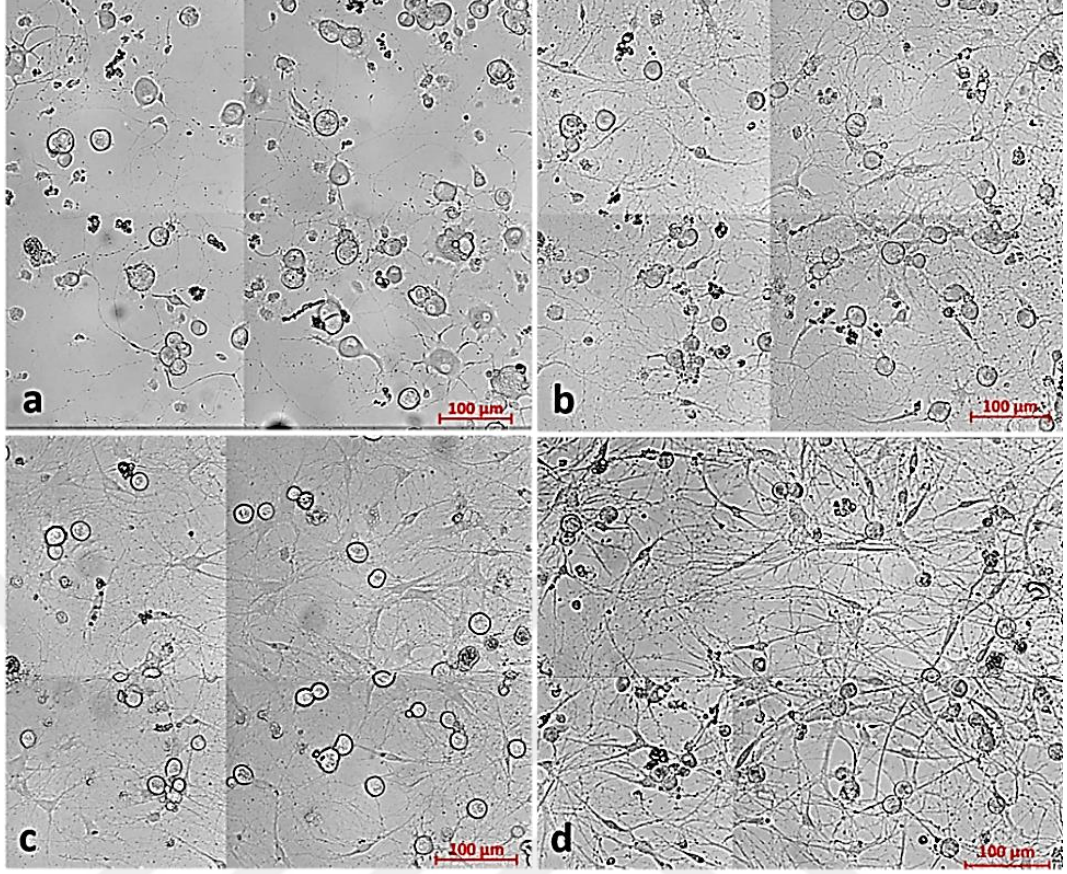
**Şekil 6.1.1:** Genotipleme Sonuçları.

Cre (sol) ve GCaMP (sağ) ifadesi için yapılan PZR sonucu agaroz jel görüntüsü. 250 numaralı farede yalnız Cre ifadesi vardır ve üretim için ayrılmıştır. 251 ve 252 numaralı fareler ise ikili transjenik olduğu için kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

### 6.2. Ekim Yoğunluğuna Dayalı Spontan Aktivitenin AKG Nöronlarının İn Vitro Hayatta Kalımına Etkisi

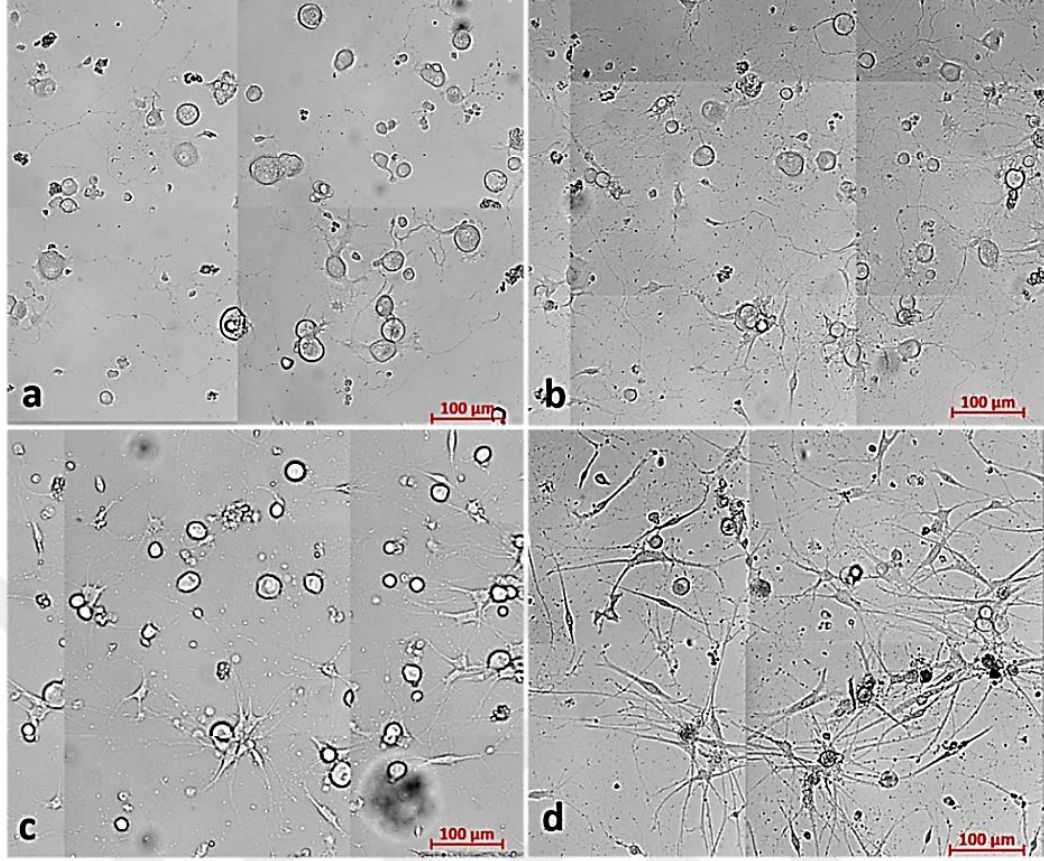
#### 6.2.1. Hayatta kalım ve aktivite takibi yapılacak örneklerde, hücreler yapıştı ve sağlıklı uzantılar geliştirdi

Her ekim yoğunluğunda, hücreler sağlıklı bir şekilde petri kabının tabanına tutunarak akson uzattılar. Hücre sayımı ve seyreltme sonucu yapılan ekimler sonrasında istenen oranda hücre yoğunluğuna erişildi. İlk gün %100 kabul edilen canlılık oranı her grupta zamanla azaldı. Petri kaplarının alt yüzeyinin UV ile aşındırılıp işaretlenmiş olması, parlak alan görüntüleme açısından bir sorun teşkil etmemekle beraber, her gün aynı hücrelerin görüntülenmesini sağladı. Her gün görüntüleme alanının dışından da örnekler bakıldı, böylece görüntüleme işleminin hücrelere zarar vermediği teyid edildi. Üç ayrı yoğunlukta ekilmiş AKG hücrelerinin çeşitli zamanlardaki görüntüleri Resim 6.2.1-3’de görülebilir.



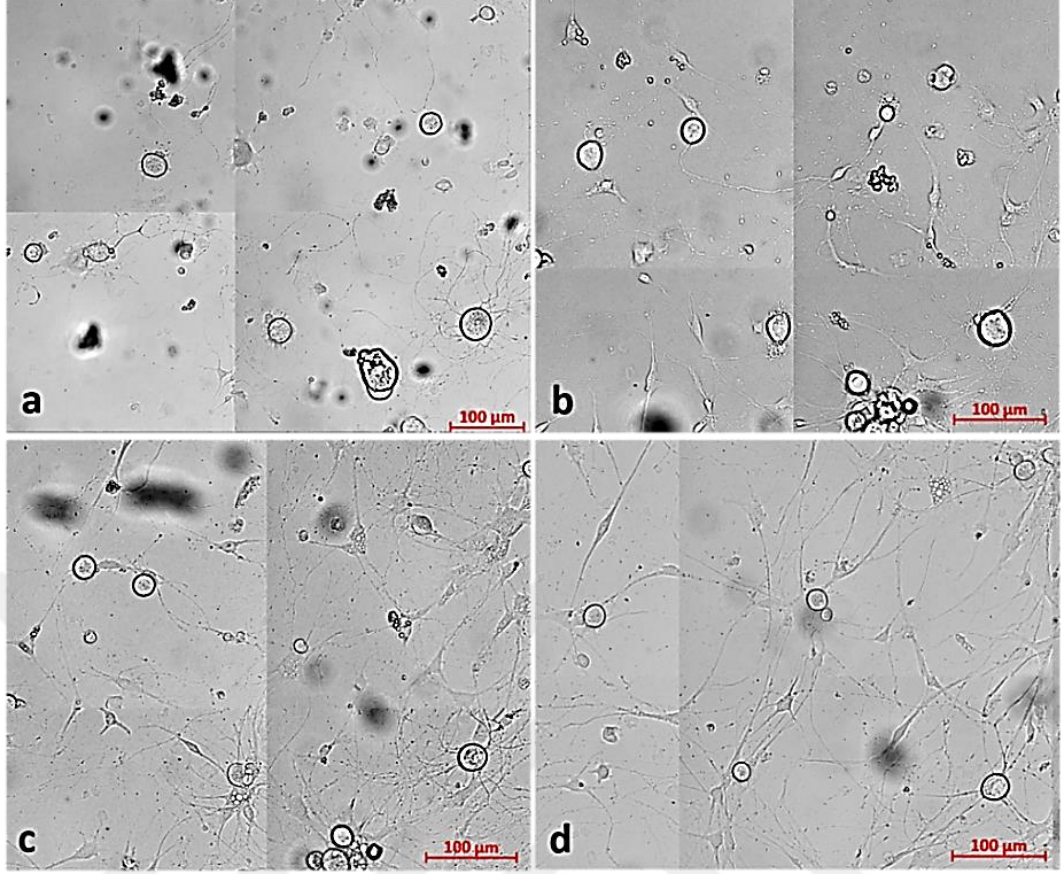
**Şekil 6.2.1:** 40 h/mm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücreleri, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d).

Zaman içinde nöronlar, uzantıları ve glial hücrelerin değişimi gözlemlenebilir. Her gün için 4 alan birleştirildi. Ölçek çubuğu: 100 µm.



**Şekil 6.2.2:** 20 h/mm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücreleri, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d).

Zaman içinde nöronlar, uzantıları ve glial hücrelerin değişimi gözlemlenebilir. Her gün için 4 alan birleştirildi. Ölçek çubuğu: 100 µm.



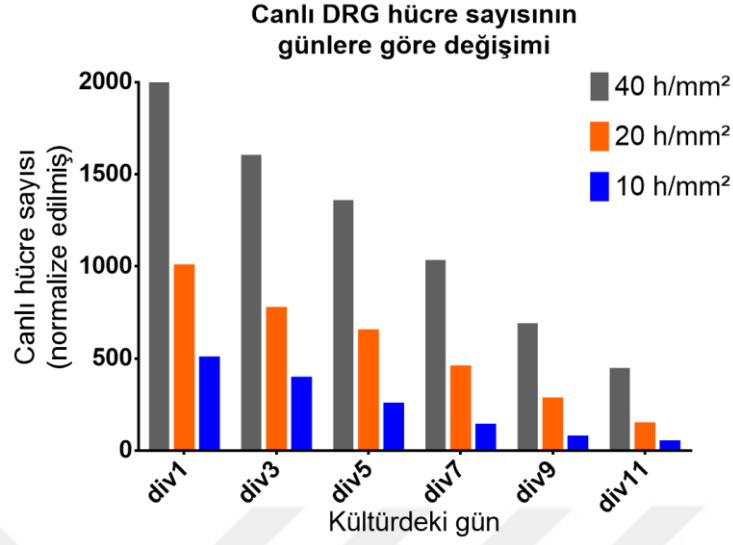
**Şekil 6.2.3:** 10 h/mm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücreleri, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d).

Zaman içinde nöronlar, uzantıları ve glial hücrelerin değişimi gözlemlenebilir. Her gün için 4 alan birleştirildi. Ölçek çubuğu: 100 µm.

### 6.2.2. Her ekim yoğunluğunda hayatta kalım zamanla azaldı

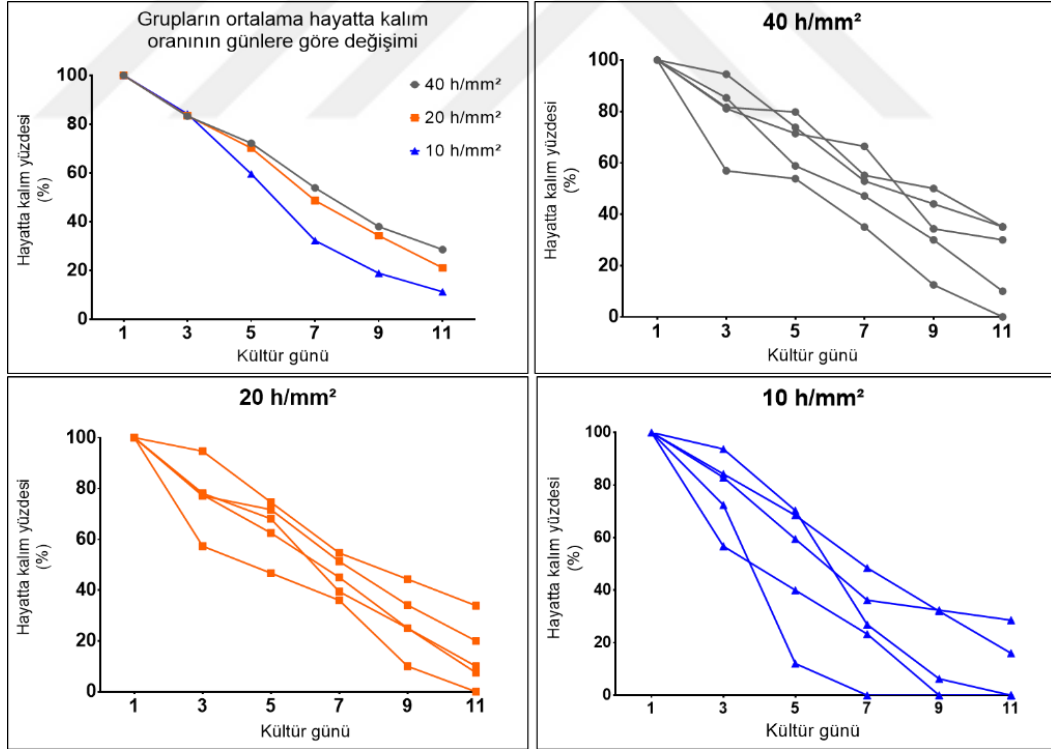
Parlak alan görüntülemesi yapılan kültürdeki 1,3,5,7,9 ve 11.günlerde her grupta hücre ölümleri gözlemlendi (5 grup, n=15). Petri kabındaki canlı nöronlar ve PI ile işaretli çekirdekler her gün için sayıldı. PI, ölen tüm hücrelerin çekirdeklerini boyadığı için yoğun glia ölümünün olduğu günler canlılık eğrilerinde probleme sebep oldu. Her görüntüleme gününde aynı bölgelerdeki hücreler sayılabildiği için canlılık, her günkü nöron sayısı dikkate alınarak hesaplandı. **Canlılık<sub>2</sub>**, her gün sayılan nöron sayısının, ilk görüntüleme gününde sayılan nöronlara oranlanarak belirlendi. Her grup için ortalama canlılık yüzdesi ve her örnek için canlılık yüzdesinin zamana göre değişimi AKG nöronları için Şekil 6.2.4 ve 5’de görülebilir.





**Şekil 6.2.4:** AKG kültürlerinde her yoğunluk grubu için sayılan toplam canlı nöronları günlere göre değişimi.

(d<sub>1</sub>: 40 h/mm<sup>2</sup>, d<sub>2</sub>: 20 h/mm<sup>2</sup>, d<sub>3</sub>: 10 h/mm<sup>2</sup>) Canlı hücre sayısı normalize edilmiştir.



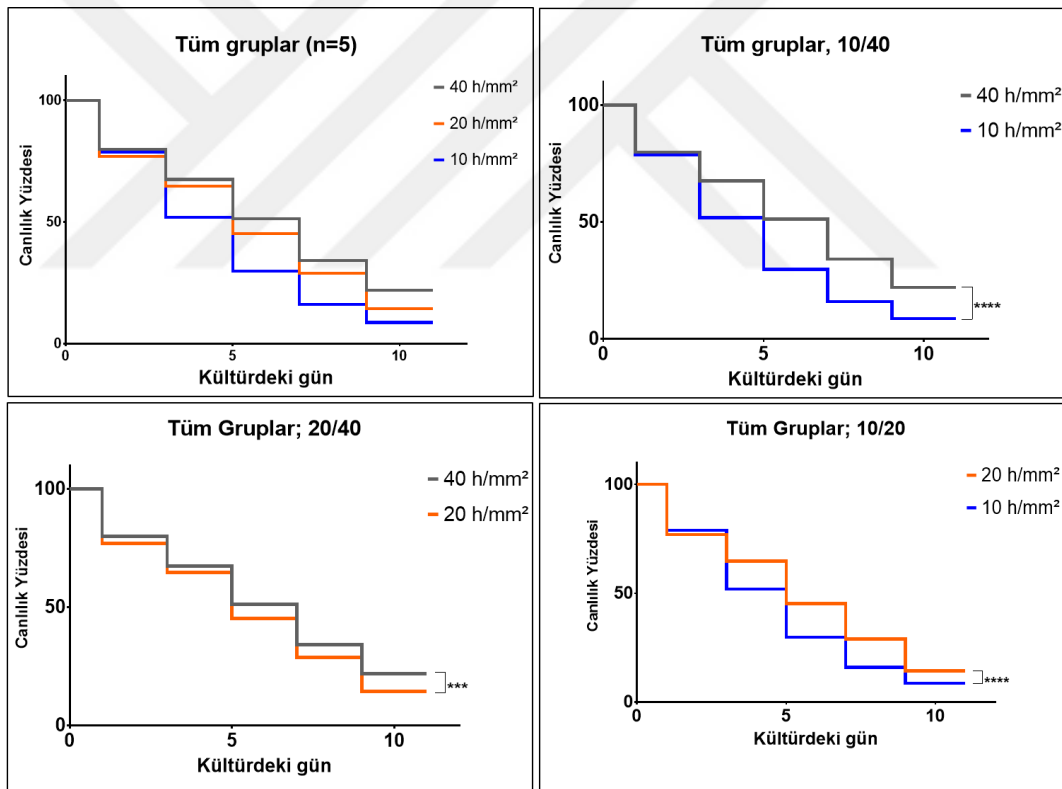
**Şekil 6.2.5:** AKG kültürlerinde grupların ortalama hayatta kalım oranı ve her yoğunlukta sayılan grupların (n=5) ortalama hayatta kalım oranının günlere göre değişimi.

İlk gün %100 canlılık olduğu kabul edilerek canlılık2 oranı plot edilmiş ve grafikler hazırlanmıştır.

### 6.2.3. Ekim yoğunluğunun petride zamanla hayatta kalan hücre oranını etkilediği tespit edildi

AKG kültürlerinde, yoğunluğun hayatta kalım oranına etkisinin araştırılması için hayatta kalım eğrileri (survival curve) çizildi. Hayatta kalım eğrilerinin kıyaslanması için “log rank testi” kullanıldı.

Öncelikle tüm gruplarda görüntüleme günlerinde sayılan canlı nöron sayıları gruplar içi toplandı ve kümülatif hayatta kalım eğrileri kıyaslandı. Kümülatif canlılık oranlarının her grup için birbirinden istatistiki olarak farklı olduğu gösterildi ( $p < 0.0001$ , Şekil 6.2.6)



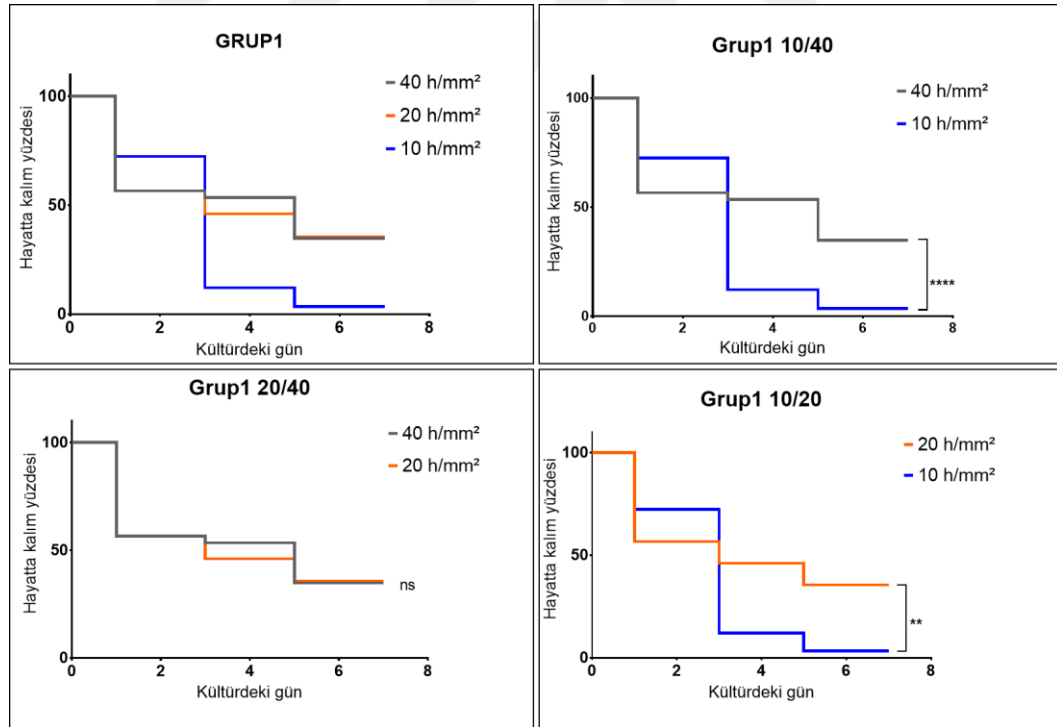
Şekil 6.2.6: AKG kültürlerinde kümülatif canlılık oranlarının (n=5) tüm ekim yoğunlukları arasındaki fark.

Araştırılan gruplarda beş tekrardan üçünde ( $n=3$ , %60), log rank testi sonucunda 20-25 h/mm<sup>2</sup> ile 40-45 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğundaki gruplar arasında hayatta kalım açısından istatistiki bir farka rastlanamadı (Şekil 6.2.7). Hayatta kalan hücre sayısının günlere

göre değişimini gösteren eğriler Friedman İstatistik testiyle araştırıldı. Tüm örneklerde kültürdeki günler arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p < 0,001$ ). Post hoc testler tablo 6.2.1’de görülebilir ( $p < 0,001$ ). Hayatta kalma yüzdesinin zamana göre değişimini gösteren eğriler Kruskal Wallis ANOVA ile kıyasladı. Üç ekim yoğunluğu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p = 0.0026$ ). Post hoc testler istatistiki farkın  $d_1$ : 40 h/mm<sup>2</sup> ve  $d_3$ : 10 h/mm<sup>2</sup> arasında olduğu tespit edildi ( $p=0.005$ )

**Tablo 6.2.1:** AKG kültürlerinde günlere göre hayatta kalan hücre sayısının farkı. Friedman istatistik testi.

	Div1	Div3	Div5	Div7	Div9	Div11
Div1	ns	ns	ns	***	****	****
Div3	ns	ns	ns	*	***	****
Div5	ns	ns	ns	ns	*	***



**Şekil 6.2.7:** AKG kültürlerinde araştırılan örneklerde beş tekrardan üçünde ( $n=3$ , %60) tüm ekim yoğunlukları arasındaki fark.

#### 6.2.4. MEA takibi sonuçları

İkinci spontan aktivite data serisi de MEA kayıtlarından elde edildi. Ölçüm yapılan her gün için aktivite görülen kanalların sayısı toplam kanal sayısına (64) oranlanarak “aktivite” değeri elde edildi. AKG kültürlerinde MEA kayıtları kalsiyum görüntüleme kadar etkin bir sonuç veremedi. Bunun sebebi olarak AKG nöronlarının aksiyon potansiyeli olmaksızın yavaş kalsiyum cevabı verebileceği düşünüldü. 40 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğundaki bir örneğe kronik NGF uygulaması yapılması ardından DIV9 itibarıyla tek kanalda aktiviteye rastlandı (Tablo 6.2.2).

**Tablo 6.2.2:** AKG hücre kültürlerinin MEA ile elektriksel aktivite ölçümü, aktif kanal yüzdesinin günlere göre değişimi.

Ekim yoğunluğu:	Petri kabı#	Aktif kanal yüzdesi		
		DIV6	DIV9	DIV14
10 hücre/mm <sup>2</sup>	1	0	0	0
20 hücre/mm <sup>2</sup>	1	0	0	0
40 hücre/mm <sup>2</sup>	1	0	0	0
40 hücre/mm <sup>2</sup> , (NGF eklenmiş)	1	0	1,6	1,6

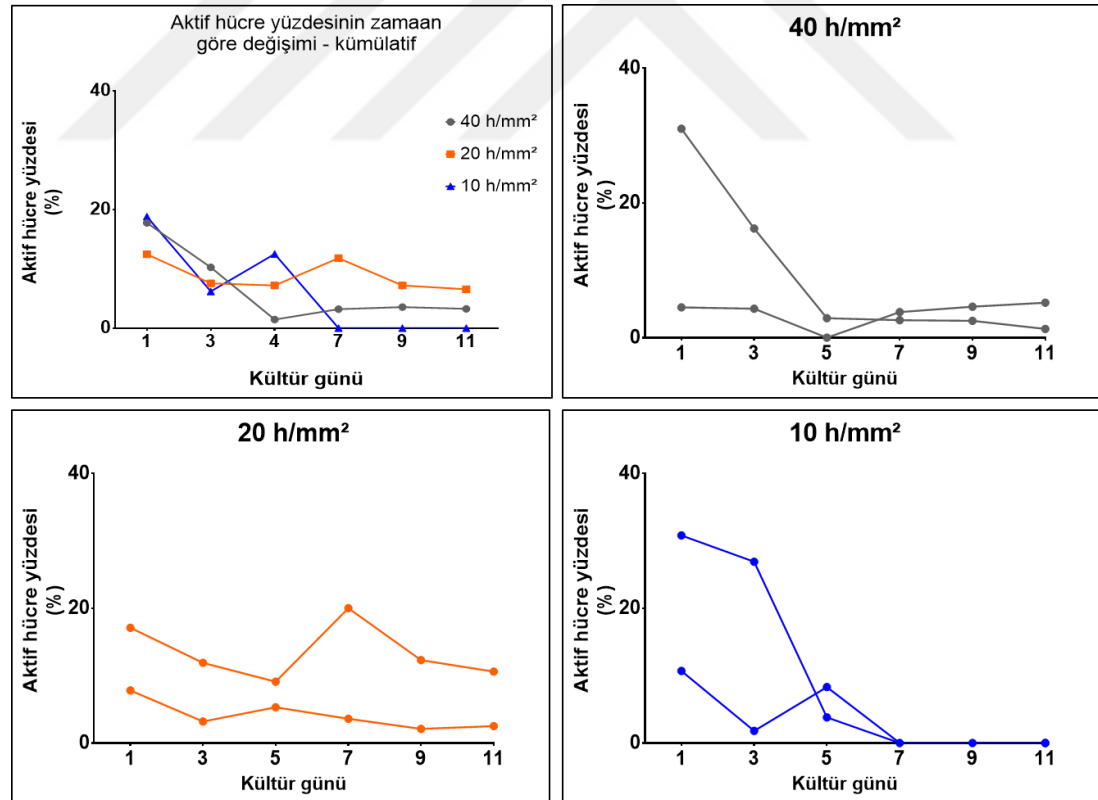
#### 6.2.5. Kalsiyum görüntüleme sonuçları

Fluo-4 yüklemesi ve görüntüleme sonucu elde edilen zaman serisi görüntüleri incelendi. Görüntüleme alanına giren her bir hücre seçilerek kalsiyum değişimi eğrileri elde edildi. Her gün için elde edilen seriler izlenerek kalsiyum aktivitesi gösteren hücrelerin sayısı, görüntülenen toplam hücrelere oranlanarak “aktif hücre yüzdesi” değeri elde edildi. Aktif hücre yüzdesinin kültürdeki günlere göre değişimi Şekil 6.2.8’de ve tablo 6.2.3’de görülebilir.

**Tablo 6.2.3:** Aktivite takibi yapılan AKG hücrelerinde aktif hücre yüzdesinin zamana göre değişimi.

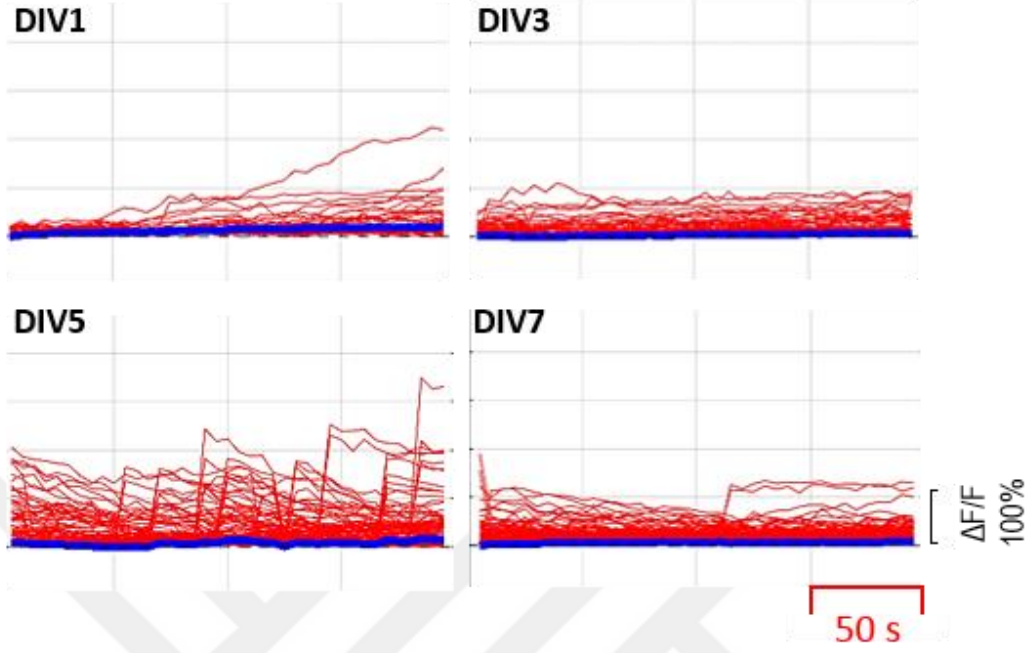
Ekim Yoğunluğu:	Petri kabı#	Aktif hücre yüzdesi					
		DIV1	DIV3	DIV5	DIV7	DIV9	DIV11
10 h/mm <sup>2</sup>	1	10,7	1,8	8,3	0	0	0
10 h/mm <sup>2</sup>	2	26,9	10,6	16,7	0	0	0
20 h/mm <sup>2</sup>	1	7,8	3,2	5,3	3,6	2,1	2,5
20 h/mm <sup>2</sup>	2	17,1	11,9	9,1	20,1	12,3	10,6
40 h/mm <sup>2</sup>	1	4,5	4,3	0	3,8	4,6	5,2
40 h/mm <sup>2</sup>	2	31,1	16,2	2,9	2,6	2,5	1,3

Aktivite yüzdesinin zamana göre değişimini gösteren eğriler Kruskal Wallis ANOVA ile kıyaslandı. Üç ekim yoğunluğu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0,48$ ). Kalsiyum görüntülemesi yapılan tüm hücrelerin kümülatif aktivitesi ve ortalaması, Şekil 6.2.9-11’de görülebilir.



