



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİKRO ELEKTROT DÜZENEĞİ VE OPTOGENETİK  
ARAÇLAR KULLANILARAK HİPOKAMPAL NÖRONLARDA  
BELLEK OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ**

SEVGİNUR BOSTAN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL- 2020

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında sağladığı tüm destek, olanak ve katkıları için danışmanım Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Tez savunma jüri üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Halil Özcan Gülçür ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ozansoy'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm bilgilerini benimle paylaşan ve bu tezin ortaya çıkmasında büyük katkıları olan Fazlı Kemal Bayat ve Esra Nur Yiğit'e,

Bu süreçte yardım ve desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Neşe Ayşit Altuncu, Dr. Mehmet Şerif Aydın, Olgü Enis Tok, Fadime Çadircı Tungaç, Nagihan Mantar, Sadık Bay, Gülsena Baydaş, Ayşe Server Sezer, Safiye Serdengeçti, Şeyma Kablan ve Özlem Mutlu Burnaz'a,

Son olarak tüm eğitim hayatım boyunca bana verdikleri destek ve motivasyon için annem Sevim Bostan, babam Yakup Bostan, kardeşlerim Betül ve Muhammed Enes Bostan'a teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU .....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ .....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ .....	ix
TABLO LİSTESİ .....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ:.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Uzun Süren Potansiyel Artışı (USPA): .....	4
4.2. Hipokampus:.....	4
4.3. Nörotransmitter Reseptörleri: .....	5
4.3.1. İyonotropik Glutamat Reseptörleri (GluR'ler): .....	6
4.3.1.1. AMPA Reseptörleri.....	6
4.3.1.2. Kainat Reseptörleri.....	6
4.3.1.3. NMDA Reseptörleri .....	6
4.4. Dopaminin USPA Üzerine Etkisi:.....	8
4.5. Kalsiyum Görüntülemesi .....	10
4.6. Mikro Elektrot Dizileri (MED) .....	11
5. YÖNTEM VE GEREÇ .....	13
5.1. Gereç.....	13

<b>5.2. Yöntem</b> .....	<b>18</b>
<b>5.2.1. Deney Hayvanları</b> .....	<b>18</b>
<b>5.2.2. Rekombinant Adeno-Asosiy Virüs (rAAV) Üretme</b> .....	<b>18</b>
<b>5.2.2.1. Kompetent Hücre Hazırlama</b> .....	<b>18</b>
<b>5.2.2.2. Transformasyon</b> .....	<b>18</b>
<b>5.2.2.3. Plazmit Çoğaltma ve İzole etme:</b> .....	<b>19</b>
<b>5.2.2.4. 293AAV Hücre Kültürü:</b> .....	<b>19</b>
<b>5.2.2.5. Plazmitin 293AAV Hücrelerine Transfeksiyonu</b> .....	<b>20</b>
<b>5.2.2.6. Virüs İzolasyonu ve Saflaştırma</b> .....	<b>20</b>
<b>5.2.3. Primer Hipokampal Hücre Kültürü</b> .....	<b>22</b>
<b>5.2.3.1. Mikro Elektrot Dizili (MED) Kültür Kabı Hazırlama</b> .....	<b>22</b>
<b>5.2.3.2. Diseksiyon Besiyeri</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2.3.3. Enzim Besiyeri</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2.3.4. Enzim İnhibisyon Besiyeri:</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2.3.5. Kalıcı Besiyeri:</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2.3.6. Diseksiyon ve Kültür</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2.3.7. Hücre Ekimi</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2.4. Elektriksel Kayıt ve Uyarı:</b> .....	<b>26</b>
<b>5.2.5. Kalsiyum Görüntülemesi:</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2.6. Deney Yordamı</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2.6.1. USPA Protokolü</b> .....	<b>34</b>
<b>5.2.6.2. Deney Grupları</b> .....	<b>35</b>
<b>5.2.7. İstatistiksel Yöntemler</b> .....	<b>35</b>
<b>6. BULGULAR</b> .....	<b>36</b>
<b>6.1. Hipokampus Kültürü</b> .....	<b>36</b>
<b>6.2. Elektriksel kayıt ile GCaMP görüntüsünün karşılaştırması</b> .....	<b>40</b>

<b>6.3.</b>	<b>Elektriksel uyarı ile Ca<sup>2+</sup> etkinliğinin yayılması.....</b>	<b>44</b>
<b>6.4.</b>	<b>Tek tek ve Toplu Analiz.....</b>	<b>45</b>
<b>6.5.</b>	<b>USPA Protokolünde Eğitimin Etkisinin İncelenmesi.....</b>	<b>46</b>
<b>6.6.</b>	<b>USPA Protokolünün Glutamaterjik Antagonistlerin Varlığı Altında Test Edilmesi.....</b>	<b>46</b>
<b>6.7.</b>	<b>USPA Protokolüne Modölatör Olarak Dopaminin Etkisi.....</b>	<b>47</b>
<b>6.8.</b>	<b>USPA Protokolünün Erken ve Geç Evre Karşılıkları .....</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>SONUÇ.....</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
	<b>ETİK KURUL ONAYI .....</b>	<b>61</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>62</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller/Kısaltmalar	Açıklamalar
AMPA	A-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
BDNF	Beyin-türevli nörotrofik faktör
C / EBPB	CCAAT/enhancer binding protein
CaM	Kalmodülin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CREB	cAMP responsive element binding protein
EGFP	Zenginleştirilmiş Yeşil Floresan Proteini
EPA	Eikosapentaeonik Asit
FBS	Fetal Bovin Serum
GECI	Genetik Olarak Kodlanmış Kalsiyum İndikatörü
GluR	Glutamat Reseptörü
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MED	Mikro Elektrot Dizileri
NAc	Nükleus Accumbens
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PFC	Prefrontal Korteks
PKA	Protein Kinaz A
PZT	Polimeraz Zincir Tepkimesi
rAAV	Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs
USPA	Uzun Süren Potansiyel Artışı
VTA	Ventral Tegmental Alan

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1 Hipokampüsün CA1, CA3 ve Dentat Girus bölümleri (8) .....	5
Şekil 4.3.1.3.1 USPA'nın geç evresini oluşturan yollar (8).....	8
Şekil 4.4.1 Ventral tegmental alan ve hipokampüsün konumları. ....	10
Şekil 4.5.1 GCaMP'in yapısı ve çalışma prensibi .....	11
Şekil 4.6.1 Mikro Elektrot Dizili bir kültür kabı yüzeyinin yakından görünüşü). ....	12
Şekil 5.2.4.1 MED yüzeyindeki elektrotlardan alınan elektriksel kayda ait bir saniyelik kesit.....	28
Şekil 5.2.4.2. 2 ms süren bir tek eylem potansiyeli.....	28
Şekil 5.2.4.3 Elektriksel uyarım için kullanılan dalga biçimleri.....	29
Şekil 5.2.5.1 Kalsiyum etkinliğine ait kayıt üzerinden seçilmiş ROI'ler.....	31
Şekil 5.2.5.2 Kalsiyum etkinliğine ait kayıt üzerinden seçilmiş ROI'lerde meydana gelen ışık şiddeti değişimlerinin zamana bağlı olarak çizilmiş grafiği .....	32
Şekil 5.2.6.1 Uyarı sıklıkları .....	33
Şekil 5.2.6.2 Test ve eğitim uyarıları ve genlikleri.....	34
Şekil 5.2.6.1.1 Deney yordamının çizimsel ifadesi.....	35
Şekil 6.2.1 Seçilen bir hücreden alınan Elektriksel kayıt ve GCaMP kaydının karşılaştırılması. ....	41
Şekil 6.2.2 Elektriksel kayıt ve GCaMP kaydının karşılaştırılması.....	42
Şekil 6.2.3 Elektriksel kayıt ve GCaMP kaydının karşılaştırılması.....	43
Şekil 6.4.1 Ağ üzerinde seçilen ROI'lerin (a) yerel (b) ve toplam (c) analiz sonuçları .....	45
Şekil 6.5.1 eğitim yapılan ve yapılmayan deneylerden alınan test sonuçları.....	46
Şekil 6.6.1 a) AP5 varlığında b) AP5 ve CNQX varlığında uygulanan USPA protokolü sonuçları.....	47
Şekil 6.7.1 USPA protokolünün farklı aşamalarında, a) Deney öncesi (n=3), b) Her bir eğitim ardından 1/10 doz ölçeğinde (n=1), c) Eğitim tamamlandıktan sonra (n=3), d) İlk eğitimin ardından (n=3), e) Hazırlayıcı uyarının ardından (n=4) dopamin uygulamaları. f) Tüm dopamin deneylerinin ortalaması (n=14).....	48
Şekil 6.8.1 Deney gruplarına göre USPA'nın a) erken evresi ve b) geç evresinde gerçekleşen % değişimler.....	49

## RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.2.2.6.1 Iodixanol Gradienti Tabakaları.....	22
Resim 5.2.3.6.1 Diseksiyon için hazırlanmış laminar akımlı kabin.....	24
Resim 5.2.3.6.2 a-b) disekte edilmiş beyin, c-d) disekte edilmiş hipokampus.....	24
Resim 5.2.3.6.3 Cam pastör pipeti yardımı ile mekanik ve enzimatik ayrıştırma.....	25
Resim 5.2.3.7.1 Mikro elektrot dizili kültür kabı yüzeyine klonlama halkası yerleştirilmesi.....	25
Resim 5.2.4.1 med ve elektronik arayüzün üstten (a-c) ve yandan (b-d) görünüşü. MED ve veri alma kartı (National Instrument) bağlı iken düzeneğin deney sırasında görünüşü (e), düzeneğin kalsiyum görüntülemesi anında görünüşü (f).....	27
Resim 6.1.1 Kültürün ekildiği günde ışık mikroskobu ile 20X(üstte) ve 40X(Altta) büyütmede çekilen hücre görüntüleri.....	37
Resim 6.1.2 Kültürün birinci gününde ışık mikroskobu ile 20X(üstte) ve 40X(Altta) büyütmede çekilen hücre görüntüleri.....	38
Resim 6.1.3 Kültürün ikinci gününde ışık mikroskobu ile 20X(üstte) ve 40X(Altta) büyütmede çekilen hücre görüntüleri.....	39
Resim 6.3.1 Elektriksel uyarı ile Ca <sup>2+</sup> etkinliğinin yayılmasının aşama aşama gösterimi. a) Uyarı öncesi ağ görüntüsü b-h) Uyarı ile birlikte kalsiyum etkinliğinin tüm ağa yayılımı.....	44



## TABLO LİSTESİ

Tablo 5.1.1 Deneylerde Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Malzemeler .....	13
Tablo 5.1.2 Cihaz ve Diğer Gereçler .....	15
Tablo 5.1.3 Görüntüleme, Elektriksel Kayıt ve Uyarım İçin Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar.....	17
Tablo 5.2.2.6.1 Iodixanol Gradienti Solüsyonları.....	21



## 1. ÖZET

### MİKRO ELEKTROT DÜZENEGİ VE OPTOGENETİK ARAÇLAR KULLANILARAK HİPOKAMPAL NÖRONLARDA BELLEK OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ

Sinirsel ağların sergilediği özelliklerin elektrofizyolojik olarak incelenmesi, öğrenme, bellek oluşumu ve sinirsel kodlama gibi konuları araştırmak için esnek ve verimli bir platform sağlar. Öğrenme ve bellek oluşumunun temelinde uzun süren potansiyel artış ve azalışın etkisi olduğu düşünülmekte ve çoğunlukla bu çerçevede araştırılmaktadır. Bu çerçevede, başta hipokampus olmak üzere bağlantı yolları bilinen doku kesitleri kullanılarak gerçekleştirilmiş pek çok çalışmada incelenmiştir. Ancak, ayrıştırılmış kültürlerde gelişen sinirsel ağlarda *in vivo* organizasyon bulunmadığından, uzun süren potansiyel artış ve azalışı üzerinden ortaya konmuş olan yöntem ve tanımlamalar yeterli değildir. Bu çalışmada, ayrıştırılmış kültürlerde gelişen sinirsel ağlarda, dışarıdan verilen uyarıların kodlanması ve öğrenilmesinin araştırılması için yeni bir yaklaşım kullanılmıştır. Kullanılan yaklaşım çerçevesinde, ayrıştırılmış kültürlerdeki sinirsel ağlarda uzun süren potansiyel artışın uygulanabilmesi için yeni bir protokol geliştirilmiştir. Bunun için mikro elektrot dizileri üzerine ekilen hipokampal sinir ağları kullanılmış ve kalsiyum görüntülemesi yönteminden yararlanılmıştır. Kalsiyum görüntülemesi yöntemi için optogenetik araç olarak genetik olarak kodlanmış kalsiyum indikatörü kullanılmıştır. Yüksek zamansal çözünürlükteki elektriksel etkinlik verileri modellenerek kalsiyum geçiş verileri ile karşılaştırılabilir hale getirilmiştir. Korelasyon analizi kullanılarak iki yöntemden elde edilen sonuçların benzerlikleri ortaya konmuştur. Geliştirilen protokol, kontrol deneyleri ve uzun süren potansiyel artışta etkili olduğu düşünülen reseptörlerin bloklanması ile yinelenen deneyler ile doğrulanmıştır. Bu protokol ile elde edilen sonuçlar, uzun süren potansiyel artışın erken ve geç evrelerinin oluşturulabildiğini göstermiştir. Ardından düzenleyici girdi olarak dopaminin uzun süren potansiyel artışın oluşumundaki etkisinin incelendiği deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, ayrıştırılmış sinir ağları üzerinde kullanılacak etkin bir yöntem elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bellek, Dopamin, GCaMP, Mikro Elektrot Dizileri, Optogenetik

## 2. ABSTRACT

### INVESTIGATION OF MEMORY FORMATION IN HIPPOCAMPAL NEURONS USING MICRO ELECTRODE ARRAYS AND OPTOGENETIC TOOLS

Electrophysiological studies on the properties of neuronal networks provide a flexible and efficient platform to investigate issues such as learning, memory formation and neuronal encoding. Since long-term potentiation and depression are thought as the bases of learning and memory formation, most studies are carried out under this framework. This framework has been investigated in many studies that use slices obtained from tissues with known connection pathways, especially from the hippocampus. However, since neuronal networks that develop in dissociated cultures lack the in vivo organization, the methods and definitions that have been demonstrated on long-term potentiation and depression are not sufficient. In this study, a new approach was employed to investigate encoding and learning of external stimuli in neuronal networks grown in dissociated cultures. Using the new approach, a protocol has been developed to apply the long-term potentiation and depression in neuronal networks in dissociated cultures. In this approach, hippocampal neuronal networks were cultured on micro electrode arrays and calcium imaging was utilized for monitoring neuronal activity. For the calcium imaging, a genetically encoded calcium indicator was used as an optogenetic tool for indicating calcium transitions. The electrical activity data with high temporal resolution are modeled and has been made comparable with calcium transition data. By using correlation analysis, the similarities of the results obtained from these two methods were revealed. The developed protocol has been validated by both control experiments and experiments repeated with blocking of receptors thought to be effective in long-term potentiation. The results obtained with this protocol showed that early and late stages of long-term potentiation can be produced. Then, experiments were carried out to examine the effect of dopamine on the formation of long-term potentiation as a regulatory input. As a result of this study, an efficient method that can be used on dissociated neuronal networks has been obtained.

**Key Words:** Dopamine, GCaMP, Memory, Micro Electrode Array, Optogenetic

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ:

Öğrenme, bellek oluşumu ve sinirsel kodlama konularını anlamak ve bunların ortaya çıkış ilkelerini tanımlayabilmek için sinirsel ağların incelenmesi verimli bir deneysel ortam sağlar. Sinirsel ağların sergilediği elektro fizyolojik özelliklerden yararlanarak ağ düzeyindeki davranışlarının ortaya konması bu konuların oluşum ve gelişim ilişkilerini açıklayan temel adımları oluşturur. Bu doğrultuda sinirsel ağlar, *in vivo* bütünlüğün korunduğu kesitler ya da ayrıştırılmış kültürler ile oluşturulan ağlar kullanılarak iki şekilde incelenebilir. Bu kapsamda yürütülen çalışmalarda, örneğin uzun süre izlenme gereksinimine bağlı olarak girişimsel veya girişimsel olmayan teknikler kullanılabilir. Girişimsel olmasına ve kısıtlamalarına karşın yama kıskacı tekniği en yaygın olarak kullanılan yöntemdir (1). Yanı sıra mikro elektrot dizileri (MED) ve kalsiyum görüntüleme gibi girişimsel olmayan teknikler ağ davranışının geniş bir zaman aralığında incelenmesine olanak tanır (2).

Öğrenme, bellek oluşumu ve sinirsel kodlama çalışmalarında temel deneysel ölçüt olarak uzun süren potansiyel artış ve azalışı (Long Term Potentiation and Depression – LTP ve LTD) değerlendirilmektedir (3). Ayrıştırılmış kültürlerde oluşan sinirsel ağlarda uzun süren potansiyel artış ve azalışının gösterilmesi kesitlerde yapılan çalışmalardaki gibi tanımlanmış değildir. Bunun tanımlanması için Chiappalone ve ark. MED kullanarak ve odaklanmış elektriksel uyarılara da yer vererek potansiyel artış ve azalış değişimlerini incelemiştir (4). İncelerken her bir kanalda artış olup olmaması ölçüt olarak kullanılmış ve tüm ağa ilişkin çıkarımlar istatistiksel yöntemlerden yararlanılarak elde edilmiştir.

Bu çalışmada, ayrıştırılmış kültürlerde oluşan sinirsel ağlarda uzun süren potansiyel artış ve azalışının tanımlanabilmesi için yeni bir protokol geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için MED üzerinde hipokampal sinir ağları büyütülmüş ve odaklanmış elektriksel uyarılar kullanılmıştır. Ağ tepkisini uzaysal olarak ayrıntılı bir şekilde ele alabilmek için kalsiyum görüntüleme yararlanılmıştır. Kalsiyum görüntüleme, genetik olarak kodlanmış kalsiyum indikatör (GECI) proteinlerinden GCaMP kullanılmıştır. Böylelikle, geliştirilecek olan protokolün *in vitro* sinirsel ağlardaki öğrenme, bellek oluşumu ve sinirsel kodlama gibi süreçlerin anlaşılmasına katkı sağlaması hedeflenmiştir.

## 4. GENEL BİLGİLER

Bilginin sinir sisteminde depolanması ve geri çağırılması nöron aktivitesini ve iletişimini modüle eden fiziksel değişikliklerle gerçekleşir. Bu değişiklikler, önceden bağlantılı olmayan nöronların yeni sinapslar oluşturması ile ve önceden var olan bağlantıların güçlenmesi ile olur (5) (6). Sinaptik iletim sinirsel uyarıya bağlı olarak güçlenebilir ya da zayıflayabilir ve bu da hafızanın temelini oluşturur (7).

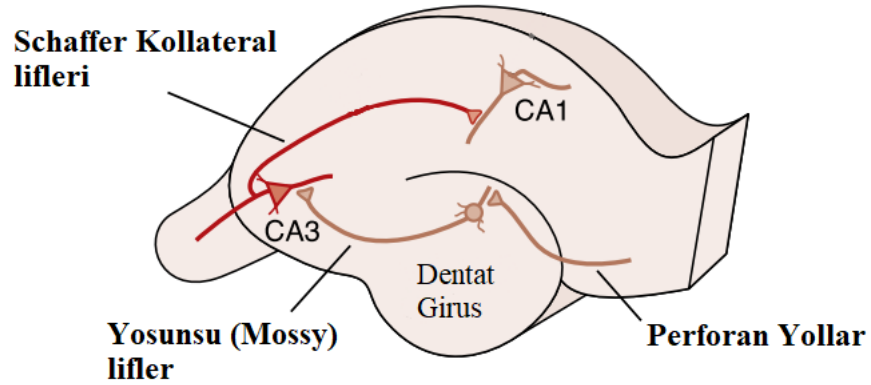
Bellek örtülü ve açık olarak iki ayrı şekilde tanımlanır. Örtülü bellek algısal ve motor beceriler ile ilgilidir ve bilinçli olarak hatırlanmadan refleksler ile ortaya konur. İnsanlar, yerler, nesnelere ve olaylar ile ilgili olan açık bellekte ise bilinçli olarak geri çağırma (hatırlama) durumu mevcuttur (8).