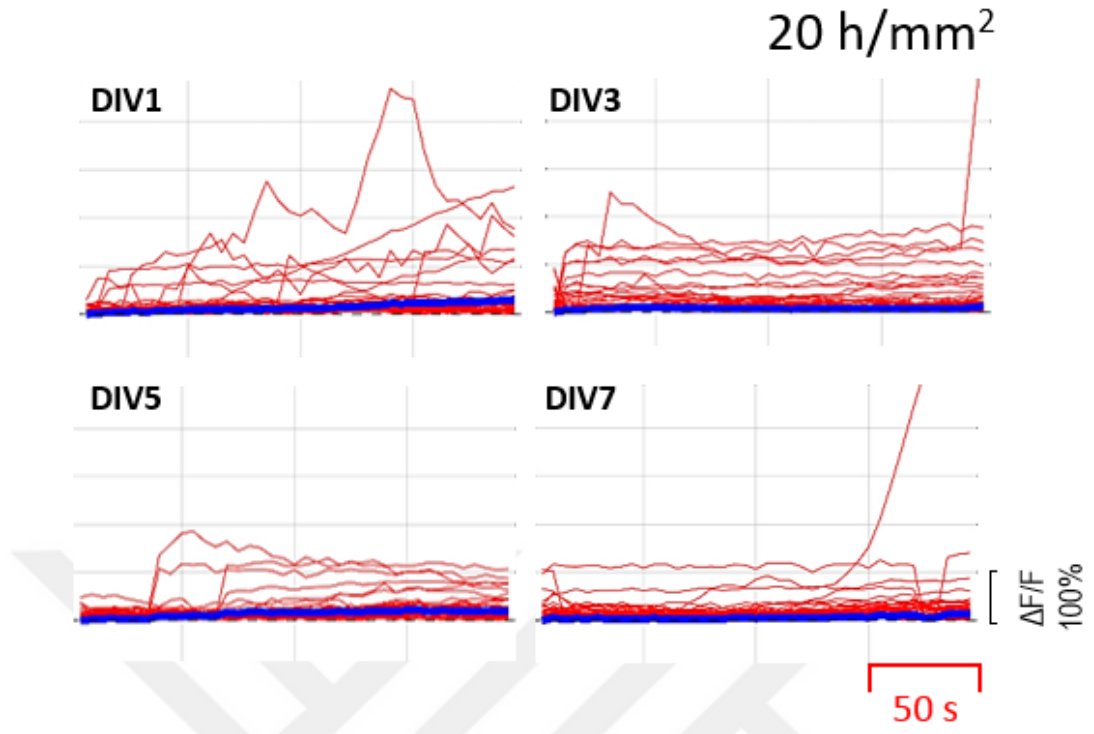
**Şekil 6.2.8:** Aktivite takibi yapılan AKG hücrelerinde aktif hücre yüzdesinin zamana göre değişimi.

40 h/mm<sup>2</sup>

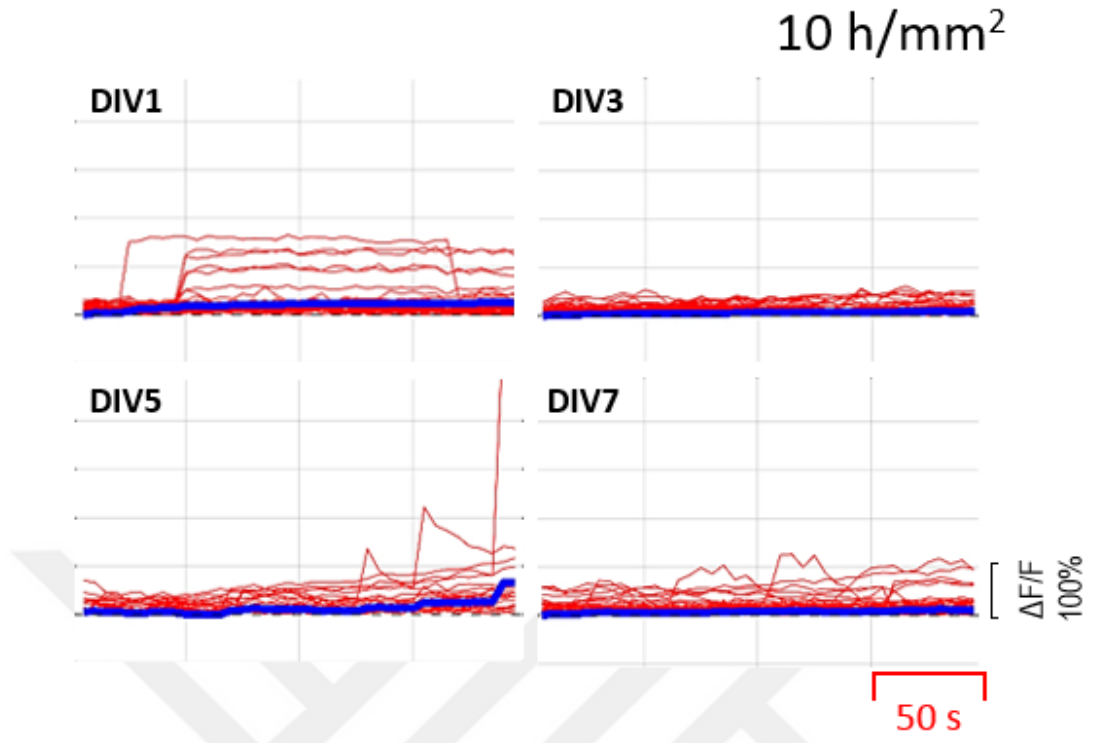


**Şekil 6.2.9:** 40 h/mm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücrelerin, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d) görülen aktiviteleri,  $\Delta F/F$ .

Her bir nöronun aktivitesi kırmızı ile günlük ortalama lacivert ile gösterilmiştir.



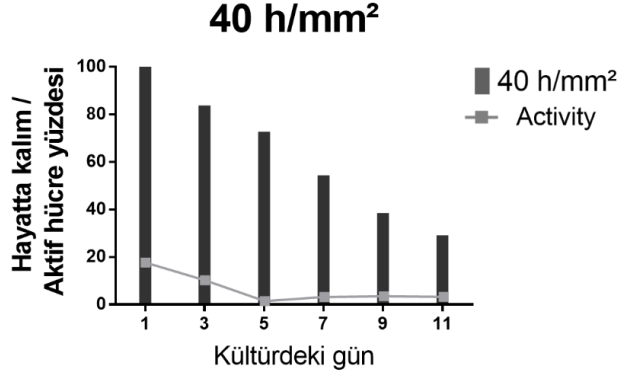
**Şekil 6.2.10:** 20 h/mm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücrelerin, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d) görülen aktiviteleri,  $\Delta F/F$ . Her bir nöronun aktivitesi kırmızı ile günlük ortalama lacivert ile gösterilmiştir.



**Şekil 6.2.11:** 10 h/mm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş AKG hücrelerin, kültürdeki 1.gün (a), 3.gün (b), 5.gün (c) ve 7.gün (d) görülen aktiviteleri,  $\Delta F/F$   
Her bir nöronun aktivitesi kırmızı ile günlük ortalama lacivert ile gösterilmiştir.



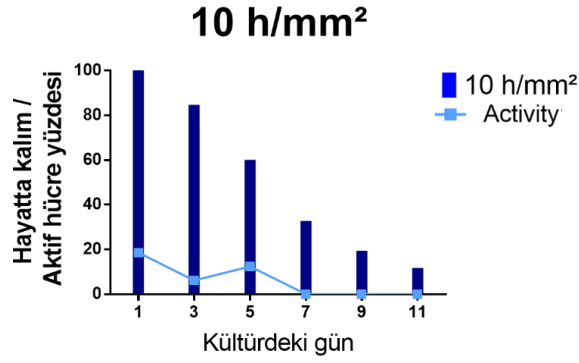
### 6.2.6. Aktivitenin canlılıkla ilişkisi araştırıldı



**Şekil 6.2.12:** 40 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen AKG hücrelerinde aktivitenin canlılıkla ilişkisi. Sütun grafiği günlere göre hayatta kalım yüzdesini (n=5), çizgi grafiği günlere göre aktif hücre yüzdesini (n=2) gösteriyor.



**Şekil 6.2.13:** 20 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen AKG hücrelerinde aktivitenin canlılıkla ilişkisi. Sütun grafiği günlere göre hayatta kalım yüzdesini (n=5), çizgi grafiği günlere göre aktif hücre yüzdesini (n=2) gösteriyor.



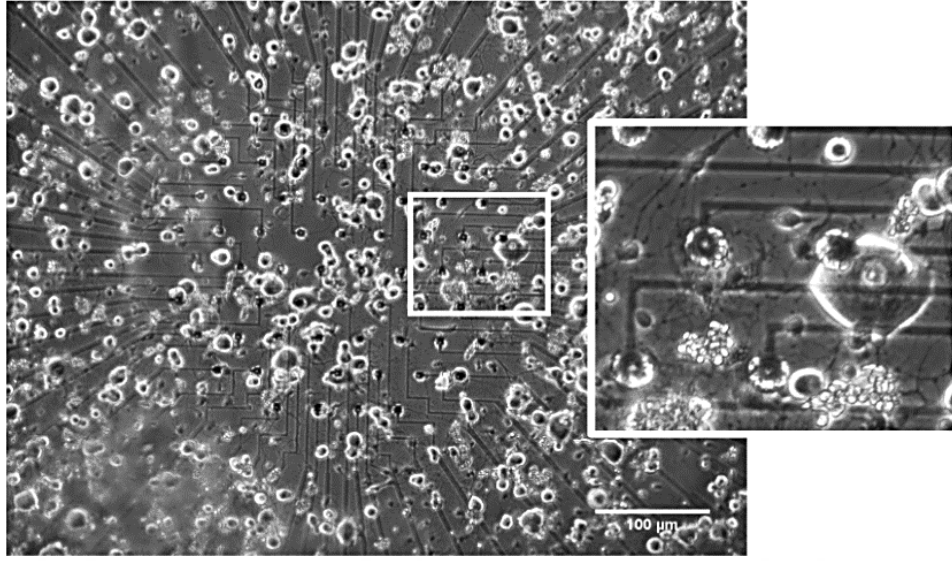
**Şekil 6.2.14:** 10 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen AKG hücrelerinde aktivitenin canlılıkla ilişkisi. Sütün grafiği günlere göre hayatta kalım yüzdesini (n=5), çizgi grafiği günlere göre aktif hücre yüzdesini (n=2) gösteriyor.

### 6.3. AKG Kültürlerinde Nöral Ağ Oluşumunun İncelenmesi

#### 6.3.1. Hücreler yapıştı, sağlıklı uzantılar oluşturdu ve gözlemlenecek yeterince GCaMP+ nöron elde edildi

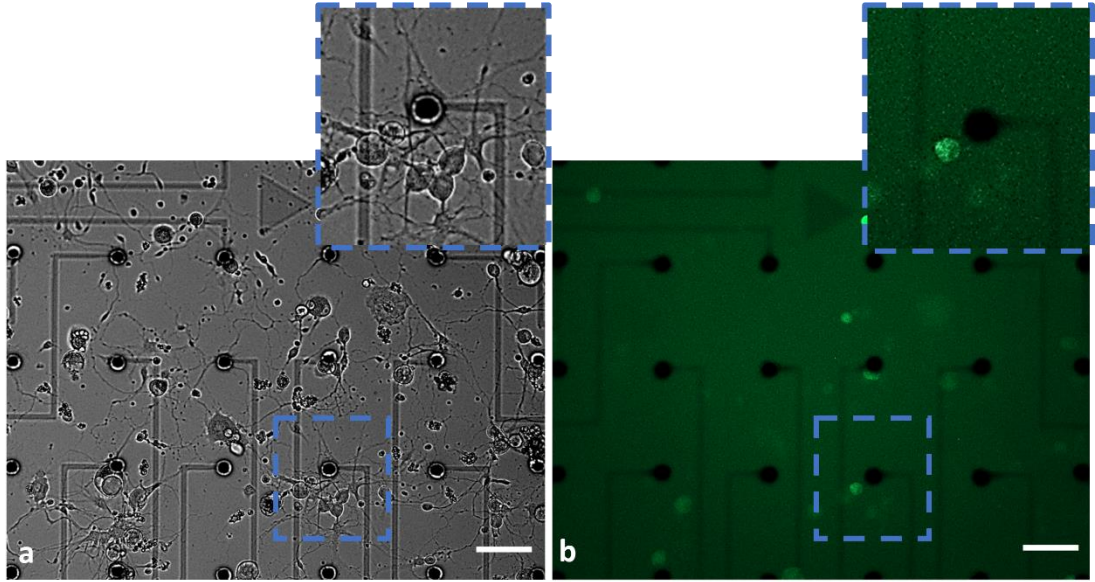
Bu deneyde noktasal elektriksel uyarılan hücrelerin kalsiyum aktivitesini eş zamanlı olarak görüntülenebileceği bir sistem geliştirilerek AKG hücrelerinin in vitro bağlantılarını araştırıldı.

Kültür protokolü sonucunda %90-95 canlılık oranında karışık bir hücre popülasyonu elde edildi. Ekilen hücreler MEA yüzeylerine güçlü şekilde tutundu ve ekim sonrası 1. saatten itibaren akson uzatmaya başladılar. Ekilen hücrelerin ortalama %60-65'inin nöronlardan, gerisinin glialardan oluştuğu tespit edildi. Şekil 6.3.1, kültürde 1. günde MEA üzerinde AKG nöronlarını göstermektedir.



**Şekil 6.3.1:** MEA üzerinde ki AKG kültürlerinin parlak-alan görüntüsü. Kültürdeki gün; DIV1, 10X/25X büyütme, Ölçek çubuğu: 100  $\mu\text{m}$ .

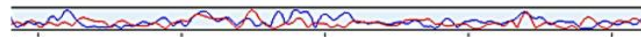
Üretilen çift-transgenik hayvanların AKG hücre kültürlerinde yüksek oranda GCaMP6s ifadesi gözlemlendi. Şekil 6.3.2, hücrelerin faz kontrast ve floresan görüntülerini göstermektedir.



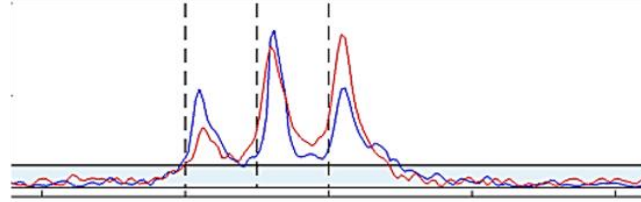
**Şekil 6.3.2:** Tipik bir kültür preparatının faz kontrast (a) ve floresan (b) resmi. MEAlarda kültürler yaklaşık 100 hücre/ $\text{mm}^2$  olacak şekilde ekildi. Floresan görüntü GCaMP6s ekspres eden glutamaterjik nöronları açıkça göstermektedir. Kültürdeki gün; DIV3, 10X büyütme, Ölçek çubuğu: 50  $\mu\text{m}$ .

Denepler kültürün 2-11. günlerinde gerçekleştirildi. AKG nöronlarının arasındaki post-sinaptik bağların araştırılması için glutamat reseptör antagonistleri kullanıldı [147]. NMDA, AMPA ve Kainate reseptör blokörleri ortamda mevcutken, sinaptik etkileşim tamamen kesildi ve indüklenen kalsiyum aktivite örüntüleri değişti. Sonuçların antagonistlerle ilişkisi, yıkama sonrası deneylerin tekrarlanması yoluyla teyid edildi. Deney aşamaları ve alınan ortalama yanıtlar, Şekil 6.3.3 de görülebilir.

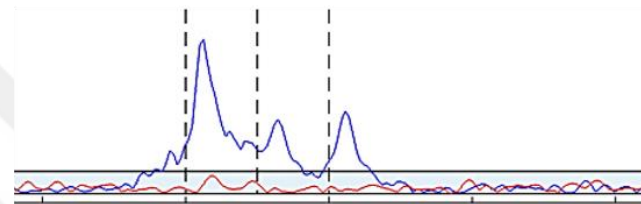




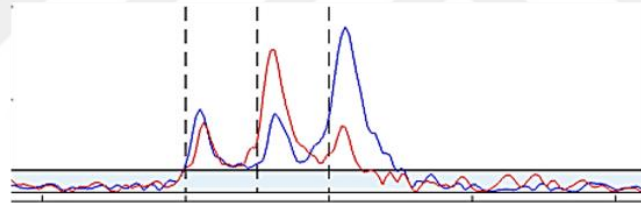
Adım 1: Spontan Aktivite



Adım 2: Uyarılmış Aktivite



Adım 3: Uyarılmış Aktivite +Blok



Adım 4: Yıkama sonrası uyarılmış Aktivite

6sn

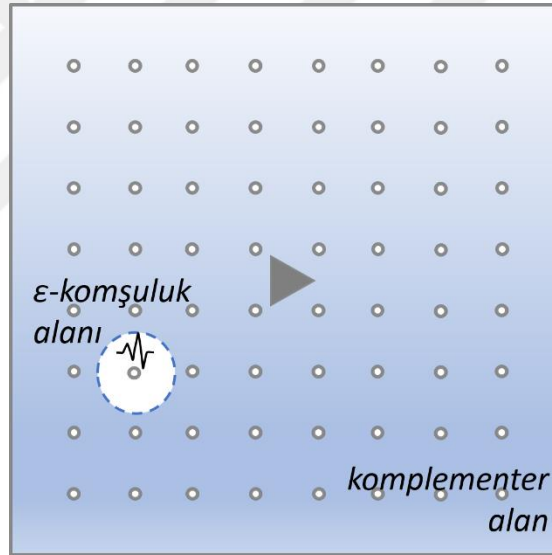
$\Delta F/F$  100%

**Şekil 6.3.3:** Deneysel aşamalar ve sonuçlar.

Birinci adım; uyarı verilmeksizin spontan kayıt. İkinci adım; Elektriksel uyarı esnasında kayıt. Üçüncü adım; Kültürler antagonistlerle muamele edildikten sonra elektriksel uyarı ve kayıt. Dördüncü adım; Blokörler ortamdan uzaklaştırılıp beklendikten sonra elektriksel uyarı ve kayıt. Kırmızı ve lacivert izler, aynı  $c^+$  ve  $c^-$  primer nöronların aktivitelerini göstermektedir. Mavi alanlar; eşik altı değerleri gösteriyor. Gri çizgiler, uyarı anlarını (instant) göstermektedir. Her uyarı metotlarda bahsi geçen 2Hz'lik ikili-iki fazlı 6 saniyelik atımları gösteriyor. Dikey eksen, normalize edilmiş  $\Delta F/F$ .

### 6.3.2. Primer ve sekonder nöronlar tanımlandı

*Aktif MEA alanları*, elektrotların bulunduğu yaklaşık  $1\text{mm}^2$ 'lik bölge, 10X objektifle gözlemlendi ve bu bölgede bulunan tüm nöron gövdeleri sayıldı (Tablo 6.3.1, Sütun A). Elektrotla direk uyarılan nöronlara *primer nöronlar* verildi. Her elektrotun çevresinde, primer nöronların bulunduğu dairesel bir  $\varepsilon$  alanı belirlendi ve  *$\varepsilon$ -komşuluk alanı* olarak adlandırıldı. Birincil nöronların aktivitesiyle uyarılan nöronlara ise *sekonder nöronlar* adı verildi. Sekonder nöronlar, komşuluk alanının dışında, aktif elektrot alanında gözlemlendi. Bu alana *komplementer alan* adı verildi. Bu tanımlara şekil 6.3.4'de yer verilmiştir. Deneylerimizde,  $\varepsilon = 50\ \mu\text{m}$  alınmıştır.



**Şekil 6.3.4:**  $\varepsilon$ -komşuluk alanı ve komplementer alan

Mavi kesikli çizgiyle sınırlanan alan aktif elektrot alanını göstermektedir. Uyarı elektrotunun çevresinde kalan alana  $\varepsilon$ -komşuluk alanı, dışında kalan alan ise komplementer alanlardır.

Her bir MEA petrisindeki temel etkileşim profilleri Tablo 6.3.1'de görülebilir. 8 adet MEA petrisinde, aktif elektrot alanlarında bulunan toplam 437 nöron (Tablo 6.3.1, Satır A) 181 adedi komşuluk alanında bulundu (Tablo 6.3.1, Satır B). Bu nöronların

hepsi primer nöron olmak için aday nöronlar olarak düşünülebilir. Adaylardan hangilerinin primer nöron olduğunu belirlemek için seçili elektrottan uyarı gönderildi. Aday nöronlardan 37 tanesi bu uyarıya kalsiyum yanıtı verdi ( $p < 0.05$ ; Primer nöronlar, Tablo 6.3.1, Satır C). 33 primer nörondan 22 tanesi en az bir adet başka nöronu uyardı ( $60\% \pm 15.7$  güven aralığı 95%,  $p < 0.05$ , Sekonder nöronlar, Tablo 6.3.1, Satır D). Primer nöronlarla uyardıkları sekonder nöronlar arasında kaydedilen maksimum mesafeler Tablo 6.3.2.1'in son satırında görülebilir.

**Tablo 6.3.1:** Temel etkileşim profilleri

	MEA 1	MEA 2	MEA 3	MEA 4	MEA 5	MEA 6	MEA 7	MEA 8
A	52	43	54	74	50	53	49	62
B	33	27	10	51	14	10	13	23
C*	5	4	3	5	6	5	4	5
D*	3	3	2	4	3	2	2	3
E ( $\mu\text{m}$ )	1000	860	730	800	920	900	600	700

A: Aktif elektrot alanındaki toplam nöronlar ( $1\text{mm}^2$ )

B:  $\epsilon$ -komşuluk alanındaki aday nöronlar.

C: Primer nöronlar

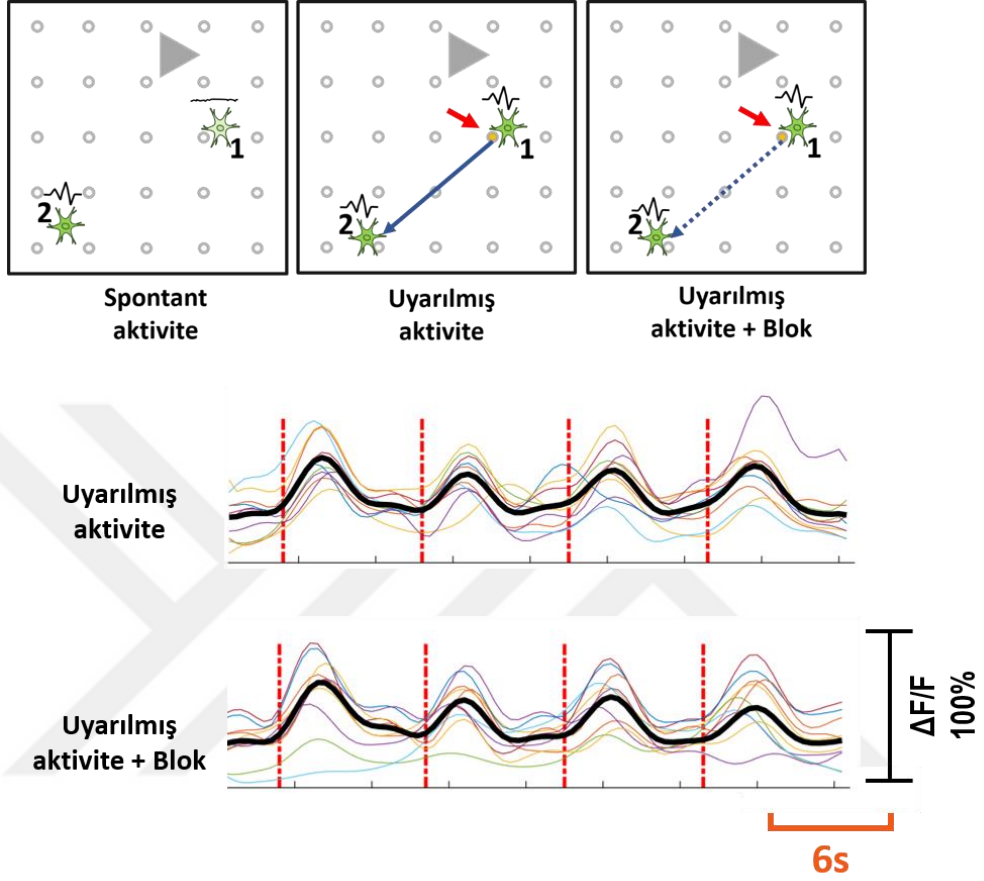
D: Sekonder nöronları aktive eden primer nöronlar

E: Primer ve sekonder nöronlar arasındaki maksimum mesafe.

\* Yalnızca denklem 2.1 ve 2.2 sonucunda ulaşılan istatistik olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) değerlere yer verildi.

Uyarı elektrotuyla primer nöronun arasında fiziksel temas olup olmamasına bağlı olarak iki çeşit yanıt profili gözlemlendi. Eğer elektrotla primer nöron arasında direk temas mevcutsa, buna  $c^+$  primer nöron, olmadığı durumda ise  $c^-$  primer nöron denildi. 37 primer nörondan 21 adedinin  $c^+$  (57%), 16 adedinin ise  $c^-$  (43%) tipinde olduğu görüldü.  $C^+$  nöronlarının aktivitesi sinaptik blokörlerle engellenemedi.  $C^-$  nöronların aktivitesi ise blokörlerle sessizleşti. Şekil 6.3.3 her deneysel aşamada  $c^+$  ve  $c^-$

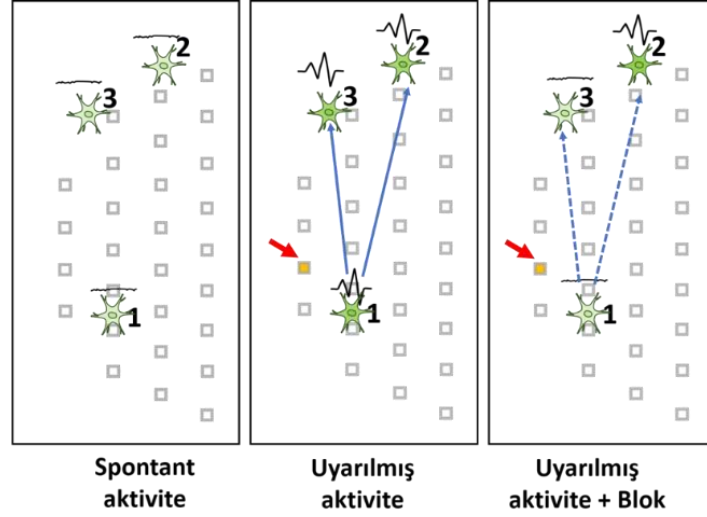
nöronlarının yanıtını göstermektedir. Şekil 6.3.5 ve 6'da deney ve bloklama fazlarında primer nöronların yanıtları ( $c^+$  için  $n=13$ ;  $c^-$  için  $n=10$ ) görülmektedir.



**Şekil 6.3.5:**  $c^+$  primer nöronların yanıt profilleri.

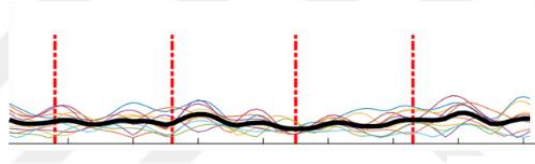
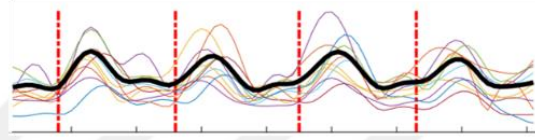
Uyarı elektrodu, ve örnek bir  $c^+$  primer nöron şematize edildi (üst). Her bir deney farklı renklerde gösterildi ( $n=13$ ). Ortalamaları ise siyah kalın çizgiyle ifade edildi. Kırmızı kesikli çizgiler uyarı atışlarını gösteriyor. Uyarı periyodu 6s. Dikey eksen normalize edilmiş  $\Delta F/F$  değerini gösteriyor.





Uyarılmış aktivite

Uyarılmış aktivite + Blok



6s

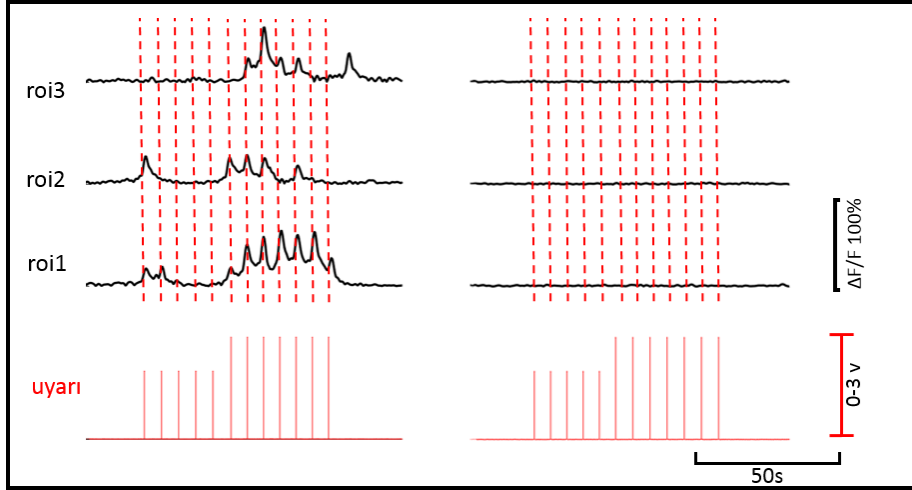
ΔF/F  
100%

**Şekil 6.3.6:** c<sup>-</sup> primer nöronların yanıt profilleri.

Uyarı elektrodu, ve örnek bir c<sup>-</sup> primer nöron şematize edildi (üst). Her bir deney farklı renklerde gösterildi (n=10). Ortalamaları ise siyah kalın çizgiyle ifade edildi. Kırmızı kesikli çizgiler uyarı atışlarını gösteriyor. Uyarı periyodu 6s. Dikey eksen normalize edilmiş  $\Delta F/F$  değerini gösteriyor.