### 4.1. Uzun Süren Potansiyel Artışı (USPA):

Sinaptik bağlantılarda aktiviteye bağlı olarak gerçekleşen güçlenme ya da zayıflama gibi değişimlerin temelinde Uzun Süren Potansiyel Artışı (USPA) olduğu düşünülmektedir. USPA aktiviteye bağlı bir plastisite türüdür ve birçok organizmada öğrenme ve bellek modelleri ile ilişkilendirilmiştir. USPA, protein sentezinin görülmediği erken ve protein sentezinin gerçekleştiği geç evrelerden oluşur (8) (9) (10) (11) (12). Deneysel olarak USPA'nın erken dönemi tek bir uyarı dizisi ile oluşturulur ve etkisi 1-3 saat kadar sürer (13). Erken evrede önceden var olan proteinlerin modifikasyonları ile zaten var olan bağlantılar güçlendirilir. Tekrarlı elektriksel uyarı dizileri kullanıldığında ise USPA'nın uzun evresi deneysel olarak oluşturulur ve bu evrenin özellikleri erken evreden oldukça farklıdır. Geç evre en az bir gün sürer ve bu evrede hem transkripsiyon hem de transkripsiyon görülmektedir. Geç evre ile birlikte yeni sinaptik bağlantıların geliştirilmeye başlandığı düşünülmektedir (8).

### 4.2. Hipokampus:

Hipokampus medial temporal lobda bulunan özelleşmiş bir anatomik yapıdır. Hipokampüste bulunan ve USPA'nın oluştuğu üç ana yol şekil 4.2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2.1 Hipokampüsün CA1, CA3 ve Dentat Girus bölümleri (8)

Entorhinal korteksten hipokampüse gelen sinyaller perforan yolun aksonları aracılığıyla Dentat Girus'a ulaşır. Dentat Girus'ta bulunan granüler nöronlar CA3 bölgesindeki piramidal nöronlarla sinaptik olarak bağlıdır. CA3 bölgesindeki nöronlar da Schaffer Kollateral olarak adlandırılan aksonları ile CA1 bölgesindeki piramidal hücreler ile bağlıdır. Buradan itibaren bilgi, subikuluma geçer ve sonra tekrar Entorhinal kortekse döner (8).

#### 4.3.Nörotransmitter Reseptörleri:

Sinapslarda yer alan nörotransmitter alıcıları metabotropik (G-protein kenetli) ve iyonotropik reseptörler olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Metobotropik reseptörlerde, nörotransmitterlerin bağlanması, postsinaptik nöronlarda art arda gelen bir dizi sinyal iletimini tetikler. İyonotropik reseptörler ise, belirli nörotransmitterlerin bağlanmasıyla açılan özel sinaptik iyon kanallarıdır. İyonotropik reseptörlerin aktivasyonu ile meydana gelen iyon akışı, postsinaptik nöronun polarizasyon durumunu değiştirir ve depolarizasyon eşliğinin aşılması durumunda aksiyon potansiyeli oluşumu tetiklenir (14).

### **4.3.1. İyonotropik Glutamat Reseptörleri (GluR'ler):**

L-glutamat, memeli sinir sistemindeki ana uyarıcı nörotransmitterdir ve postsinaptik uçlarda hem G-protein bağlı reseptörler hem de iyonotropik glutamat reseptörleri (GluR'ler) tarafından tanınır (14). GluR'ler üç ana gruba ayrılmıştır:

- 1) A-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) reseptörleri,
- 2) Kainat reseptörleri
- 3) N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörleri

GluR'ler, uzun ve kısa süreli bellek, bellek konsolidasyonu, uzamsal bellek, dönemsel bellek ve bağlamsal korku belleğini içeren çeşitli bellek türleri ile ilişkilendirilmiştir (15)(16) (17)

#### **4.3.1.1.AMPA Reseptörleri**

AMPA reseptörleri, temel olarak sodyum ve potasyum iyonlarını ileten tetramerik iyon kanallarıdır, ancak alt birim bileşenlerine bağlı olarak kalsiyum geçirgen de olabilirler (18). Sinapslardaki AMPA reseptörlerinin konsantrasyonu USPA'nın başlaması ile artarken, USP-Azalışı sırasında düşer (19). AMPA reseptörlerinin postsinaptaki konsantrasyonunun artması veya azalması, sinaptik kalsiyum dalgalanmalarıyla tetiklenen spesifik reseptör alt birimlerinin fosforilasyonu yoluyla düzenlenir (14).

#### **4.3.1.2.Kainat Reseptörleri**

Kainat reseptörleri, kalsiyum için düşük iletkenliğe sahip, çoğunlukla sodyum ve potasyuma geçirgen olan pentamerik iyon kanallarıdır (20).

#### **4.3.1.3.NMDA Reseptörleri**

NMDA reseptörleri, tetramerik seçici olmayan katyon kanallarıdır (21). NMDA reseptörünün açılması için, hem ligand bağlantısına hem de voltaj artışına

ihtiyaç vardır. Presinapstan salınan glutamatın NMDA reseptörüne bağlanması reseptörün aktif hale gelmesi için gerekli ancak yeterli değildir.

Diğer reseptörlerin (AMPA kainat) aktifleşerek post sinapta voltaj değişimi oluşturması gerekmektedir. Böylece NMDA reseptörünü kapalı tutan magnezyum ( $Mg^{2+}$ ) tıkaçı açılır ve reseptör aktif hale gelir (14).

AMPA reseptörlerinin presinaptik terminallere ulaşan bir dizi impuls ile sürekli aktive olması postsinaptik membranın depolarize olmasını sağlar. Bu depolarizasyon sonucunda  $Mg^{2+}$  iyonları NMDA reseptörlerinden uzaklaşır (22). Böylece NMDA kanalı kalsiyum iyonlarını hücre içine alabilir ve USPA'nın erken evresi başlatılmış olur. Merkezi bir haberci molekül olan kalsiyum, cAMP'ye bağlı protein kinazı aktive edecek olan adenilil siklazı (AC) da devreye sokar. Kinaz, CREB (cAMP responsive element binding protein)'i fosforile eder. CREB sırayla yapısal değişikliklere yol açtığı düşünülen C / EBPB (CCAAT/enhancer binding protein), EPA (eicosapentaenoic acid), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) gibi düzenleyicileri ve büyüme faktörlerini etkinleştirir. USPA'nın geç evresini oluşturan yollar Şekil 4.3.1.3.1'de gösterilmiştir.

Farelerde Protein Kinaz A (PKA) veya CREB'yi bloke eden mutasyonlar, USPA'nın geç evresinin gerçekleşmesini engeller. Adenilil siklaz ayrıca dopamin sinyalleri ile de modüle edilebilir. Ek olarak, USPA'nın geç evresini engelleyen Kalsinörin, Fosfataz inhibitörü, Protein fosfataz 1 gibi moleküllerin ortadan kaldırılması USPA'nın geç evresi için gereken eşiği düşürür ve bellek oluşturulmasını kolaylaştırır (8).

PKA'nın düzenleyici alt ünitesinin mutant bir formunu taşıyan transgenik farelerde, hipokampal PKA yoğunluğundaki düşüşün USPA'nın geç evresinin oluşumunu zayıflattığı görülmüştür. Ancak USPA'nın erken evresi herhangi bir değişikliğe uğramamıştır. Böylece PKA'nın kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya çevrilmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. (23).

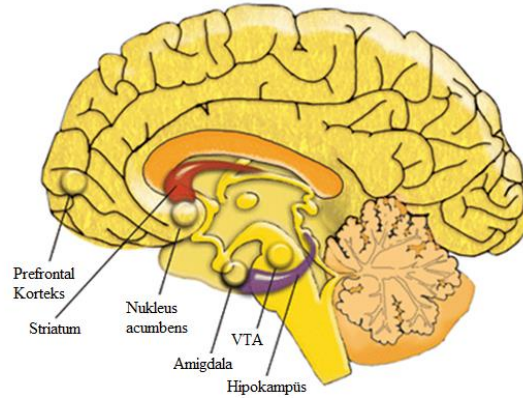




65), GABAerjik (% 30) ve glutamaterjik (% 5) hücrelerden oluşur (27). VTA prefrontal korteks (PFC), nükleus accumbens (NAc), amigdala ve hipokampus gibi bölgeler ile bağlantılıdır (Şekil 4.4.1). Dopaminerjik reseptörlerin bulunduğu bu bölgelere uzanan bağlantılardan dopamin salınımı gerçekleşir (28). Hipokampus, uzun süreli bellekte bulunmayan yeni bilgileri tespit ettiğinde Hipokampus-VTA döngüsü aktive olur. Ortaya çıkan yenilik sinyali, subiculum, akumbens ve ventral pallidumdan VTA'ya iletilir ve burada bu hücrelerin yeniliğe bağlı ateşlenmesine katkıda bulunur. Hipokampus içinde serbest kalan dopamin, USPA ve öğrenmenin geliştirilmesini sağlar (28) (29).

Dopamin iki farklı metabotropik reseptör grubu olan, D1 benzeri (D1 / D5) ve D2 benzeri reseptörler (D2, D3, D4) üzerine etki eder (30). Mu ve arkadaşları kantitatif gerçek zamanlı PZT ile D1 ve D5 reseptörlerinin hipokampusta bulunduğunu doğrulamışlardır (31). Ayrıca dopaminin hipokampal sinaptik plastisite üzerinde oynadığı önemli modülatör rolün, esas olarak D1 / D5 reseptörleri aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (32). Dopamin-reseptör sinyali hipokampüste öğrenmeyle ilişkili sinaptik mekanizmaları düzenlemektedir (29).

D1 reseptörlerinin adenilat siklazı uyarması ile cAMP üretimi artar. Dopamine bağlı cAMP artışı, CREB'nin PKA'ya bağlı olarak aktive olmasına yol açar. Ayrıca, Rap1 yoluyla etki eden cAMP, p42 / 44 MAPK aktivasyonunu başlatır. Böylece USPA'nın geç evresi için gerekli protein sentezi uyarılır. (28) USPA'nın geç evresinin dopamine bağlı olduğu ve protein sentezi gerektirdiği Sajikumar ve arkadaşları tarafından da gösterilmiştir. (33).



Şekil 4.4.1 Ventral tegmental alan ve hipokampüsün konumları.

(<https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh314/310-339.htm>, Erişim tarihi: 10 Haziran 2020).

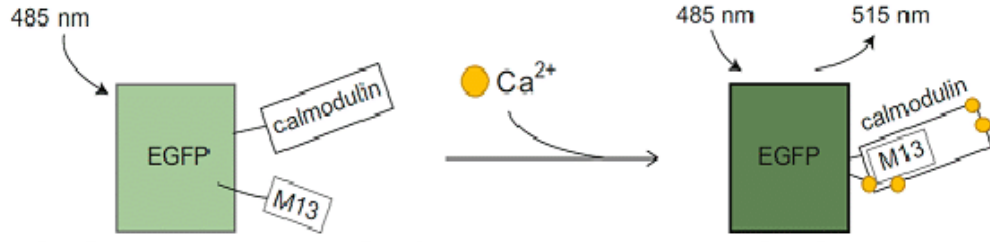
#### 4.5. Kalsiyum Görüntülemesi

Kalsiyum, nöronlarda önemli bir hücre içi habercidir. Dinlenim halinde çoğu nöron yaklaşık 50-100 nM hücre içi kalsiyum konsantrasyonuna sahiptir ve bu konsantrasyon elektriksel aktivite sırasında geçici olarak 10 ila 100 kat daha yüksek seviyelere çıkabilir (34).

Hücre içi kalsiyum sinyalleri, mikrosaniye ölçeğindeki nörotransmitter salınımından dakikalar ve saatler süren gen transkripsiyonuna kadar geniş bir zaman aralığında çalışan işlemleri düzenler. Kalsiyum akışı presinaptik uçlardan nörotransmitter taşıyan veziküllerin salınımını tetiklerken postsinaptistik nörondaki kalsiyum seviyesinin geçici olarak yükselmesi, aktiviteye bağlı sinaptik plastisitenin indüklenmesini sağlar. Kalsiyum sinyallerinin zamanı, genliği ve yerel etki alanı, bu sinyallerin işlevi için temel belirleyicilerdir. Bu nedenle, hücre içi kalsiyum sinyallerinin görselleştirilmesini ve nicel olarak tahmin edilmesini sağlayan teknikler geliştirilmiştir (35).

Aktif bilgi işleme sırasında nöronal ağ aktivitesini canlı olarak izlemek için geliştirilen yöntemlerden biri kalsiyum görüntüleme yöntemidir (36). Kalsiyum görüntüleme yöntemleri, nöronal aktivitenin hücre içi serbest kalsiyum miktarında hızlı değişikliklere neden olması prensibine dayanır (37). Bunun için genetik olarak kodlanmış kalsiyum indikatör proteinleri (GECI) yaygın olarak kullanılmaktadır (38).

GECI ailesine ait olan GCaMP, zenginleştirilmiş yeşil floresan proteini (EGFP), kalsiyum bağlayıcı protein kalmodulin (CaM) ve CaM ile etkileşen M13 peptidinden oluşur. Kalsiyum varlığında, CaM ve M13'teki konformasyonel değişiklikler floresan proteinin parlaklığının artmasına neden olur (Şekil 4.5.1) (37).

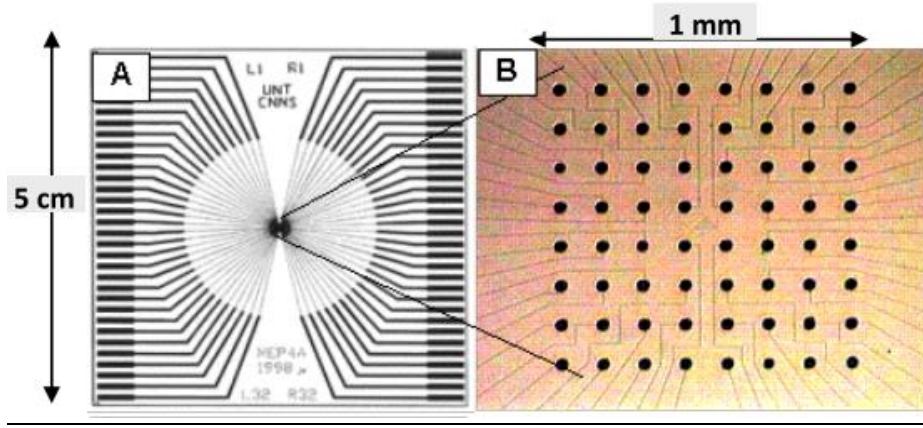


Şekil 4.5.1 GCaMP'in yapısı ve çalışma prensibi (35).

#### 4.6. Mikro Elektrot Dizileri (MED)

Cam yüzey üzerine yerleştirilen çok sayıda elektrottan oluşan Mikro Elektrot Dizileri, nöronlar, kardiyomiyositler ve beyin kesitleri gibi uyarılabilir hücreler ile bilgisayar arasında uzun süreli ve iki yönlü bağlantı kurulmasını sağlar (Şekil 4.6.1.) (39). Genellikle altın (Au) ya da titanyum nitrür (TiN)'den yapılan mikrometre ölçeğindeki (10-100  $\mu\text{m}$ ) elektrotlar hücre dışı küçük sinyallerin (10 ila 100 mikro volt) saptanmasını sağlarlar (40) (39). Böylece elektrot yakınında bulunan nöronlarda gerçekleşen iyonik süreçlerden kaynaklanan hücre dışı alandaki akım değişimi ölçülebilmektedir (41).

Hücre içi kayımda tek hücreli veya tek kanallı çözünürlüğünün aksine, mikro elektrotlar çevrelerindeki olası tüm kaynaklardan gelen sinyalleri algırlar (40). Mikro Elektrot Dizileri aynı anda birden fazla hücreden elektro fizyolojik aktivite kaydedilmesine ya da bu hücrelerin uyarılmasına olanak tanır (42).



Şekil 4.6.1 Mikro Elektrot Dizili bir kültür kabı yüzeyinin yakından görünüşü ([https://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/manuals/MEA\\_Manual.pdf](https://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/manuals/MEA_Manual.pdf) Erişim Tarihi: Haziran 2020).

MED'ler uzun süreli nöron kültürlerinin elektriksel aktivitelerini analiz etmek (43), uzun süreli potansiyel artışı ve azalışı oluşturmak (4) ve ilaç test etmek(44) amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

## 5. YÖNTEM VE GEREÇ

### 5.1.Gereç

Tablo 5.1.1 Deneylerde Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Malzemeler

	Ürün Kodu/Model	Marka
LB Agar	A8523-500G	Biomatik
LB Broth	A8521-500G	Biomatik
Gliserol	G8898	Sigma
Kalsiyum Klorür (CaCl <sub>2</sub> )	C1016	Sigma-Aldrich
<i>E. coli</i> (Stb13) hücre hattı	C737303	invitrogen
Ampicillin, sodium salt	A2154-5G	Biomatik
Qiagen Endogen free Maxi-kit	12362	Qiagen
293AAV Hücre hattı	AAV-100	Cell BioLabs
MEM non Essential Amino Acids 100X	XC-E1154/100	Biosera
Fetal Bovine Serum (FBS)	10500-064	Bibco
DMEM (1X)	21969-035	Bibco

Phosphate Buffered Saline 1X (PBS)	311-010-CL	Multicell
Phosphate Buffered Saline 10X (PBS)	311-012-CL	Multicell
Trypsin-EDTA (0.05%) in DPBS (1X)	TRY-1B	Capricorn
Optimem (1X)	51985-034	Gibco
GCaMP6s (Ana Plazmit)	100843	Addgene
pAAV2/1 (Yardımcı Plazmit)	112862	Addgene
pAdDeltaF6 (Yardımcı Plazmit)	112867	Addgene
Polietilenimin, Linear (PEI 25K)	23966-1	Polysciences, Inc.
Polietilenimin solution (PEI 50% in dH2O)	P3143-100ML	Sigma-Aldrich
OptiPrep™ Density Gradient Medium	D1556-250ML	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	31434-1KG-R	Sigma-Aldrich
Trizma base	T1503-500G	Sigma
Benzonaz	E8263-25K	Sigma
Magnezyum Klorür Hekzahidrat (Cl <sub>2</sub> Mg.6H <sub>2</sub> O)	BP214-500	Fisher BioReagents
Potasyum Klorür (KCl)	P9541-1KG	Sigma

Fenol Kırmızısı	A3616-5G	Biomatik
D-sorbitol	S1876-100G	Sigma
Laminin	L2020	Sigma
Hibernate-A	A1247501	Gibco
L-15 1X (Leibovitz)	323-050-CL	Multicell
Neurobasal-A Medium 1X	10888-022	Gibco
Antibiyotik	450-115-EL	Multicell
Glutamax	35050-061	Gibco
B27 (50X)	17504-044	Gibco
Papain	P4762	Sigma
DNAz	A2442	Biomatik
At serumu	H1270-500ML	Sigma

Tablo 5.1.2 Cihaz ve Diğer Gereçler

	<b>Model</b>	<b>Marka</b>
İnkübatör	Forma Steri-Cycle	ThermoFisher



Spektrofotometre	UV-1800	Shimadzu
Nanodrop One	ND-ONE-W	ThermoFisher
Saf Su Cihazı	Direct-Q™ 8	Millipore
Kültür kabı kabı (100 mm)	704004	Nest
Kültür kabı (150 mm)	168381	Thermo
Santrifüj tüpü (50 ml)	602002	Nest
Santrifüj tüpü (15 ml)	601002	Nest
Mikrosantrifüj tüpü (2 ml)	620011	Nest
Çalkalamalı Etüv	MAXQ 6000	Thermo Scientific
Sonikatör	AM120DT	Amtech
Santrifüj	SL 16R	Thermo Scientific
Ultrasantrifüj tüpü	361625	Beckman
Amicon 100K filtreli kolon	UFC910024	Millipore
Laminar Akımlı Kabin	Safe 2020	Thermo Scientific
Stereo mikroskop	SteREO Discovery V8	Zeiss

Floresan mikroskop	CKX41	Olympus
Klonlama Halkası	C7983	Sigma

Tablo 5.1.3 Görüntüleme, Elektriksel Kayıt ve Uyarım İçin Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar

	<b>Model</b>	<b>Marka</b>
Mikro Elektrot Dizili Kültür Kabı	MMEP4 ve MMEP4R	Kuzey Teksas Üniversitesi
MED elektronik bağlantı arayüzü	MHP-64	Plexon
64 kanallı işaret yükseltici	PBX	Plexon
Veri alma kartı (stimülatör)	USB-6001	National
Veri alma kartı (64 kanal)	PCIe-6353	National
Floresan mikroskop ve kamera	CKX41 ve DP72	Olympus
Matlab	Sürüm: 9.7 (R2019b)	Mathworks

## 5.2. Yöntem

### 5.2.1. DeneY Hayvanları

Tüm deneylerde toplam 20 adet postnatal (p0-p3) Balb-c türü fare kullanıldı. Farelerin bakımı ve üretimi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) tarafından gerçekleştirildi. DeneY yol ve yöntemleri İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafından onaylandı.