### 6.3.3. Primer nöronların sekonder nöronların aktivitesini glutamaterjik bağlantılar yoluyla modüle ettiği gösterildi

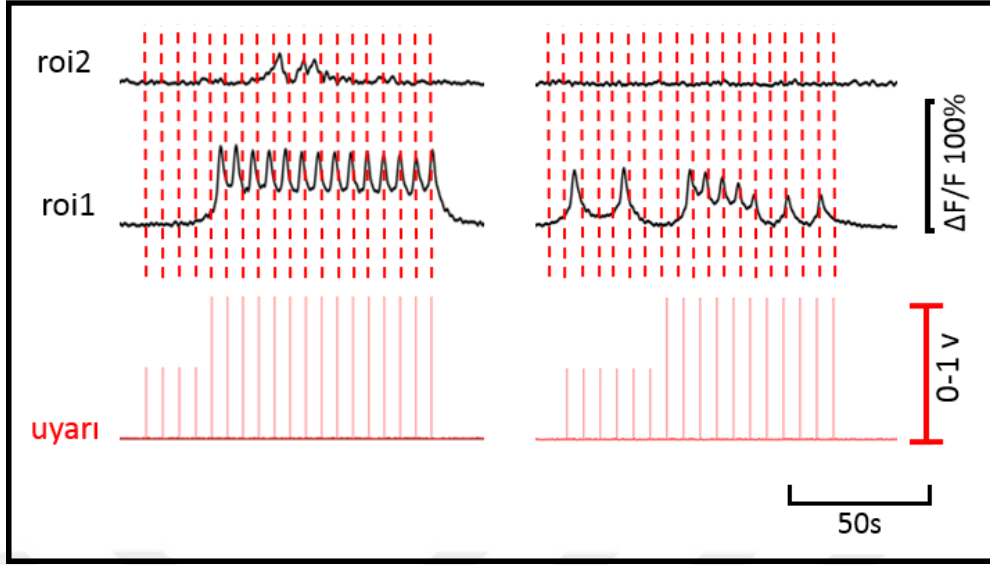
Primer ve sekonder nöronlar arasındaki etkileşimler şekil 6.3.7, 8 ve 9'da gösterilmiştir. Şekil 6.3.7'de bir c<sup>-</sup> primer nöron gösterilmiştir. Primer nöron (ROI 1) sekonder nöronları (ROI 2 ve 3) uyarır ( $p < 0.05$ ) ve bloklandığında tüm uyarılan aktivite sessizleşir.



**Şekil 6.3.7:**  $c^-$  nöron etkileşimleri.

Elektrotla primer nöron arasında direk temas bulunmamaktadır.  $C^-$  primer nöron, 2 tane sekonder nöronu uyarıyor. Blokörlerin varlığında (sağ) ve yokluğunda (sol)  $\Delta F/F$  grafiklerini gösteriyor.

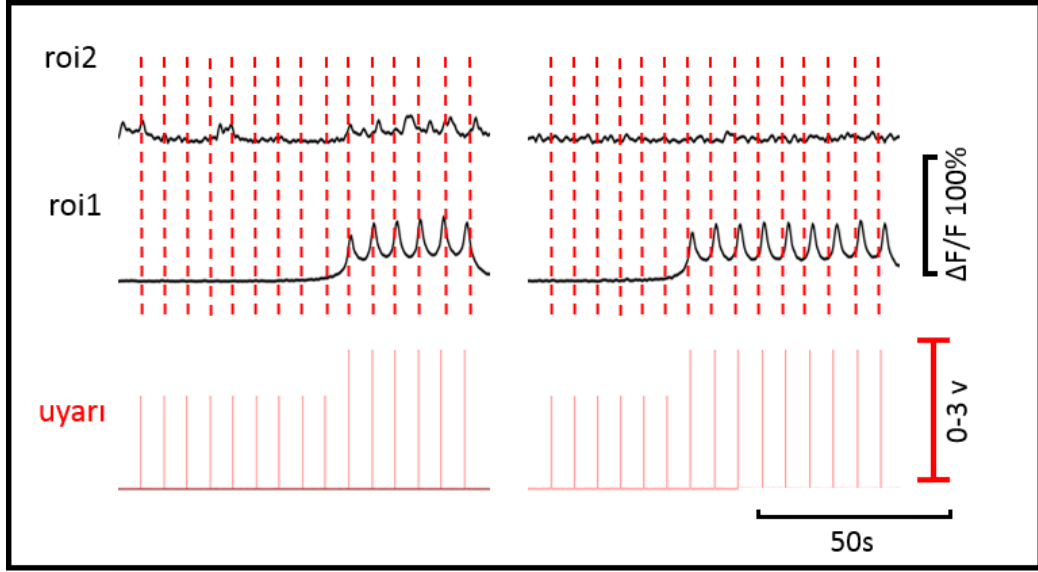
Şekil 6.3.8 ve 6.3.9'da  $c^+$  nöronlar görülmektedir. Glutamaterjik inhibitörlerin etkisiyle primer nöronların  $Ca^{2+}$  aktivitesi bloklanmasa bile, sekonder nöronlarda uyarılan aktivitenin durduğu görülmektedir. İkincil nöronlar, primer nöronlarca uyarılmaları öncesinde sessiz veya spontan biçimde aktif olmalarına bağlı olarak iki aktivite profile sergilemektedir. Bu iki profilin görülme sıklığı eşittir (%30, 7/22). Şekil 6.3.8'de  $C^+$  primer nöronun önceden sessiz olan bir nöronu uyardığı ve bu ikincil aktivitenin blokörlerle sessizleştiği görülebilir ( $p < 0.005$ ).



**Şekil 6.3.8:**  $c^+$  nöron etkileşimleri, sekonder nöron uyarı öncesinde sessiz.

Elektrotla primer nöron arasında direk temas bulunmaktadır.  $C^+$  primer nöron, önceden sessiz olan bir tane sekonder nöronu uyarıyor. Blokörlerin varlığında (sağ) ve yokluğunda (sol)  $\Delta F/F$  grafiklerini gösteriyor.

Şekil 6.3.9'da  $c^+$  primer nöronun önceden spontan olarak aktif olan bir nöronu uyardığı görülmektedir. Bu ikincil aktivite, blokör varlığında sürse de, devam eden aktivitenin primer nöron aktivitesiyle gösterdiği faz-uyum modülasyonu ortadan kalkmıştır ( $p < 0.005$ ).

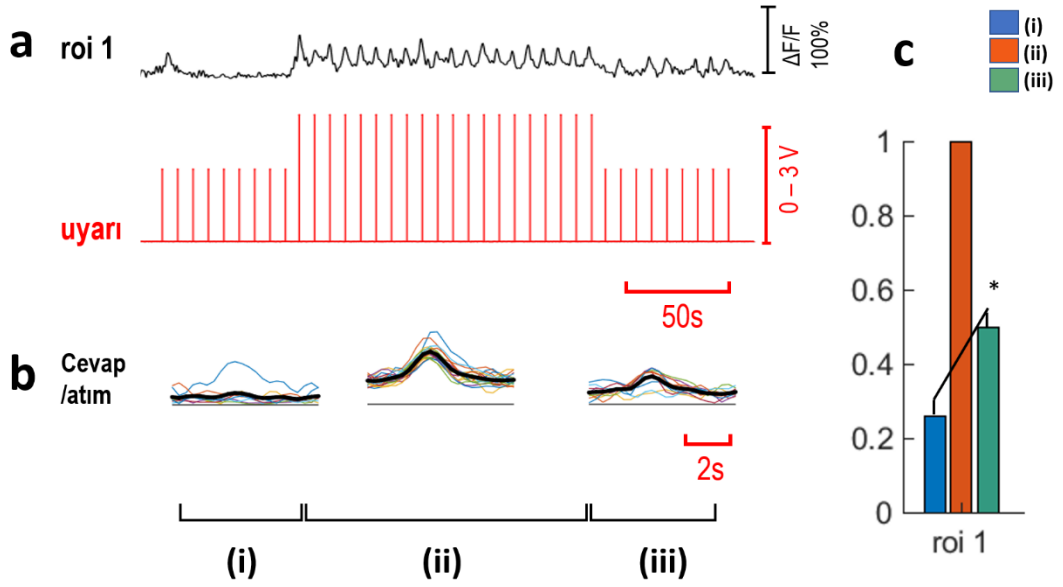


**Şekil 6.3.9:**  $c^+$  nöron etkileşimleri, sekonder nöron uyarı öncesinde aktif.

Elektrotla primer nöron arasında direk temas bulunmaktadır.  $C^+$  primer nöron, önceden aktif olan bir tane sekonder nöronu uyarıyor. Bloklü durumda faz-uyum modülasyonu görülüyor. Blokörlerin varlığında (sağ) ve yokluğunda (sol)  $\Delta F/F$  grafiklerini gösteriyor.

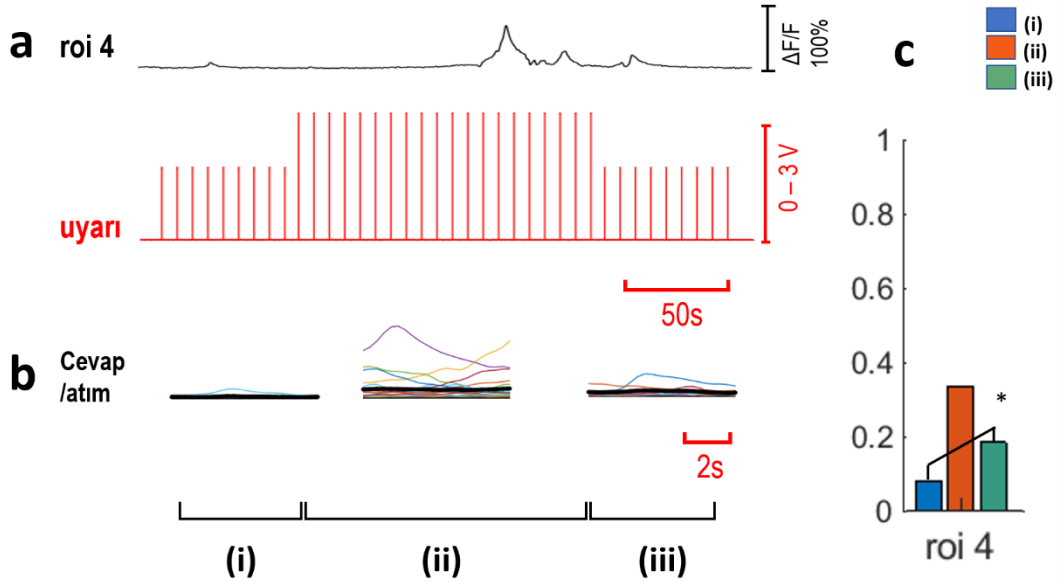
#### 6.3.4. Yüksek-dereceli (high-order) Sinaptik bağlantılar

Kültürlerin ekim yoğunluğunun artırılması ile daha komplike bağlantı örüntüleri ortaya çıktı. Böyle bir örüntünün şeması Şekil 6.3.10-13'de görülecektir.  $C^-$  primer nöron, komplementer alanda 8 ayrı sekonder nöronu uyarmıştır (Şekil 6.3.14-b). Antagonistlerle deney tekrarlandığında, primer ve sekonder nöronlar arasındaki etkileşim yok olmuştur ( $p < 0.005$ ). 3 genlik basamağından oluşan bir uyarı stratejisi izlenmiştir (2V-3V-2V; i, ii, iii). i ve iii basamakları arasında, ROI 1, 4,5 ve 9'un uyarılabilirlik seviyelerinde (excitability) istatistiki olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $*p < 0.05$ ).



**Şekil 6.3.10:** Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI 1.

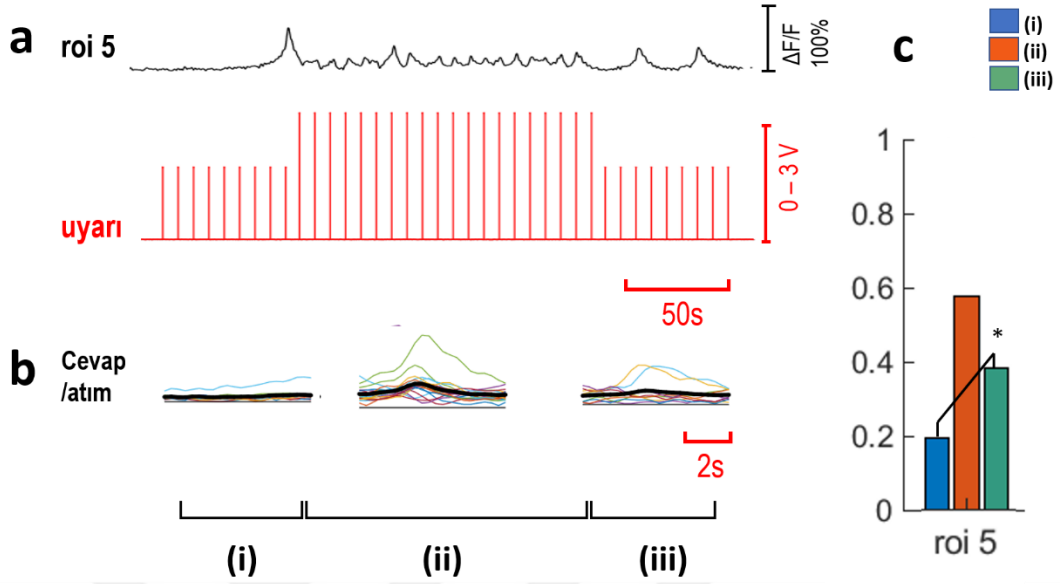
Roi 1'in zamana bağlı aktivitesi, i, ii ve iii voltaj adımlarında (2V-3V-2V) c- nöronun aktivitesini ( $\Delta F/F$ ) gösteriyor. (b) Her uyarı atımında kaydedilen ayrı yanıtlar ve ortalamaları, i için n=10 atım, ii için n=20 atım ve iii için n=10 atım. (c) Roi 1'in 3 voltaj adımında kaydedilen ortalama cevapları, roi 1'in ortalama cevap derecesi (i) adımından (iii) adımına anlamlı olarak arttı ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 6.3.11:** Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI 4.

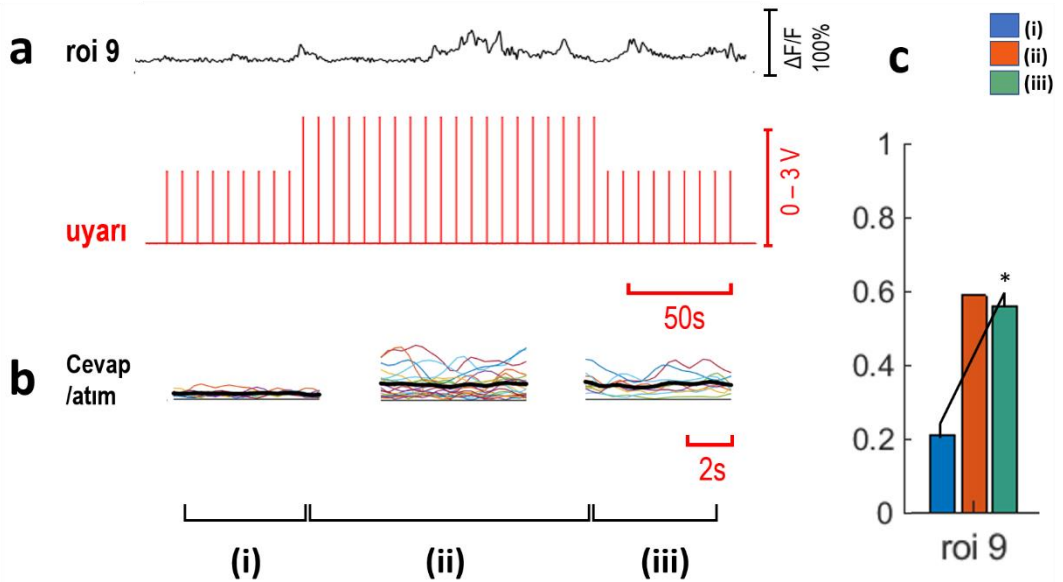
Roi 4'ün zamana bağlı aktivitesi, i, ii ve iii voltaj adımlarında (2V-3V-2V) c- primer nöronun uyardığı sekonder nöronun aktivitesini ( $\Delta F/F$ ) gösteriyor. (b) Her uyarı atımında kaydedilen ayrı yanıtlar ve ortalamaları, i için n=10 atım, ii için n=20 atım ve iii için n=10 atım. (c) Roi

4'ün 3 voltaj adımında kaydedilen ortalama cevapları, roi 4'ün ortalama cevap derecesi (i) adımından (iii) adımına anlamlı olarak arttı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 6.3.12:** Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI 5.

Roi 5'in zamana bağlı aktivitesi, i, ii ve iii voltaj adımlarında (2V-3V-2V) c- primer nöronun uyardığı sekonder nöronun aktivitesini ( $\Delta F/F$ ) gösteriyor. (b) Her uyarı atımında kaydedilen ayrı yanıtlar ve ortalamaları, i için n=10 atım, ii için n=20 atım ve iii için n=10 atım. (c) Roi 5'in 3 voltaj adımında kaydedilen ortalama cevapları, roi 5'in ortalama cevap derecesi (i) adımından (iii) adımına anlamlı olarak arttı ( $p<0.05$ ).

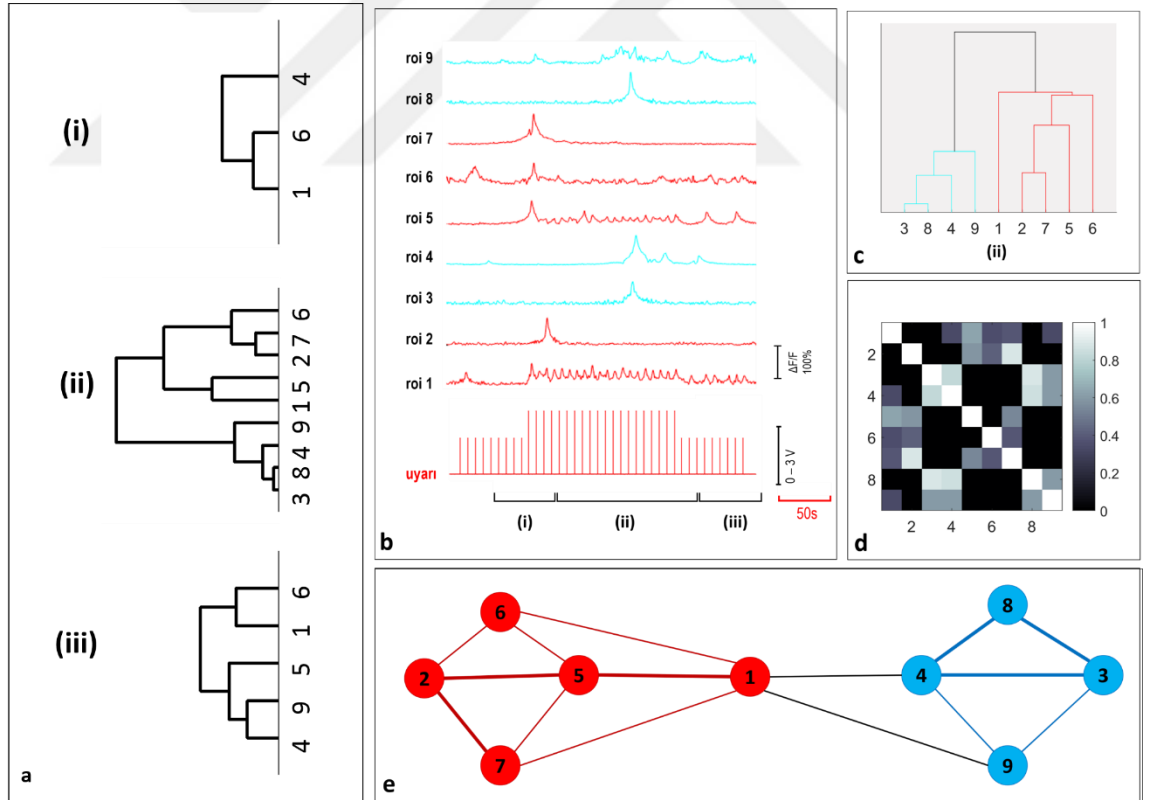


**Şekil 6.3.13:** Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI 9.

Roi 9'un zamana bağlı aktivitesi, i, ii ve iii voltaj adımlarında (2V-3V-2V) c- primer nöronun uyardığı sekonder nöronun aktivitesini ( $\Delta F/F$ ) gösteriyor. (b) Her uyarı atımında kaydedilen

ayrı yanıtlar ve ortalamaları, i için n=10 atım, ii için n=20 atım ve iii için n=10 atım. (c) Roi 9'un 3 voltaj adımında kaydedilen ortalama cevapları, roi 9'un ortalama cevap derecesi (i) adımından (iii) adımına anlamlı olarak arttı ( $p<0.05$ ).

Her uyarı periyodunda (i,ii,iii) kaydedilen yanıtlar arasında çapraz korelasyon ve MPC analizi ile bağlantısallık araştırıldı. Anlamlı bağlantılar ( $p<0.005$ ) hiyerarşik ağaçlar olarak şekil 6.3.14-a'da bulunabilir. Çapraz korelasyon analizi sonrasında ilişkili olduğu gözlemlenen ROİlerin renk-kodlu bir ağ örüntü önerisi Şekil 6.3.14-e de görülebilir. Üç uyarı periyodunda ağ yapılarının hiyerarşik bağlantıları değişiklikler gösterdi. her uyarı periyodunda, eş ROI'ler arasında kaydedilen bağlantı kuvvetleri (strength) Tablo 6.3.2'de verilmiştir.



**Şekil 6.3.14:** Çok-katmanlı etkileşim profilleri; ROI'lerin aktivitelerinin korelasyon analizine göre oluşturulmuş hiyerarşik ağaçlar (a).

Anlamlı bağlantılar kuvvetine göre sıralanmıştır ( $p<0.05$ ).

**Tablo 6.3.2:** Çok-katmanlı etkileşim profilleri

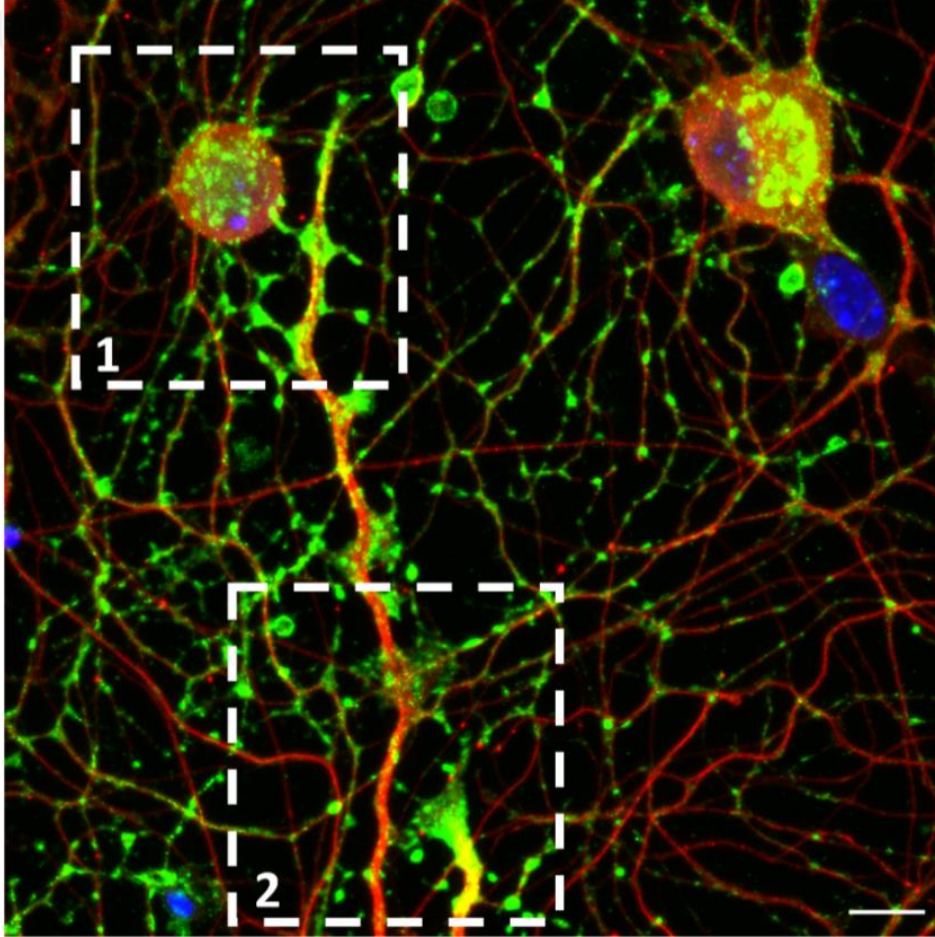
	i	ii	iii
ROI 1 – 6	0.61	0.74	0.77
ROI 1 – 4	0.53	0.72	0.81
ROI 1 – 5	-	0.91	0.75
ROI 1 – 9	-	0.79	0.76
ROI 4 – 5	-	0.65	0.75
ROI 4 – 6	0.61	0.42	0.82
ROI 4 – 9	-	0.80	0.90
ROI 5 – 6	-	0.76	0.73
ROI 5 – 9	-	0.77	0.78
ROI 6 – 9	-	0.57	0.77

\* Yalnızca istatistiki olarak anlamlı MPC skorları dikkate alınarak hazırlandı ( $p < 0.05$ ; denklemler 4 ve 5).



### 6.3.5. Sinapsların varlığı yapısal olarak doğrulandı

Fonksiyonel olarak gösterilen sinaptik bağlantıların yapısal olarak varlığı, immünohistokimya yoluyla doğrulandı. Bu boyama için Tablo 6.3.1'deki 8. MEA petrisi kullanıldı. Sinaptofizin, tüm tübülün(+) nöronların bilhassa üç bölgesinde görüntülendi. Bu bölgeler; akson uçları, akson-gövde kontak alanları ve akson-akson kesişim bölgeleridir. Bunlar akso-sinaptik, akso-somatik ve akso-aksonik sinapslara tekabül eder. Boyama sonuçları Şekil 6.3.15'de görülebilir.



Şekil 6.3.15: İmmünohistokimya.

8 no'lu MEA petrisindeki AKG kültürü, kültürün 3. Gününde (deney günü) fikse edilip boyandı. 3 kanalda görüntü gösterilmektedir,  $\beta$ -III Tübülün; kırmızı, Synaptophysin; yeşil, ve DAPI; mavi ile gösterilmiştir. (1), akson-soma bağlantılarını, (2) akson terminalini göstermektedir. Objektif: 40X, Ölçek çubuğu: 10 $\mu$ m.

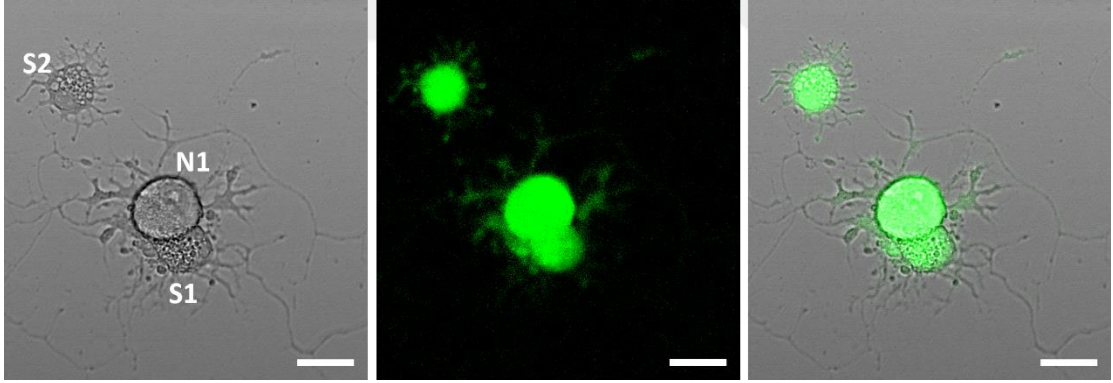
## 6.4. In-Vitro Nörit Transeksiyonuna SGH Hücrelerinin Akut Kalsiyum Yanıtı

### 6.4.1. Hücreler sağlıklı şekilde yapışıp akson uzattı

Kültür protokolü, yaklaşık %95 hayatta kalım oranına sahip sağlıklı hücreler elde etmemizi sağladı. Satellit glial hücreler, deneylerin amacına uygun sayıda gözlemlendi (Kültürde 2. Gün; %65 civarı).

### 6.4.2. Kalsiyum indikatörü yükleme işlemi sonrası nöron ve SGH hücreleri etkin bir şekilde boyandı

Boyama protokolü sonucu tüm hücreler Fluo-4 AM ile yüklendi. Hücrelerin faz kontrast ve florasan görüntüleri Şekil 6.4.1’de görülebilir. Deney esnasında, hem AKG nöron gövdelerine bitişik, hem de göç etmiş satellit glial hücre grupları görülmekteydi. Bitişik glial hücreler SGH<sup>A</sup>, göç etmiş olanlar SGH<sup>D</sup> olarak adlandırılmıştır.