### 5.2.2. Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs (rAAV) Üretme

Hücrelerin GCaMP üretmesi için gereken plazmitin hücre içine aktarılması gerekmektedir. Bu amaç için nöronlarda etkin olduğu bilinen bir araç olarak AAV tercih edildi ve üretildi.

#### 5.2.2.1. Kompetent Hücre Hazırlama

Su ile 35g/L oranında hazırlanan LB agar otoklavlanarak steril hale getirildi. Agar, 10 cm'lik kültür kaplarına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Gliserolle dondurulmuş E. coli hücrelerinden alınan kazıntı agarlı kültür kaplarına yayıldı ve 16-20 saat 37°C'de bekletildi. Kültür kabından tek koloni seçilerek 5 ml LB sıvı besiyerine(20 g/L) ekim yapıldı. Kültür 1 gece 37°C ve 250 rpm'de bekletildi. Kültürden 1 ml alınarak, 100 ml LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de çalkalamalı etüvde spektrofotometre ile ölçülen OD600 değeri 0,4 olana kadar bekletildi. Kültür 10 dakika buz banyosunda bekletildikten sonra soğutulmuş 50 ml'lik tüplere bölündü. 2700xg'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve bakteri çökeltisine 1.6 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> eklendi. Buzda 20 dakika inkübe edildikten sonra hücreler bir tüpte birleştirilerek 0,5 ml %80 gliserol eklendi. Hücreler 100er µL olarak bölündü ve sıvı nitrojen ile dondurularak -80°C'de muhafaza edildi.

#### 5.2.2.2. Transformasyon

Buz üzerine yerleştirilmiş 1,5 µl'lik tüpün içine önce GCaMP6s plazmiti (Addgene -pAAV.Syn.GCaMP6s.WPRE.SV40) sonra 100 µl kompetent hücre

eklendi. Tüp sırasıyla buzda 20 dakika, 42°C’de 90 saniye, buz üzerinde 5 dakika boyunca bekletildikten sonra son hacim 1 ml olacak şekilde tüpe antibiyotiksiz LB sıvı besiyeri eklendi. 150-200 rpm’de dönen çalkalamalı etüvde 37°C’de 1 saat bekletildi. Tüpün içindeki bakteriler 100 mm’lik agarlı kültür kabına yayıldı ve gece boyu 37°C’de bekletildi.

### **5.2.2.3. Plazmit Çoğaltma ve İzole etme:**

Agar üzerinden tek koloni seçilerek bu koloni %1’lik Ampisilin içeren 350 ml LB sıvı besiyeri içerisine aktarıldı. 225 rpm’de dönen çalkalamalı etüvde 14-16 saat 37°C’de bekletildi. 14-16 saat sonra çoğalan bakterileri içeren sıvı besiyeri 200 ml’lik tüplere aktarıldı ve 5000 rpm’de çevrilerek bakteriler çöktürüldü. Qiagen Endogen free Maxi-kit kullanılarak GCaMP6s plazmiti izole edildi. Plazmit konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile ölçüldü. Aynı işlemler rAAV yardımcı plazmitleri 2/1 ve Helper için tekrarlandı.

### **5.2.2.4. 293AAV Hücre Kültürü:**

293AAV hücre hattının besiyeri olarak %10 FBS ve %1 100X esansiyel olmayan aminoasit solüsyonu içeren DMEM kullanıldı. 1 ml hücre eritilerek 10 ml DMEM içerisine aktarıldı ve 1200 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra hücre çökeltisi üzerine 1 ml DMEM eklendi ve pipetlendi. Daha sonra hücreler içerisinde 19 ml DMEM bulunan 150 mm’lik kültür kabına homojen şekilde dağıtıldı. Kültürler 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> ortamı sağlayan inkübatöre kaldırıldı.

Hücreler %80 yoğunluğa eriştiğinde besiyeri uzaklaştırıldı ve 5 ml 1X steril PBS ile yıkama yapıldı. 2 ml %0,05 Tripsin-EDTA 1X eklendi ve 2 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsin aktivitesini durdurmak için 5 ml DMEM eklendi. kültür kabının yüzeyinden kalkan hücreler serolojik pipet ile toplanarak santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra çökelti üzerine yeni besiyeri eklenerek alt kültürler oluşturuldu.

### 5.2.2.5. Plazmitin 293AAV Hücrelerine Transfeksiyonu

520 µl DMEM, 32.1 ng GCaMP6s (ana plazmit), 64.2 ng pAdDeltaF6 (yardımcı plazmit), 53.7 ng pAAV2/1 (yardımcı plazmit), 10 ml Optimem ve DNA miktarının 3 katı PEI(1mg/ml) içeren transfeksiyon solüsyonu hazırlandı. Her kültür kabına 550 µl transfeksiyon solüsyonu eklendi ve hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edildi. 4 saat sonra besiyeri %10 FBS içeren DMEM ile değiştirildi.

### 5.2.2.6. Virüs İzolasyonu ve Saflaştırma

Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler mekanik olarak kazılarak kültür kabının yüzeyinden kaldırıldı ve 50 ml'lik tüpler içerisinde 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre çökeltisine 9 ml lysis buffer (150mM NaCl, 20Mm Tris pH 8.0) eklendi. Hücreler 3 kez sıvı nitrojen ile dondurulup 37°C su banyosunda eritildi ve ardından 3 dakika sonikatörde bekletildi. 1 mM MgCl<sub>2</sub> ve 250U/mL Benzonaz eklendi. Dondurup çözme işlemleri sırasında çöken DNA-Protein agregatlarının çözünmesi için tüp 37°C'de 20 dakika bekletildi. Hücreler 4000 rpm, 4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvıda kalan virüsleri diğer hücre kalıntılarından ayırmak için Iodixanol gradienti hazırlandı.

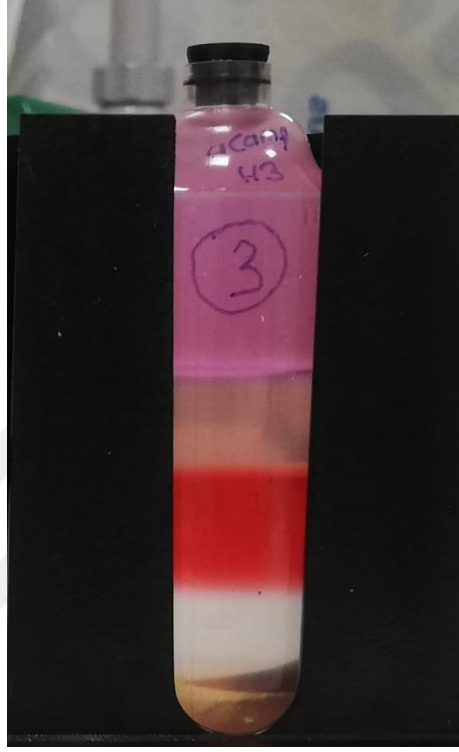
Iodixanol gradienti hazırlanırken kullanılan solüsyonlar Tablo 6.2.2.6.1'de verilmiştir.

Tablo 5.2.2.6.1 Iodixanol Gradienti Solüsyonları

	<b>%17'lik solüsyon</b>	<b>%25'lik solüsyon</b>	<b>%40'lık solüsyon</b>	<b>%60'lık solüsyon</b>
<b>PBS 10x</b>	5ml	5 ml	5ml	-
<b>1M MgCl<sub>2</sub></b>	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
<b>1M KCl</b>	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml	0.125 ml
<b>Optiprep</b>	12.5 ml	20 ml	33.3 ml	50 ml
<b>5M NaCl</b>	-	-	10 ml	-
<b>%0.5'lik fenol kırmızısı</b>	-	0,1 ml	-	0,2 ml
<b>Distile su</b>	50 ml'ye tamamlayacak miktarında	50 ml'ye tamamlayacak miktarında	50 ml'ye tamamlayacak miktarında	-

Ultrasantrifüj tüpüne sırasıyla 3 ml %60'lık, 5 ml %40'lık, 6 ml %25lik ve 6 ml %17'lik solüsyon çok yavaş bir şekilde damlalar halinde eklendi (Resim 5.2.2.6.1). Tüpün en üst kısmına saflaştırılacak olan virüsler eklendi ve 50000 rpm'de 18°C'de 2 saat santrifüj edildi. Ultrasantrifüj tüpünün duvarı enjektör ile delinerek virüslerin bulunduğu %40'lık solüsyon çekildi. Virüslerin bulunduğu sıvının üzerine 15 ml'ye tamamlayacak kadar 1X storage buffer (1L: 100ml 10x PBS, 50g D-sorbitol, 42.4ml

5M NaCl, distile su) eklendi. Virüsler Amicon 100K filtrelili kolonlarına aktarılarak 4°C’de 30 dakika 3500 rpm’de santrifüj edildi. Bu aşama 3 kez tekrar edildikten sonra filtre üzerinde kalan virüs solüsyonu 2şer µl olacak şekilde tüplere bölündü ve -80°C’de muhafaza edildi.



Resim 5.2.2.6.1 Iodixanol Gradienti Tabakaları. Altan üste sırasıyla %60, %40, %25, %17’lik Iodixanol tabakaları ve virüs içeren solüsyon.

### 5.2.3. Primer Hipokampal Hücre Kültürü

#### 5.2.3.1. Mikro Elektrot Dizili (MED) Kültür Kabı Hazırlama

Kuzey Teksas Üniversitesinden satın alınan 64 elektrotlu iki tür MED tasarımı kullanılmıştır. Bu tasarımlarda elektrotların bulunduğu bölgeler yaklaşık 1mm<sup>2</sup> ve 0,25 mm<sup>2</sup> ‘lik alanlara karşılık gelmektedir. Birden fazla kullanıma uygun olan bu MED’ler tekrar kullanım için hazırlanırken bir sterilizasyona tabi tutulmuştur. MED’ler çamaşır suyu (%10) ve etanol (%70) ile yıkandıktan sonra 30 dakika UV ışık

altında bekletilerek sterilize edilmektedir. Sterilize edilen MED'ler 750 µL borat tamponunda çözülmüş %0,05-0,1'lik polietilenimin (PEI) ile kaplanarak bir gece inkübatörde (37°C, %5 CO<sub>2</sub>) bekletilmektedir. Kültürden en az iki saat önce polietilenimin uzaklaştırılmakta ve MED'ler distile su ile yıkanmaktadır. Ardından da 500 µL lik %1 laminin ile ikinci kaplama yapılmaktadır.

#### **5.2.3.2. Diseksiyon Besiyeri**

5 ml Hibernate-A (Gibco-A1247501) solüsyonuna %1 Antibiyotik ve %1 Glutamax eklendi. Besiyeri diseksiyon aşamasına kadar +4°C'de muhafaza edildi.

#### **5.2.3.3. Enzim Besiyeri**

960 µL L-15 (Sigma L5520) solüsyonuna %1 antibiyotik, %1 Glutamax, %2 B27, %1 papain ve %1 DNaz eklenerek +4°C'de bekletildi.

#### **5.2.3.4. Enzim İnhibisyon Besiyeri:**

4 ml L-15 solüsyonuna %1 antibiyotik, %1 Glutamax, %2 B27 ve %10 FBS eklendi. Mekanik ayrıştırma besiyeri kullanılacağı zamana kadar +4°C'de bekletildi.

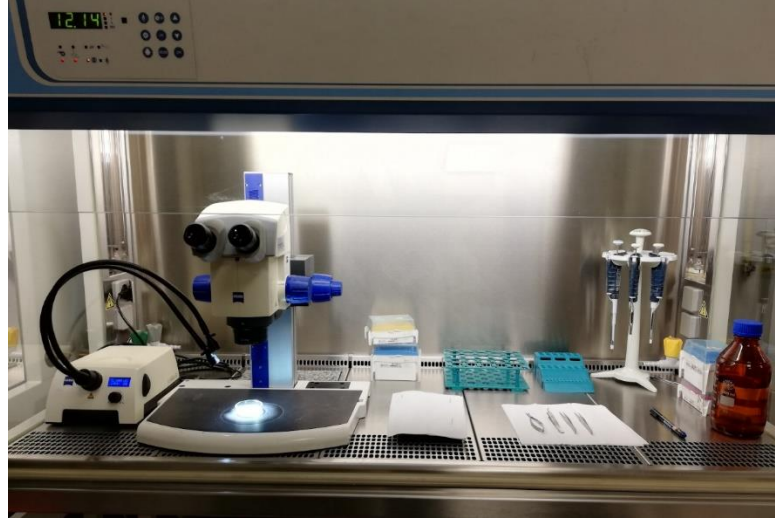
#### **5.2.3.5. Kalıcı Besiyeri:**

8 ml Neurobasal-A (Gibco-10888022) besiyerine %1 antibiyotik, %1 Glutamax, %2 B27 ve %2 at serumu eklenerek hazırlandı ve ekim aşamasına kadar kapağı yarı açık şekilde 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> sağlayan inkübatörde bekletildi.

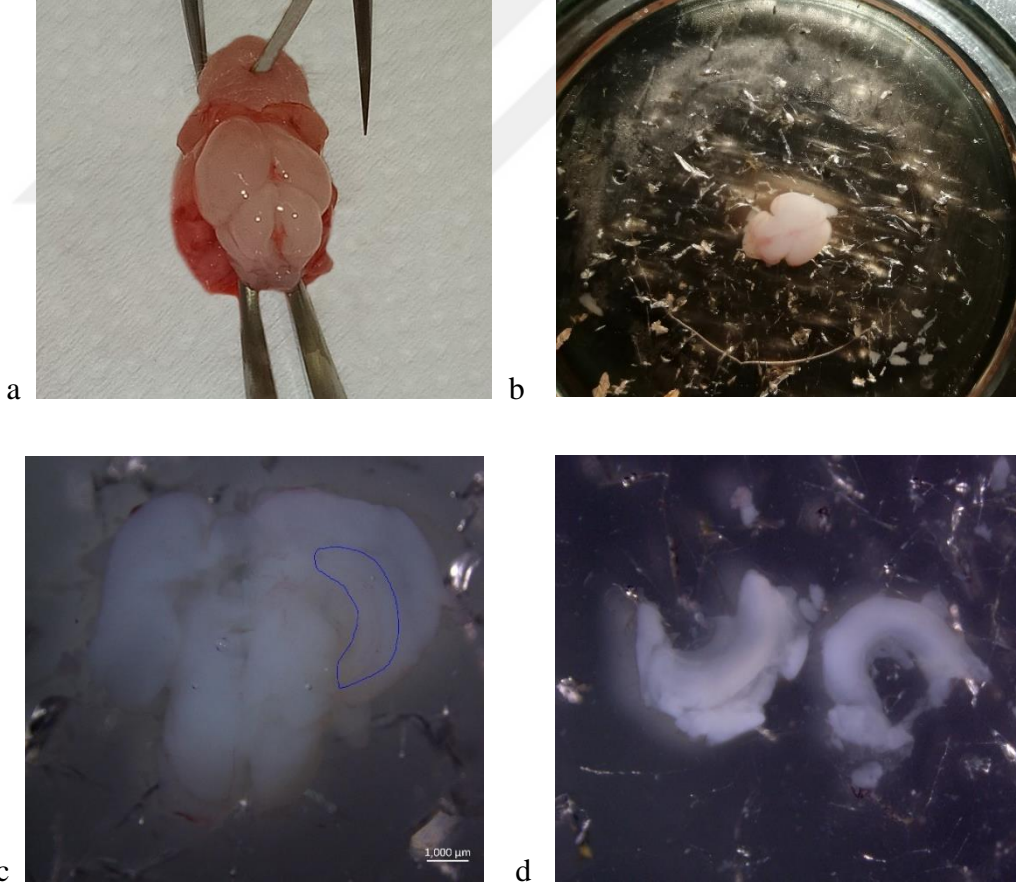
#### **5.2.3.6. Diseksiyon ve Kültür**

0-3 günlük yenidoğan fareler etik kurallara uygun bir şekilde dekapite edildi. Beyin laminer akımlı kabin içerisinde (Resim 5.2.3.6.1) çıkarılarak diseksiyon besiyeri içerisine alındı (Resim 5.2.3.6.2 a-b). Hipokampüsler stereo mikroskop altında izole edildi (Resim 5.2.3.6.2 c-d) ve enzim besiyerine aktarılarak 4°C'de 45 dakika bekletildi.



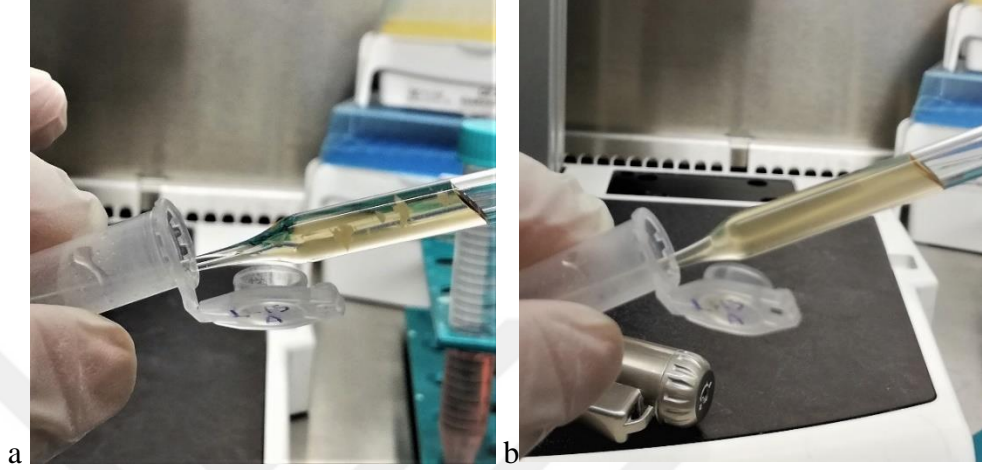


Resim 5.2.3.6.1 Diseksiyon için hazırlanmış laminar akımlı kabin



Resim 5.2.3.6.2 a-b) disekte edilmiş beyin, c-d) disekte edilmiş hipokampus. Mavi ile işaretli alan hipokampusün konumunu göstermektedir.

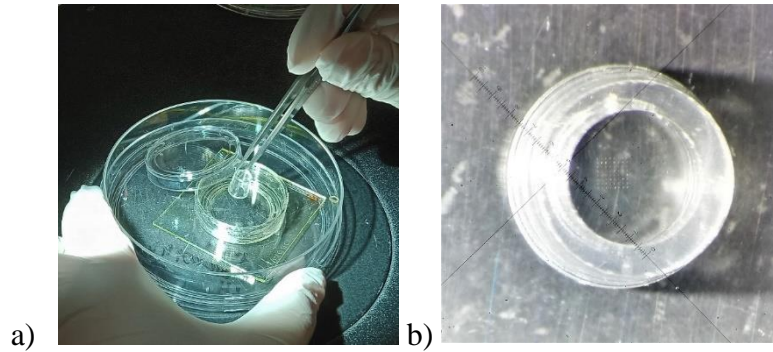
Hipokampüsler enzimde bekledikten sonra ucu büyükten küçüğe doğru daralan üç farklı boyutta cam pastör pipeti ile mekanik olarak ayrıştırıldı (Resim 5.2.3.6.3). Homojen hale getirilen solüsyon, enzim inhibisyon besiyerine aktarıldı ve 15 dakika 4°C’de tutuldu.



Resim 5.2.3.6.3 a) cam pastör pipeti yardımı ile mekanik ve enzimatik ayrıştırma b) Ayrıştırılan dokunun besiyeri içerisinde aldığı homojen görünüm.

### 5.2.3.7. Hücre Ekimi

Laminin ile kaplı olan MED’ler distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Ardından yüzeye klonlama halkaları stereo mikroskop yardımıyla elektrotları içine alacak şekilde yerleştirildi (Resim 5.2.3.7.1.).



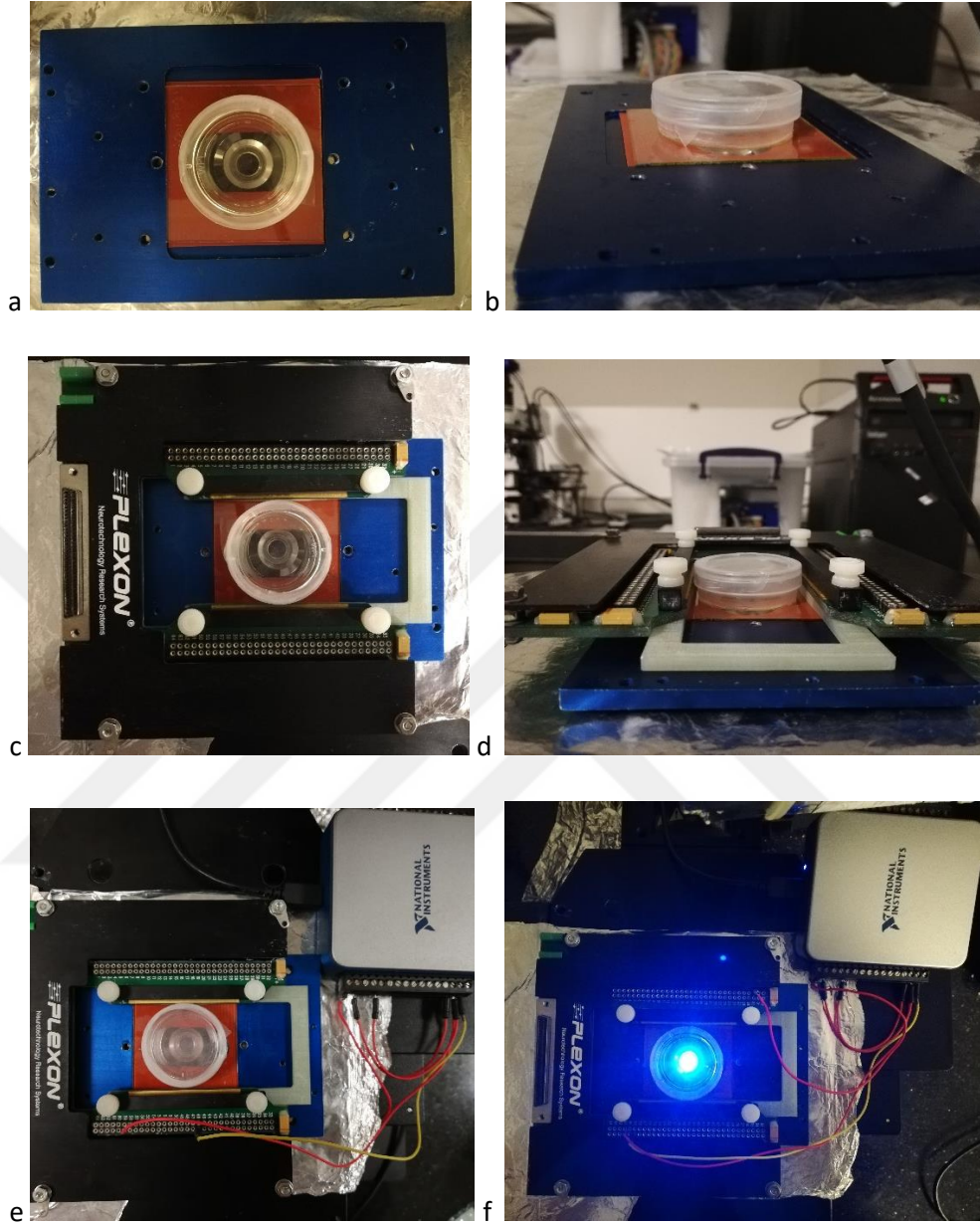
Resim 5.2.3.7.1 a) Mikro elektrot dizili kültür kabı yüzeyine klonlama halkası yerleştirilmesi. b) Klonlama halkasının ve elektrotların görünümü.

Enzim inhibisyon besiyeri içindeki hücreler 1000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Çöken hücrelerin üzerine 700 µL kalıcı besiyeri eklendi. Hücreler pipetlenerek besiyeri içinde homojen olarak dağılmaları sağlandı ve klonlama halkalarının içine 140ar µL olacak şekilde ekildi (15,000–20,000 hücre/mm<sup>2</sup>). Ekimden sonra klonlama halkaların içinde 37°C’de ve %5 CO<sub>2</sub> sağlayan inkübatörde 2 saat bekletildi. İki saat sonra yüzeye tutunan hücrelerin şekilsel farklılaşmaları ve uzantıları gözle görülür hale geldi. Kültür kabı içerisindeki toplam miktar 1500 µL olacak şekilde kalıcı besiyeri ilave edildi ve klonlama halkası MED yüzeyinden uzaklaştırıldı. Kültürlerin 2. gününde her kültür kabına 1 µL virüs eklendi. İlerleyen her üç günde bir mevcut besiyerin yarısı taze hazırlanan kalıcı besiyeri ile değiştirildi. Virüs verilen kültürlerde bir hafta sonra gcamp ifade edilmeye başlandığı görüldü. GCaMP ifadesinin belirginleşmesi ve sinir ağının olgunlaşmasının ardından 20. günde deneylere başlandı.

#### **5.2.4. Elektriksel Kayıt ve Uyarı:**

Elektriksel kayıt almak ve uyarı vermek için MED kültür kabı, bilgisayar ile bağlantı sağlayan elektronik arayüze yerleştirildi (Resim 5.2.4.1 a-d). Elektriksel uyarı vermek için, elektronik arayüz üzerinde bulunan ve her bir elektrota dışarıdan bağlantı yapılmasını sağlayan bağlantı uçları kullanıldı (Resim 5.2.4.1 e).

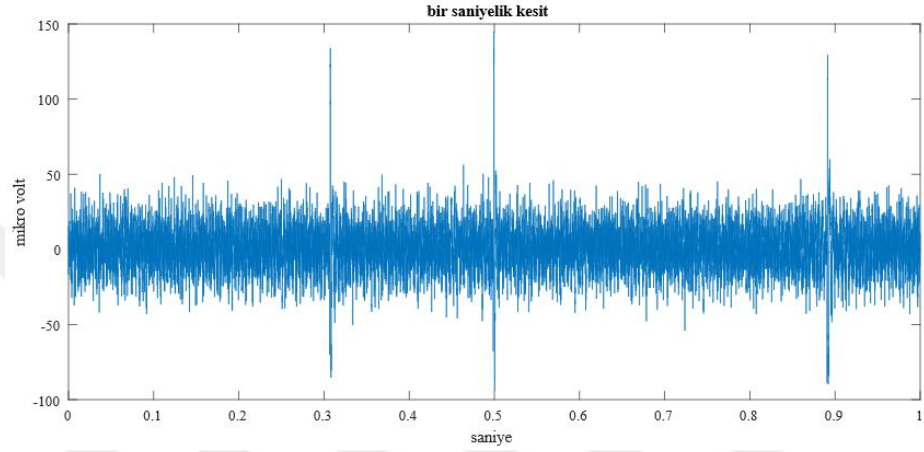
Mikro elektrotlar ile hücre dışından eylem potansiyelleri alınabilmektedir. Ortalama 20 um çapındaki elektrotların yakın çevresinde ve üzerinde bir veya birden fazla ortalama 10 um gövde çapı olan merkezi sinir hücreleri bulunabilir. Hücrenin elektrota göre olan konumuna bağlı olarak farklı biçimlerde eylem potansiyeli dalga şekilleri elde edilebilmektedir. Ortalama 200 uV genliğinde ölçülen, bir saniye süreli kendiliğinden bir elektriksel etkinlik kaydı şekilde gösterilmiştir. 2 ms süren tek bir eylem potansiyeli 25 kHz’te örneklenerek alındığında Şekil 5.2.4.2’deki gibi görülmektedir. Elektriksel etkinlik tek bir eylem potansiyelinden oluşabileceği gibi püskürme halinde çok sayıda eylem potansiyelinin bir araya gelmesi ile de oluşabilir.



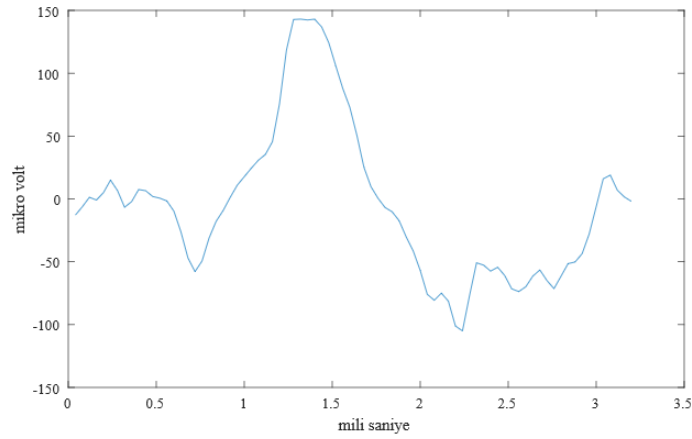
Resim 5.2.4.1 med ve elektronik arayüzün üstten (a-c) ve yandan (b-d) görünüşü. MED ve veri alma kartı (National Instrument) bağlı iken düzeneğin deney sırasında görünüşü (e), düzeneğin kalsiyum görüntülemesi anında görünüşü (f).

Elektriksel uyarı çoğunlukla dürtü işlevine benzer bir dalga biçiminde düzenlenmektedir. Uyarım uygulanırken temel hedef süreyi olabildiğince kısa tutmak ve genliği değişken saymaktır. Elektriksel uyarımın süresi arttıkça hücrelere zarar

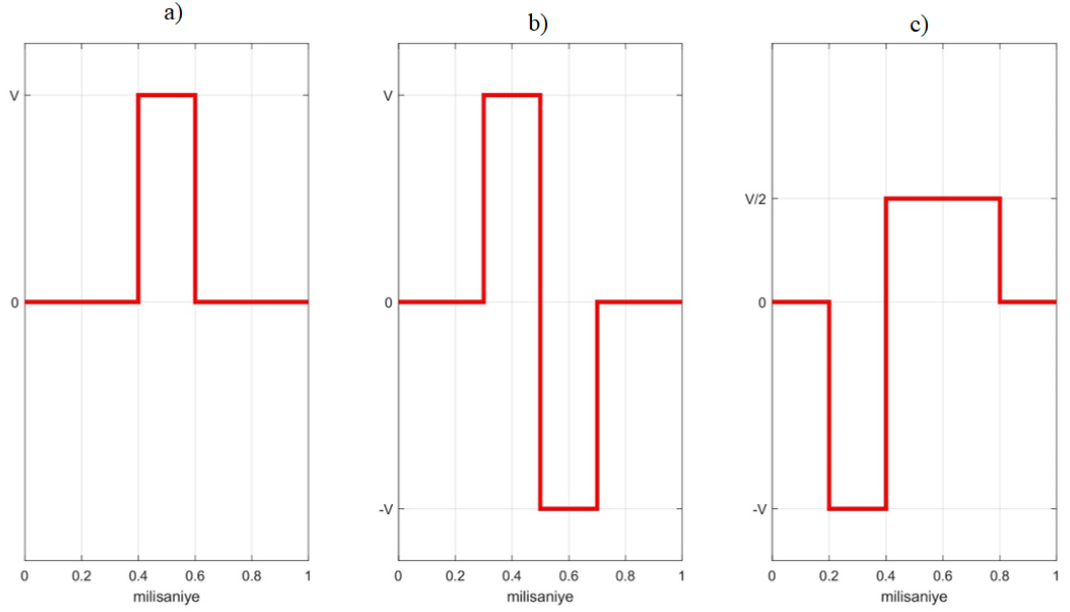
verebilmektedir. Bu elektriksel işaret analog veya sayısal olarak üretilebilmekle beraber bu çalışmada sayısal olarak üretilmiştir. Sayısal işaret veri alma kartı kullanılarak analog işarete dönülmüştür. Analog işaret akım veya gerilim üzerinden denetlenebilmektedir. Dolayısı ile uyarımın büyüklüğü akım veya gerilim cinsinden ifade edilmektedir. Bu çalışmada uyarım büyüklüğü gerilim ile denetlenmiştir.



Şekil 5.2.4.1 MED yüzeyindeki elektrotlardan alınan elektriksel kayda ait bir saniyelik kesit



Şekil 5.2.4.2. 2 ms süren bir tek eylem potansiyeli



Şekil 5.2.4.3 Elektriksel uyarım için kullanılan a) tek evreli, b) bakışumlu ve c) bakışumsuz iki evreli dalga biçimleri.

Elektriksel uyarımın dalga biçimi, elektrotta elektroliz oluşmasını engellemek için genellikle iki evreli olarak uygulanmaktadır. Bu sayede uyarımın kültür ortamında anlık etki oluşturması (iyon dağılışının sinirsel etkinliği etkileyecek sapmalar göstermesinin önüne geçmek) arzu edilmektedir. Şekil 5.2.7.1’de tek evreli (a), bakışumlu (b) ve bakışumsuz (c) iki evreli dalga biçimleri gösterilmiştir. Bu çalışmada sinirsel uyarılabilirlik ve elektrotların kimyasal yapısı göz önünde bulundurularak en iyi etki oluşturan, iki evreli ve bakışumsuz bir dalga biçimi benimsenmiştir. Bir uyarı iğneciğinin süresi, ilk evrede  $-V$  genliğinde 200 us süreli, ikinci evrede  $+V/2$  genliğinde 400 us süreli olarak belirlenmiştir. Burada  $V$  gerilim cinsinden genlik olmak üzere, 0-10 volt arasında ayarlanabilen uyarım değişkenidir. Elektrotun zamanla değişen empedans değerine bağlı olarak gerilim düzeyini yukarı doğru kaydırmak gerekebilmektedir.

Hücre dışından uygulanan elektriksel uyarı hücre içi uygulamaya göre farklılık gösterir. Tek bir uyarı iğneciği hücrenin anlık durumuna bağlı olarak düzenli ve yinelenabilir sinirsel yanıtlar oluşturmayabilmektedir. Bu nedenle uyarım iğnecikleri

belirli sıklıkta arka arkaya sıralanmaktadır. Burada iğnecik sıklığı ve iğnecikler arası boşluk süresi deneysel olarak belirlenmiştir.

### **5.2.5. Kalsiyum Görüntülemesi:**

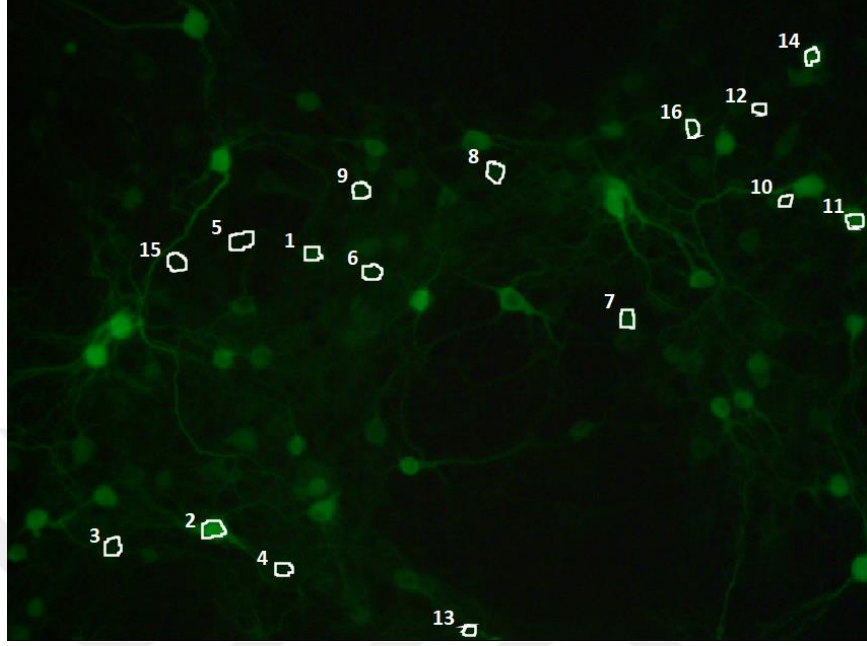
Art arda oluşan eylem potansiyelleri sonucunda hücre içine büyük ölçekte kalsiyum girişi olmaktadır. Hücre içine giren kalsiyum GCaMP proteinine bağlı olan kalsiyum bağlayıcılara bağlanmasıyla proteinde konformasyonel değişiklikler olmaktadır. Bu konformasyonel değişiklikler yine GCaMP proteinine bağlı yeşil floresan proteinin (EGFP) aktifleşmesine ve floresan ışımının şiddetinin artmasına neden olmaktadır. Floresan ışımının görülebilmesi için EGFP'nin 488 nm dalga boyunda mavi ışık ile uyarılması gerekmektedir. Böylelikle 515 nm dalga boyunda floresan ışımaya (yeşil renkte) görünür hale gelmektedir.

Hipokampal sinir ağlarının elektriksel (kalsiyum) etkinlikleri floresan mikroskop ve bağlı olan kamera ile alınarak görüntülendi. Görüntülemelerde 10x ve 20x objektifler kullanıldı ve ışık şiddeti gereksinimine bağlı olarak 5-10 fps sıklık ile çekilen fotoğraflar video olarak kaydedildi.