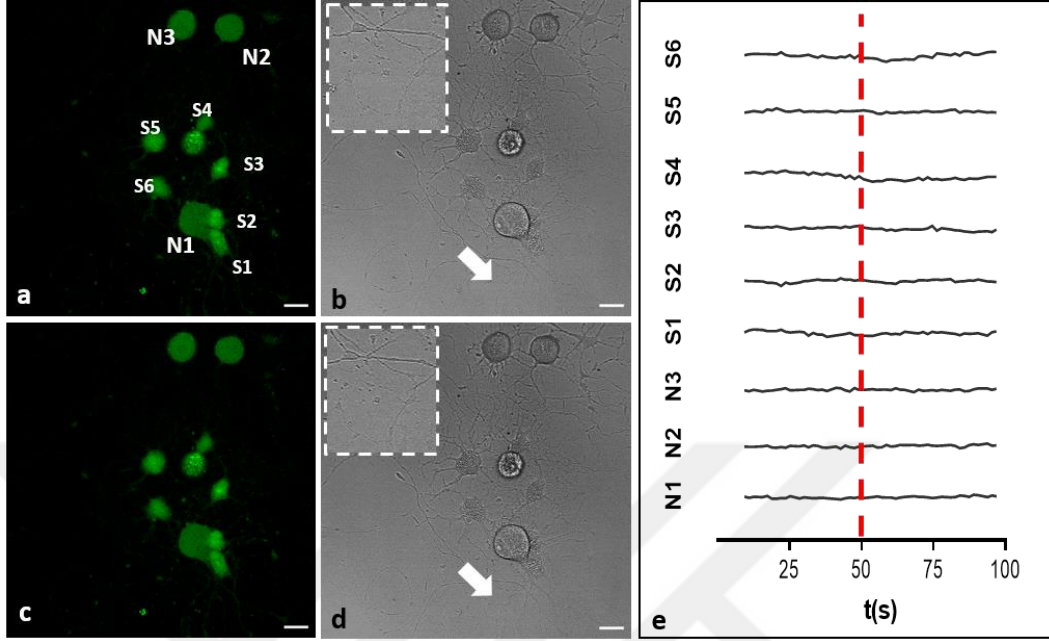


**Şekil 6.4.1:** Kültürde 2. günde Fluo-4 yüklü AKG nöronu (N1) ve glialar (S1, S2). Soldan sağa florasan, parlak alan ve bileşik görüntüler görülmektedir. S1 nöronla fiziksel teması olan SGH'lere (SGH<sup>A</sup>), S2 ise göç etmiş ve nöronla fiziksel teması bulunmayan SGH'lere (SGH<sup>D</sup>) örnek olarak gösterilebilir. Büyütme:40X, Ölçek çubuğu: 20µm.

### 6.4.3. Nörit transeksiyonuna hem nöral hem glial hücreler yanıt verdi

Nörit kesimi, kültürde 48 saat civarı gerçekleştirildi. Hasar modeli sayesinde civardaki hücre ve uzantılar etkilenmeden tek hücrenin etkileneceği şekilde kesim

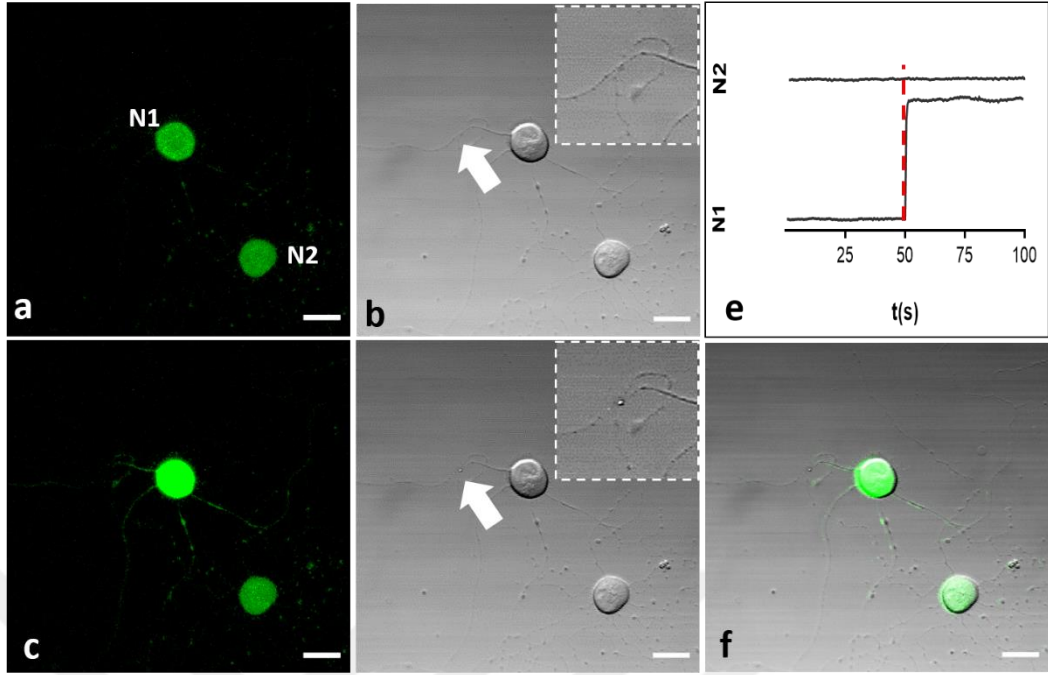
gerçekleşti. Sham grubu deneyleri, odaklanmış lazer uygulamasının lazer odağı civarında herhangi bir kalsiyum yanıtı indüklediğini göstermektedir. (Şekil 6.4.2)



**Şekil 6.4.2:** Tipik bir sham deneyi.

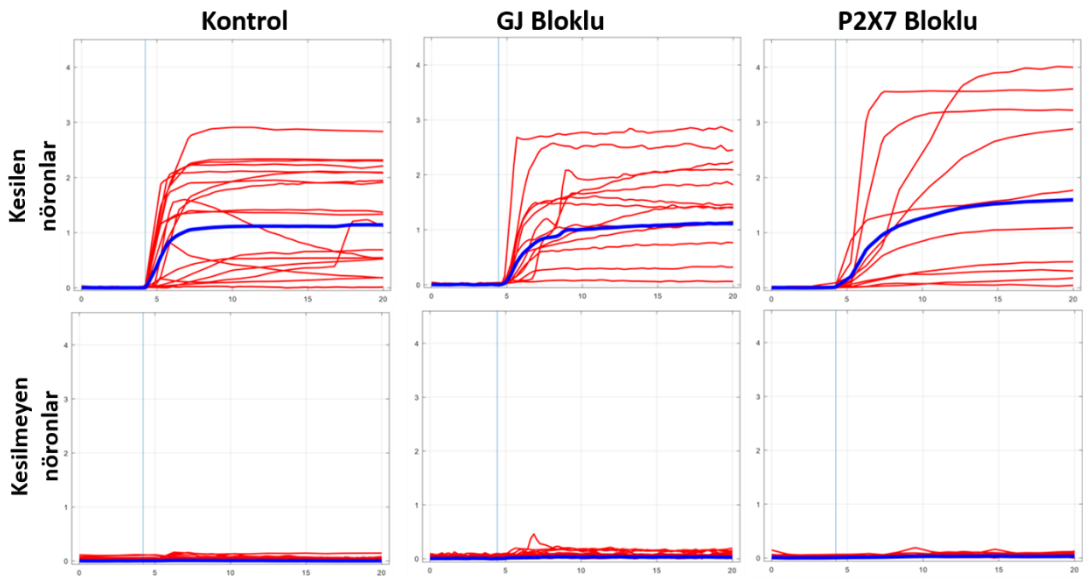
Florasana (a ve c), parlak alan (b ve d) görüntüleri. Beyaz oklar lazer atım alanına işaret eder ve atım bölgesi kesikli beyaz çizgi ile büyütülmüştür. Üst sıra atış öncesi, alt sıra atış sonrası göstermektedir. Her ROI'nin  $\Delta F/F$  değeri (e) şıkında gösterilmiştir. Kırmızı kesikli çizgi atış anını göstermektedir. Büyütme: 20X, Ölçek çizgisi: 20 $\mu$ m.

Kesilen nöronlar, kesime ani bir kalsiyum artışıyla cevap verdi. Görüntüleme alanındaki diğer nöronlar (kesilmeyen) bu işlemde akut olarak etkilenmedi. Kesilen nöron etkileşimine örnek bir görüntü Şekil 6.4.3'de bulunmaktadır. Tüm deneylerde kesilen nöronların kalsiyum yanıtları Şekil 6.4.4'de görülebilir (n= 65).



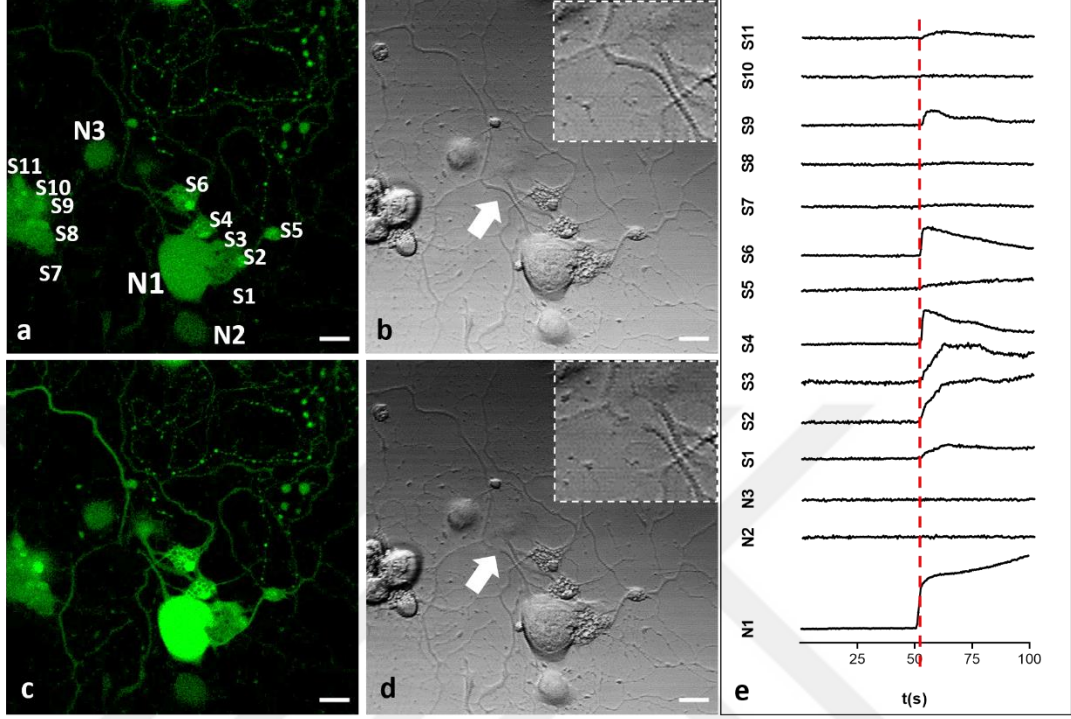
**Şekil 6.4.3:** Tipik bir nöron kesisi.

Florasan (a ve c), parlak alan (b ve d) görüntüleri. Beyaz oklar kesim alanına işaret eder ve kesilen nöritler kesikli beyaz çizgi ile büyütülmüştür. Üst sıra kesi öncesi, alt sıra kesi sonrası göstermektedir. Her ROI'nin  $\Delta F/F$  değeri e'de gösterilmiştir. Kırmızı kesikli çizgi kesim anını göstermektedir. f'de kesi sonrası florasan ve parlak alan görüntülerin bileşke görüntü görülmektedir. Büyütme: 20X, Ölçek çizgisi: 20 $\mu$ m



**Şekil 6.4.4:** Görüntüleme alanındaki tüm nöronların nörit kesisine kalsiyum yanıtı  $\Delta F/F$ .

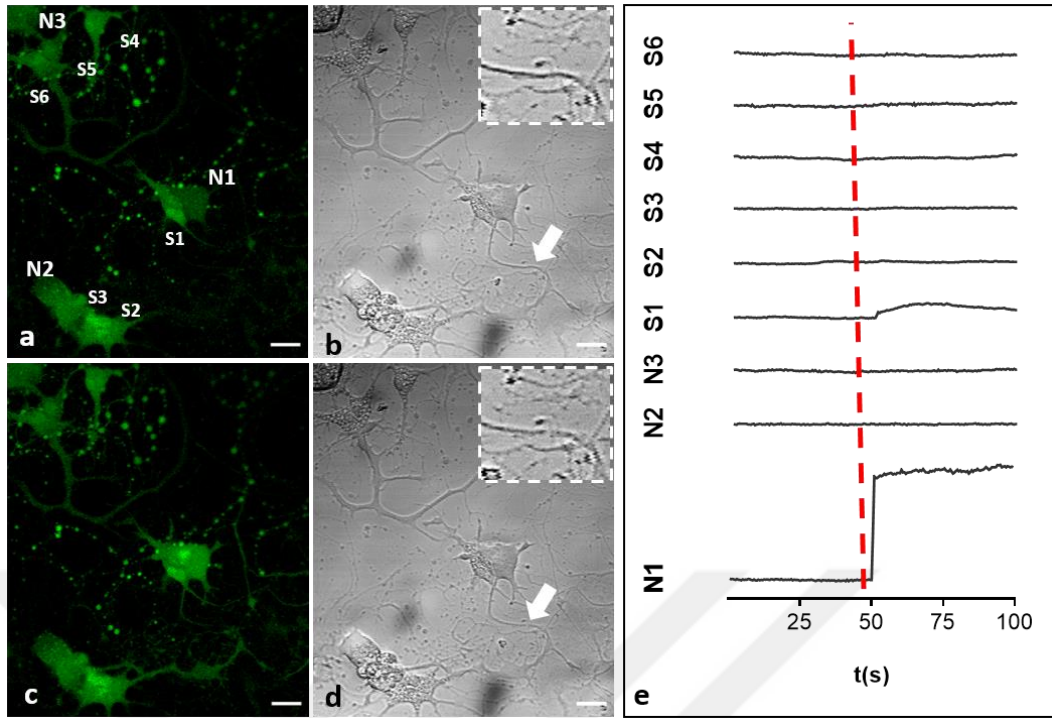
Çevredeki satellit glial hücreler, (SGH<sup>A</sup> ve SGH<sup>D</sup>), nörit kesimine kalsiyum yanıtı vermiştir. Satellit yanıtına örnek bir görüntü Şekil 6.4.5’de görülebilir.



**Şekil 6.4.5:** Tipik bir nöron kesimine SGH yanıtı.

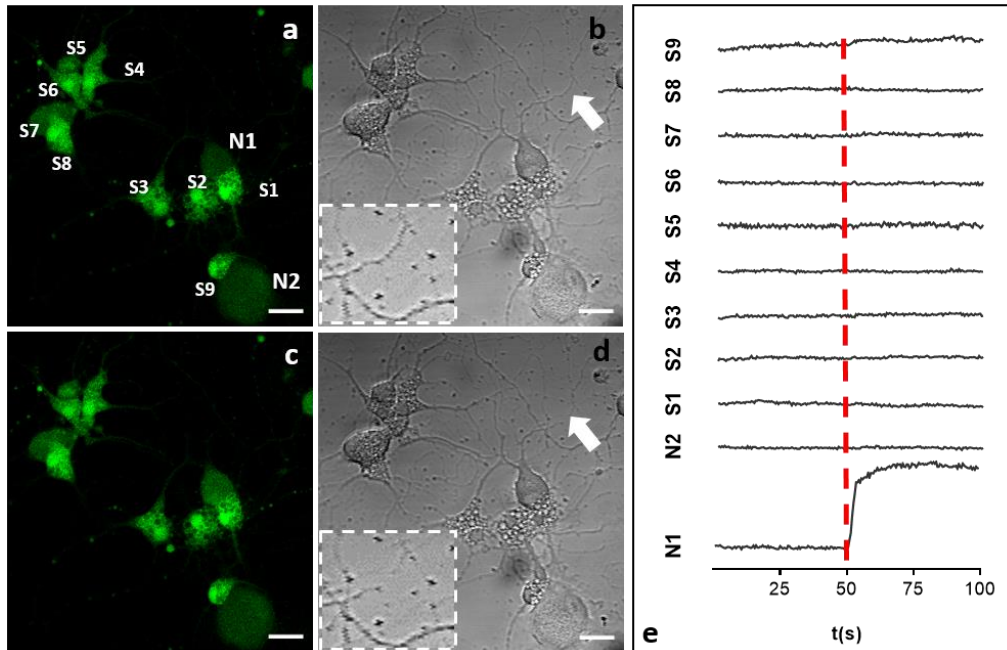
Florasana (a ve c), parlak alan (b ve d) görüntüleri. Beyaz oklar kesim alanına işaret eder ve kesilen nöritler kesikli beyaz çizgi ile büyütülmüştür. Üst sıra kesi öncesi, alt sıra kesi sonrası göstermektedir. Her ROI'nin  $\Delta F/F$  değeri e’de gösterilmiştir. Kırmızı kesikli çizgi kesim anını göstermektedir. Büyütme: 20X, Ölçek çizgisi: 20 $\mu$ m

Deneyle, GJ ve P2X7 blokörlerinin varlığında da tekrarlandı. Blokör varlığı kesilen nöron yanıtını etkilemedi (Şekil 6.4.4). Satellit cevabı blokör varlığından yüksek oranda etkilendi. Şekil 6.4.6 ve 6.4.7 Blokör varlığında tipik SGH cevabını göstermektedir. Kontrol grubunda toplam SGH’lerin %70’i (Kontrol, n=67) kesime artan  $Ca^{2+}$  ile yanıt verdi. GJ blok (CBX uygulaması) ve P2X7 blok (BBG uygulaması) durumunda,  $Ca^{2+}$  yanıtı her grupta anlamlı olarak azaldı ( $p < 0.0001$ ). GJ bloklandığında %35’e, (CBX, n=60) P2X7 bloklandığında %28’e, (BBG, n=82) düştüğü gözlemlendi. Şekil 6.4.8’de bulguların özeti görülebilir.



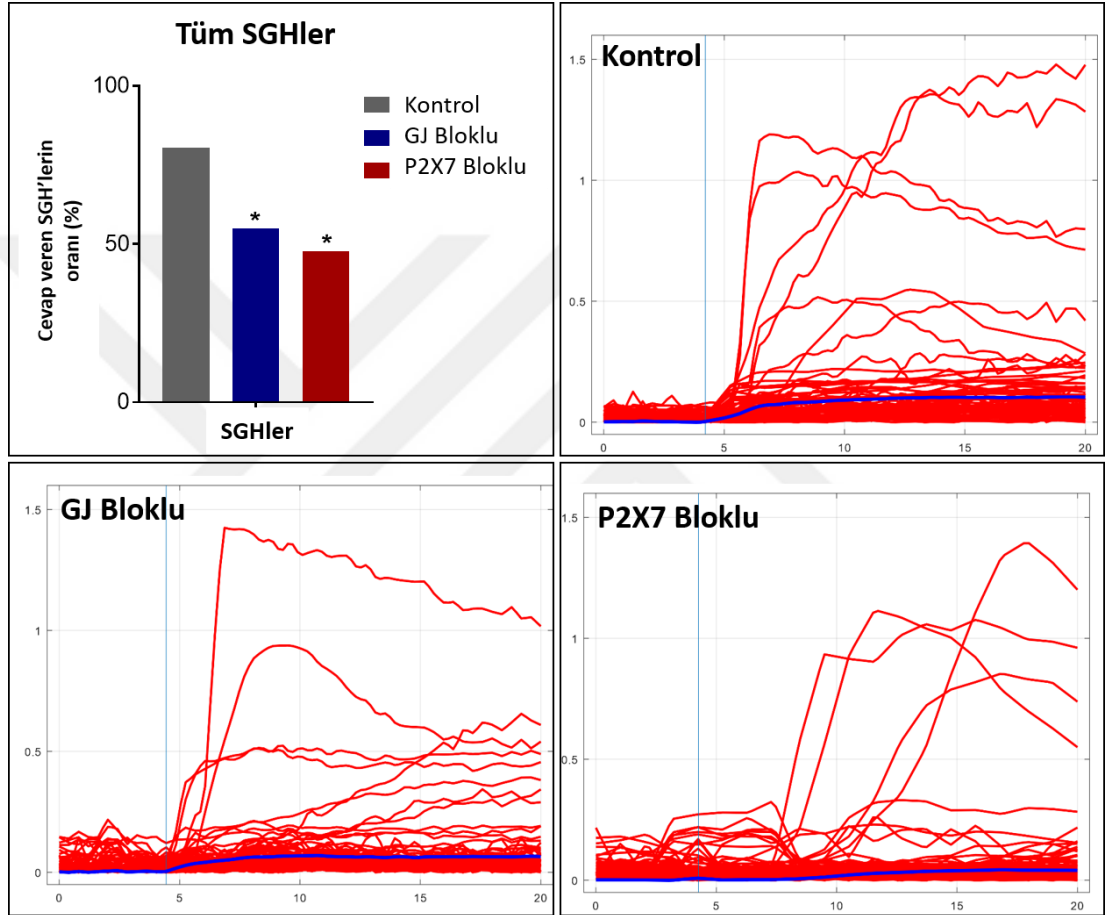
**Şekil 6.4.6:** GJ'ler bloklı durumdayken, nöron kesisine SGH yanıtı.

Florasana (a ve c), parlak alan (b ve d) görüntüleri. Beyaz oklar kesim alanına işaret eder ve kesilen nöritler kesikli beyaz çizgi ile büyütülmüştür. Üst sıra kesi öncesi, alt sıra kesi sonrası göstermektedir. Her ROI'nin  $\Delta F/F$  değeri e'de gösterilmiştir. Kırmızı kesikli çizgi kesim anını göstermektedir. Büyütme: 20X, Ölçek çizgisi: 20 $\mu$ m



**Şekil 6.4.7:** P2X7'ler bloklı durumdayken, nöron kesisine SGH yanıtı.

Florasın (a ve c), parlak alan (b ve d) görüntüler. Beyaz oklar kesim alanına işaret eder ve kesilen nöritler kesikli beyaz çizgi ile büyütülmüştür. Üst sıra kesi öncesi, alt sıra kesi sonrası göstermektedir. Her ROI'nin  $\Delta F/F$  değeri e' de gösterilmiştir. Kırmızı kesikli çizgi kesim anını göstermektedir. Büyütme: 20X, Ölçek çizgisi: 20 $\mu$ m



**Şekil 6.4.8:** Nöron kesisine cevap veren tüm SGH'lerin aktivite oranı.

Üst sol: Nöron kesisine cevap veren tüm SGH'lerin aktivite oranı (%). Üst sağ ve alt: Tüm SGH'lerin kontrol ve blok durumunda kalsiyum yanıtı ( $\Delta F/F$ ). Ayrı SGH yanıtları kırmızı, ortalaması lacivert ile gösterilmiştir.

#### 6.4.4. SGH yanıtları kesilen nöronla kurdukları bağlar göz önünde bulundurularak tekrar değerlendirildi

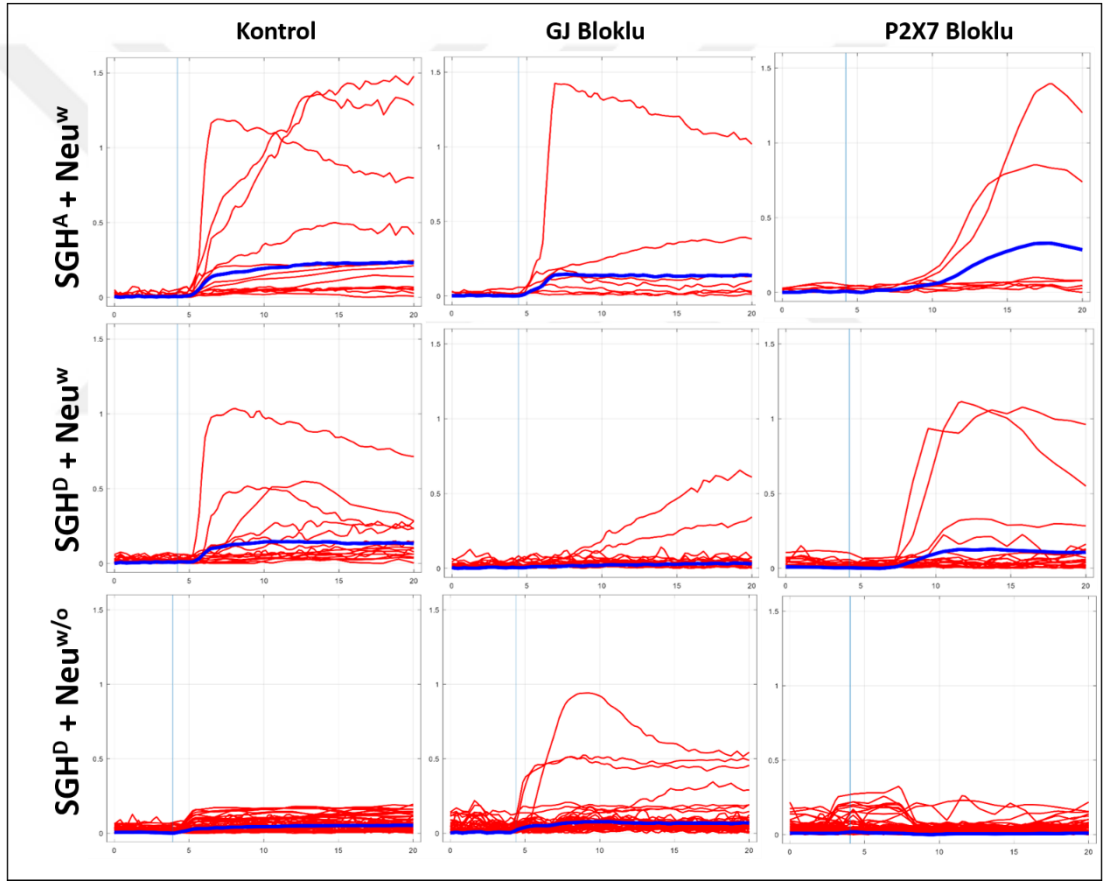
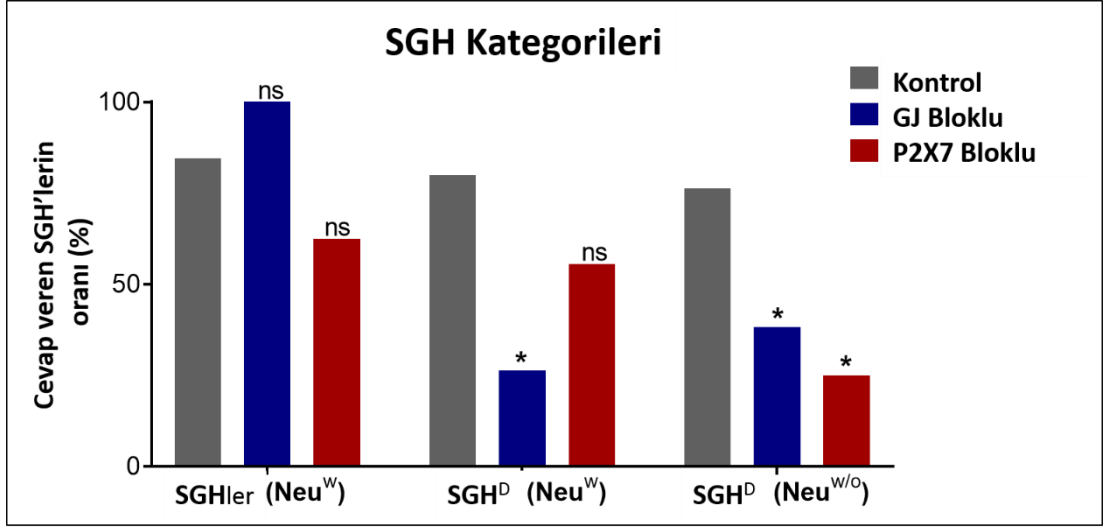
SGH yanıtları, kesilen nöronla olan fiziksel bağları göz önünde bulundurularak tekrar irdelendi. Satelitler SGH<sup>A</sup> ve SGH<sup>D</sup> olarak kategorize edildi. Kesilen nöron ise ona bitişik SGH olup olmamasına bağlı olarak Neu<sup>w</sup> ve Neu<sup>w/o</sup> olarak adlandırıldı. Özetlemek gerekirse her deneyde 3 kategori SGH (SGH<sup>A</sup> + Neu<sup>w</sup>), (SGH<sup>D</sup> + Neu<sup>w</sup>), (SGH<sup>D</sup> + Neu<sup>w/o</sup>) ve 3 grup (Kontrol, GJ Bloklı, P2X7 Bloklı) incelendi.

SGH<sup>A</sup>, her grupta sinir kesisine kalsiyum yanıtıyla cevap verdi. SGH<sup>D</sup>, kesilen nöronun Neu<sup>w</sup> veya Neu<sup>w/o</sup> olmasına bağlı olarak blokörlere farklı cevap verdi. Neu<sup>w</sup> keski durumunda, SGH<sup>D</sup> aktivitesi yalnızca GJ blokörüyle bloklandı. Neu<sup>w/o</sup> keski durumunda SGH<sup>D</sup> aktivitesi hem GJ hem P2X7 blokörüyle engellendi. Kategorilerin ve istatistiki değerlerin özeti Tablo 6.4.1'de Şekil 6.4.9'da görülebilir. Gruplardaki kalsiyum olaylarının özeti Şekil 6.4.10-13'de görülebilir.

**Tablo 6.4.1:** SGH kategorilerinin kontrol ve blok durumlarında nörit kesisine yanıt oranı ve p değerleri.

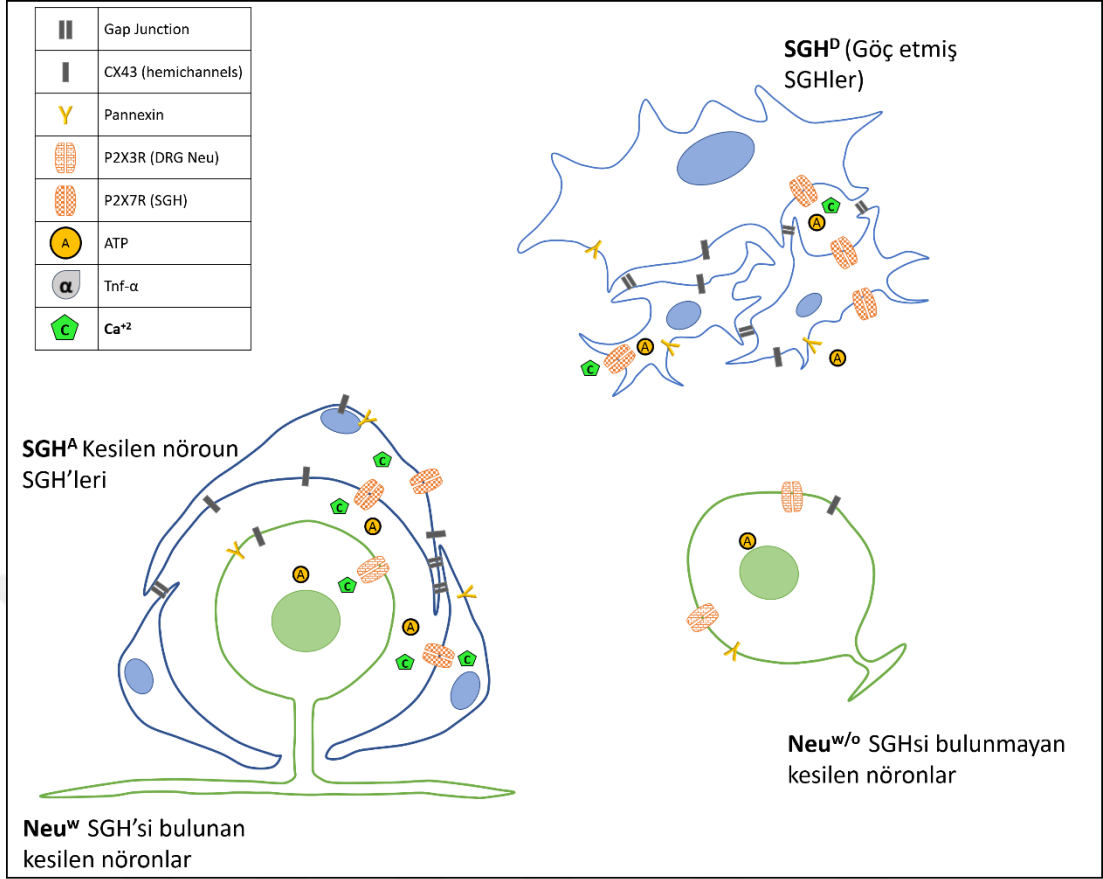
	Kontrol		GJ Bloklı			P2X7 Bloklı		
	n	Yanıt %	n	Yanıt %	p-değeri	n	Yanıt %	p-değeri
SGH <sup>A</sup> + Neu <sup>w</sup>	13	85%	7	90%	ns	8	63%	ns
SGH <sup>D</sup> + Neu <sup>w</sup>	15	80%	19	26%	*	18	56%	ns
SGH <sup>D</sup> + Neu <sup>w/o</sup>	38	76%	34	38%	*	56	25%	*





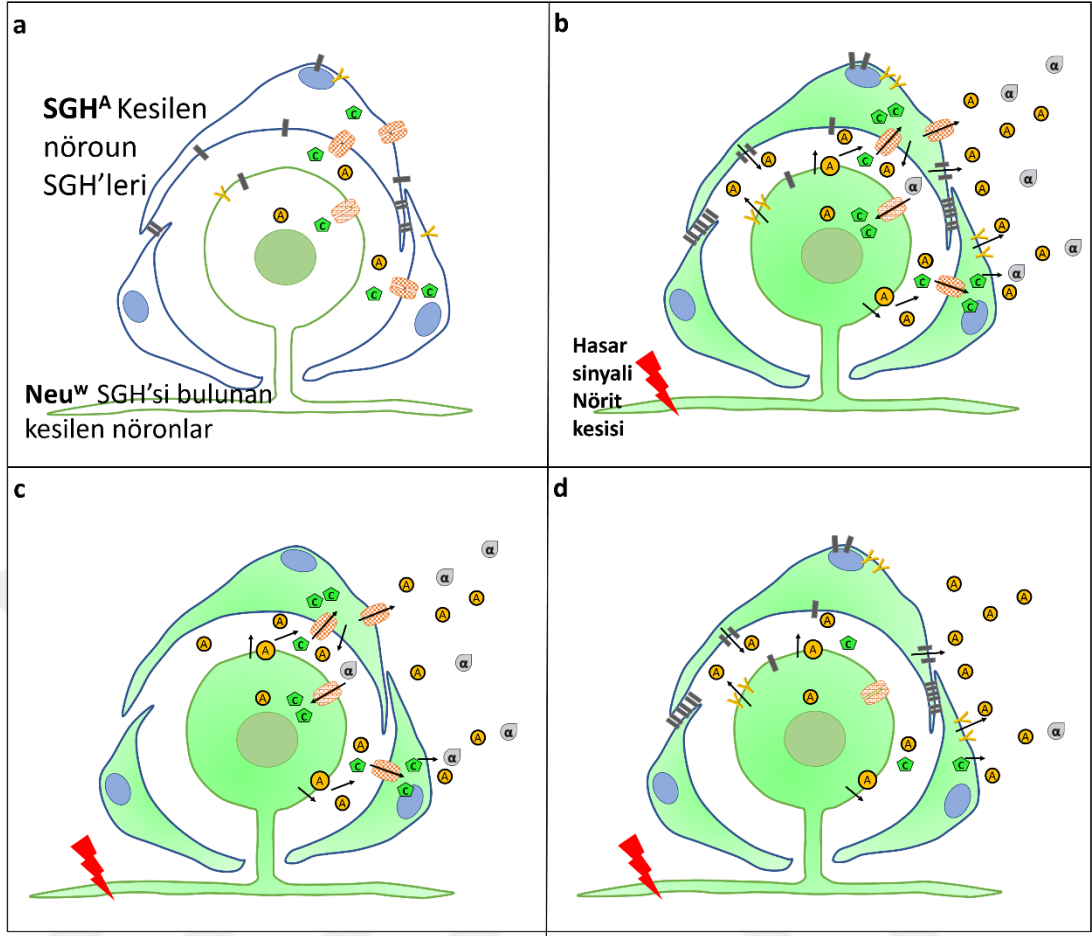
**Şekil 6.4.9:** Üst: SGH kategorilerinin kontrol ve blok durumlarında nörit kesisine yanıt oranı ve kontrol grubuna göre farklar. Alt: SGH kategorilerinin kalsiyum yanıtı.

Ayrı SGH yanıtları kırmızı, ortalaması lacivert ile gösterilmiştir.



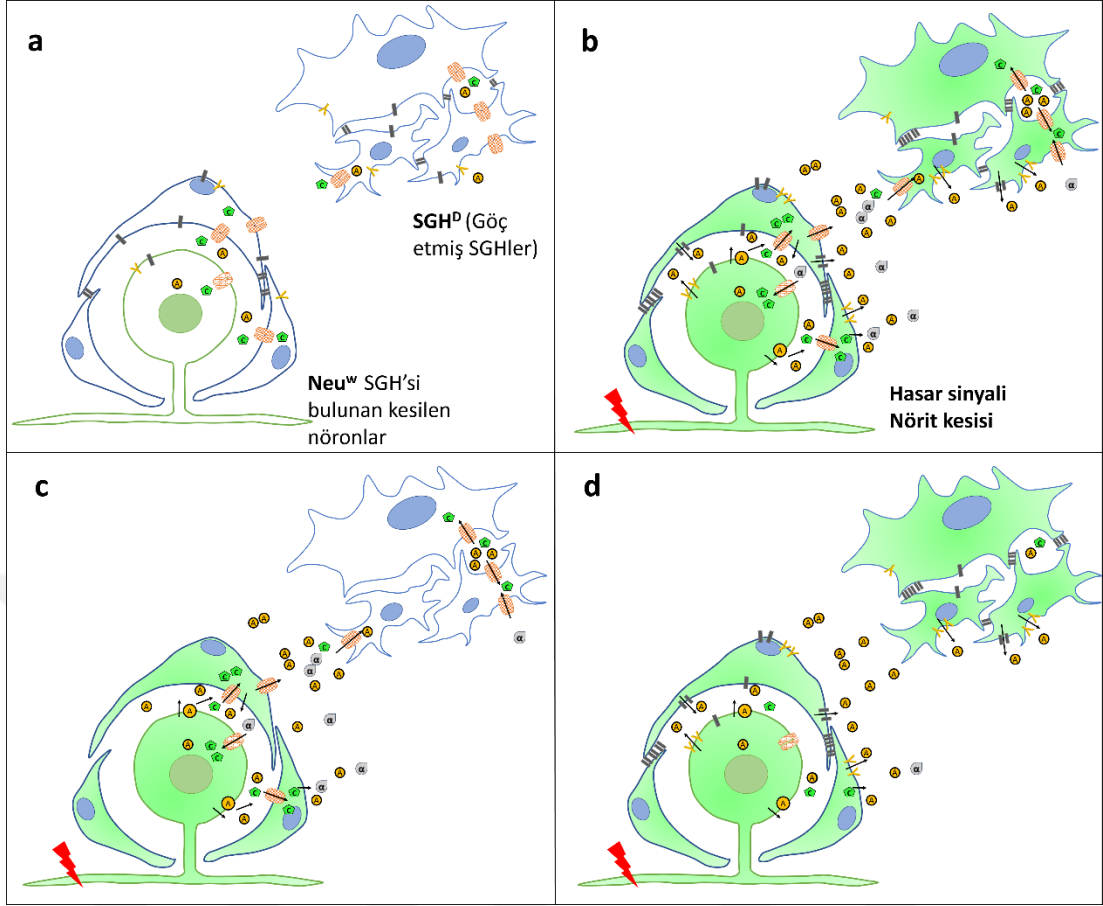
**Şekil 6.4.10:** Deneyler esnasında gözlemlenen yapıların şematik gösterimi.

**SGH<sup>A</sup>**; kesilen nörona bitişik SGH'ler. **SGH<sup>D</sup>** göç etmiş ve kesilen nöronla fiziksel bağlantısı olmayan SGH'ler. **Neu<sup>w</sup>**: Kesilen nöronlardan bitişik SGH'si olanlar. **Neu<sup>w/o</sup>**: SGH'si bulunmayan kesilen nöronlar. GJ'ler, CX43 kanalları, Pannexinler, satellitik P2X7 ve nöronal P2X3 reseptörleri hücreler üzerinde görülebilir. Deneylerde etkili olduğu veya bloklandığı düşünülen ATP, Tnf $\alpha$  ve Ca<sup>2+</sup> da gösterilmiştir. Her deneyde 3 kategoriden biri SGH (SGH<sup>A</sup> + Neu<sup>w</sup>), (SGH<sup>D</sup> + Neu<sup>w</sup>), (SGH<sup>D</sup> + Neu<sup>w/o</sup>) ve 3 grup (Kontrol, GJ Bloklü, P2X7 Bloklü) görülmektedir.



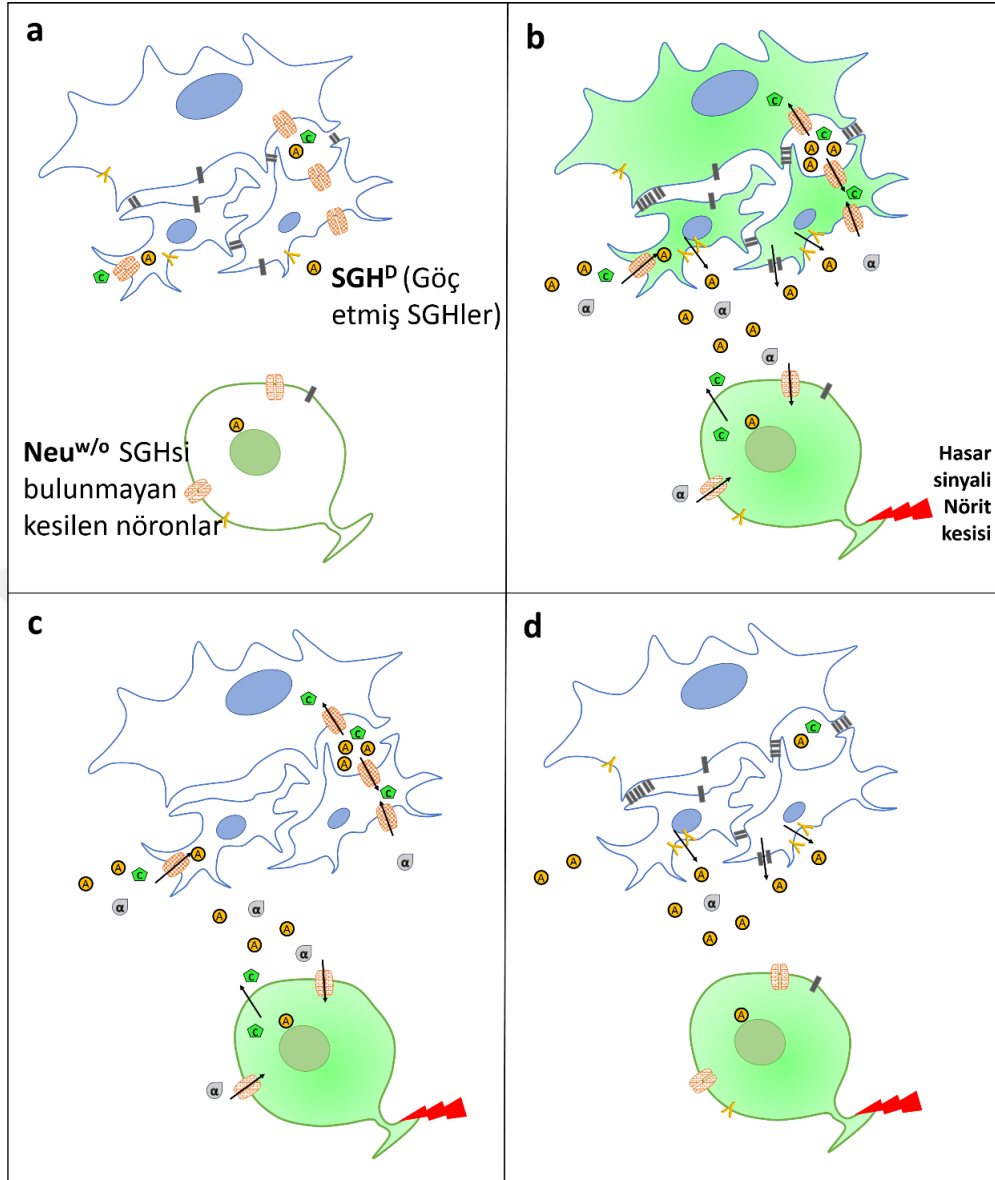
**Şekil 6.4.11:** SGH<sup>A</sup> + Neu<sup>w</sup> kategorisi.

Deney öncesinde kesilen nöron sessiz (a). Nörit kesisi uygulandığında kesilen nöronun ATP deşarjı gerçekleşir. ATP, glial P2X7 kanalları için bir aktivatör görevi görür. P2X7 kanallarının açılmasıyla Ca<sup>2+</sup>'nin içeri akışı indüklenir. SGH'ler arasında Panx1 ve Cx43 kanalları bulunmaktadır. Bu kanallar, küçük moleküllerin yanında elektriksel uyarının da hücreler arasında difüze olmasını sağlar. Akut etkisi bilinmemekle beraber GJ'lerin sayısı ve bağlantı kuvvetinin hasarla arttığı bilinmektedir. Sınır kesisiyle, ATP, TNF $\alpha$  ve GJ'ler yoluyla kalsiyum sinyali SGH<sup>A</sup> arasında hızla yayılır (b). GJ'lerin bloklanmasıyla Panx1 ve Cx43 kanalları deaktive olur, uyarı SGH<sup>A</sup> arasında ATP yoluyla yayılmaya devam eder (c). Pürinerjik kanalların bloke edilmesiyle SGH<sup>A</sup>'lar ATP'ye duyarsızlaşır, elektriksel uyarı GJ'ler ile yayılır (d).



**Şekil 6.4.12:** SGH<sup>D</sup> + Neu<sup>w</sup> kategorisi.

Deney öncesinde kesilen nöron sessiz (a). Nörit kesisi uygulandığında kesilen nöronun ATP deşarjı gerçekleşir. ATP, glial P2X7 kanalları için bir aktivatör görevi görür. P2X7 kanallarının açılmasıyla Ca<sup>2+</sup>'nin içeri akışı indüklenir. SGH'ler arasında Panx1 ve Cx43 kanalları bulunmaktadır. Bu kanallar, küçük moleküllerin yanında elektriksel uyarının da hücreler arasında tiffuse olmasını sağlar. Sinir kesisiyle, ATP , TNF $\alpha$  ve GJ'ler yoluyla kalsiyum sinyali SGH<sup>D</sup> arasında hızla yayılır (b). GJ'lerin bloklanmasıyla Panx1 ve Cx43 kanalları deaktive olur, uyarı SGH<sup>A</sup> arasında ATP yoluyla yayılmaya devam eder fakat SGH<sup>D</sup> ye ulaşmaz. (c). Pürinerjik kanalların bloke edilmesiyle SGH<sup>A</sup>lar ATP'ye duyarsızlaşır, elektriksel uyarıGJ'ler SGH<sup>D</sup> arasında yayılmaya devam eder (d).



**Şekil 6.4.13:** SGH<sup>D</sup> + Neu<sup>w/o</sup> kategorisi.

Deney öncesinde kesilen nöron sessiz ve çevresinde bağlantılı olduğu SGH<sup>A</sup> yok (a). Nörit kesisi uygulandığında kesilen nöronun ATP deşarjı gerçekleşir. ATP, glial P2X7 kanalları için bir aktivatör görevi görür. P2X7 kanallarının açılmasıyla Ca<sup>2+</sup>'nin içeri akışı indüklenir. SGHler arasında Panx1 ve Cx43 kanalları bulunmaktadır. Bu kanallar, küçük moleküllerin yanında elektriksel uyarının da hücreler arasında difüze olmasını sağlar. Sinir kesisiyle, ATP, TNF $\alpha$  ve GJ'ler yoluyla kalsiyum sinyali SGH<sup>D</sup> arasında hızla yayılır (b). GJ'lerin bloklanmasıyla Panx1 ve Cx43 kanalları deaktive olur, uyarı SGH<sup>D</sup> ye ulaşmaz. (c). Pürinerjik kanalların bloke edilmesiyle SGH'alar ATP'ye duyarsızlaşır, elektriksel uyarı SGH<sup>D</sup> ye ulaşmaz (d). Kesilen nöron çevresindeki SGHler diğerlerine öncelikle GJler yoluyla bağlı olmalıdır, GJ öne çıkar.

## 7. TARTIŞMA

### 7.1. Ekim Yoğunluğuna Dayalı Spontan Aktivitenin AKG Nöronlarının İn Vitro Hayatta Kalımına Etkisi

Bu çalışmada, olgunlaşmakta olan AKG kültürlerin ekim yoğunluğunun kültürde gelişen spontan aktiviteye bağlı olarak hücre hayatta kalımını etkileyip etkilemediği değerlendirilmek istendi. Üç farklı yoğunlukta kaplanmış bağımsız nöronal kültürün hayatta kalım ve kalsiyum aktivitesi çok bölgesel şekilde ölçüldü ve olgunlaşma sırasında (kültürün ilk günlerinde) hücre yoğunluğunun elektriksel aktivite ve hücre hayatta kalımı üzerindeki etkisi incelendi. Literatürle bir kıyaslama gerçekleştirebilmek için benzer bir CNS sistem kültürü olarak hipokampal kültürler seçildi ve deneyler tekrarlandı (Ekler)

Literatürde, in-vitro ve in-vivo şartlarda tekrarlanan deneyler, elektriksel aktivite kaybının/azlığının nöral dejenerasyonla sonuçlandığını ve bununla birlikte endojen ve ekzojen elektriksel aktivitenin nöronların hayatta kalımını desteklediğini göstermektedir. Retinal gangliyon hücrelerinde [148] ve retinal eksplant kültürlerde [149], ve organotipik kortikal kültürlerde [150] endojen aktivitenin tetradoksin ile bloklanması sonucu nöron ölümünün arttığı ve nörit uzatımını engellediği gösterilmiştir. Tavuk AKG kültürleri ile yapılan bir çalışmada, ekstraselüler ortamda  $K^+$  iyonlarının artmasının in-vitro hayatta kalımı artırdığı gösterilmiştir [151]. Bunun nedenini kronik depolarizasyon olduğu ve ortamda oluşan nöral elektriksel aktivitenin voltaj-kapılı  $Ca^{2+}$  kanallarının aktivitesini indüklediği, bu sayede artmış hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun hayatta kalımı desteklediği tartışılmıştır [152].

Tez çalışması sonucunda, az sayıda ekilen kültürlerde hayatta kalım düşük çıkmıştır. Gruplarda ekim alanı ve besiyeri miktarı hücre sayısına göre ayarlanmasına rağmen hayatta kalımdaki düşüş, bu sonucun humoral ve metabolik olaylardan bağımsız olduğunu düşündürmektedir. Seyrek ekim yapılan petrilere nöronlar daha hızlı bir şekilde dejenere olmuştur. Bununla beraber kalsiyum görüntüleme çalışmalarıyla yapılan erken dönem incelemeler beklendiği gibi seyrek kültürlerde düşük aktiviteye

işaret etmemektedir. Takip edilen günler süresince aktif hücre yüzdesi zamanla azalmış buna rağmen belirli bir miktarda kalsiyum aktivitesi petrielerde korunmuştur.

Önceki çalışmalar, MEA'lar ile hücre dışı kayıtlar yoluyla, ancak yalnızca tek bir yoğunlukta veya deneysel gereksinimler için kullanılacak farklı yoğunluklarla ekilmiş, kültürlerin işlevsel (functional) özellikleri hakkında net göstergeler sağlamadan nöronal ağ olgunlaşmasını karakterize etmiştir [153, 154]. Previtara ve meslektaşları, değişen hücre yoğunluklarının hipokampal kültürlerde dendrit dallanmasını düzenlemede bir rol oynadığını göstermişlerdir [155]. Bazı çalışmalarda, ağ olgunlaşmasından sonra nöronal yoğunluk ile sinaps sayısı arasında ters bir ilişki olduğu, hücre sayısı azaltıkça yapılan bağlantı sayısının arttığı kanıtlanmıştır [16]. Başka incelenen bir konu ise bu bağlantıların kuvvetidir. Farklı yoğunluklarda ekimin nöronlar arasındaki bağlantıyı etkilediği, seyrek ağların, yoğun kültürlerle göre nöron çiftleri arasında daha güçlü sinaptik bağlantılar sergilediği gösterilmiştir. Örneğin seyrek kültürlerde ateşleme genliği (burst size) büyük ve frekans düşükken, yoğun kültürlerde ise daha az senkronize aktivite ve düşük ateşleme genliği gözlemlenmiştir [17, 156]. Literatürde sunulan bu ve diğer kanıtlar, nöral ve sinaptik gelişimin ortak paydasının, girdi eleme (input elimination) işlevinin olgunlaşma sırasında nöral yanıtı keskinleştirmek için faydalı olduğunu göstermektedir; Presinaptik eş sayısı azaldıkça, kalan hücrelerdeki sinaptik kuvvet artar. Bu kavram bir süre önce önerilmiş olmasına rağmen [157], sinaptik yoğunluk ve güç arasındaki ilişki kontrollü koşullar altında sistematik olarak çalışılmamıştır ve çelişkili bulgular da mevcuttur. Örneğin Wagenaar ve meslektaşları, MEA'larda büyütülen kortikal kültürlerde; yoğunlukla doğru orantılı yüksek ateşleme genliği ve hızlı ağ olgunlaşması gözlemlenmiştir [154]. Nöronal kültürlerin içsel değişkenliği nedeniyle, farklı çalışmalarda açıklanan farklı yoğunluklardaki verilerin dolaylı olarak karşılaştırılması neredeyse imkânsızdır, bu nedenle çalışmamız önem kazanmaktadır. Bu çalışma kapsamında, benzer koşullarda üretilmiş farklı kültür yoğunluklarına sahip AKG kültürlerinin spontan aktivitesinin evriminin ve hayatta kalım kayıtlarının basit bir tanımını verilerek farklı kültür günlerinde incelendi.

Spontan popülasyon aktivitesi, sinir sisteminin gelişiminde [158, 159] ve duyuşal bilginin kortikal entegrasyonunda [160] önemlidir. İn vitro nöronlar, çok çeşitli MSS

preparatlarında gözlenen rastgele bir sinir ağı için tipik bir davranış gibi görünen (in-vivo benzeri) toplu patlama aktivitesi (burst activity) sergiler. Bu büyük genlikli aktivitenin, nöronal ağ özelliklerinin incelenmesinde faydalı olduğu bilinmektedir [161, 162]. Nöronal aktivite takibi esnasında en çok karşılaşılan zorluk, aktivitenin genellikle kültürün izlenmeyen bölümlerinde başlamasıdır [64]. Başka bir deneysel zorluk, aksonal aktivite kaynağının tespitidir [163]. AKG kültürlerinde de, aktivite aksonal olarak başlayarak T bölgesinde kalabilir ve çekirdek hiç uyarılmayabilir [1], bunun yanında AP akson boyunca çok ileri sıçrama yapabilir ve bilinen yöntemlerle takibi mümkün olmayabilir [164]. Yayılımdaki bu sıçramalar, sinyalin nedensel ilerlemesini takip etmeyi son derece zorlaştırır. Başka bir deneysel komplikasyon, aynı merkezden başlayan farklı olayların yayılma yollarında belirgin farklılıklar gösterebilmesi nedeniyle ortaya çıkar [165].

Normal fizyolojik koşullar altında AKG hücreleri, in vitro [26, 166] ve in-vivo [167, 168] koşullarda sınırlı spontan aktivite sergilerler. Bununla birlikte, sinir hasarı veya enflamasyonu takiben, AKG hücrelerinin hiper-uyarılabilir hale geldiği gösterilmiştir [168, 169]. Fizyolojik koşullar altında sınırlı spontan aktivite kaydedilmesi, elektrofizyolojik kayıt metodlarının çeşitli verim problemleriyle birleştiğinde, AKG kültür modellerinin potansiyel etkinlik açısından araştırılmasını zorlaştırmıştır. Önceki çalışmalar, tipik kültür koşulları altında, yaralanmamış hayvanlardan izole edilen yetişkin sıçan AKG hücrelerinin, kronik olarak sinir büyüme faktörü (NGF) ile muamele edilmedikçe veya farmakolojik uyarılar ile inkübe edilmeksizin çok az spontan ateşleme sergilediğini veya hiç spontan aktivite sergilemediğini göstermiştir [170, 171]. Sıçan kronik ağrı modellerinde hem spontan AKG aktivitesi hem de NGF seviyelerinin önemli ölçüde arttığı gösterildiğinden [47, 172], kronik NGF ile tedavi edilen, aşırı uyarılabilir AKG hücrelerinin olabileceği öne sürülmüştür. Kronik konstrüksiyon hasarı (CCI) gibi diğer ağrılı sinir yaralanması modelleriyle primer AKG kültürlerinin spontan aktivitesinde bir artış gözlemlenir [47, 53, 166]. Bu uygulamalar in vitro ağrı modeli olarak kullanılır [171] fakat normal fizyolojik koşulları yansıtmazlar.

Bu çalışma kapsamında alınan kayıtlar hasar veya uyarı olmaksızın kaydedilmiş spontan kayıtlardan oluşmaktadır. Öncelikle MEA kayıtları spontan aktivite şiddetinin



azlığı sebebiyle yetersiz data elde edilmiştir. Kalsiyum kayıtları daha sağlıklı olmakla ve geniş alanların sürekli izlemi ile yukarda bahsi geçen aktivite kaynağı ve yöneliminin saptanmasına ilişkin bazı problemlerden kaçınılabilmesi ile beraber kalsiyum aktivitesiyle hayatta kalım arasında net bir ilişki gösterecek miktarda veri kaydedilememiştir. Bunlara rağmen gelişmekte olan periferel kültürlerde hayatta kalım ile ilgili sağlıklı bulgular kaydedilmiştir. Bu çalışma daha hassas, aksonal aktiviteyi saptayabilecek MEA sistemleri veya aksonal bir GCaMP indikatörü kullanılarak aksonal kalsiyum salınımlarının gözlemlendiği, yıpratıcı boyama protokollerine gereksinim duyulmayan, böylece daha uzun süreli izlenebilen bir çalışma destekleyici olabilir [173].

## **7.2. AKG Kültürlerinde Nöral Ağ Oluşumunun İncelenmesi**

Bu çalışma kapsamında AKG nöronlarının uyarılmış elektriksel aktivite örüntülerini incelemek suretiyle in vitro ortamda birbirleriyle ağ yapıp yapmadıkları araştırıldı. Bu amaç için nöronları GCaMP6s ifade eden yetişkin farelerden elde edilen AKG nöronlarını kullanıldı. Kalsiyum görüntüleme ve elektriksel uyarı metotlarının eş zamanlı olarak kullanabileceği bir deneysel platform tasarlandı. AKG nöronları arasında istatistiki olarak ilişkili aktivite tespit edildi ve bu aktivitenin ağ oluşumundan kaynaklandığı blokörler ve boyama metoduyla doğrulandı. Ağ olayları, hemen hemen tüm nöronlarda aksonal terminallerde, akson-soma kavşaklarında ve akson-akson kesişim bölgelerinde tespit edilen glutamaterjik sinapslarda başarıyla gösterildi. Bu çalışma AKG nöronlarının in vitro etkileşim profillerini anlamak için birden fazla deneysel modaliteden faydalanılan deneysel bir yaklaşım kullanılarak, in vitro AKG nöral ağları bildirilen literatürdeki ilk çalışmadır.

Çalışmada kullanılan serumsuz AKG kültür protokolü, yüksek canlılık sağlayarak nöronların büyümesi ve gelişmesi için yeterli koşulları sağladı. Bununla beraber gradient-tabanlı bir hücre ayrıştırma sonrası ekim yapıldı, bu nedenle ekilen hücre popülasyonunun yüksek oranı literatürdeki diğer çalışmalara kıyasla nöronlardan oluşmaktaydı. Bu teknik sayesinde literatüre çok kullanılan anti-mitotik ajanları

kullanılmadı. Bu ajanların hücrel strese katkıda bulunduğu bilinmektedir ve aktiviteye etkisi hakkında yeterli çalışma mevcut değildir [174].

Önceden de belirtildiği gibi, AKG kültürlerinde elektrik ve kalsiyum aktivitesini uyarmak için büyüme faktörleri ve NGF, BDNF veya GDNF gibi sitokinlerin kullanımı yaygın bir uygulamadır [8, 9]. Bununla birlikte, nöronların sentetik biçimde duyarlılığının artırılması, örneklere fizyolojik olarak beklenmedik etkileşimleri getirebilir [175, 176]. Örneğin Cheng ve meslektaşları, NGF seviyelerindeki artışın, yeni oluşan nöritler arasında sinaps-benzeri yapılar oluşturarak sağlıklı nöronların aşırı mekanik duyarlılığına yol açtığını göstermiştir [177]. Bu kanıtlar ışığında, bu çalışma kapsamında fizyolojik aktivite profillerini mümkün olduğu kadar korumak için sentetik duyarlılaştırma veya enflamasyon modellerine başvurmaktan kaçınıldı.