Video dosyası olarak alınan kayıtlar Fiji yazılımı kullanılarak açıldı ve görüntüde yer alan hücre gövdeleri ROI olarak seçildi. Bir ROI içerisindeki ışık değişiminin uniform olduğu kabul edilerek her bir görüntü karesi için seçilen alanlarda gerçekleşen ışıksal değişim ortalama olarak hesaplandı. Hesaplanan bu veriler MATLAB yazılımı kullanılarak işlendi ve çözümlendi. Seçilen hücre gövdelerinde görülen ışık şiddeti değişimleri zamana bağlı olarak çizildi. Işık şiddeti değişim aralıkları örnekler arasında farklılık gösterdiği için genlikler birim aralığa yansıtılarak uyumlanmıştır,

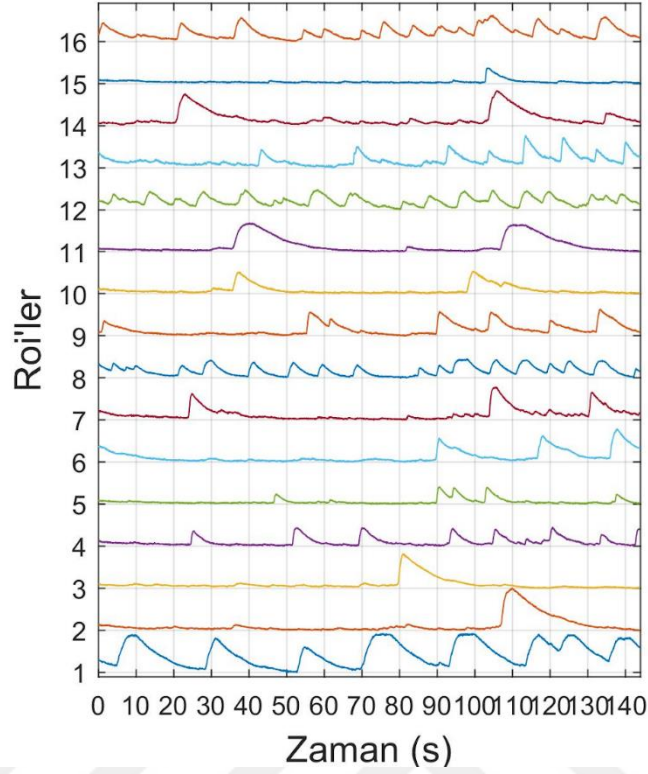
Olağan bir kendiliğinden etkinlik örneği şekillerde gösterilmiştir. Bu örnekte, yaklaşık 150 saniye süren kendiliğinden bir kalsiyum etkinliği 70 ms'de bir fotoğraf alınarak (14,28 fps) kaydedilmiştir. Burada görüntü alanına giren ağ içerisinde 16 adet hücre gövdesi ROI olarak belirlenmiş ve çözümlenmiştir. Hücre içine giren kalsiyum miktarının büyüklüğüne bağlı olarak kalsiyumun dışarı çıkarılma süresi artmakta, dolayısıyla kalsiyum olaylarının genliğine orantılı olarak süreleri

değişmektedir (ROI 3,4,5). Bu örnekte olay sürelerinin 1-30 saniye aralığında değiştiği görülmüştür.



Şekil 5.2.5.1 Kalsiyum etkinliğine ait kayıt üzerinden seçilmiş ROI'ler



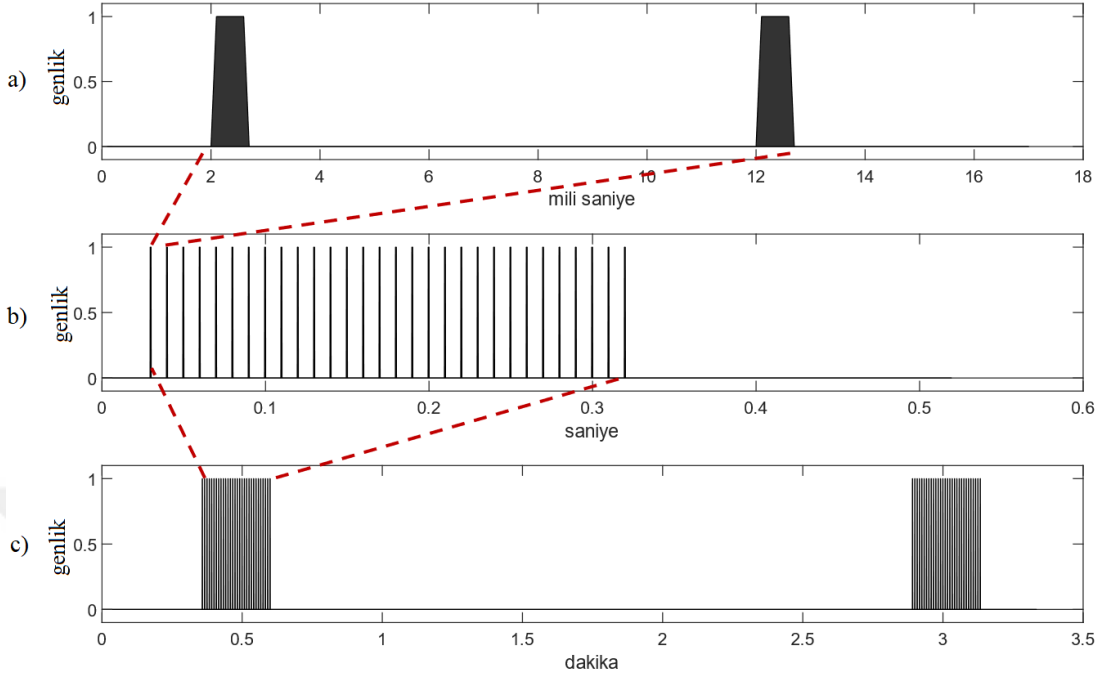


Şekil 5.2.5.2 Kalsiyum etkinliğine ait kayıt üzerinden seçilmiş ROI'lerde meydana gelen ışık şiddeti değişimlerinin zamana bağlı olarak çizilmiş grafiği

### 5.2.6. Deney Yordamı

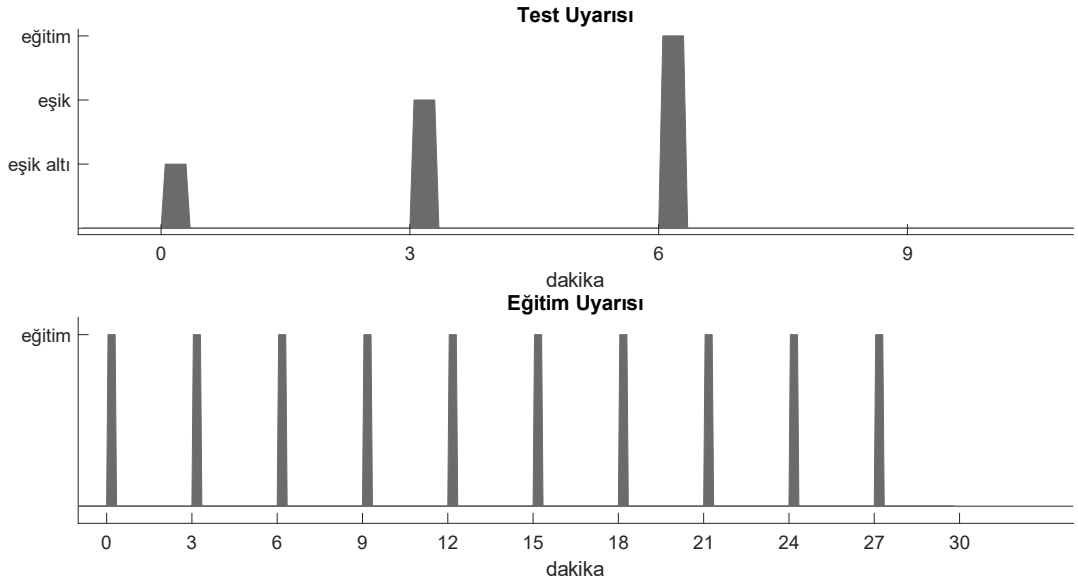
Uyarıma bağlı alınan kalsiyum yanıtlarının sürekli ve yinelenabilir olarak elde edilmesi amacı göz önünde bulundurularak art arda 30 iğnecikten oluşan bir öbek uyarımın deneysel olarak uygun olduğu belirlenmiştir. Buna göre bir iğnecik 600 us sürmek üzere 30 iğnecik saniyede 100 kez olacak şekilde düzenlenmiş, dolayısı ile 300 ms içerisinde 30 iğnecik uygulama biçiminde düzenlenmiştir.

Uyarım iğnecikleri ile oluşturulan öbeklerin sıklığı yine deneysel olarak belirlenmiştir. Burada ölçüt uyarımdan doğrudan etkilenen hücrelerin kalsiyum alış-verişini sağlıklı olarak sürdürebilmeleri olmuştur. Art arda gelen uyarım öbeklerinin etkilerini bağımsız olarak değerlendirebilmek amacıyla öbekler arasında üç dakikalık (hüresel etkinlik için uzun sayılabilecek) boşluk bırakılmıştır. Uyarı iğnecik sayısı ve uyarım öbekleri arası süre belirlendikten sonra değişken olarak uyarım genliği kullanılmıştır.



Şekil 5.2.6.1 Uyarı sıklıkları: 600  $\mu$ s süreli iğnecikler (a) ve 30 adet iğnecikten oluşan uyarı treni (b) görülmektedir. c’de ise üç dakika aralıklarla uygulanan uyarım öbekleri gösterilmiştir.

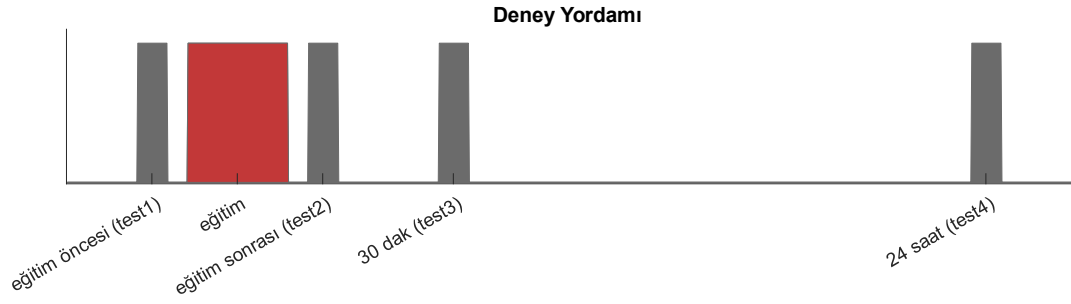
Kültür kabı mikroskop üzerinde bulunan MED bağlantı arayüzüne yerleştirilerek floresan görüntü alınmaya başlandı. Uyarıya uygun elektrot belirlemek için ağız kendiliğinden etkinliği kaydedildi. Kendiliğinden etkinlik kaydı incelenerek aktif olan sinir gövdelerinin yanında veya altında bulunan elektrot seçildi. Seçilen elektrodu aktifleştirmek için en yüksek genlikte (10 V) hazırlayıcı uyarı verildi. Arkasından en düşükten başlayarak hangi genlik seviyesinde ilk yanıt alındığı belirlendi. İlk yanıtın alındığı genlik seviyesi eşik değer olarak kabul edildi. Eşik değerinin bir üst seviyesi eğitim uyarısı olarak kullanıldı. Eşik değeri, bir alt ve bir üst genlik seviyeleri de test uyarısı olarak belirlendi.



Şekil 5.2.6.2 Test ve eğitim uyarıları ve genlikleri. Eşik, eşik altı ve eğitim genlikleri (üstte), eğitim genliğinde gerçekleştirilen uyarı dizisi (altta).

### 5.2.6.1. USPA Protokolü

- Hazırlayıcı Uyarı: Kullanılan (Seçilen) elektrot ve çevresindeki hücreler ile uygun etkileşim oluşturabilmek için en yüksek genlikte uyarı verilerek başlangıç yapıldı.
- İlaç Uygulama: Çeşitli antagonist ve düzenleyici gibi uygulamalar bu aşamada gerçekleştirildi. Gereken ilaçlarda etki süresi için 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> sağlayan inkübatörde 30 dk bekletildi.
- Test 1: Eğitim öncesinde eşik seviyesi altı, eşik seviyesi ve eşik seviyesi üstü genlikte test uyarısı verildi.
- Eğitim - Eşik üstü genlikte 3 dakika aralıklarla 10 kez uyarı verildi.
- Test 2: Eğitimin hemen ardından eşik seviyesi altı, eşik seviyesi ve eşik seviyesi üstü genlikte test uyarısı verildi.
- Test 3: Eğitimden 30 dakika sonra eşik seviyesi altı, eşik seviyesi ve eşik seviyesi üstü genlikte test uyarısı verildi.
- Test 4: Eğitimin ertesi gününde eşik seviyesi altı, eşik seviyesi ve eşik seviyesi üstü genlikte test uyarısı verildi.



Şekil 5.2.6.1.1 Deney yordamının çizimsel ifadesi

### 5.2.6.2. Deney Grupları

- A. USPA protokolünün uygulandığı grup
- B. Kontrol grubu: Eğitim uygulanmadan gerçekleştirilen USPA protokolü
- C. NMDA kanallarının bloklandığı grup: Antagonist olarak 100uM AP5 kullanıldı ve etkisinin yaygınlaşması için 30 dakika inkübatörde bekletildi
- D. NMDA, AMPA ve Kainat kanallarının bloklandığı grup: Antagonist olarak 100uM AP5 ve 10uM CNQX kullanıldı ve etkisinin yaygınlaşması için 30 dakika inkübatörde bekletildi
- E. USPA destekleyici olarak dopamin kullanılan grup: 100uM yeni hazırlanmış dopamin, protokolün çeşitli aşamalarında uygulandı.

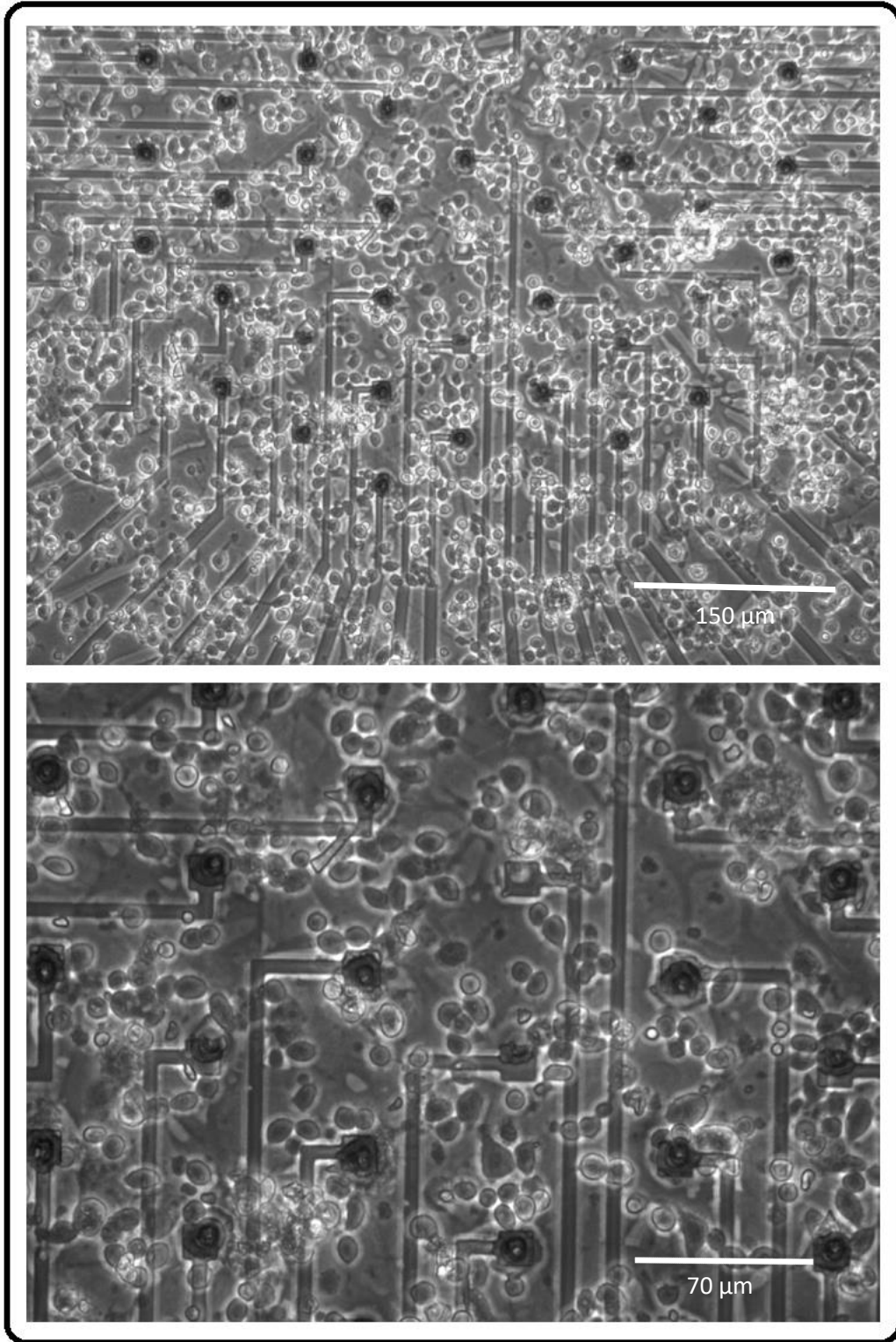
### 5.2.7. İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen ham veriler MATLAB üzerinde işlenerek tüm istatistiksel analizler (Çapraz korelasyon, Mann-Whitney U testi, Fisher testi ve standart hata) ve sonuç grafikleri yine bu yazılım üzerinde gerçekleştirilmiştir.

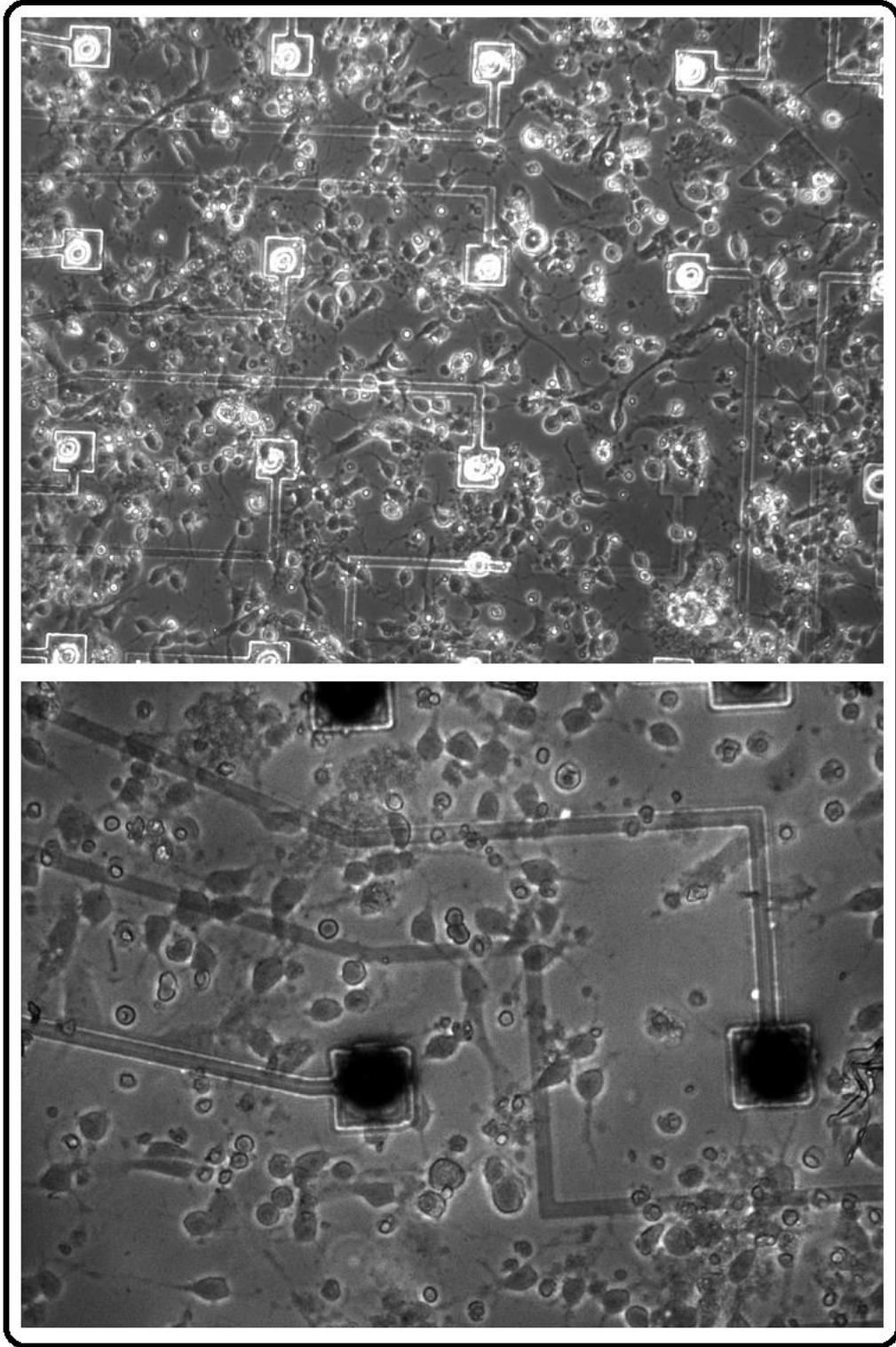
## 6. BULGULAR

### 6.1. Hipokampus Kùltürü

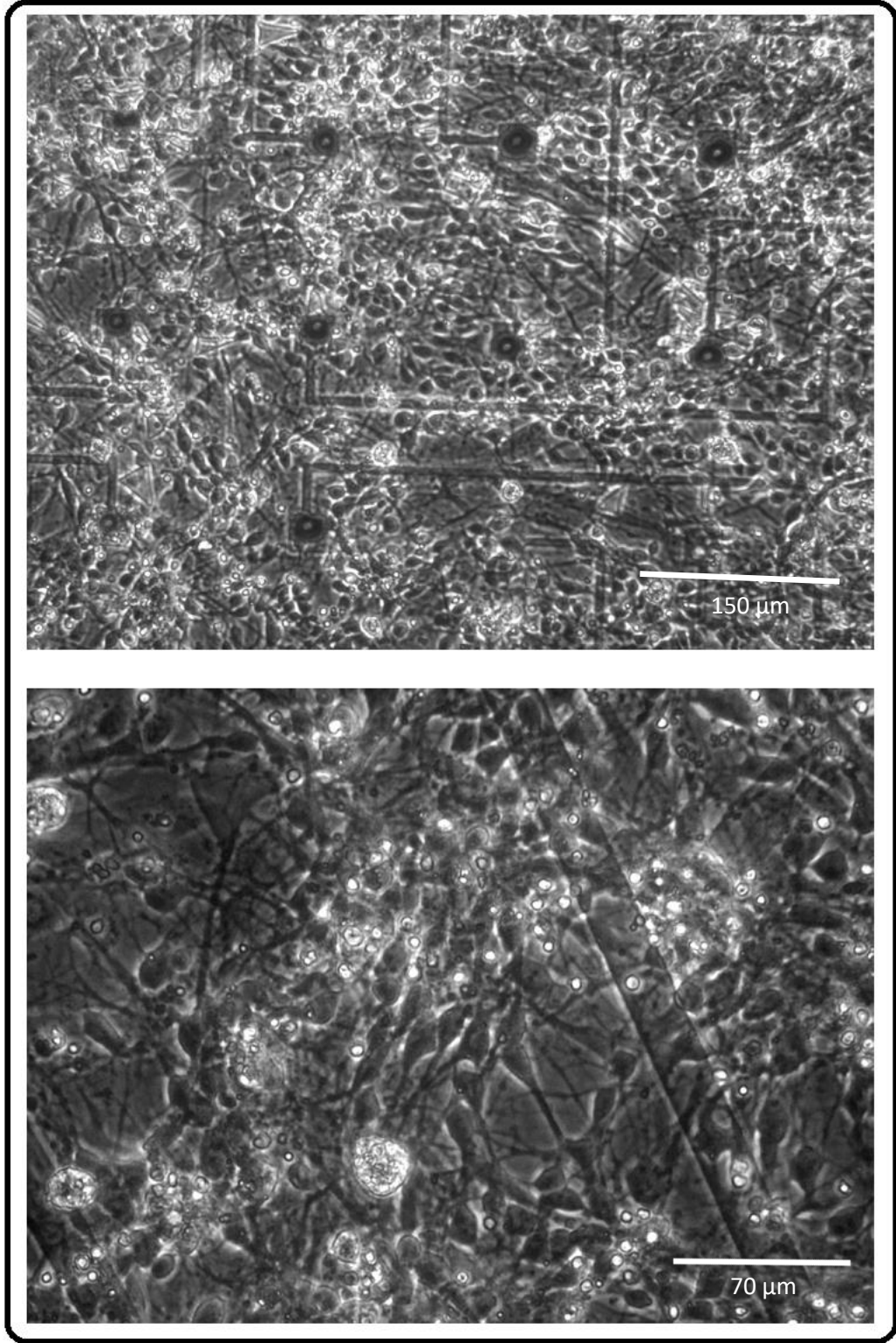
Geliştirilen hücre kùltürü protokolü ile sağlıklı hücre popùlasyonları elde edildi. Hücreler MED üzerine ekildi ve kullanılan kaplama sayesinde hücreler yüzeye tutunarak uzantı geliştirmeye başladı. Ekimden 1-2 saat sonrasında uzantılar seçilebilir ölçülere ulaştı. Şekil 1 de Div0 da (ekimden 1-2 saat sonra) 20x ve 40x objektiflerle faz kontrast mikroskobu kullanılarak alınan görüntüler gösterildi. Kùltürde 1. gününde (div1) hücre morfolojileri belirgin olarak görülür hale geldi. 2. gün ile birlikte hipokampal nöronların ağ kurma faaliyetlerinin arttığı görüldü. Div1 ve div2 resimleri Resim 6.1.1.'de gösterilmiştir. Sonraki günlerde ağ bağlantı ve yapılarının yoğunlaşması nedeni ile tek tek hücre görüntüleri almak zorlaşmaktadır. Bu yüzden kùltürün ilerleyen günlerinde floresan görüntüler tercih edildi. Kùltürün 2. günlerinde hücre vasatına AAV GCaMP eklendi ve yaklaşık 10. Günden itibaren hücrelerde GCaMP ifadesi belirgin olarak görülmeye başlandı.



Resim 6.1.1 Kültürün ekildiği günde ışık mikroskobu ile 20X(stte) ve 40X(Altta) büyütmede çekilen hücre görüntüleri



Resim 6.1.2 Kültürün birinci gününde ışık mikroskobu ile 20X(stte) ve 40X(Alta) büyütmede çekilen hücre görüntüleri

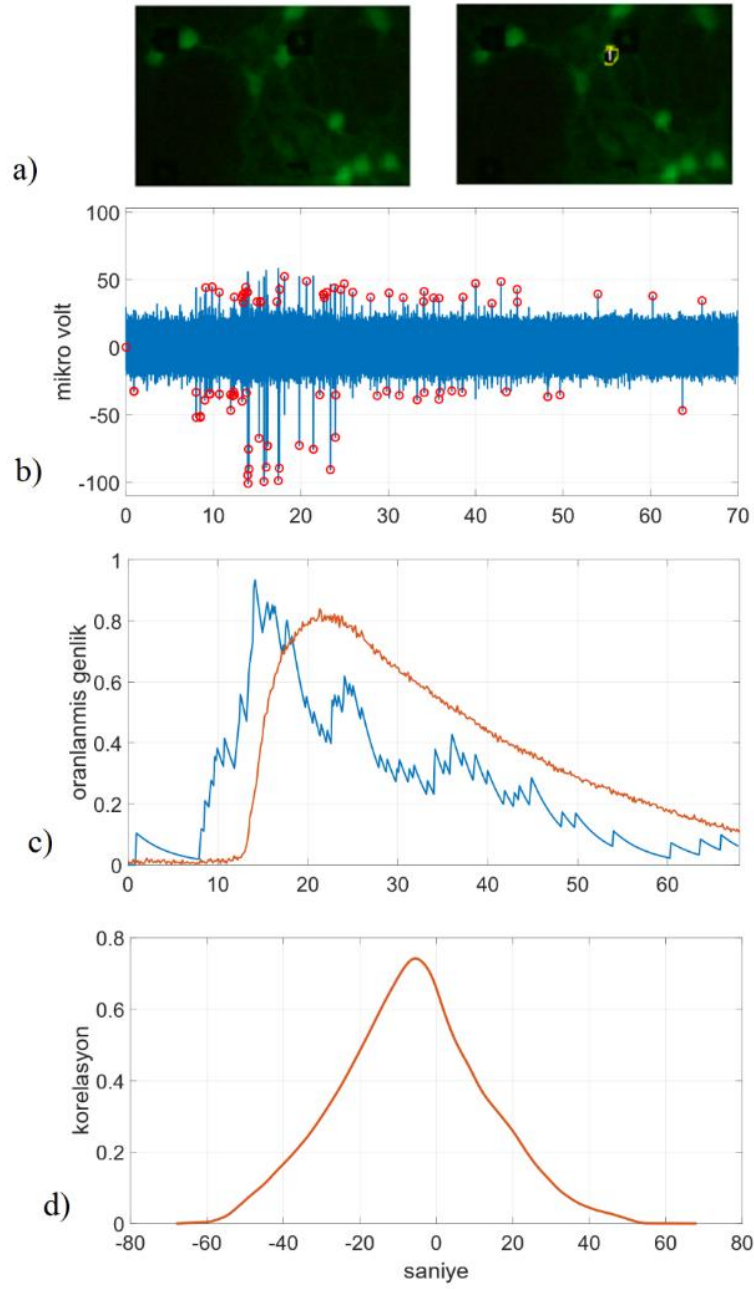


Resim 6.1.3 Kùltürün ikinci gününde ışık mikroskobu ile 20X(ùstte) ve 40X(Altta) bùyùtmede çekilen hücre görüntüleri

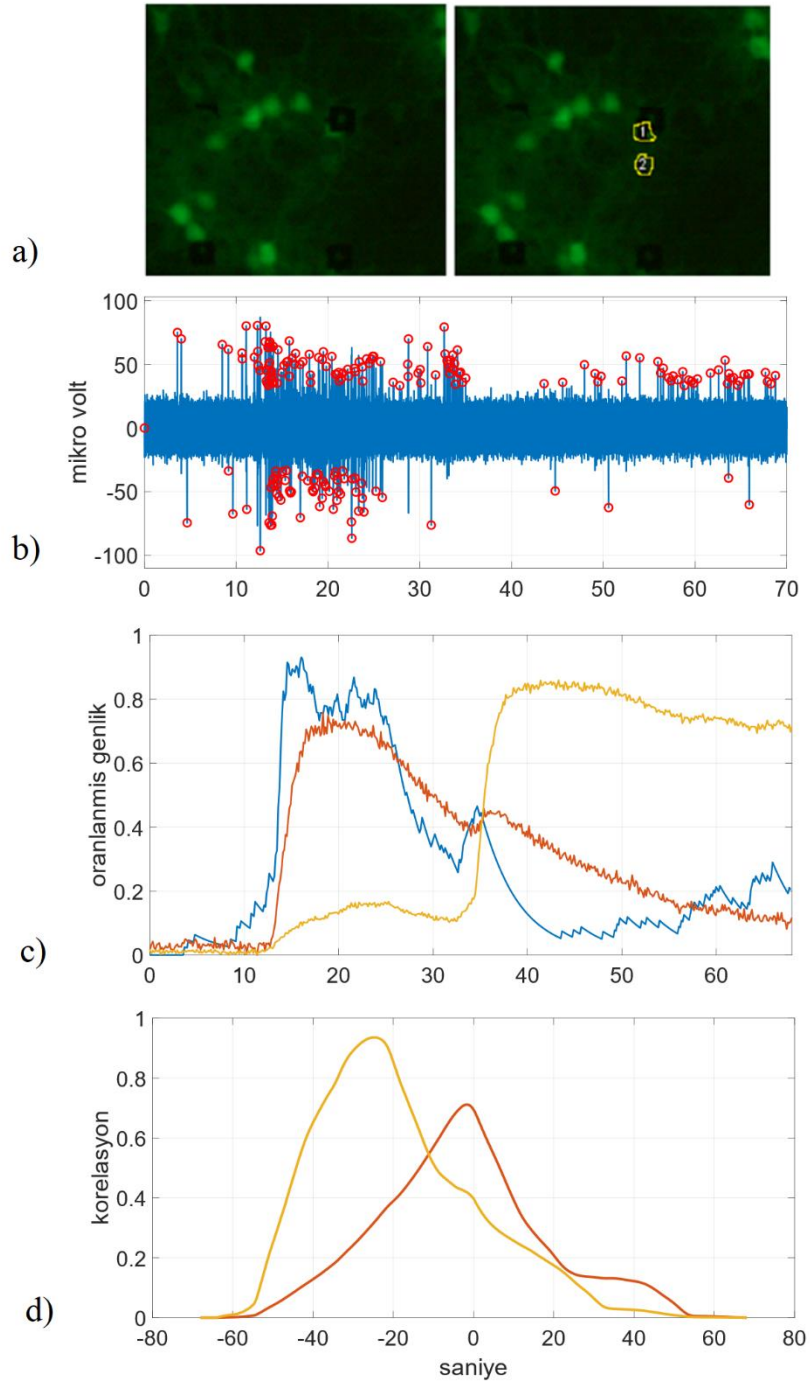


## 6.2. Elektriksel kayıt ile GCaMP görüntüsünün karşılaştırması

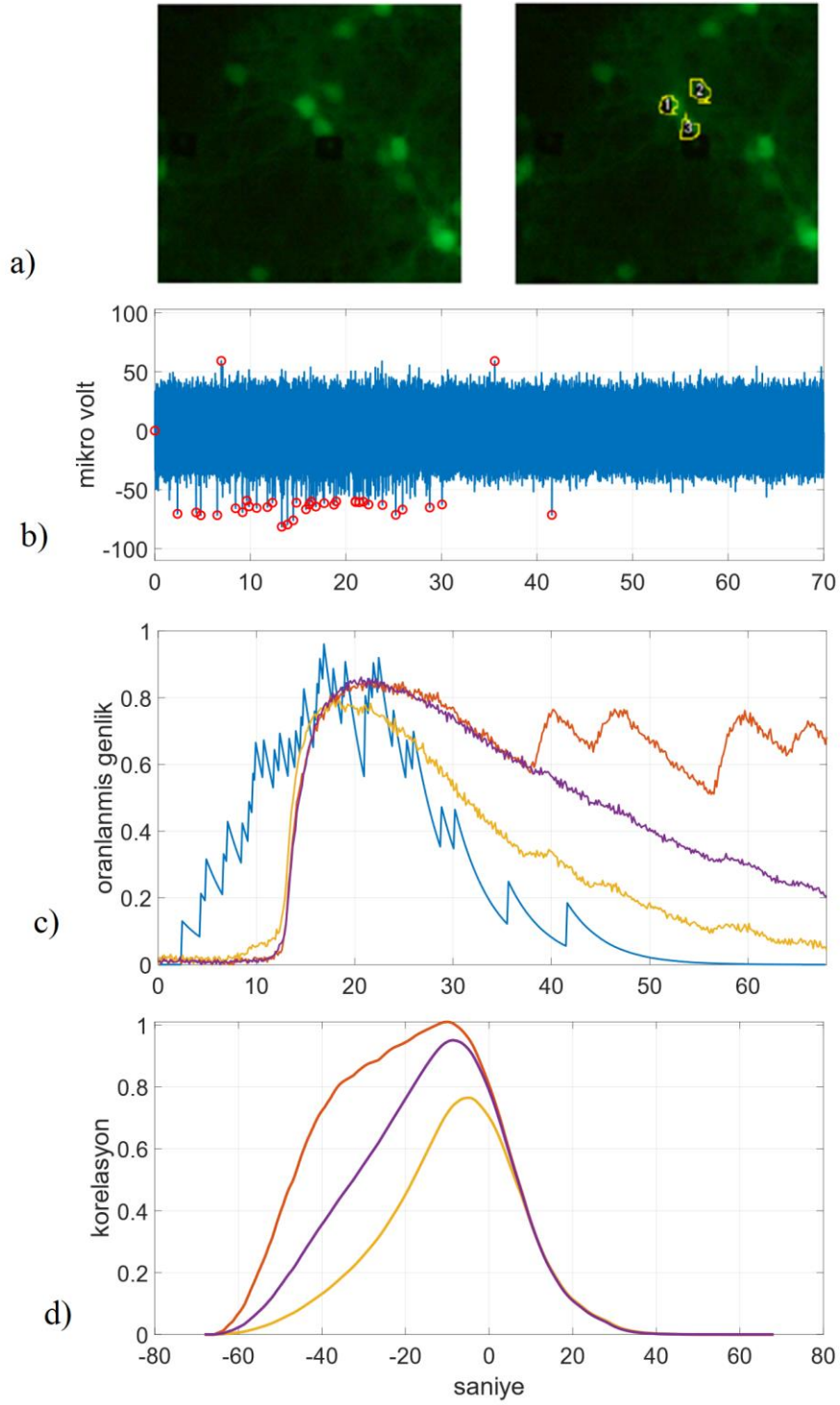
Elektriksel yanıt ve kalsiyum yanıtının benzerliklerini göstermek için aynı anda elektriksel kayıt alındı ve GCaMP görüntüldü. Bir elektrot yakınında bulunan birden fazla hücreden kayıt alınabildiğinden, Şekil 7.2.1-1, 2 ve 3'te bir elektrot çevresinde bulunan sırasıyla 1, 2, ve 3 aktif hücrenin yanıtları gösterilmiştir. a'da elektrot ve ilgili hücre veya hücrelerin konumu gösterilmiştir. b'de, elektriksel kayıt ile alınan ham iğnecik verileri mavi ile gösterilmiş, tespit edilen iğnecikler de kırmızı ile işaretlenmiştir. c'de ise iğnecik verisi kullanılarak modelden elde edilen toplam potansiyel değişim mavi ile, kalsiyum parlaklık değişimleri ise hücre sayısına göre sırasıyla kırmızı, sarı ve mor ile gösterilmiştir. d'de model çıktısı ile kalsiyum değişimlerinin çapraz korelasyonu verilmiştir.