Wainger ve meslektaşları elektrik ve optik teknikler kullanarak, ağrı araştırması için bir model geliştirmek amacıyla fibroblastlardan yeniden programlanan nosiseptör nöronlarının aktivitesini takip ettiler [178]. Bunu takiben Enright, kimyasal uyarıcılara maruz kalan primer insan AKG nöronlarını araştırmak için MEA kaydıyla eşzamanlı Fluo-8 görüntüleme uyguladı [57]. Fluo-8, GECC'lere kıyasla daha iyi bir zamansal znrlğe sahiptir, ancak kalsiyuma duyarlı non-ratiometric bu boyalar; hücre tipine spesifik değildir, sınırlı sürelerle çalışır ve uzun ve yıpratıcı boya yükleme protokolleri gerektirir [179]. Çalışma kapsamında glutamata hedefli genetik bir işaretçi kullanıldı. Glutamat, perifer ile spinal kord arasında majör bir nörotransmitterdir [141]. Glutamaterjik nöronlarda bulunan veziküler glutamat taşıyıcıları vGLUT'ler, AKG nöronlarının, özellikle de orta ve kk nosiseptif nöronlarının daha fazla ifade ettiği bilinen vGLUT-2, çok spesifik bir hücre tipinin hedeflenmesi ve mikroskop altında görüntülenmesi için kullanılabilir [147, 180]. Geliştirilen genetik model, vGLUT-2 pozitif AKG nöronlarında, GCaMP6s ekspres etmektedir.

Daha nceki çalışmalarda kullanılan uyarı protokolleri genellikle kimyasal uygulamalarla [9, 57, 178], sıcak/soğuk gibi modalite-spesifik uyarılarla [8] veya mekanik stres ile [139] sınırlıydı. Bu çalışmada, tek hücre hassasiyetinde lokal elektriksel uyarı kullanıldı ve modaliteye özgü uygulamalardan kaçınıldı. Sonuç olarak, uyarı serilerin uygulamasıyla, herhangi bir modaliteden kaynaklanabilecek kodlanmış duyuusal sinyalleri taklit etmek amaçlandı.

Daha önceki bir çalışmada, Newberry ve meslektaşları, nöral ağlar bağlamında duyuşal nöronları incelemek için MEA plakalarında büyütölen spontan olarak aktif AKG költürleri geliştirmiştir [9]. Sonrasında, Black, MEA platformu kullanarak yaptığı AKG költürlerini inceleyerek GJ'lerden kaynaklandığını belirttiği senkronize ve korale aktivite gözlemledi [8]. Bu çalışma kapsamında glutamaterjik reseptör antagonistleri kullanılarak, nöronlar arasındaki bağlantılardan kaynaklanan yayılan aktiviteyi başarılı şekilde kesildi, bu yöntemle post-sinaptik glutamaterjik bağlantıların varlığı gösterildi. Ardından ICC metodunu kullanılarak pre-sinaptik işaretleyici sinaptofizin ile sinapsların varlığı fiziksel olarak gösterildi. Bu ardışık bulgular, ilk kez, AKG költürlerinde sinapsların bulunduğunu ve sinaptik ağların oluşumunu doğrulamıştır.

Hücre dışı elektrofizyoloji deneylerinin ilk kısmı, uyarıya verilen birincil nöronal tepkileri tanımlar. İkinci kısım, birincil ve ikincil nöronlar arasındaki temel etkileşim profillerini gösterir. Üçüncü kısım, çoklu nöronların etkileşimlerini içeren ağ özelliklerini araştırır. şekil 6'da özetlenen analizler, uyarılabilirlikteki değişiklikleri ve uyarı eşiğindeki adaptasyon göstermektedir. Ek olarak, tekrarlayan uyarımdan sonra bağlı nöron çiftlerin sayısının da arttığı bulunmuştur. Tekrarlayan uyarıların belirgin istatistiki olarak anlamlı değişikliklere neden olması, altta yatan bir sinaptik kolaylaştırma mekanizmasını düşündürmektedir [147].

Fizyolojik koşullarda gangliyon içinde AKG nöron gövdeleri sinaps yapmaz ve bu periferdeki bilgilerin MSS'ye taşınırken gerçekliğinin korunması için önemlidir [97, 131, 181, 182]. Bu çalışma költür ortamında bu sinapsların varlığını göstermektedir. Költür platformuna alındığında gangliyon yapısal bütönlüğünü enzimatik ve mekanik uygulamalar sonucu kaybeder ve AKG nöronları bağdoku ve glia katmanlarından oluşan paketlerinden açığa çıkar. Bu değişiklik, sinaps oluşumu için başlatıcı bir sinyal olabilir. Költür sisteminin bir başka özelliği ise, disosiasyon protokolünün kendisi bir hasar modeli olarak çalışmış olabilir ve hücrelerin fizyolojik profilini değiştirerek yeniden programlamış olabilir [183, 184]. Költür için gerekli olan nöronal kimyasal ve fiziksel ayırıtırma mutlaka yakın aksotomiye gerektirdiğinden, bu ayırıtırmanın diğer yaralanma formları tarafından uyarılan aynı nöronal tepkilerin bazılarını tetiklemesi şaşırtıcı olmayacaktır. Ayırıtırma kaynaklı hiper-uyarılabilirlik, genellikle

nosiseptif olan ve C-fiber iletim hızlarına sahip olan duyu nöronlarına karşılık gelen küçük AKG nöronlarında meydana geldiği gösterilmiştir [26, 185]. Zheng et.al, hem AKG nöronlarının akut ayrışmasının hem de uzun süreli CCD tedavisinin sadece AP eşliğini düşürmediğini, aynı zamanda nöronları depolarize ettiğini, tekrarlayan ateşlemeyi ve spontan aktiviteyi arttırdığını yama-kıskacı kayıt yöntemlerini kullanarak göstermişlerdir [186, 187].

Çalışma kapsamında majör olarak nöron gövdelerinde gerçekleşen kalsiyum salınımları araştırıldı. Aksonal bir GCaMP indikatörü kullanılarak aksonal kalsiyum salınımlarının gözlemlendiği bir çalışma destekleyici olabilir [173]. Ayrıca benzer bir deneysel protokol kullanılarak deneylerin in-vivo veya ex-vivo organotipik koşullarda gangliyon seviyesinde tekrarlanması faydalı olacaktır. Bu çalışma ile başka kültür sistemlerinde de kullanılabilir bir deney düzeneği geliştirilip test edildi. Kalsiyum görüntüleme sayesinde, uyarı esnasında tek hücre seviyesinde az miktarda bile olsa kalsiyum yanıtını görüntüleme fırsatı ortaya çıktı. Böylece sonuçlar primer AKG kültürlerinde, uyarılan bir nöronun diğer nöronların spontan aktivitesini modüle ettiği veya daha önce sessiz nöronları aktive ettiği sinaptik bağlantılar yoluyla yürütülen yeni bir nöron-nöron etkileşimi tipini göstermektedir. Duyusal nöronların fonksiyonel ve yapısal sinaps oluşturma ve ağ geliştirme potansiyeli, gangliyon içi nöron-nöron etkileşimlerini yeni bir bağlamda açıklayabilir [50]. Bu bulgular nöropatilerden, fibromiyalji, hayalet uzuv ağrısı immün aracılı hiperaljezi gibi periferik sinir sisteminin gizemli ağrı sendromlarına gibi bakışımıza yeni bir ışık tutabilir. [37, 188].

### **7.3. In-Vitro Nörit Transeksiyonuna SGH Hücrelerinin Akut Kalsiyum Yanıtı**

Bu çalışmada, AKG kültürlerinde nöron/glia çiftlerinin (N/G'ler) aksonal hasara yanıtı incelendi. Hasar modeli olarak fokal lazer ile nörit transeksiyonu uygulandı. Kesilen nöronun hemen sonra SGH'lerin kalsiyum yanıtı verdiği gözlemlendi. Önceki çalışmalarda, hasar sonrasında ve fizyolojik durumlarda, N/G'ler arasında çift yönlü bir iletişim gözlenmiştir [31]. SGH'lerin nöral uyarı sonrası aktif olduğu en bilinen mekanizmalar, ATP yoluyla P2R'ler aktivasyonu üzerinden [100, 106] ve konneksinler

[189-191] ve panneksinler [122, 192, 193] aracılığıyla, gangliyon içi hücrel bağlantıların yeniden düzenlenmesi yoluyla. Bu nedenle bu çalışma kapsamında aksonal hasara verilen akut yanıt, pürinerjik reseptörleri ve GJ'leri bloklayarak incelendi. Kesim alanından 180 µm'lik bir radyal mesafedeki SGH'ler, kesilen nöronla fiziksel bağlantıları olsun ya da olmasın nörit kesimine cevaben artan kalsiyum aktivitesi gösterdi. Bitişik ve ayrı duran SGH'ler antagonistlerin varlığında farklı yanıtlar verdi. GJ antagonisti CBX koneksin ve panneksinleri bloklamak için [194-196], BBG ise satellitik pürinerjik reseptör P2X7'yi bloklamak için [197, 198] kullanıldı. Kesilen nöronla fiziksel bağlantıları olan SGH'lere (SGH<sup>A</sup>) Ca<sup>2+</sup> girişi, her iki antagonistin varlığında da devam etti. Ayrı duran SGH yanıtları, kesilen nöronun bağlı bir SGH'si sahip olup olmamasına bağlı olarak önemli ölçüde değişti.

Duyusal gangliyonlardaki nöronlar in-vivo koşullarda sinaps yapmazlar, bunun yerine SGH'ler ve bağ dokusu ile birbirlerinden ayrı durmaktadırlar [31]. Bu nedenle, bu gangliyonlardaki nöronlar arasında hiçbir etkileşimin olmadığı düşünülmüştür. Bununla birlikte Devor ve Wall [53] AKG nöronlarındaki elektriksel aktivitenin komşu nöronlarda depolarizasyona neden olduğunu göstermiş ve buna çapraz depolarizasyon (cross-depolarization) adını vermiştir. Daha sonraki çalışmalar, bu etkinin tanımlanamayan kimyasal araçların salınımından kaynaklanıyor olabileceğini önermiştir [199, 200]. Sinir hasarı, SGH'lerde belirgin değişikliklere neden olur ve yaralanma bölgesi gangliyondan çok uzakta olabileceğinden, hangi nöronal sinyallerin bu değişiklikleri indüklediğini belirlemek önem kazanmıştır. Güncel çalışmalar, SGH'lerin çapraz depolarizasyona katkıda bulunduğuna ve P2R'ler ve GJ'ler yoluyla kendi aralarında ve nöronlarla kimyasal olarak etkileşime girdiklerine dair kanıtlar göstermektedir [98, 112, 128]. Hasarsız farelerde AKG üzerinde yapılan in-vivo bir kalsiyum görüntüleme çalışması, bir nörondaki elektriksel aktivitenin komşu nöronları aktive edebileceğini gösterdi. Yazarlar bu aktivasyona bağlı aktivite (coupled activation) demişlerdir [111]. Bu etki, sinir hasarı veya periferik enflamasyondan sonra büyük ölçüde artar ve SGH'lerde Cx43'ün artan ekspresyonuna bağlanmıştır. Bağlı aktivitenin, GJ blokörü CBX'in lokal veya sistemik uygulamasıyla ve ayrıca Cx43-nakavt fare modellerinde azaldığı bilinmektedir. Ayrıca ağrıya aşırı duyarlılık davranışının da CBX uygulaması ile azaldığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemler, SGH'lerdeki GJ'lerin bağlı aktiviteye ve ağrı oluşumuna önemli bir katkıda

bulduğunu göstermektedir. Bağlı aktivitenin altında yatan mekanizma tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Muhtemel bir açıklama, yaralı nöronlardaki yüksek ateşleme hızının, SGH'leri etkileyen ve onları aktive eden kimyasal araçların salınmasına neden olmasıdır [201].

Gliyal hücrelerin  $Ca^{2+}$  iletimi, MSS'de geniş bir şekilde açıklanmıştır [202].  $Ca^{2+}$  aktivitesinin yayılması, öncelikle ATP mobilizasyonu ve  $Ca^{2+}$ 'nın GJ aracılı difüzyonu yoluyla gerçekleşir (Scemes ve Giaume 2006). Duyusal gangliyonlardaki SGH'ler astrositlere benzer özellikler gösterir [97]. Kısa süreli periferik kültürler üzerinde yapılan çalışmalar, SGH'lerin, (nöronlarla birlikte) sinyallerin uzun mesafeler boyunca yaymasını sağlayan  $Ca^{2+}$  dalgalarını iletebildiğini göstermiştir [126, 127]. Bu dalgalara GJ'ler yanında kimyasal haberciler ATP ve glutamat aracılık eder.

ATP, AKG'lerde N/G ve G/G iletişimini kolaylaştıran ana moleküllerden biridir [128]. Sinir yaralanmasından sonra, SGH'lerin ATP'ye duyarlılığı artar. ATP, sinir dokusunun uyarılması veya hasarı sonrası serbest bırakılır ve bu da hasar sinyalleşmesini tetikler. [203]. ATP'nin nöron gövdesinden veziküler salınımı, P2X7 reseptörü aracılığıyla SGH'leri aktive eder ve bu da SGH'lerin hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu artırır. [204].  $Ca^{2+}$  görüntüleme çalışmaları TG kültürlerinde, enflamasyon ve hasar sonrası SGH'lerin ATP salınımına daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Artan GJ iletişiminin ve ATP'ye duyarlılığın, ağrı modellerinde [112] nöronal hipereksitabilededeki SGH'lerin rolünü, açıklamak için bir model önerilmiştir. Bu modelde, duyu nöronların hipereksitabilitesi sinir hasarı ile uyarılır. Bir nöronun aktivasyonu daha sonra diğerlerine yayılır ve nöron toplulukları içinde senkronize ve sürekli aktivite elde edilir. Artan nöronal aktivite, artan GJ ve Panx1 kanalları yoluyla ATP salınımına yol açması ve yanıtların, SGH'lerde P2R aktivasyonunun bir sonucu olarak gerçekleşen bir döngü olarak düşünülebilir. Gelişmiş P2R iletimi ile birlikte SGH'ler arasında gelişmiş GJ aracılı eşleşme, aktivasyonu diğer duyu nöronlarına yayarak, sürekli yankılanan aktiviteye ve nosiseptör olmayanların ağrı tepkisine alınmasına yol açar. Bu bulgular, SGH'lerin ganglion içinde nöronların çapraz depolarizasyonunda rol oynadığını göstermektedir [205]. Literatürde çift yönlü N/G iletişimini indüklemek için çeşitli uygulamalar yer almaktadır. Bu çalışmalara, in vitro fokal mekanik veya elektriksel uyarım [126], afferent fiber stimülasyonu [128, 131]

ve bütün-sinir kompresyonunu [206] örnek verilebilir. Bildiğimiz kadarıyla, yüksek-odaklı aksotominin SGH aktivitesine etkisinin incelenmesi, literatürde bir ilktir. Bu çalışmada, in vitro tek-nöron aksotomi modeli kullanarak nöral hasara akut SGH yanıtını araştırdık. Tek hücre düzeyinde nörit transeksiyonu, etkilenen alanı kesin olarak tek bir nöronla sınırlar ve uyarılan hücrel iletişimi daha yüksek bir çözünürlükte gösterir.

Literatürdeki P2X7 ve GJ antagonistlerinin analjezik etkisini öne süren çalışmalara benzer şekilde; çalışmamızda incelediğimiz tüm SGH'ler dikkate alındığında, antagonist uygulamasıyla SGH'ler arasındaki  $Ca^{2+}$  yayılımı azalmıştır. Bu etkiyi daha detaylı araştırmak amacıyla analiz sırasında  $SGH^A$  ve  $SGH^D$  kategorileri çalışma kapsamında ayrı ayrı incelendi.

$SGH^A$ , komşu nöron kesildiğinde kalsiyum aktivitesi gösterdi ve bu aktivite, ne GJ ne de P2X7 antagonisti ile bloke edilmedi. Bu bulgu, nöronların uyarılmasına bağlı olarak tüm SGH'lerin aktive olduğunu bildiren Saudicani'nin sonuçlarıyla uyumludur. Elektriksel ve mekanik uyarı sonucu aktive olan SGH'ler GJ antagonisti ile bloklanmamış, pürinerjik sinyalleşme ise geniş spektrumlu bir P2 reseptör antagonisti Suramin ile bloklanmıştır [126]. Suramin ve CBX arasındaki bu asimetrik sonuçları yorumlamak için ise GJ ve pürinerjik kanalların birbiriyle dönüşümlü olarak önem kazandığını tartışmışlardır.

Bu çalışma indüklenen  $SGH^D$  hem GJ hem P2X7 antagonistleri ile bloklandı. Bu grupta kesilen nöronun bağlı gliyası bulunup bulunmadığına göre analizler planlandı. Hasara uğrayan nöron çevresinde in-vivo koşulları andıracak şekilde bitişik SGH'ler olduğunda ( $Neu^w$ ),  $SGH^D$  GJ antagonisti ile bloklandı. Kesilen nöron gliyasız olduğunda ( $Neu^{w/o}$ ) her iki antagonist de  $SGH^D$  aktivitesini blokladı. Çalışma sonuçları, GJ'lerin hasar sinyalini yaymakta öncelikli bir görevi olduğunu ve konneksin ve panneksinlerle oluşan bir SGH ağının varlığını önermektedir.

Literatürde, CFA enjeksiyonu [207], LPS enjeksiyonu[208], kapsaisin uygulaması[209], tüm gangliyonun sıkıştırılması (constriction) [210], tüm sinirin tam veya kısmi kesisi [211] gibi inflamatuvar ağrı modelleri aracılığıyla hasar uygulanmıştır. Ayrıca, çalışmalar, bu uygulamalardan yaklaşık 3 gün ila 2 hafta sonra

iltihaplanma/yaralanma modellerinin etkilerini araştırmaktadır. Benzer bir çalışmada, AKG kültürlerinde kapsaisin uygulaması, SGH'lerde (8 saniyelik bir gecikmeden sonra) Ca<sup>2+</sup> olaylarına neden oldu. Kapsaisin seçici olarak TRPV1 kanalını uyarır ve SGH'lerde bu kanal bulunmaz ve satellitik Ca<sup>2+</sup> sinyali, P2X7 antagonisti A740003 aracılığıyla bloke edildiğinden, satellitik Ca sinyalinin nöronlar tarafında indüklendiği tartışılmıştır [212]. Bu alışma kapsamında, literatürde ilk kez, kronik ağrı modelleri değil spesifik aksotomi hasarı akut olarak incelendi, nöral dokunun hassaslaştırılmasına başvurulmadı ve hasar yapılırken eşzamanlı görüntüleme yapıldı. Fluo-4, her iki hücre tipinde de verimli bir şekilde biriktiğinden, hem nöral hem de glial Ca<sup>2+</sup> hareketini görselleştirmek için yeterli bir ajandır. Uygulanan yaralanma modeli, gliayı bilinmeyen şekillerde etkileyebilecek kimyasal değişiklikler gibi diğer müdahaleler olmadan nörit transeksiyonunun etkilerinin izlenmesini sağlar, böylece in-vitro nöral yaralanma sırasında akut SGH yanıtı ve N/G etkileşim mekanizmaları hakkında daha ayrıntılı sonuçlar elde edilmiştir.

AKG nöronları SGHler ve bağ dokusu ile sıkıca sarılıdır ve çevreden neredeyse izoledir. Bu yapı, SGH/Nöron iletişiminin somatik aktivite ve hasar sinyalizasyonu için kilit bir unsur olduğunu göstermektedir. Bu alışma öncelikle tek nörit transeksiyona akut SGH yanıtını araştırmaktadır. SGH'lerin nöral transeksiyona akut yanıt mekanizması, yaralanma sonrası nöral kader için önemli olabilir. Akut yanıt anlamak, ganglion düzeyinde ağrı yollarına ilişkin açıklamalarımızı geliştirebilir ve bu da periferik hasar ve ağrı çalışmalarında yeni klinik ve farmakolojik yaklaşımlara fayda sağlayacaktır.



## 8. SONUÇ

AKG nöronları periferden gelen duysal bilgilerin taşınıp aktarılması için ilk basamağı oluşturmaktadır. Bu bilgilerin gerçekliğe uygun olarak, hızlı ve efektif bir şekilde taşınması canlının hayatını devam ettirmesi için yüksek öneme sahiptir. Bazen bu sistemin detaylı şekilde anlaşılmamış aksaklıkları sonucu ağrı bozuklukları ile endike problemler görülmektedir. Bu problemler periferel nöron ve gliaların daha önce göz ardı edilmiş ağ özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir. Bu çalışma kapsamında, AKG nöronlarının in-vitro ağ özellikleri derinlemesine araştırıldı.

Çalışmanın ilk kısmında AKG nöronlarının ekim yoğunluğunun ağ aktivitesine ve buna bağlı hücre hayatiyetine (survival) olan etkileri araştırılmak istendi. Bu nedenle çeşitli ekim yoğunluğundaki kültürlerin hayatta kalımı ve aktivite oranları takip edildi. Aktivite takibi için MEA ve kalsiyum görüntüleme yöntemlerinden faydalandı. Her kültürde, hayatta kalım açısından yoğun hücreler, az yoğun olanlara göre daha avantajlıydı. Fakat benzer bir örüntüye aktivite takibinde rastlanmadı. Aktivite sonuçları daha rasgele sonuçlar verdi. Buna rağmen hayatta kalım datası literatürde ilk kez az yoğun hücrelerin hayatta kalmakta zorlandığını kantifiye etmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında AKG nöron aktivitesi detaylı şekilde incelenmek istendi ve bunun için nöral ağlar yaklaşımı kullanıldı. Nöronları aynı zamanda elektriksel olarak uyarırken kalsiyum aktivitesi GECİ aracılığıyla izlendi. Deneyle sonuçunda elektriksel olarak uyarılan AKG hücrelerinin petri kabında başka hücrelerin aktivitesini indüklediği ve modüle ettiği gözlemlendi. Bu bağlantılar sinaptik blokörlerin uygulanmasıyla susturuldu böylece in-vivo şartların aksine kültürde AKG hücrelerinin sinaps yaptığı ispatlandı. Boyama yöntemiyle sinapslar fiziksel olarak gösterildi.

Çalışmanın son aşamasında AKG nöronları arasında yayılan aktiviteye satellitik glial hücrelerin etkisi test edildi. Bu kez uyarı olarak aksonal hasar sinyalinde faydalandı. Öncelikle aksonal hasara çevrede bulunan glial hücrelerin yaygın şekilde yanıt verdiği tespit edildi. Bu yanıt genel olarak GJ'lerin ve glial pürinerjik reseptörlerin bloklanmasıyla ortadan kalkmaktaydı bu nedenle literatüre uygun olarak GJ'ler ve

ATP yoluyla yayıldığı tespit edildi. GJ bloklanması, kesilen nöronun bir gliyası olup olmamasına bakılmaksızın yayılan glial kalsiyum yanıtını engelledi. Bununla beraber pürinerjik reseptörlerin BBG ile bloklanması ancak kesilen nöronla sitoplazmik bağları olan bir SGH olmaması durumunda etkili olmaktadır. Bu bulgular sonucunda yaygın şekilde oluşan glial haberleşme ağının temelde konneksin ve panneksinlerce yönetildiği, diğer kimyasal haberleşme kanallarının ikincil derecede önemli olduğunu düşündürdü.

Tüm bu çalışmalar ve sonuçları AKG hücreleri için bu güne dek var olduğu düşünülmemeyen veya göz ardı edilen yeni bağlantı tiplerinin olabileceğini göstermektedir. PSS gangliyon seviyesinde sadece iletiyi alıp işleneceği ve cevap oluşturacak MSS'ye göndermekten daha fazlasını yapıyor olabilir. En yaygın görülen gangliyon tipi olan AKG nöronlarının bağlantıları ve duysal sinyali belli bir düzeyde kompute ettikleri düşünüldüğünde bu hücreler yeni farmakolojik ve multi-modal tedaviler için hedef doku olarak kullanılabilir.

## 9. KAYNAKLAR

1. Krames, E.S., *The role of the dorsal root ganglion in the development of neuropathic pain*. Pain Med, 2014. **15**(10): p. 1669-85.
2. Soresi, A.L., *Control of intractable pain by spinal ganglia block*. Am J Surg, 1949. **77**(1): p. 72-8.
3. Deer, T.R., et al., *A prospective study of dorsal root ganglion stimulation for the relief of chronic pain*. Neuromodulation, 2013. **16**(1): p. 67-71; discussion 71-2.
4. Deer, T.R., et al., *Dorsal root ganglion stimulation yielded higher treatment success rate for complex regional pain syndrome and causalgia at 3 and 12 months: a randomized comparative trial*. Pain, 2017. **158**(4): p. 669-681.
5. Killian, N.J., et al., *A Device for Long-Term Perfusion, Imaging, and Electrical Interfacing of Brain Tissue In vitro*. Front Neurosci, 2016. **10**: p. 135.
6. Obien, M.E., et al., *Revealing neuronal function through microelectrode array recordings*. Front Neurosci, 2014. **8**: p. 423.
7. Vassallo, A., et al., *A multi-laboratory evaluation of microelectrode array-based measurements of neural network activity for acute neurotoxicity testing*. Neurotoxicology, 2017. **60**: p. 280-292.
8. Black, B.J., et al., *Adult mouse sensory neurons on microelectrode arrays exhibit increased spontaneous and stimulus-evoked activity in the presence of interleukin-6*. J Neurophysiol, 2018. **120**(3): p. 1374-1385.
9. Newberry, K., et al., *Development of a spontaneously active dorsal root ganglia assay using multiwell multielectrode arrays*. J Neurophysiol, 2016. **115**(6): p. 3217-28.
10. Akerboom, J., et al., *Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging*. J Neurosci, 2012. **32**(40): p. 13819-40.
11. Zhao, Y., et al., *An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup>(+) indicators*. Science, 2011. **333**(6051): p. 1888-91.
12. Zariwala, H.A., et al., *A Cre-dependent GCaMP3 reporter mouse for neuronal imaging in vivo*. J Neurosci, 2012. **32**(9): p. 3131-41.
13. Colman, H. and J.W. Lichtman, *Interactions between nerve and muscle: synapse elimination at the developing neuromuscular junction*. Dev Biol, 1993. **156**(1): p. 1-10.
14. Lichtman, J.W. and H. Colman, *Synapse elimination and indelible memory*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 269-78.
15. Morin, F.O., Y. Takamura, and E. Tamiya, *Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives*. J Biosci Bioeng, 2005. **100**(2): p. 131-43.
16. Cullen, D.K., et al., *Synapse-to-neuron ratio is inversely related to neuronal density in mature neuronal cultures*. Brain Res, 2010. **1359**: p. 44-55.
17. Ivenshitz, M. and M. Segal, *Neuronal density determines network connectivity and spontaneous activity in cultured hippocampus*. J Neurophysiol, 2010. **104**(2): p. 1052-60.
18. Khazipov, R., et al., *Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero*. J Neurosci, 2001. **21**(24): p. 9770-81.
19. Minlebaev, M., Y. Ben-Ari, and R. Khazipov, *Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex in vivo*. J Neurophysiol, 2007. **97**(1): p. 692-700.
20. Wilson, J.M., A.I. Cowan, and R.M. Brownstone, *Heterogeneous electrotonic coupling and synchronization of rhythmic bursting activity in mouse Hb9 interneurons*. J Neurophysiol, 2007. **98**(4): p. 2370-81.

21. Feinerman, O., M. Segal, and E. Moses, *Identification and dynamics of spontaneous burst initiation zones in unidimensional neuronal cultures*. *J Neurophysiol*, 2007. **97**(4): p. 2937-48.
22. Corredor, R.G. and J.L. Goldberg, *Electrical activity enhances neuronal survival and regeneration*. *J Neural Eng*, 2009. **6**(5): p. 055001.
23. Goldberg, J.L., *Role of electrical activity in promoting neural repair*. *Neurosci Lett*, 2012. **519**(2): p. 134-7.
24. Tien, N.W. and D. Kerschensteiner, *Homeostatic plasticity in neural development*. *Neural Dev*, 2018. **13**(1): p. 9.
25. Devor, M., *Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion*. *Pain*, 1999. **Suppl 6**: p. S27-35.
26. Ma, C. and R.H. LaMotte, *Multiple sites for generation of ectopic spontaneous activity in neurons of the chronically compressed dorsal root ganglion*. *J Neurosci*, 2007. **27**(51): p. 14059-68.
27. Huang, T.Y. and M. Hanani, *Morphological and electrophysiological changes in mouse dorsal root ganglia after partial colonic obstruction*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **289**(4): p. G670-8.
28. Gemes, G., et al., *Failure of action potential propagation in sensory neurons: mechanisms and loss of afferent filtering in C-type units after painful nerve injury*. *J Physiol*, 2013. **591**(4): p. 1111-31.
29. Miller, K.E., V.D. Douglas, and T. Kaneko, *Glutaminase immunoreactive neurons in the rat dorsal root ganglion contain calcitonin gene-related peptide (CGRP)*. *Neurosci Lett*, 1993. **160**(1): p. 113-6.
30. Oliveira, A.L., et al., *Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia*. *Synapse*, 2003. **50**(2): p. 117-29.
31. Ennio, P., *Biology and Pathology of Perineuronal Satellite Cells in Sensory Ganglia*. 2018: Springer.
32. Blum, E., et al., *Systemic inflammation alters satellite glial cell function and structure. A possible contribution to pain*. *Neuroscience*, 2014. **274**: p. 209-17.
33. Sheng, S.R., et al., *Anatomy of large animal spines and its comparison to the human spine: a systematic review*. *Eur Spine J*, 2010. **19**(1): p. 46-56.
34. Brierley, J.B., *The penetration of particulate matter from the cerebrospinal fluid into the spinal ganglia, peripheral nerves, and perivascular spaces of the central nervous system*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1950. **13**(3): p. 203-15.
35. Haberberger, R.V., et al., *Human Dorsal Root Ganglia*. *Front Cell Neurosci*, 2019. **13**: p. 271.
36. Hu, P. and E.M. McLachlan, *Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat*. *Neuroscience*, 2002. **112**(1): p. 23-38.
37. Esposito, M.F., et al., *Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation*. *Pain Med*, 2019. **20**(Suppl 1): p. S23-S30.
38. Dun, F.T., *The delay and blockage of sensory impulses in the dorsal root ganglion*. *J Physiol*, 1955. **127**(2): p. 252-64.
39. Ito, M. and M. Saiga, *The mode of impulse conduction through the spinal ganglion*. *Jpn J Physiol*, 1959. **9**(1): p. 33-42.
40. Luscher, C., et al., *Action potential propagation through embryonic dorsal root ganglion cells in culture. II. Decrease of conduction reliability during repetitive stimulation*. *J Neurophysiol*, 1994. **72**(2): p. 634-43.
41. Luscher, C., et al., *Action potential propagation through embryonic dorsal root ganglion cells in culture. I. Influence of the cell morphology on propagation properties*. *J Neurophysiol*, 1994. **72**(2): p. 622-33.

42. Zhou, L. and S.Y. Chiu, *Computer model for action potential propagation through branch point in myelinated nerves*. J Neurophysiol, 2001. **85**(1): p. 197-210.
43. Ha, H., *Axonal bifurcation in the dorsal root ganglion of the cat: a light and electron microscopic study*. J Comp Neurol, 1970. **140**(2): p. 227-40.
44. Spencer, P.S., C.S. Raine, and H. Wisniewski, *Axon diameter and myelin thickness. Unusual relationships in dorsal root ganglia*. Anat Rec, 1973. **176**(2): p. 225-43.
45. Wall, P.D. and M. Devor, *Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats*. Pain, 1983. **17**(4): p. 321-339.
46. Burchiel, K.J., *Effects of electrical and mechanical stimulation on two foci of spontaneous activity which develop in primary afferent neurons after peripheral axotomy*. Pain, 1984. **18**(3): p. 249-265.
47. Kajander, K.C., S. Wakisaka, and G.J. Bennett, *Spontaneous discharge originates in the dorsal root ganglion at the onset of a painful peripheral neuropathy in the rat*. Neurosci Lett, 1992. **138**(2): p. 225-8.
48. Wang, W., et al., *Are voltage-gated sodium channels on the dorsal root ganglion involved in the development of neuropathic pain?* Mol Pain, 2011. **7**: p. 16.
49. Angevine, J.B. and C. Cotman, *Principles of neuroanatomy*. 1981, New York; Oxford: Oxford University Press.
50. Devor, M., *Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion*. Pain, 1999. **Suppl 6**: p. S27-S35.
51. Znaor, L., et al., *Association of neural inflammation with hyperalgesia following spinal nerve ligation*. Croat Med J, 2007. **48**(1): p. 35-42.
52. Wood, J., *The Oxford handbook of the neurobiology of pain*. 2020.
53. Devor, M. and P.D. Wall, *Cross-excitation in dorsal root ganglia of nerve-injured and intact rats*. J Neurophysiol, 1990. **64**(6): p. 1733-46.
54. Utzschneider, D., J. Kocsis, and M. Devor, *Mutual excitation among dorsal root ganglion neurons in the rat*. Neurosci Lett, 1992. **146**(1): p. 53-6.
55. Anand, U., et al., *Glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) expression by nerve fibres in inflammatory bowel disease and functional effects in cultured neurons*. PLoS One, 2018. **13**(5): p. e0198024.
56. Desormeaux, C., et al., *Protease-activated receptor 1 is implicated in irritable bowel syndrome mediators-induced signaling to thoracic human sensory neurons*. Pain, 2018. **159**(7): p. 1257-1267.
57. Enright, H.A., et al., *Long-term non-invasive interrogation of human dorsal root ganglion neuronal cultures on an integrated microfluidic multielectrode array platform*. Analyst, 2016. **141**(18): p. 5346-57.
58. Rostock, C., et al., *Human vs. Mouse Nociceptors - Similarities and Differences*. Neuroscience, 2018. **387**: p. 13-27.
59. Bae, J.Y., et al., *Quantitative analysis of afferents expressing substance P, calcitonin gene-related peptide, isolectin B4, neurofilament 200, and Peripherin in the sensory root of the rat trigeminal ganglion*. J Comp Neurol, 2015. **523**(1): p. 126-38.
60. Badea, T.C., et al., *Combinatorial expression of Brn3 transcription factors in somatosensory neurons: genetic and morphologic analysis*. J Neurosci, 2012. **32**(3): p. 995-1007.
61. Duan, W., et al., *Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(3): p. 1637-1647.
62. Waxman, S.G. and G.W. Zamponi, *Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets*. Nat Neurosci, 2014. **17**(2): p. 153-63.
63. Devor, M., *Ectopic discharge in Abeta afferents as a source of neuropathic pain*. Exp Brain Res, 2009. **196**(1): p. 115-28.
64. Wu, G., et al., *Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers*. J Neurosci, 2001. **21**(8): p. RC140.

65. Reichling, D.B. and J.D. Levine, *Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain*. Trends Neurosci, 2009. **32**(12): p. 611-8.
66. Dib-Hajj, S.D., P. Geha, and S.G. Waxman, *Sodium channels in pain disorders: pathophysiology and prospects for treatment*. Pain, 2017. **158 Suppl 1**: p. S97-S107.
67. Namer, B., et al., *Specific changes in conduction velocity recovery cycles of single nociceptors in a patient with erythromelalgia with the I848T gain-of-function mutation of Nav1.7*. Pain, 2015. **156**(9): p. 1637-1646.
68. Coward, K., et al., *Plasticity of TTX-sensitive sodium channels PN1 and brain III in injured human nerves*. Neuroreport, 2001. **12**(3): p. 495-500.
69. Coward, K., et al., *Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states*. Pain, 2000. **85**(1-2): p. 41-50.
70. Li, Y., et al., *DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain*. J Neurosci, 2018. **38**(5): p. 1124-1136.
71. Caffrey, J.M., et al., *Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons*. Brain Res, 1992. **592**(1-2): p. 283-97.
72. Kostyuk, P.G., N.S. Veselovsky, and A.Y. Tsyndrenko, *Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents*. Neuroscience, 1981. **6**(12): p. 2423-30.
73. Lacinova, L., *Voltage-dependent calcium channels*. Gen Physiol Biophys, 2005. **24 Suppl 1**: p. 1-78.
74. Park, J. and Z.D. Luo, *Calcium channel functions in pain processing*. Channels (Austin), 2010. **4**(6): p. 510-7.
75. Catterall, W.A., et al., *International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 411-25.
76. Li, W., et al., *Characterization of voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat dorsal root ganglion neurons*. J Cell Physiol, 2007. **212**(2): p. 348-57.
77. Pagadala, P., et al., *Loss of NR1 subunit of NMDARs in primary sensory neurons leads to hyperexcitability and pain hypersensitivity: involvement of Ca(2+)-activated small conductance potassium channels*. J Neurosci, 2013. **33**(33): p. 13425-30.
78. Boettger, M.K., et al., *Calcium-activated potassium channel SK1- and IK1-like immunoreactivity in injured human sensory neurones and its regulation by neurotrophic factors*. Brain, 2002. **125**(Pt 2): p. 252-63.
79. Hille, B., *Ion channels of excitable membranes*. 2007, Sunderland, Mass.: Sinauer.
80. Mo, G., et al., *Subtype-specific regulation of P2X3 and P2X2/3 receptors by phosphoinositides in peripheral nociceptors*. Mol Pain, 2009. **5**: p. 47.
81. Suh, Y.G. and U. Oh, *Activation and activators of TRPV1 and their pharmaceutical implication*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(21): p. 2687-98.
82. Simone, D.A., T.K. Baumann, and R.H. LaMotte, *Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin*. Pain, 1989. **38**(1): p. 99-107.
83. Anand, P. and K. Bley, *Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch*. Br J Anaesth, 2011. **107**(4): p. 490-502.
84. Chen, J. and D.H. Hackos, *TRPA1 as a drug target--promise and challenges*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2015. **388**(4): p. 451-63.
85. Liu, C.N., et al., *Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury*. Pain, 2000. **85**(3): p. 503-521.
86. Hanani, M., *Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **48**(3): p. 457-76.

87. Sapunar, D., et al., *Dorsal root ganglion - a potential new therapeutic target for neuropathic pain*. J Pain Res, 2012. **5**: p. 31-8.
88. Guha, D. and M.F. Shamji, *The Dorsal Root Ganglion in the Pathogenesis of Chronic Neuropathic Pain*. Neurosurgery, 2016. **63 Suppl 1**: p. 118-126.
89. Huang, T.Y., V. Belzer, and M. Hanani, *Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain*. Eur J Pain, 2010. **14**(1): p. 49 e1-11.
90. Vaso, A., et al., *Peripheral nervous system origin of phantom limb pain*. Pain, 2014. **155**(7): p. 1384-1391.
91. Amir, R., M. Michaelis, and M. Devor, *Membrane potential oscillations in dorsal root ganglion neurons: role in normal electrogenesis and neuropathic pain*. J Neurosci, 1999. **19**(19): p. 8589-96.
92. Devor, M., W. Janig, and M. Michaelis, *Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats*. J Neurophysiol, 1994. **71**(1): p. 38-47.
93. Puigdemivoll-Sanchez, A., et al., *Sciatic and femoral nerve sensory neurones occupy different regions of the L4 dorsal root ganglion in the adult rat*. Neurosci Lett, 1998. **251**(3): p. 169-72.
94. Kovalsky, Y., R. Amir, and M. Devor, *Simulation in sensory neurons reveals a key role for delayed Na<sup>+</sup> current in subthreshold oscillations and ectopic discharge: implications for neuropathic pain*. J Neurophysiol, 2009. **102**(3): p. 1430-42.
95. Liem, L. and N. Mekhail, *Management of Postherniorrhaphy Chronic Neuropathic Groin Pain: A Role for Dorsal Root Ganglion Stimulation*. Pain Pract, 2016. **16**(7): p. 915-23.
96. Liem, L., et al., *The Dorsal Root Ganglion as a Therapeutic Target for Chronic Pain*. Reg Anesth Pain Med, 2016. **41**(4): p. 511-9.
97. Huang, L.Y., Y. Gu, and Y. Chen, *Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia*. Glia, 2013. **61**(10): p. 1571-81.
98. Rozanski, G.M., Q. Li, and E.F. Stanley, *Transglial transmission at the dorsal root ganglion sandwich synapse: glial cell to postsynaptic neuron communication*. Eur J Neurosci, 2013. **37**(8): p. 1221-8.
99. Ji, R.R., C.R. Donnelly, and M. Nedergaard, *Astrocytes in chronic pain and itch*. Nat Rev Neurosci, 2019. **20**(11): p. 667-685.
100. Burnstock, G., *Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 659-797.
101. Fields, R.D. and G. Burnstock, *Purinergic signalling in neuron-glia interactions*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(6): p. 423-36.
102. Kettenmann, H. and A. Verkhratsky, *[Neuroglia--living nerve glue]*. Fortschr Neurol Psychiatr, 2011. **79**(10): p. 588-97.
103. Woodham, P., et al., *Satellite cells surrounding axotomised rat dorsal root ganglion cells increase expression of a GFAP-like protein*. Neurosci Lett, 1989. **98**(1): p. 8-12.
104. Tang, X., et al., *Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 is responsible for the native inward potassium conductance of satellite glial cells in sensory ganglia*. Neuroscience, 2010. **166**(2): p. 397-407.
105. Vit, J.P., et al., *Silencing the Kir4.1 potassium channel subunit in satellite glial cells of the rat trigeminal ganglion results in pain-like behavior in the absence of nerve injury*. J Neurosci, 2008. **28**(16): p. 4161-71.
106. Kushnir, R., P.S. Cherkas, and M. Hanani, *Peripheral inflammation upregulates P2X receptor expression in satellite glial cells of mouse trigeminal ganglia: a calcium imaging study*. Neuropharmacology, 2011. **61**(4): p. 739-46.
107. Takeda, M., M. Takahashi, and S. Matsumoto, *Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain*. Neurosci Biobehav Rev, 2009. **33**(6): p. 784-92.

108. Cherkas, P.S., et al., *The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion*. Pain, 2004. **110**(1-2): p. 290-8.
109. Lee-Kubli, C.A., et al., *Analysis of the behavioral, cellular and molecular characteristics of pain in severe rodent spinal cord injury*. Exp Neurol, 2016. **278**: p. 91-104.
110. Procacci, P., V. Magnaghi, and E. Pannese, *Perineuronal satellite cells in mouse spinal ganglia express the gap junction protein connexin43 throughout life with decline in old age*. Brain Res Bull, 2008. **75**(5): p. 562-9.
111. Kim, Y.S., et al., *Coupled Activation of Primary Sensory Neurons Contributes to Chronic Pain*. Neuron, 2016. **91**(5): p. 1085-1096.
112. Spray, D.C. and M. Hanani, *Gap junctions, pannexins and pain*. Neurosci Lett, 2019. **695**: p. 46-52.
113. Garrett, F.G. and P.L. Durham, *Differential expression of connexins in trigeminal ganglion neurons and satellite glial cells in response to chronic or acute joint inflammation*. Neuron Glia Biol, 2008. **4**(4): p. 295-306.
114. Hanani, M., et al., *Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage*. Neuroscience, 2002. **114**(2): p. 279-83.
115. Dublin, P. and M. Hanani, *Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain*. Brain Behav Immun, 2007. **21**(5): p. 592-8.
116. Warwick, R.A. and M. Hanani, *The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain*. Eur J Pain, 2013. **17**(4): p. 571-80.
117. Ledda, M., et al., *Augmentation in gap junction-mediated cell coupling in dorsal root ganglia following sciatic nerve neuritis in the mouse*. Neuroscience, 2009. **164**(4): p. 1538-45.
118. Pannese, E., et al., *Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths*. Anat Embryol (Berl), 2003. **206**(5): p. 337-47.
119. Durham, P.L. and F.G. Garrett, *Neurological mechanisms of migraine: potential of the gap-junction modulator tonabersat in prevention of migraine*. Cephalalgia, 2009. **29 Suppl 2**: p. 1-6.
120. Dahl, G., F. Qiu, and J. Wang, *The bizarre pharmacology of the ATP release channel pannexin1*. Neuropharmacology, 2013. **75**: p. 583-93.
121. Sosinsky, G.E., et al., *Pannexin channels are not gap junction hemichannels*. Channels (Austin), 2011. **5**(3): p. 193-7.
122. Zhang, Y., et al., *Pannexin-1 Up-regulation in the Dorsal Root Ganglion Contributes to Neuropathic Pain Development*. J Biol Chem, 2015. **290**(23): p. 14647-55.
123. Magni, G., D. Riccio, and S. Ceruti, *Tackling Chronic Pain and Inflammation through the Purinergic System*. Curr Med Chem, 2018. **25**(32): p. 3830-3865.
124. Braun, N., et al., *Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system*. Glia, 2004. **45**(2): p. 124-32.
125. Weick, M., et al., *P2 receptors in satellite glial cells in trigeminal ganglia of mice*. Neuroscience, 2003. **120**(4): p. 969-77.
126. Suadicani, S.O., et al., *Bidirectional calcium signaling between satellite glial cells and neurons in cultured mouse trigeminal ganglia*. Neuron Glia Biol, 2010. **6**(1): p. 43-51.
127. Warwick, R.A. and M. Hanani, *Involvement of aberrant calcium signalling in herpetic neuralgia*. Exp Neurol, 2016. **277**: p. 10-18.
128. Zhang, X., et al., *Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(23): p. 9864-9.



129. Retamal, M.A., et al., *Connexin43 Hemichannels in Satellite Glial Cells, Can They Influence Sensory Neuron Activity?* Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 374.
130. Ji, R.R., T. Berta, and M. Nedergaard, *Glia and pain: is chronic pain a gliopathy?* Pain, 2013. **154 Suppl 1**: p. S10-28.
131. Gu, Y., et al., *Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors.* Neuron Glia Biol, 2010. **6**(1): p. 53-62.
132. Magni, G. and S. Ceruti, *P2Y purinergic receptors: new targets for analgesic and antimigraine drugs.* Biochem Pharmacol, 2013. **85**(4): p. 466-77.
133. Gross, G.W., W.Y. Wen, and J.W. Lin, *Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures.* J Neurosci Methods, 1985. **15**(3): p. 243-52.
134. Mahmud, M., et al., *QSpice tools: a generic framework for parallel batch preprocessing of extracellular neuronal signals recorded by substrate microelectrode arrays.* Front Neuroinform, 2014. **8**: p. 26.
135. Gross, G.W., et al., *Stimulation of monolayer networks in culture through thin-film indium-tin oxide recording electrodes.* J Neurosci Methods, 1993. **50**(2): p. 131-43.
136. Wagenaar, D.A., J. Pine, and S.M. Potter, *Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays.* J Neurosci Methods, 2004. **138**(1-2): p. 27-37.
137. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.* Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
138. Chisholm, K.I., et al., *Large Scale In Vivo Recording of Sensory Neuron Activity with GCaMP6.* eNeuro, 2018. **5**(1).
139. Emery, E.C., et al., *In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP.* Sci Adv, 2016. **2**(11): p. e1600990.
140. Johnstone, A.F., et al., *Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century.* Neurotoxicology, 2010. **31**(4): p. 331-50.
141. Li, P., A.A. Calejesan, and M. Zhuo, *ATP P2x receptors and sensory synaptic transmission between primary afferent fibers and spinal dorsal horn neurons in rats.* J Neurophysiol, 1998. **80**(6): p. 3356-60.
142. Harris, K.D., et al., *Improving data quality in neuronal population recordings.* Nat Neurosci, 2016. **19**(9): p. 1165-74.
143. Jang, M.J. and Y. Nam, *NeuroCa: integrated framework for systematic analysis of spatiotemporal neuronal activity patterns from large-scale optical recording data.* Neurophotonics, 2015. **2**(3): p. 035003.
144. Mormann, F., et al., *Mean phase coherence as a measure for phase synchronization and its application to the EEG of epilepsy patients.* Vol. 144. 2000. 358-369.
145. Spray, D.C., R. Rozental, and M. Srinivas, *Prospects for rational development of pharmacological gap junction channel blockers.* Curr Drug Targets, 2002. **3**(6): p. 455-64.
146. Jiang, L.H., et al., *Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors.* Mol Pharmacol, 2000. **58**(1): p. 82-8.
147. Fernandez-Montoya, J., C. Avendano, and P. Negredo, *The Glutamatergic System in Primary Somatosensory Neurons and Its Involvement in Sensory Input-Dependent Plasticity.* Int J Mol Sci, 2017. **19**(1).
148. Lipton, S.A., *Blockade of electrical activity promotes the death of mammalian retinal ganglion cells in culture.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(24): p. 9774-8.
149. Goldberg, J.L., et al., *Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity.* Neuron, 2002. **33**(5): p. 689-702.
150. Heck, N., et al., *Activity-dependent regulation of neuronal apoptosis in neonatal mouse cerebral cortex.* Cereb Cortex, 2008. **18**(6): p. 1335-49.

151. Scott, B.S. and K.C. Fisher, *Potassium concentration and number of neurons in cultures of dissociated ganglia*. Exp Neurol, 1970. **27**(1): p. 16-22.
152. Franklin, J.L. and E.M. Johnson, Jr., *Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium*. Trends Neurosci, 1992. **15**(12): p. 501-8.
153. Chiappalone, M., et al., *Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development*. Brain Res, 2006. **1093**(1): p. 41-53.
154. Wagenaar, D.A., J. Pine, and S.M. Potter, *An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures*. BMC Neurosci, 2006. **7**: p. 11.
155. Previtara, M.L., C.G. Langhammer, and B.L. Firestein, *Effects of substrate stiffness and cell density on primary hippocampal cultures*. J Biosci Bioeng, 2010. **110**(4): p. 459-70.
156. Cohen, E., et al., *Determinants of spontaneous activity in networks of cultured hippocampus*. Brain Res, 2008. **1235**: p. 21-30.
157. Liu, G. and R.W. Tsien, *Synaptic transmission at single visualized hippocampal boutons*. Neuropharmacology, 1995. **34**(11): p. 1407-21.
158. Gu, X. and N.C. Spitzer, *Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 784-7.
159. Komuro, H. and P. Rakic, *Intracellular Ca<sup>2+</sup> fluctuations modulate the rate of neuronal migration*. Neuron, 1996. **17**(2): p. 275-85.
160. Engel, A.K., et al., *Temporal coding in the visual cortex: new vistas on integration in the nervous system*. Trends Neurosci, 1992. **15**(6): p. 218-26.
161. Papa, M. and M. Segal, *Morphological plasticity in dendritic spines of cultured hippocampal neurons*. Neuroscience, 1996. **71**(4): p. 1005-11.
162. Shahaf, G. and S. Marom, *Learning in networks of cortical neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(22): p. 8782-8.
163. Kistler, W.M., *Stability properties of solitary waves and periodic wave trains in a two-dimensional network of spiking neurons*. Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics, 2000. **62**(6 Pt B): p. 8834-7.
164. Buonomano, D.V., *Timing of neural responses in cortical organotypic slices*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4897-902.
165. Beggs, J.M. and D. Plenz, *Neuronal avalanches are diverse and precise activity patterns that are stable for many hours in cortical slice cultures*. J Neurosci, 2004. **24**(22): p. 5216-29.
166. Xie, W., et al., *Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger*. Pain, 2005. **116**(3): p. 243-256.
167. Djouhri, L., et al., *Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors*. J Neurosci, 2006. **26**(4): p. 1281-92.
168. Weng, X., et al., *Chronic inflammatory pain is associated with increased excitability and hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in C- but not Adelta-nociceptors*. Pain, 2012. **153**(4): p. 900-914.
169. Djouhri, L., et al., *Persistent hindlimb inflammation induces changes in activation properties of hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in rat C-fiber nociceptors in vivo*. Neuroscience, 2015. **301**: p. 121-33.
170. Kayano, T., et al., *Chronic NGF treatment induces somatic hyperexcitability in cultured dorsal root ganglion neurons of the rat*. Biomed Res, 2013. **34**(6): p. 329-42.
171. Kitamura, N., et al., *Nerve growth factor-induced hyperexcitability of rat sensory neuron in culture*. Biomed Res, 2005. **26**(3): p. 123-30.
172. Herzberg, U., et al., *NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve*. Neuroreport, 1997. **8**(7): p. 1613-8.

173. Broussard, G.J., et al., *In vivo measurement of afferent activity with axon-specific calcium imaging*. Nat Neurosci, 2018. **21**(9): p. 1272-1280.
174. Brewer, G.J., et al., *Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination*. J Neurosci Res, 1993. **35**(5): p. 567-76.
175. Gavazzi, I., et al., *Growth responses of different subpopulations of adult sensory neurons to neurotrophic factors in vitro*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(10): p. 3405-14.
176. Tanaka, K., et al., *Effect of nerve growth factor on delayed neuronal death after cerebral ischaemia*. Acta Neurochir (Wien), 1994. **129**(1-2): p. 64-71.
177. Cheng, C.F., et al., *Nerve growth factor-induced synapse-like structures in contralateral sensory ganglia contribute to chronic mirror-image pain*. Pain, 2015. **156**(11): p. 2295-309.
178. Wainger, B.J., et al., *Modeling pain in vitro using nociceptor neurons reprogrammed from fibroblasts*. Nat Neurosci, 2015. **18**(1): p. 17-24.
179. Lock, J.T., I. Parker, and I.F. Smith, *A comparison of fluorescent Ca(2)(+) indicators for imaging local Ca(2)(+) signals in cultured cells*. Cell Calcium, 2015. **58**(6): p. 638-48.
180. Malet, M., et al., *Transcript expression of vesicular glutamate transporters in lumbar dorsal root ganglia and the spinal cord of mice - effects of peripheral axotomy or hindpaw inflammation*. Neuroscience, 2013. **248**: p. 95-111.
181. Amir, R. and M. Devor, *Electrical excitability of the soma of sensory neurons is required for spike invasion of the soma, but not for through-conduction*. Biophys J, 2003. **84**(4): p. 2181-91.
182. Pannese, E., *The satellite cells of the sensory ganglia*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 1981. **65**: p. 1-111.
183. Garriga, J., et al., *Nerve Injury-Induced Chronic Pain Is Associated with Persistent DNA Methylation Reprogramming in Dorsal Root Ganglion*. J Neurosci, 2018. **38**(27): p. 6090-6101.
184. Renthal, W., et al., *Transcriptional Reprogramming of Distinct Peripheral Sensory Neuron Subtypes after Axonal Injury*. Neuron, 2020. **108**(1): p. 128-144 e9.
185. Zhang, J.M., X.J. Song, and R.H. LaMotte, *Enhanced excitability of sensory neurons in rats with cutaneous hyperalgesia produced by chronic compression of the dorsal root ganglion*. J Neurophysiol, 1999. **82**(6): p. 3359-66.
186. LaMotte, R.H., *Acutely dissociated sensory neurons: normal or neuropathic? Focus on: "Dissociation of dorsal root ganglion neurons induces hyperexcitability that is maintained by increased responsiveness to cAMP and cGMP"*. J Neurophysiol, 2007. **97**(1): p. 1-2.
187. Zheng, J.H., E.T. Walters, and X.J. Song, *Dissociation of dorsal root ganglion neurons induces hyperexcitability that is maintained by increased responsiveness to cAMP and cGMP*. J Neurophysiol, 2007. **97**(1): p. 15-25.
188. Martinez-Lavin, M., *Dorsal root ganglia: fibromyalgia pain factory?* Clin Rheumatol, 2021.
189. Lloyd, S.A., et al., *Evidence for the role of connexin 43-mediated intercellular communication in the process of intracortical bone resorption via osteocytic osteolysis*. BMC Musculoskelet Disord, 2014. **15**: p. 122.
190. Kaji, K., et al., *Connexin 43 contributes to ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury*. Mol Pain, 2016. **12**.
191. Ohara, P.T., et al., *Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo*. J Neurophysiol, 2008. **100**(6): p. 3064-73.
192. Feldman-Goriachnik, R., V. Belzer, and M. Hanani, *Systemic inflammation activates satellite glial cells in the mouse nodose ganglion and alters their functions*. Glia, 2015. **63**(11): p. 2121-2132.

193. Hanstein, R., et al., *Glial pannexin1 contributes to tactile hypersensitivity in a mouse model of orofacial pain*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 38266.
194. Bai, D. and J.C. Sáez, *GAP JUNCTION CHANNELS AND HEMICHANNELS*. 2021, [S.l.]: CRC PRESS.
195. Michalski, K. and T. Kawate, *Carbenoxolone inhibits Pannexin1 channels through interactions in the first extracellular loop*. *J Gen Physiol*, 2016. **147**(2): p. 165-74.
196. Hanani, M. and D.C. Spray, *Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction*. *Nat Rev Neurosci*, 2020. **21**(9): p. 485-498.
197. Anderson, C.M. and M. Nedergaard, *Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons*. *Trends Neurosci*, 2006. **29**(5): p. 257-62.
198. Taylor, J.M. and Z. Han, *Purinergic receptor functionality is necessary for infection of human hepatocytes by hepatitis delta virus and hepatitis B virus*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15784.
199. Liu, C.N., R. Amir, and M. Devor, *Effect of age and nerve injury on cross-excitation among sensory neurons in rat dorsal root ganglia*. *Neurosci Lett*, 1999. **259**(2): p. 95-8.
200. Oh, E.J. and D. Weinreich, *Chemical communication between vagal afferent somata in nodose Ganglia of the rat and the Guinea pig in vitro*. *J Neurophysiol*, 2002. **87**(6): p. 2801-7.
201. Xie, W., J.A. Strong, and J.M. Zhang, *Early blockade of injured primary sensory afferents reduces glial cell activation in two rat neuropathic pain models*. *Neuroscience*, 2009. **160**(4): p. 847-57.
202. Fujii, Y., S. Maekawa, and M. Morita, *Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13115.
203. Bo, X., *Is ATP a key player in conditioning neurons to support axonal regeneration?* *Neural Regen Res*, 2018. **13**(12): p. 2077-2079.
204. Fields, R.D., *Nonsynaptic and nonvesicular ATP release from neurons and relevance to neuron-glia signaling*. *Semin Cell Dev Biol*, 2011. **22**(2): p. 214-9.
205. Amir, R. and M. Devor, *Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia*. *J Neurosci*, 1996. **16**(15): p. 4733-41.
206. Zhang, H., et al., *Altered functional properties of satellite glial cells in compressed spinal ganglia*. *Glia*, 2009. **57**(15): p. 1588-99.
207. Iadarola, M.J., et al., *Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding*. *Pain*, 1988. **35**(3): p. 313-26.
208. Ydens, E., et al., *Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response*. *J Neuroinflammation*, 2012. **9**: p. 176.
209. Caterina, M.J., et al., *Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor*. *Science*, 2000. **288**(5464): p. 306-13.
210. Bennett, G.J. and Y.K. Xie, *A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man*. *Pain*, 1988. **33**(1): p. 87-107.
211. Malmberg, A.B. and A.I. Basbaum, *Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates*. *Pain*, 1998. **76**(1-2): p. 215-22.
212. Lemes, J.B.P., et al., *Participation of satellite glial cells of the dorsal root ganglia in acute nociception*. *Neurosci Lett*, 2018. **676**: p. 8-12.
213. Fath, T., et al., *Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(1): p. 78-85.

## 10. EKLER

### Hipokampal kültürlerde, ekim yoğunluğuna bağlı aktivitenin hayatta kalmaya etkisinin araştırılması

AKG hücrelerinin spontan aktivitesi düşüktür ve çok anlaşılmayan bir konudur. Bu nedenle deney yönteminin ve bulguların sağlığının test edilebilmesi için benzer deney düzeneği MSS hücreleri olan hipokampal hücrelerle test edilmiştir. Metot ve sonuçlar aşağıda görülecektir.

#### 10.1. Vasatların Hazırlanması

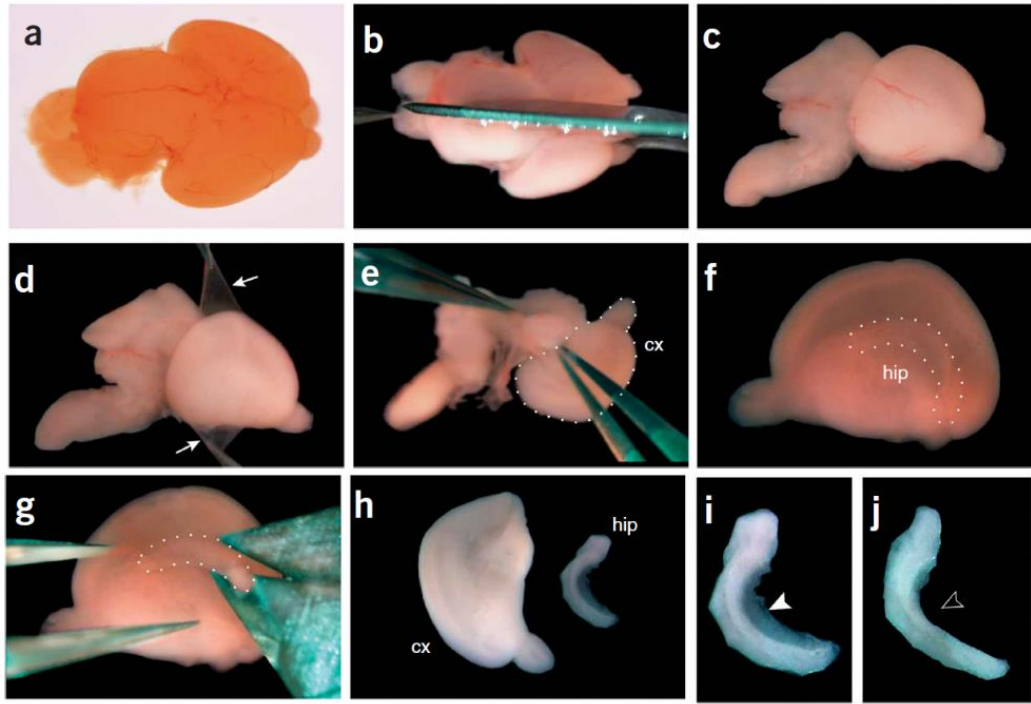
Vasatlar kültür ve vasat değiştirme öncesinde taze olarak hazırlandı. Hücre vasatı değiştirilmeden önce hazırlanan taze vasat etüvde 37°C'ye getirildi. Vasatların içeriğine tablo 10.1.1'de görülebilir.