Şekil 6.2.1 Seçilen bir hücreden alınan Elektriksel kayıt ve GCaMP kaydının karşılaştırılması. a) elektrot ve ilgili hücrenin konumu. b) elektriksel kayıt ile alınan ham iğnecik verisi. c) iğnecik verisi kullanılarak modellenen elde edilen toplam potansiyel değişim ve kalsiyum parlaklık değişimleri d) elektriksel kayıt ile kalsiyum değişimlerinin çapraz korelasyonu



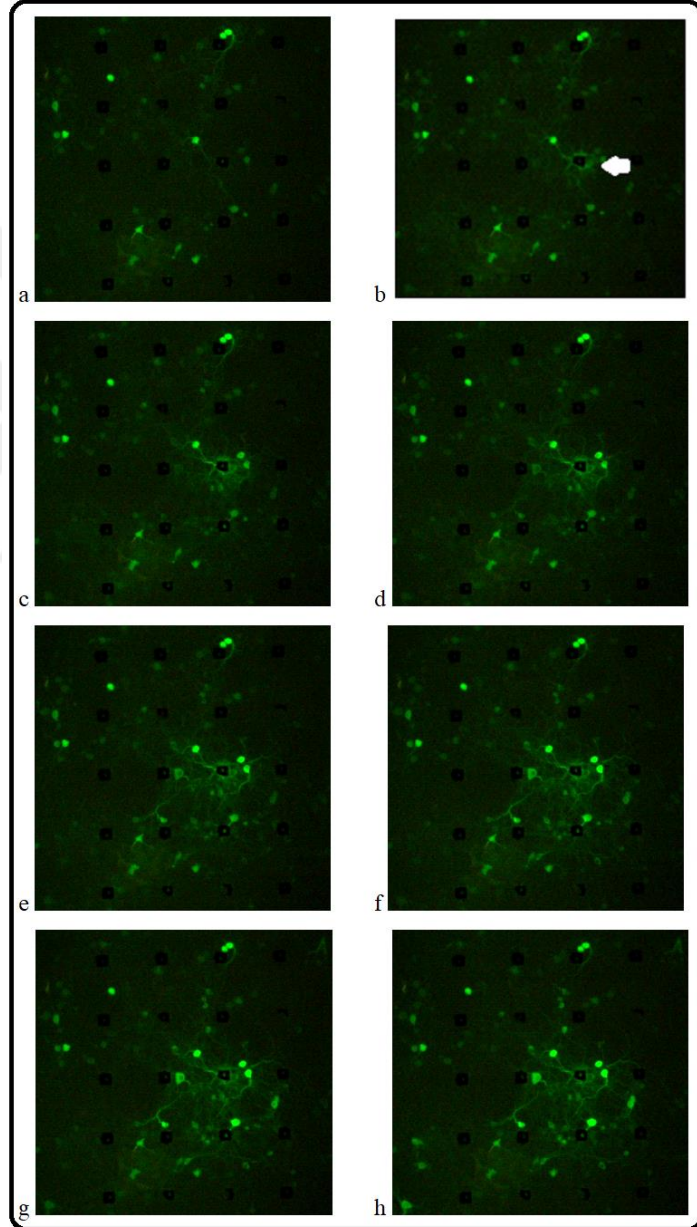
Şekil 6.2.2 Elektriksel kayıt ve GCaMP kaydının karşılaştırılması. a) elektrot ve ilgili hücrelerin konumu. b) elektriksel kayıt ile alınan ham iğnecik verisi. c) iğnecik verisi kullanılarak modellenen elde edilen toplam potansiyel değişim ve kalsiyum parlaklık değişimleri d) elektriksel kayıt ile kalsiyum değişimlerinin çapraz korelasyonu.



Şekil 6.2.3 Elektriksel kayıt ve GCaMP kaydının karşılaştırılması. a) elektrot ve ilgili hücrelerin konumu. b) elektriksel kayıt ile alınan ham iğnecik verisi. c) iğnecik verisi kullanılarak modellenen elde edilen toplam potansiyel değişim ve kalsiyum parlaklık değişimleri d) elektriksel kayıt ile kalsiyum değişimlerinin çapraz korelasyonu.

### 6.3. Elektriksel uyarı ile $Ca^{2+}$ etkinliğinin yayılması

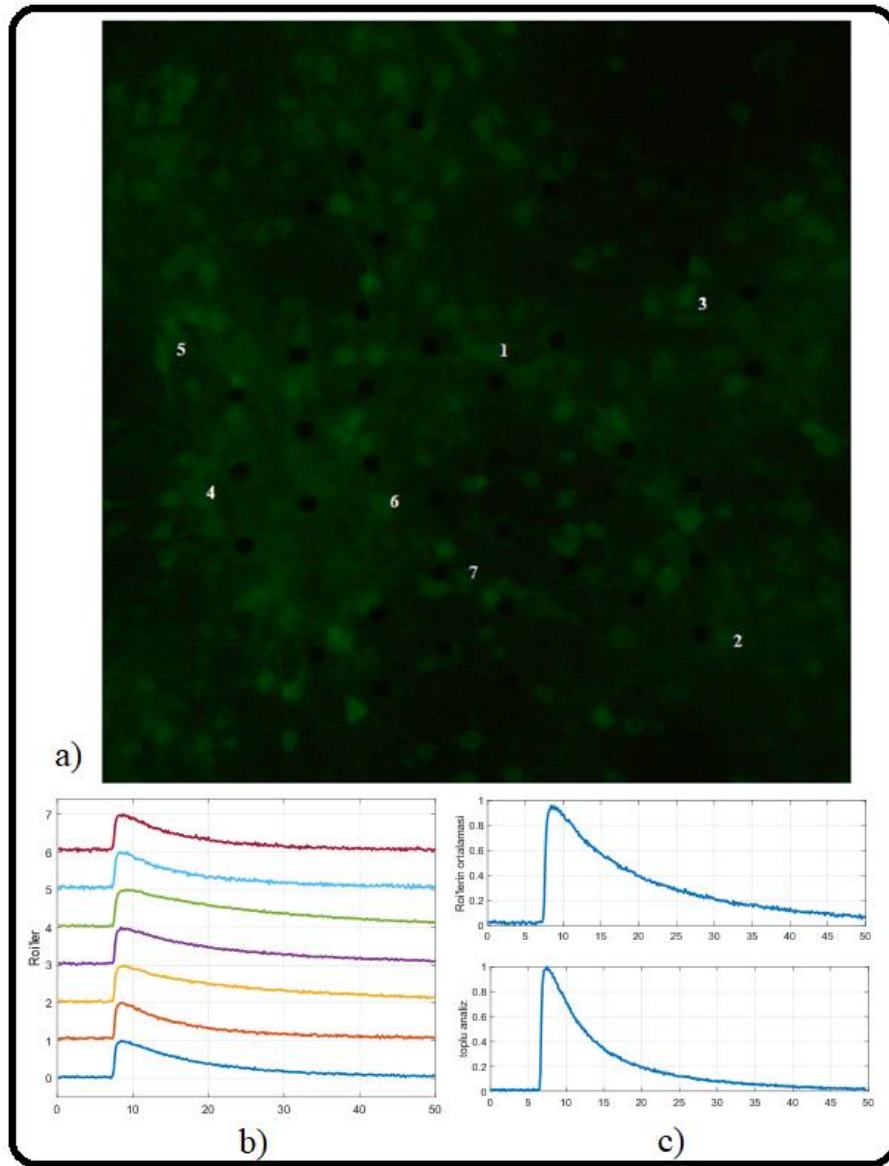
Resim 6.3.1'de 23. Gününde bir hipokampal kültürde elektriksel uyarının etkisiyle kalsiyum geçişinin yayılması gösterilmiştir. Resim 7.3.1-a'da uyarı öncesi görülmekte ve b'de ise beyaz okla gösterilen elektrotla yöntem ve gereç kısmında açıklanan uyarı uygulanmaktadır. Kalsiyum geçişinin elektrot çevresinden başlayarak gösterilen kesitteki ağın tümüne yayılışı c-h'de gösterilmiştir.



Resim 6.3.1 Elektriksel uyarı ile  $Ca^{2+}$  etkinliğinin yayılmasının aşama aşama gösterimi. a) Uyarı öncesi ağ görüntüsü b-h) Uyarı ile birlikte kalsiyum etkinliğinin tüm ağa yayılımı.

#### 6.4. Tek tek ve Toplu Analiz

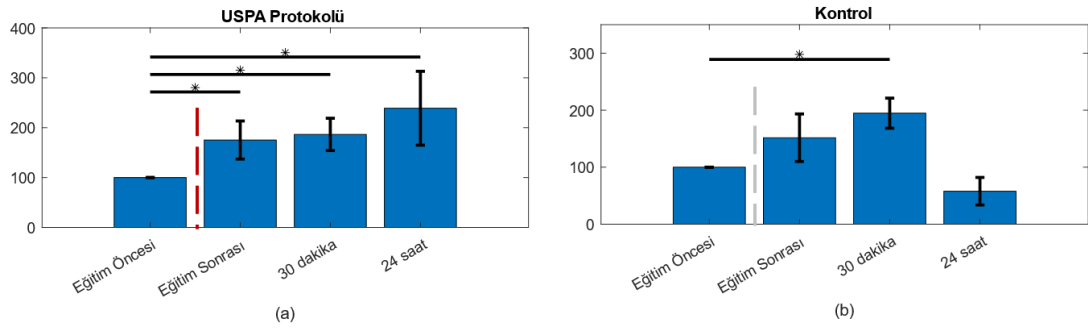
Şekil 7.4.1.-a’da görülen ağda iki ayrı analiz yapılmıştır. Bu analizlerden ilki yöntem ve gereç kısmında da açıklandığı gibi hücre gövdelerinin seçilmesiyle belirlenmiş olan bölgelerin ışık değişimlerini yerel olarak hesaplamaktadır. İkincisi ise tüm ağda görülen ışık değişimini toplam olarak ifade etmektedir. Şekil 7.4.1.-b’de yerel analizden elde edilen tek tek ROI’lere ait değişimler gösterilmiştir. Bu değişimlerin ortalaması Şekil 7.4.1.-c’de üstte gösterilirken toplam analizden elde edilen sonuçlar da altta gösterilmiştir.



Şekil 6.4.1 Ağ üzerinde seçilen ROI’lerin (a) yerel (b) ve toplam (c) analiz sonuçları

## 6.5. USPA Protokolünde Eğitimin Etkisinin İncelenmesi

USPA protokolünde test 1 ve test 2 arasında uygulanan eğitimin etkisini incelemek için eğitim süresi kadar ancak uyarı verilmeden beklenen bir kontrol deneyi tasarlanmıştır. Şekil 7.5.1.-a'da USPA protokolünün uygulandığı deneyin test sonuçları ve Şekil 7.5.1.-b'de kontrol deneyinin sonuçları gösterilmiştir. Eğitim uygulanan deneylerde görülen ikinci (eğitimin hemen ardından yapılan) ve üçüncü (eğitimden yarım saat sonra yapılan) testlerdeki artan potansiyel, eğitim uygulanmadığında da görülmüştür. Ancak ertesi gün yapılan dördüncü testte eğitimin etkisine bağlı olarak görülen potansiyel artışının sürdüğü, eğitim yapılmayan deneylerde potansiyel artışın olmadığı anlaşılmıştır.

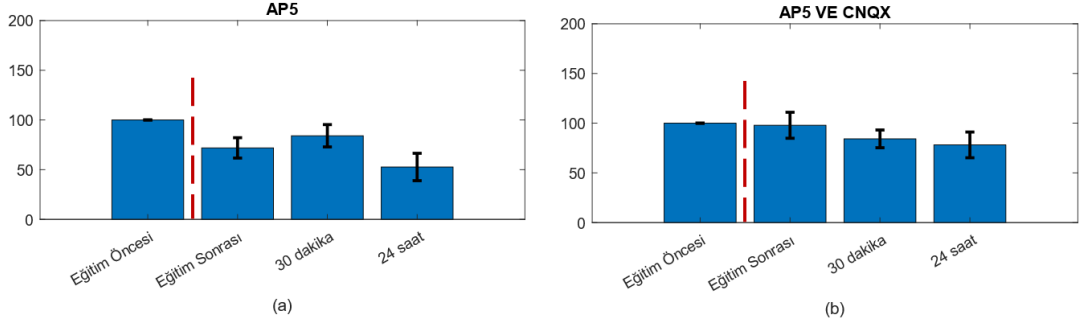


Şekil 6.5.1 a) eğitim yapılan (n=4) b) eğitim yapılmayan (n=3) deneylerden alınan test sonuçlarını göstermektedir. Yüzde artış mavi ile, standart hata siyah ile gösterilmiştir. Kırmızı kesikli çizgi eğitim aşamasının gerçekleştiğini, gri ise gerçekleşmediğini belirtmektedir. \*Mann-Whitney U-test, p<0.05

## 6.6. USPA Protokolünün Glutamaterjik Antagonistlerin Varlığı Altında Test Edilmesi

USPA protokolünü glutamaterjik antagonistlerin varlığı altında incelemek için iki ayrı deney grubu oluşturuldu. Normal protokolde görülen potansiyel artışının NMDA reseptörü ile ilgili olduğu düşünülerek ilk grupta da bu reseptör bloklandı. İkinci grupta ise NMDA reseptörü ile birlikte AMPA ve Kainat reseptörleri de bloklandı. Şekil 6.6.1.a'da NMDA reseptörünün, b'de ise NMDA, AMPA ve Kainat reseptörlerinin bloklandığı deneylerden elde edilen test sonuçları gösterilmiştir. Antagonistlerin

varlığında eğitim sonrası yapılan testlerde (test 2, 3 ve 4) potansiyel artışı olmamış, eğitim öncesine göre azalma gözlemlenmiştir.

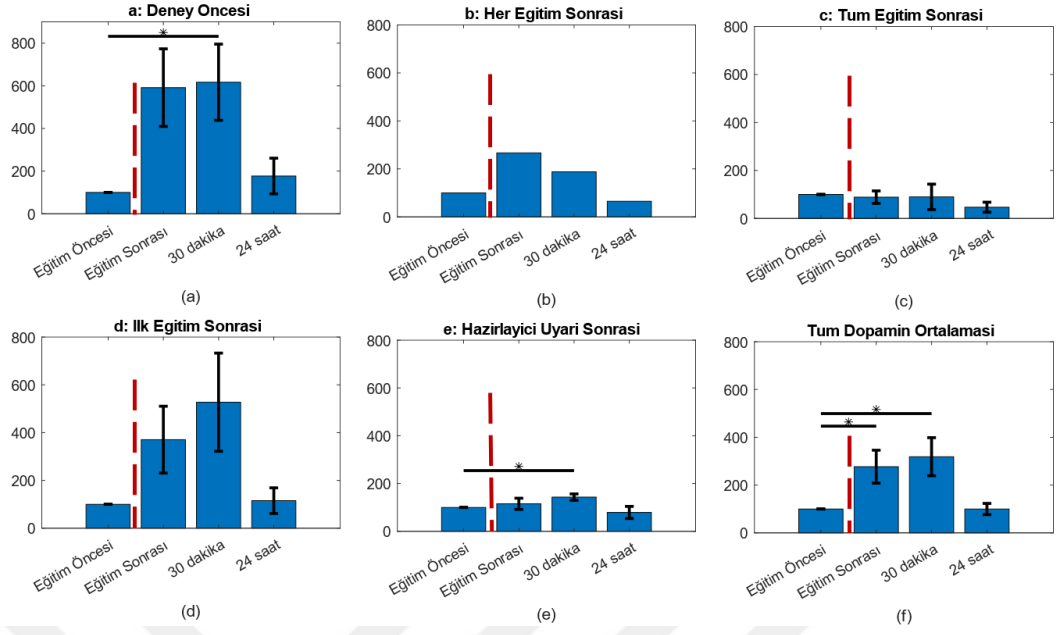


Şekil 6.6.1 a) AP5 varlığında (n=3) b) AP5 ve CNQX varlığında (n=2) uygulanan USPA protokolü sonuçları. Yüzde artış mavi ile, standart hata siyah ile gösterilmiştir. Kırmızı kesikli çizgi eğitim aşamasını temsil etmektedir.

## 6.7. USPA Protokolüne Modülör Olarak Dopaminin Etkisi

USPA protokolüne modülör olarak dopamin eklenmiştir. Modülasyonun etkin zamanını belirlemek amacı ile protokolün çeşitli aşamalarında kültürlere dopamin (100uM) verilmiştir. Bu aşamalar (a) deney öncesi, (b) her bir eğitim uyarısı sonrası 1/10 doz, (c) tüm eğitim sonrası, (d) ilk eğitim uyarısı sonrası (e) hazırlayıcı uyarı sonrası olarak seçilmiştir. Bu deneylerden alınan test sonuçları sırasıyla şekil 6.7.1- a- e'de gösterilmiştir. Dopamin uygulanarak yapılan tüm deneyler bir arada değerlendirildiğinde de 6.7.1.f'deki ortalama sonuçlar elde edilmiştir.

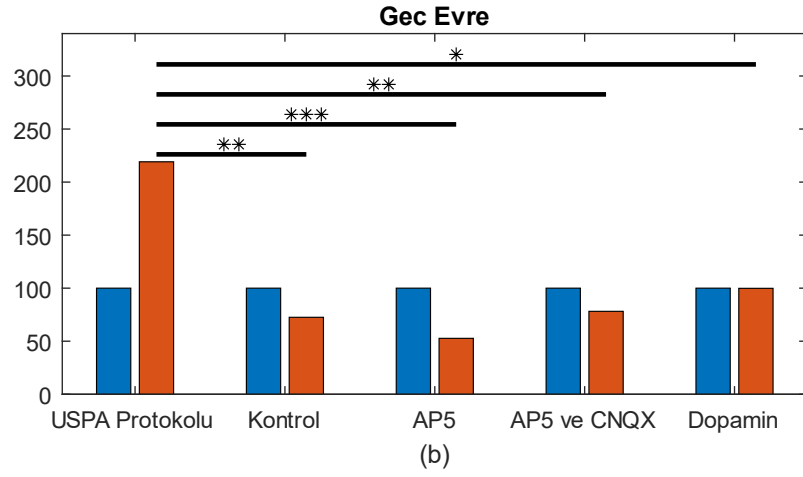
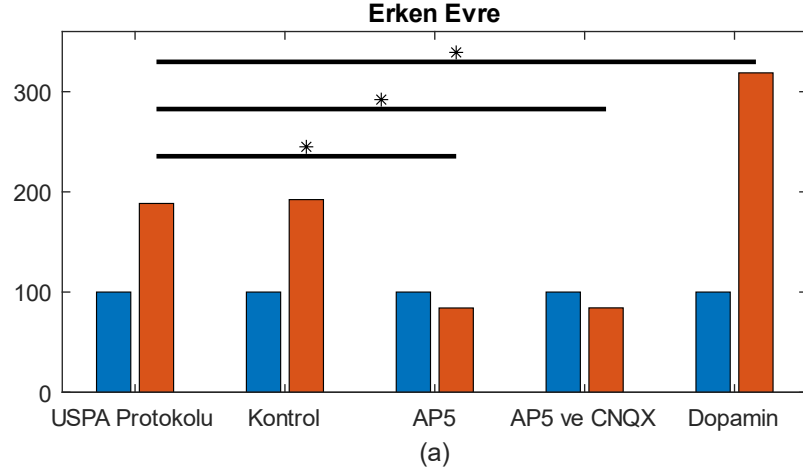




Şekil 6.7.1 USPA protokolünün farklı aşamalarında, a) Deney öncesi (n=3), b) Her bir eğitim ardından 1/10 doz ölçeğinde (n=1), c) Eğitim tamamlandıktan sonra (n=3), d) İlk eğitimin ardından (n=3), e) Hazırlayıcı uyarının ardından (n=4) dopamin uygulamaları. f) Tüm dopamin deneylerinin ortalaması (n=14). Yüzde artış mavi ile, standart hata siyah ile gösterilmiştir. \*Mann-Whitney U-test  $p < 0.05$

## 6.8. USPA Protokolünün Erken ve Geç Evre Karşılıkları

Test sonuçlarından elde edilen potansiyel değişimleri tüm deney grupları için oranlanarak USPA'nın erken ve geç evreleri bağlamında bir karşılaştırma yapılmıştır. Beş deney grubu için erken ve geç evre değerlendirmeleri Şekil 6.8.1.a'da ve b'de özetlenmiştir. Erken evre ilk eğitimin bir saat sonrasında, geç evre ise deneyin ertesi gününde yapılan testler üzerinden incelenmiştir.