**Tablo 10.1.1:** Hipokampus kültürleri için diseksiyon, kültür ve yaşam vasatları bileşenleri

Diseksiyon vasatı		Kültür vasatı		Yaşam Vasatı	
Hibernat-A	%1 Antibiyotik	L15	%1 Antibiyotik	Neurobasal A	%1 Antibiyotik
	%1 GlutaMAX		%1 GlutaMAX		%1 GlutaMAX
			%2 B27		%2 B27
					%5 Horse Serum

#### 10.2. Yeni Doğan Hipokampus Diseksiyonu

Postnatal 0-3 günlük Balb/c fareler dekapitasyon ile sakrifiye edilerek hızlı bir şekilde kafatası açıldı. Tüm beyin çıkarılarak soğuk tabla içindeki diseksiyon vasatına alındı. 0,5X stereo mikroskop altında [213]'de anlatıldığı şekilde disekte edildi (Şekil 10.2.1). Beyin zarlari dikkatli bir şekilde soyularak kültür aşamasına geçildi.



**Şekil 10.2.1:** Hipokampus diseksiyonu.

Yenidoğan 0-2 günlük hayvandan tüm beyin çıkarıldı. Hemisferler birbirinden korpus kallozum hizasında kesilerek ayrıldı. Zarlar ve görünen damarlar temizlenerek korteks diğer beyin parçalarından ayrıldı. İç yüzeyinde surları belli olan hiponalmüs kesilerek çıkarıldı. [213]

### 10.3. Yeni Doğan Hipokampal Hücrelerin Elde Edilmesi

- Her bir hipokampus enzim çözeltisine alındı (Papain, 18U/ml, kültür vasatı içinde)
- 45 dakika +4°C’de, laboratuvarımızda üretilen 50 Hz’lik yatay ajitatör üstünde inkübe edildi.
- Cam pastör pipetlerinin uçları alev ile yumuşatıldı ve 2 ayrı çapta (geniş ve dar) olacak şekilde inceltildi.
- Papain ortamdayken dokulara DNase eklendi (50 lg/mL)
- Enzim solüsyonu içindeki dokular önce cam pipetlerde sonra 26G insülin iğnesinden geçirilerek nazikçe triture edildi

- Hücre süspansiyonu 5 ml enzim durdurma solüsyonu içine alındı (%10'luk FBS, kültür vasatı içinde)
- 800 RPM'de 3 dakika santrifüjlendi.
- Pellet yaşam vasatı içinde istenen konsantrasyonda seyreltilerek ekime hazır hale getirildi.
- Sayım için örnek alınarak REMER hücre kültürü laboratuvarında bulunan Muse Cell Counter aracılığıyla sayım yapıldı.

#### 10.4. Yeni Doğan Hipokampal Hücrelerin Ekimi

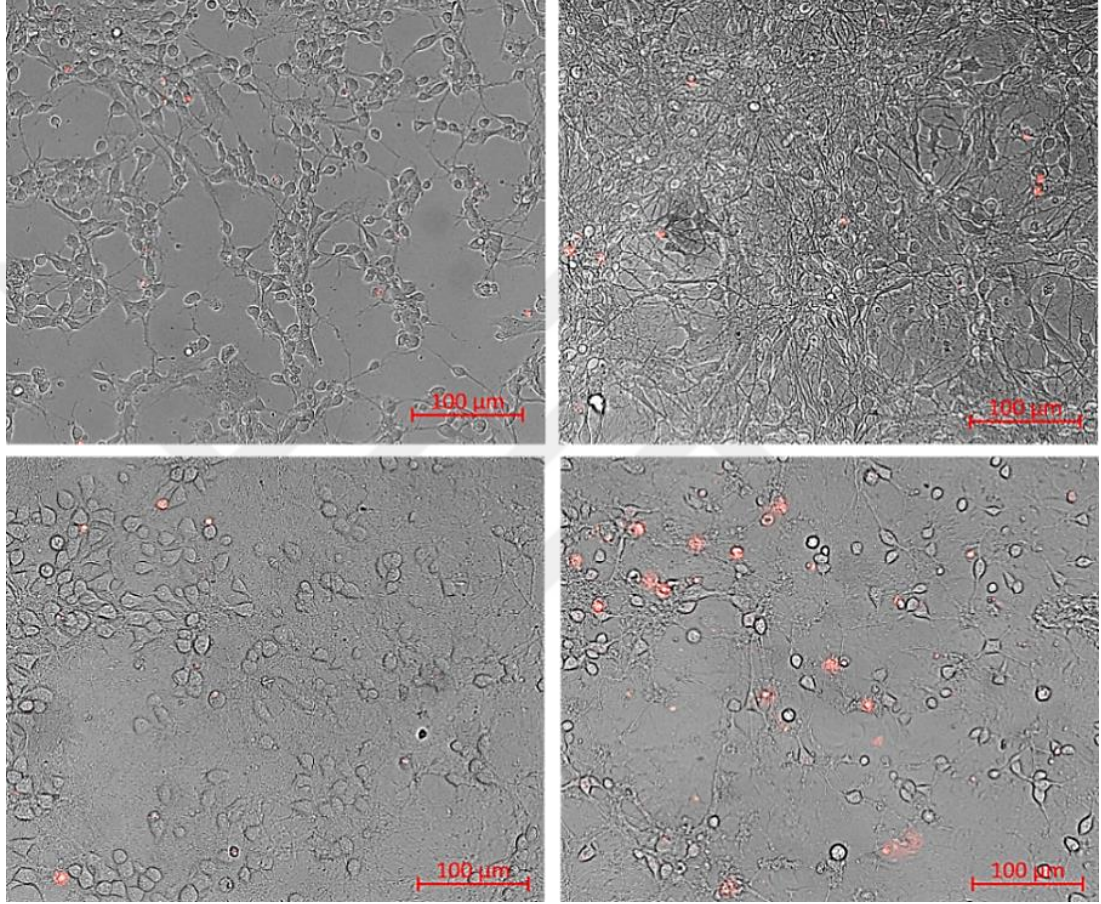
Hipokampal hücre süspansiyonu, çeşitli yarıçaplarda ekim alanları çizili, UV lazer ile işaretli 35-mm cam tabanlı petri kaplarına ve çeşitli yarıçaplarda silikon ekim havuzları oluşturulan MEAlara,  $\text{mm}^2$ 'ye yaklaşık 500, 1000 ve 2000, hücre gelecek şekilde, yaşam vasatı içinde ekildi. AKG hücrelerinde olduğu gibi, hücre ekim yoğunluğu değiştirilirken petri kabı başına düşen toplam hücre sayısının ve toplam yaşam vasatının tüm gruplarda aynı olmasına dikkat edildi. Böylece hayatta kalımı veya aktiviteyi etkileyebilecek olası hümorale olayların her grupta aynı olması planlandı. Cam petrilere ekilen hücreler kültür vasatı içinde, MEAlara ekilen hücreler yaşam vasatı içinde yaşatıldı (Tablo:10.4.1)

**Tablo 10.4.1:** Hipokampal hücrelerinin ekim yoğunlukları

Nominal yoğunluk (hücre/ $\text{mm}^2$ ):	1500-2000 h/ $\text{mm}^2$	750-1000 h/ $\text{mm}^2$	375-500 h/ $\text{mm}^2$
Kültür sayısı:	8	8	8
Ekilen hücre sayısı:	10000	100000	100000
Ekim alanı( $\text{mm}^2$ )	24 $\text{mm}^2$	95 $\text{mm}^2$	201 $\text{mm}^2$
Ekim alanı yarıçapı (mm)	(r=4mm)	(r=5,5mm)	(r=8mm)

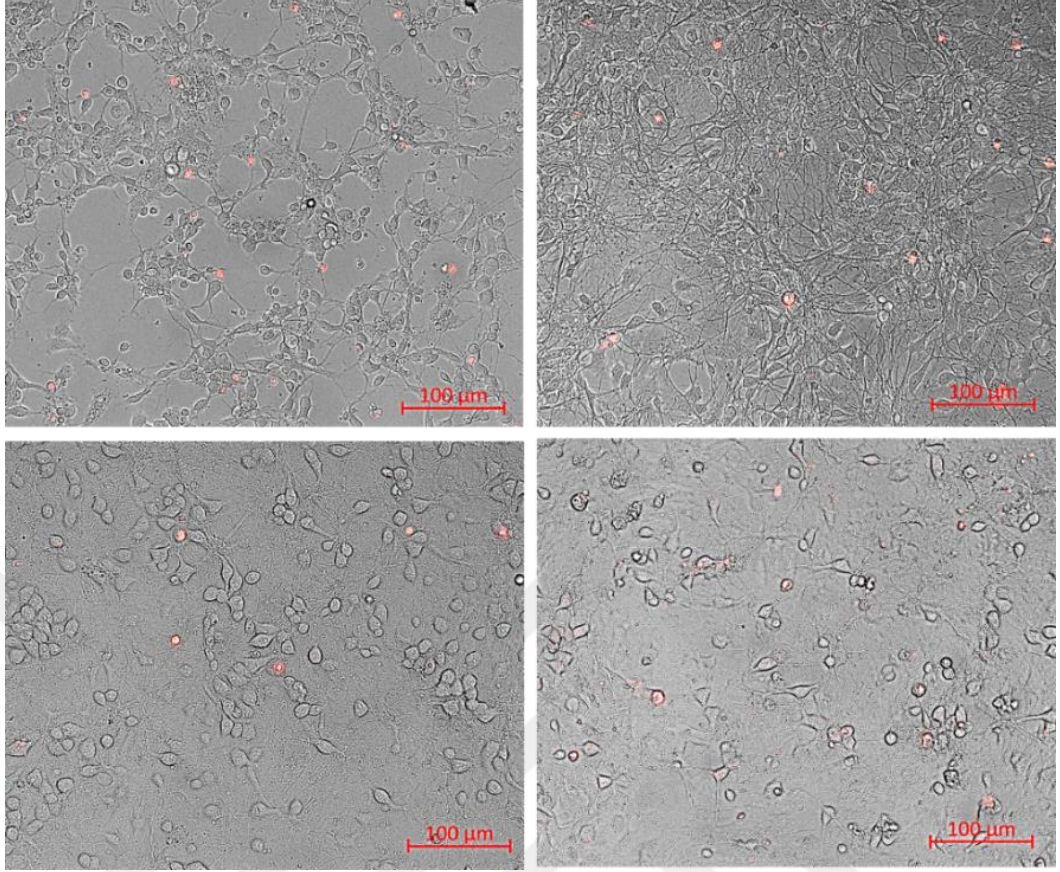
## 10.5. Sonuçlar

### 10.5.1. Hayatta kalım ve aktivite takibi yapılacak petrilerde, hücreler yapıştı ve sağlıklı uzantılar gelişti

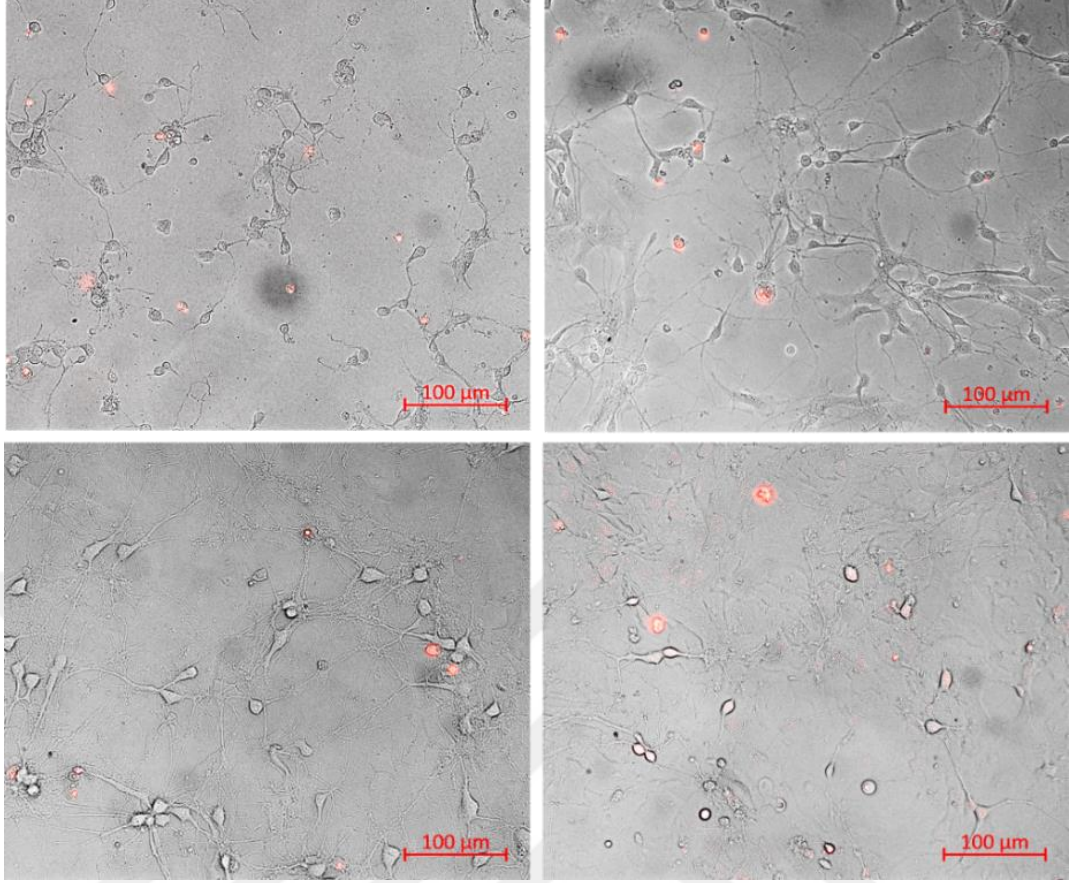


**şekil 10.5.1:** 2000 h/mm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş hipokampal hücreler, sırasıyla; kültürdeki 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 7.gün.



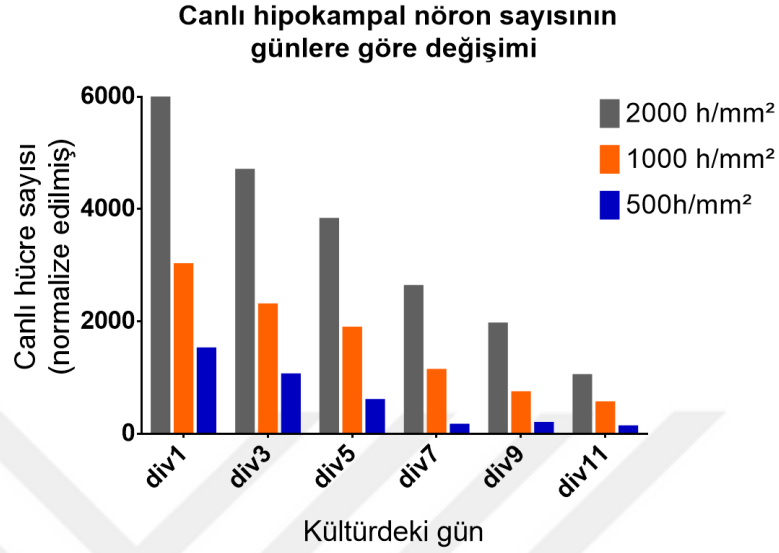


**Şekil 10.5.2:** 1000 h/mm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş hipokampal hücreler, sırasıyla; kültürdeki 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 7.gün.

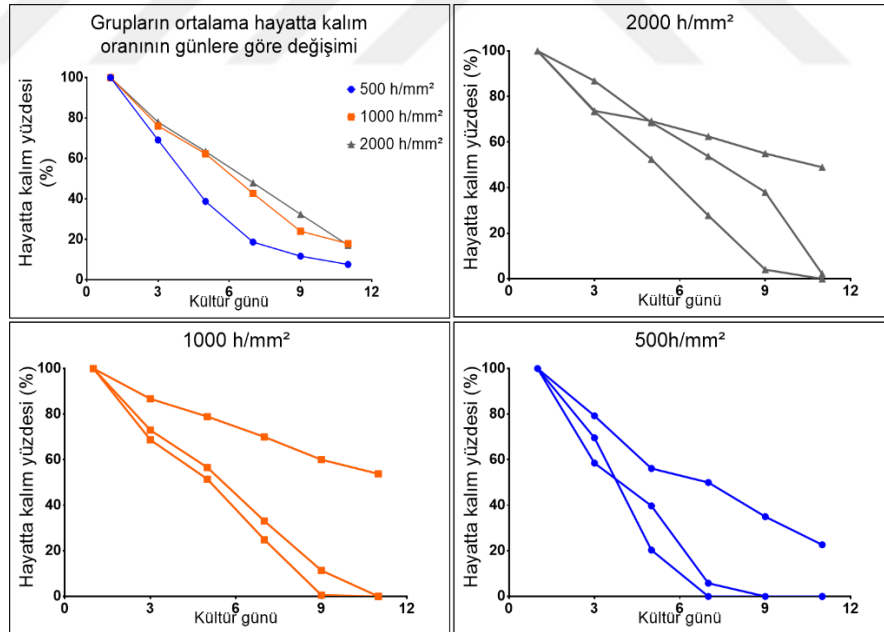


**Şekil 10.5.3:** 500 h/mm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş hücreler, sırasıyla; kültürdeki 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 7.gün.

## 10.5.2. Her ekim yoğunluğunda hayatta kalım zamanla azaldı



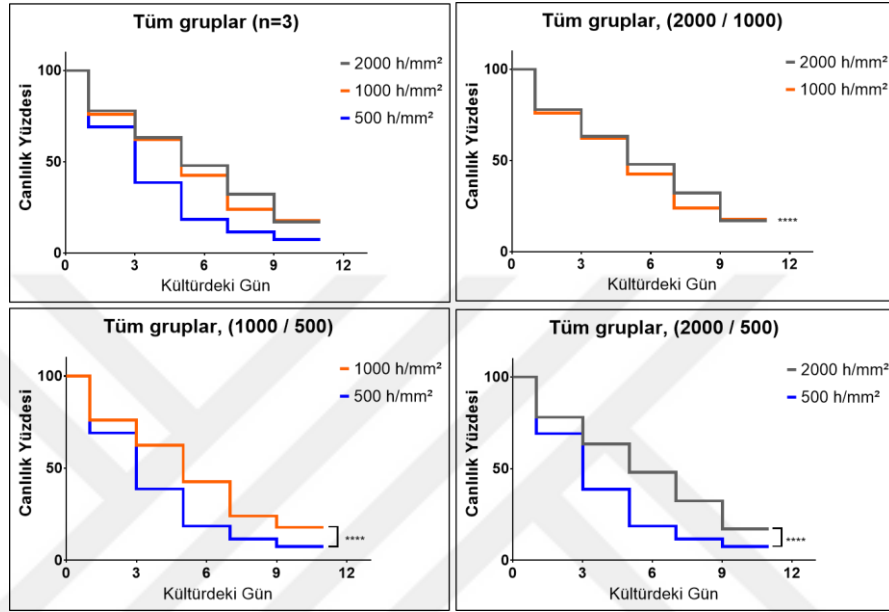
**Şekil 10.5.4:** Her grup için sayılan toplam canlı hipokampal nöronları günlere göre değişimi. (d<sub>1</sub>: 2000 h/mm<sup>2</sup>, d<sub>2</sub>: 1000 h/mm<sup>2</sup>, d<sub>3</sub>: 500 h/mm<sup>2</sup>)



**Şekil 10.5.5:** Grupların ortalama hayatta kalım oranı ve her yoğunlukta sayılan grupların (n=3) ortalama hayatta kalım oranının günlere göre değişimi.

### 10.5.3. Ekim yoğunluğunun petride zamanla hayatta kalan hücre oranını etkilediği tespit edildi

Hipokampal kültürlerde, üç tekrardan üçünde (%100), her yoğunluktaki gruplar arasında hayatta kalım açısından istatistiki bir fark tespit edildi ( $p < 0,02$ , Şekil 10.5.6).



Şekil 10.5.6: Hipokampal kültürlerde kümülatif canlılık oranlarının (n=3) tüm ekim yoğunlukları arasındaki fark.

Hipokampal kültürlerde hayatta kalma yüzdesinin günlere göre değişimini gösteren eğriler Friedman İstatistik testiyle araştırıldı. Tüm petrielerde kültürdeki günler arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p < 0,001$ ). Post hoc testler istatistiki farkın kültürün 1. ve 5. günleri arasında olduğunu gösterdi ( $p < 0,001$ ). Her ekim yoğunluğu Kuskal Wallis ANOVA testiyle kıyaslandı, Üç ekim yoğunluğu arasında istatistiki farka rastlanmadı.

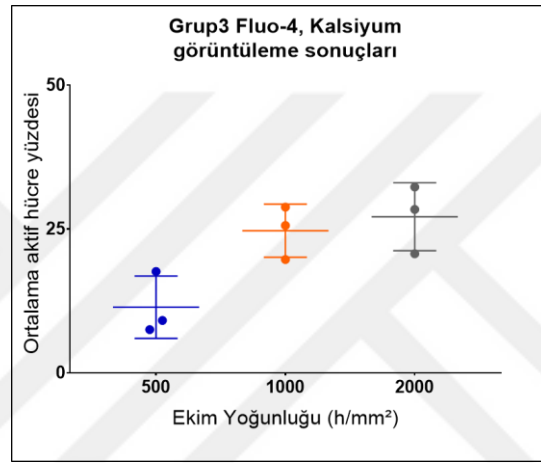
Tablo 10.5.1: Hipokampus kültürlerinde gün ve yoğunluklara bağlı Friedman skorları

	Div1	Div3	Div5	Div7	Div9	Div11
Div1	ns	ns	ns	**	****	****
Div3	ns	ns	ns	ns	**	***
Div5	ns	ns	ns	ns	ns	*

#### 10.5.4. Aktivite takibi komplike sonuçlar verdi

##### Kalsiyum görüntüleme sonuçları

Her gün için elde edilen seriler izlenerek kalsiyum aktivitesi gösteren hücrelerin sayısı, görüntülenen toplam hücrelere oranlanarak “aktif hücre yüzdesi” değeri elde edildi. Gruplarda aktif hücre yüzdesinin kültürdeki güne göre değişimi şekil 10.5.7’de ve tablo 10.5.2’de görülebilir.



**Şekil 10.5.7:** Aktivite takibi yapılan hipokampal hücrelerde aktif hücre yüzdesinin zamana göre değişimi.

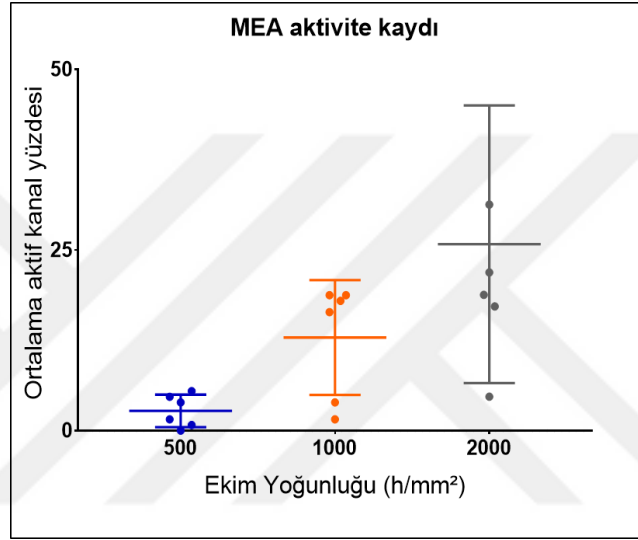
**Tablo 10.5.2:** Aktivite takibi yapılan hipokampal hücrelerinde aktif hücre yüzdesinin zamana göre değişimi.

Ekim Yoğunluğu:	Petri kabı#	Aktif hücre yüzdesi		
		DIV1	DIV3	DIV5
500 h/mm <sup>2</sup>	1	10,5	20,5	13,6
1000 h/mm <sup>2</sup>	1	23,4	22,2	18,6
2000 h/mm <sup>2</sup>	1	21,3	13,0	20,8

Aktivite yüzdesinin zamana göre değişimini gösteren eğriler Friedmann ANOVA ile kıyasladı. Üç ekim yoğunluğu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0,52$ ).

## MEA takibi sonuçları

Hipokampal kültürlerde MEA kayıtları sonucu elde edilen aktif kanal yüzdeleri Kruskal Wallis ANOVA ile kıyaslandı ( $p=0,0016$ ). 500 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğundaki hücrelerin aktivitesi 1000 h/mm<sup>2</sup> ve 2000h/mm<sup>2</sup>'den istatistiki olarak anlamlı derecede az olduğu tespit edildi. (Şekil 10.5.8, Tablo 10.5.3)

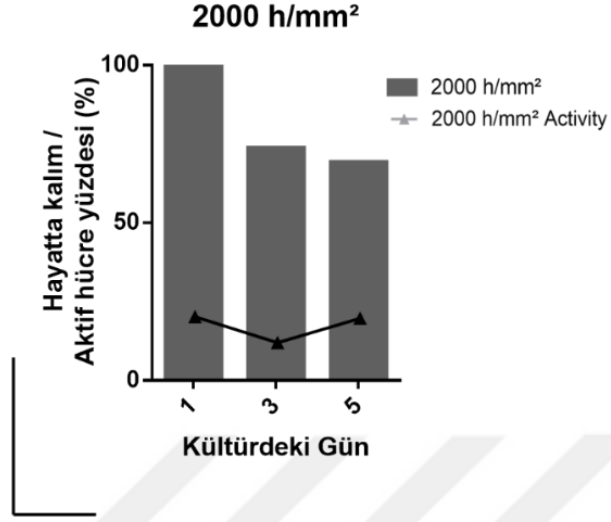


**Şekil 10.5.8:** Aktivite takibi yapılan hipokampal hücrelerde aktif kanal yüzdesinin zamana göre değişimi.

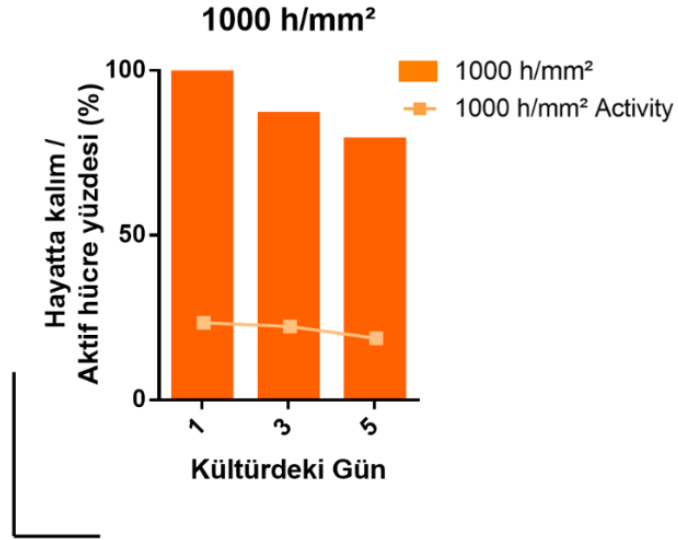
**Tablo 10.5.3:** Hipokampal hücre kültürlerinin MEA ile elektriksel aktivite ölçümü, aktif kanal yüzdelерinin günlere göre değişimi.

Ekim yoğunluğu:	MEA #	Aktif kanal yüzdesi					
		DIV6	DIV10	DIV14	DIV21	DIV29	DIV31
500 hücre/mm <sup>2</sup>	1	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0
500 hücre/mm <sup>2</sup>	2	0,0	1,6	3,1	4,7	10,9	9,4
1000 hücre/mm <sup>2</sup>	1	0,0	4,7	18,8	20,3	20,3	18,8
1000 hücre/mm <sup>2</sup>	2	3,1	3,1	14,1	17,2	17,2	17,2
2000 hücre/mm <sup>2</sup>	1	17,2	18,8	31,3	60,9	21,9	4,7

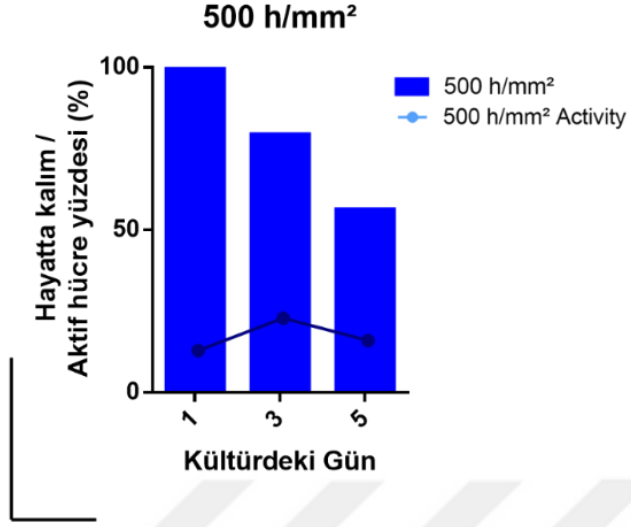
### 10.5.5. Aktivitenin canlılıkla ilişkisi araştırıldı



**Şekil 10.5.9:** 2000 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen hipokampal hücreler  
Sütün grafiği günlere göre hayatta kalım yüzdesini (n=3), çizgi grafiği günlere göre aktif hücre yüzdesini (n=2) gösteriyor.



**Şekil 10.5.10:** 1000 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen hipokampal hücreler.  
Sütün grafiği günlere göre hayatta kalım yüzdesini (n=3), çizgi grafiği günlere göre aktif hücre yüzdesini (n=2) gösteriyor.



**Şekil 10.5.11:** 500 h/mm<sup>2</sup> yoğunluğunda ekilen hipokampal hücreler.

Sütun grafiği günlere göre hayatta kalım yüzdesini (n=3), çizgi grafiği günlere göre aktif hücre yüzdesini (n=2) gösteriyor.



## 11. ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-6802  
Konu : Etik Kurulu Kararı

26/02/2018

Sayın Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğumuz “İn-Vitro Nöral Devre Çalışmaları” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYЕК) Başkanı

EK:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.  
Evrakımızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 1540E2AFX0 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi  
Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
23/02/2018	11		Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

“İn-Vitro Nöral Devre Çalışmaları” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.
<b>Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 yıl</b>

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Dr. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	