Şekil 6.8.1 Deney gruplarına göre USPA'nın a) erken evresi ve b) geç evresinde gerçekleşen % değişimler. Mavi: eğitim öncesi test uyarısı, Kırmızı (a): eğitimden yarım saat sonra verilen test uyarısı (a), Kırmızı (b): eğitimden yaklaşık 24 saat sonra verilen test uyarısı sonuçları. USPA protokolü ile diğer grupların Fisher test ile ikili karşılaştırma sonuçlarının p değeri istatistikleri. (\*  $p < 5e-3$ , \*\*  $p < 5e-6$ , \*\*\*  $p < 5e-9$ )

Erken evrede, eğitimin yapılması ya da yapılmaması potansiyel artışında bir fark oluşturmamaktadır. Bloklama yapılan deney gruplarında ise erken evre potansiyel artışı engellenmiştir. Dopamin uygulanan deneyler bir arada değerlendirildiğinde ise erken evrede yüksek bir potansiyel artışı görülmüştür. Geç evrede ise potansiyel artışı yalnızca USPA protokolü grubunda görülmüş, kontrol, bloklama ve dopamin

gruplarında ise potansiyel değişim deney öncesi düzeyinde veya bu düzeyin altında seyretmiştir.



## 7. TARTIŞMA

Bu çalışmada, ayrıştırılmış hipokampal kültürlerde gelişen sinirsel ağlarda, dışarıdan verilen uyarıların kodlanması ve öğrenilmesinin araştırılması için yeni bir yaklaşım kullanıldı. Kullanılan yöntemlerden MED ile yerel elektriksel uyarılar verilebildi ve kalsiyum görüntüleme yöntemi ile elektriksel kayıttan elde edilemeyen uzaysal ayrıntılar elde edildi (45). Böylece ağ tepkisinin uyarıya bağlı etkinliğin başladığı elektrot bölgesinden ağın hangi bölgelerine hangi hücreler üzerinden yayıldığı bilgisi elde edilmiş oldu. Yüksek zamansal çözünürlükteki elektriksel etkinlik verileri modellenerek kalsiyum geçiş verileri ile karşılaştırılabilir hale getirildi. Daha önce yapılan çalışmalarda (46) gösterilen iki yöntemin ortak yanları ile paralel sonuçlar elde edildi. Ayrıca iğnecik verisi modellenerek kalsiyum yanıtına oldukça yakın zaman cevapları oluşturuldu. Korelasyon analizi kullanılarak iki yöntemden elde edilen sonuçların benzerlikleri ortaya kondu. Bunun sonucu olarak da zamansal olarak düşük çözünürlükteki kalsiyum görüntülemeden elde edilen yanıtların ağdaki değişimleri toplamsal olarak yakalayabilir ve yansıtabilir olduğu gösterilmiş oldu.

Ayrıştırılmış sinirsel ağların kullanıldığı ve mikro elektrot dizilerinden yararlanılarak gerçekleştirilen önceki çalışmalarda, öğrenme ve uzun süren potansiyel artışının elde edilemediği rapor edilmiştir (47) (48) (45). Kesitler kullanılarak yama kısıncı yöntemi ile gerçekleştirilmiş standart protokoller ayrıştırılmış sinirsel ağlara uyarlandığında ise elde edilen sonuçlar farklı bir yanıt çeşitliliği oluşturmuştur (4) (49). Bu yanıt çeşitliliğinin ortaya çıkmasının nedeni, kesitlerde korunan anatomik yapının ayrıştırılmış sinirsel ağlarda ortadan kalkması, hücrelerin karışık ve rasgele yerleşerek yeniden organize olmalarının sonucu olabilir. Ağ yapısının ve ağ etkinliğin işlevsel olarak görüntülenmesi ile yalnızca MED kullanıldığında karşılaşılan kısıtların ve düzensizliklerin ortadan kalkacağı düşünülmektedir (50). Bu çalışmada, MED üzerine ekilmiş ayrıştırılmış sinirsel ağlarda uzun süren potansiyel artışı inceleyebilmek için yeni bir protokol geliştirildi. Bu protokolda, MED ile alınan hücre dışı iğnecik etkinliği yerine çıktı olarak iğnecik etkinliğini toplamsal olarak yansıtan kalsiyum etkinliğinden yararlanılmıştır. Bu nedenle yalnızca MED kullanılarak

gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan uyarı protokollerinden farklı bir protokol tasarlanmıştır.

Geliştirilen protokolde uyarının tekrarlanması ile yapılan eğitim aşamasının etkisi kontrol deneyleri yapılarak incelendi. Uzun süren potansiyel artışın erken evresinin eğitim aşamasına bağlı olmaksızın gerçekleştiği görüldü. Buna karşın geç evrenin oluşumunda eğitim aşamasının gerekli olduğu gösterildi. Bu bulgular önceki çalışmalarla uyumludur (13). Uzun süren potansiyel artışta birincil etkiye sahip olduğu düşünülen NMDA reseptörlerinin (24) (25) hem tek başına bloklandığı, hem de USPA'nın farklı bir türünde etkin olan (26) AMPA ve Kainat reseptörleri ile birlikte bloklandığı deneyler gerçekleştirilerek geçmiş çalışmalara uygun bulgular elde edildi. Bu bulgularda görülen sonuçlar incelendiğinde, her iki bloklayıcı seçeneğinin de uzun süren potansiyel artışın hem erken hem de geç evrelerinin oluşmasını engellediği gözlemlendi.

Etkinliğe bağlı potansiyel artış kısa süreli bellek ile ve düzenleyici girdiye bağlı potansiyel artış uzun süreli bellek ile ilişkilendirilmektedir (51). Bu ilişkiyi test etmek için düzenleyici girdi olarak dopaminin kullanıldığı keşif amaçlı deneyler gerçekleştirilerek geliştirilen protokolün yaygın kullanılabilirliği test edilmiş oldu. Geçmiş çalışmalarda, yeni girdi (52) ve ödül (53) ile ilişkili anlarda dopamin salınımının gerçekleştiği ve USPA'ya katkı sağladığı belirtilmiştir. Buradan yola çıkılarak bu çalışmada da USPA protokolünün farklı aşamalarında dopamin uygulaması denendi. Deney başlangıcında ve ilk uyarı arkasından gerçekleştirilen uygulamaların erken evre potansiyel artışında katkısı olduğu görülürken eğitim tamamlandıktan sonra gerçekleştirilen uygulamada potansiyel azalışı gözlemlendi. Yanı sıra dopamin uygulama anına bağlı olmaksızın geç evre oluşumunda belirgin bir etki görülmedi. Tüm dopamin deneyleri bir arada incelendiğinde ise USPA'nın erken evresinde belirgin artış olduğu ancak geç evresinde değişiklik olmadığı önceki bir çalışmayla uyumlu olarak gösterildi (28). Buna karşın dopaminin USPA'nın geç evresinin oluşumunda düzenleyici bir girdi olarak gerekli olduğu da belirtilmiştir (33). Önceki bu iki çalışmadaki karşıt bulgular D1 ve D2 dopamin reseptör gruplarının uyaran ve bastırıcı türde karşıt etkiler oluşturmalarından (54) kaynaklanıyor olabilir. Bu çalışmada da elde edilen kimi karşıtlık içeren bulgular da ayrıştırılmış sinirsel ağ özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir. Nitekim hipokampus içerisinde, D1 ve D2

reseptörlerinin hangi hücre tipinde veya topluluğunda ne ölçüde ifade edildiği açık olarak tanımlanmamıştır (55).

Bu çalışmada yalnızca genliğin değişken olarak kullanıldığı bir uyarı protokolü ile çalışıldı ancak uyarı sıklığının da değişken olarak kullanılabilceği deneyler sonraki çalışmalara bırakıldı. Bunun dışında protokolde yer alan eğitim aşaması belirli periyotlarla tekrarlanarak kalıcı bellek oluşumu incelenebilir. Bu yöntemin zamansal olarak zayıf olabilecek olan yanını iyileştirmek üzere, örneğin kalsiyum indikatörü yerine yama kıskacı yöntemiyle aynı hassasiyete sahip (56) bir voltaj indikatörü olan ASAP kullanılabilir.



## 8. SONUÇ

Bu çalışmada MED ile yerel uyarı uygulayarak ve GCaMP ile yüksek uzaysal çözünürlük ile görüntüleme sağlayarak, ayrıştırılmış sinirsel ağlarda USPA oluşturabilmek için yeni bir yöntem geliştirildi. Bu yöntemin geçerliliği bloklama ve kontrol deneyleri ile doğrulandı. Yeni geliştirilen protokol kullanılarak dopaminin USPA üzerindeki modülatör etkisi incelendi. Bu protokolda dopamin USPA'nın erken evresine etki ederken geç evresine etki etmediği gözlemlendi. Bu yöntem öğrenme ve bellek oluşumu ile ilgili çalışmalarda kullanılabileceği gibi, ayrıştırılmış sinirsel ağların sergilediği yerel uyarılma, etkinlik yayılımı, ağ örgüsü ve bu örgüde yer alan hücrelerin davranışları gibi özellikleri inceleyebilmek için uygun bir ortam sağlayacaktır.

## 9. KAYNAKLAR

1. Marder CP, Buonomano D V. Timing and Balance of Inhibition Enhance the Effect of Long-Term Potentiation on Cell Firing. 2004;24(40):8873–8884.
2. Marom S, Eytan D. Learning in ex-vivo developing networks of cortical neurons. *Prog. Brain Res.* 2004;147(SPEC. ISS.):189–199.
3. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD : An Embarrassment of Riches. 2004;44:5–21.
4. Chiappalone M, Massobrio P, Martinoia S. Network plasticity in cortical assemblies. *Eur. J. Neurosci.* 2008;28(1):221–237.
5. Nicoll RA, Schmitz D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005;6(11):863–876.
6. Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 2002;64:355–405.
7. Turrigiano GG, Nelson SB. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000;10(3):358–364.
8. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses. *Science (80-. ).* 2001;294(5544):1030–1038.
9. Bear MF, Malenka RC, Francisco S. Synaptic plasticity : LTP and LTD.
10. Siegelbaum SA, Kandel ER. synaptic plasticity : LTP and LTD.
11. Xu J, Kang N, Jiang L, Nedergaard M, Kang J. Activity-Dependent Long-Term Potentiation of Intrinsic Excitability in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. 2005;25(7):1750–1760.
12. Vose LR, Stanton PK. Current Neuropharmacology Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.ae](mailto:reprints@benthamscience.ae) Synaptic Plasticity, Metaplasticity and Depression. *Curr. Neuropharmacol.* 2017;15:71–86.



13. Nguyen P V, Abel T, Kandel ER. 111111TI,I. :2–5.
14. Voglis G, Tavernarakis N. The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep.* 2006;7(11):1104–1110.
15. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996;87(7):1327–1338.
16. Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, vd. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 2005;47(6):859–872.
17. Lüscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic. 2000:545–550.
18. Gouaux E. Structure and function of AMPA receptors. *J. Physiol.* 2004;554(2):249–253.
19. Lu WY, Man HY, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 2001;29(1):243–254.
20. Ferrer-montiel A V, Montal M. glutamate receptor. 1996;93(3):2741–2744.
21. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 1999;51(1):7–61.
22. Daw NW. THE ROLE OF NMDA. 1990:207–222.
23. Abel T, Nguyen P V., Barad M, Deuel TAS, Kandel ER, Bourchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 1997;88(5):615–626.
24. Bliss TVP, Gardner-Medwin AR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 1973;232(2):357–374.
25. Morris RGM et al. 1986. Selective impairment of learning and bloakde of

- long-term potentiation by an NMDA receptor antagonist, AP5. *Nature* 1986;319:774–776.
26. Lauri SE, Bortolotto ZA, Nistico R, Bleakman D, Ornstein PL, Lodge D, vd. A Role for Ca<sup>2+</sup> Stores in Kainate Receptor- Dependent Synaptic Facilitation and LTP at Mossy Fiber Synapses in the Hippocampus Eli Lilly and Company. 2003;39:327–341.
  27. Pignatelli M, Bonci A. Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron* 2015;86(5):1145–1157.
  28. Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 2005;46(5):703–713.
  29. Broussard JI, Yang K, Levine AT, Tsetsenis T, Jenson D, Cao F, vd. Dopamine Regulates Aversive Contextual Learning and Associated In Vivo Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Cell Rep.* 2016;14(8):1930–1939.
  30. Papaleonidopoulos V, Kouvaros S, Papatheodoropoulos C. Effects of endogenous and exogenous D1 / D5 dopamine receptor activation on LTP in ventral and dorsal CA1 hippocampal synapses. 2018;(November 2017):1–12.
  31. Mu Y, Zhao C, Gage FH. Dopaminergic modulation of cortical inputs during maturation of adult-born dentate granule cells. *J. Neurosci.* 2011;31(11):4113–4123.
  32. Hansen N, Manahan-Vaughan D. Dopamine D1/D5 receptors mediate informational saliency that promotes persistent hippocampal long-term plasticity. *Cereb. Cortex* 2014;24(4):845–858.
  33. Sajikumar S, Frey JU. Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2004;82(1):12–25.
  34. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. THE VERSATILITY AND SIGNALLING. 2000;1(October).
  35. Grienberger C, Konnerth A. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron* 2012;73(5):862–885.

36. Sun XR, Lynch LA, Wang SS, Badura A, Sun XR, Giovannucci A, vd. Fast calcium sensor proteins for monitoring neural activity monitoring neural activity. 2018. doi:10.1117/1.NPh.1.2.025008.
37. Muto A, Ohkura M, Abe G. Report Real-Time Visualization of Neuronal Activity during Perception. *Curr. Biol.* 2013;23(4):307–311.
38. Ohkura M, Sasaki T, Sadakari J, Gengyo-ando K, Kagawa- Y. Genetically Encoded Green Fluorescent Ca<sup>2+</sup> Indicators with Improved Detectability for Neuronal Ca<sup>2+</sup> Signals. 2012;7(12):1–10.
39. Potter SM. Distributed processing in cultured neuronal networks. *Prog. Brain Res.* 2001;130:49–62.
40. Obien MEJ, Deligkaris K, Bullmann T, Bakkum DJ, Frey U. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Front. Neurosci.* 2015;9(JAN):423.
41. Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C. The origin of extracellular fields and currents — EEG , ECoG , LFP and spikes. 2012;13(June):407–420.
42. Pimashkin A, Gladkov A, Agrba E, Mukhina I, Kazantsev V. Selectivity of stimulus induced responses in cultured hippocampal networks on microelectrode arrays. *Cogn. Neurodyn.* 2016;10(4):287–299.
43. Jimbo Y, Kasai N, Torimitsu K, Tateno T, Robinson HPC. A system for MEA-based multisite stimulation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2003;50(2):241–248.
44. Stett A, Egert U, Guenther E, Hofmann F, Meyer T, Nisch W. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. 2003:486–495.
45. Paolo Massobrio, Jacopo Tessadori, Michela Ciappalone MG. In Vitro Studies of Neuronal Network and Synaptic Plasticity in Invertebrates and in Mammals Using Multielectode Arrays. *Neural Plast.* 2015;2015.
46. Hamasaki Y, Haba N, Iwata N, Uno Y, Saito M. Simultaneous Measurement

- of Neural Activities of Acute Mouse Hippocampal Slices Using Multi-Electrode Array System and Laser Confocal Calcium Imaging. *J. Behav. Brain Sci.* 2017;07(02):68–78.
47. Wagenaar DA, Pine J, Potter SM. Searching for plasticity in dissociated cortical cultures on multi-electrode arrays. *J. Negat. Results Biomed.* 2006;5. doi:10.1186/1477-5751-5-16.
  48. Van Staveren GW, Buitenweg JR, Marani E, Rutten WLC. The effect of training of cultured neuronal networks, can they learn ? *2nd Int. IEEE EMBS Conf. Neural Eng.* 2005;2005:328–331.
  49. Massobrio P, Tessadori J, Chiappalone M, Ghirardi M. In vitro studies of neuronal networks and synaptic plasticity in invertebrates and in mammals using multielectrode arrays. *Neural Plast.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/196195.
  50. Cohen E, Ivenshitz M, Amor-baroukh V, Greenberger V, Segal M. Determinants of spontaneous activity in networks of cultured hippocampus. 2008;35:0–9.
  51. Bailey CH, Giustetto M, Huang Y, Hawkins RD, Kandel ER. IS HETEROSYNAPTIC MODULATION ESSENTIAL FOR STABILIZING HEBBIAN PLASTICITY AND MEMORY ? 2000;1(October):1–10.
  52. Ihalainen JA, Riekkinen P, Feenstra MGP. Comparison of dopamine and noradrenaline release in mouse prefrontal cortex, striatum and hippocampus using microdialysis. *Neurosci. Lett.* 1999;277(2):71–74.
  53. Morrens J, Aydin Ç, Janse van Rensburg A, Esquivelzeta Rabell J, Haesler S. Cue-Evoked Dopamine Promotes Conditioned Responding during Learning. *Neuron* 2020;106(1):142-153.e7.
  54. Smialowski A, Bijak M. EXCITATORY AND INHIBITORY ACTION OF DOPAMINE ON HIPPOCAMPAL NEURONS IN VITRO . INVOLVEMENT OF D2 AND D , RECEPTORS. 1987;23(I):95–101.
  55. Gangarossa G, Longueville S, De Bundel D, Perroy J, Hervé D, Girault JA,

vd. Characterization of dopamine D1 and D2 receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus* 2012;22(12):2199–2207.

56. Villette V, Chavarha M, Dimov IK, Bradley J, Pradhan L, Mathieu B, vd. Ultrafast Two-Photon Imaging of a High-Gain Voltage Indicator in Awake Behaving Mice. *Cell* 2019;179(7):1590-1608.e23.



# ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
29/08/2019	49		Prof. Dr. Gürkan Öztürk

“Mikro Elektrot Düzenegi ve Optogenetik Araçlar Kullanılarak Hipokampal Nöronlarda Bellek Oluşumunun İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “**Oybirliği**” ile karar verilmiştir.

**Etik Onay Geçerlilik Süresi:** 1 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Sevginur	<b>Soyadı</b>	Bostan
<b>Doğum Yeri</b>	Rize	<b>Doğum Tarihi</b>	06-07-1990
<b>Uyruğu</b>	Türkiye	<b>TC Kimlik No</b>	
<b>E-mail</b>	sbostan@medipol.edu.tr	<b>Tel</b>	

## Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>	-	-
<b>Yüksek Lisans</b>	-	-
<b>Lisans</b>	Hacettepe Üniversitesi - Ankara	2015
<b>Lise</b>	Etimesgut Anadolu Lisesi - Ankara	2008

## İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (yıl-yıl)</b>
1. Araştırma Görevlisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	2019 -

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi
İspanyolca	Çok iyi	İyi	İyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

<b>Yabancı Dil Sınav Notu</b> □								
YÖKDİL	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
86,25	77.50	7.0						

□□Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

□□KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	76,30710	78,28390	71,28958
<b>(Diğer) Puanı</b>			

## Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>
MATLAB	Orta

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin