TIPTEKNO'19
TIP TEKNOLOJİLERİ KONGRESİ
MEDICAL TECHNOLOGIES CONGRESS
3-5 Ekim 2019
Kuşadası / Aydın

PC12 Sinir Hücrelerinin Mikroçip Üzerinde Uzun Süreli Elektriksel Stimülasyonu
Prolonged Electrical Stimulation of Neuronal PC12 Cells Using a Microchip

Fikri Seven[1], Tansu Gölcez[1], Mert Şahinler[2], Aylin Şendemir[2], Ozan Karaman[1] ve Mustafa Şen[1]
[1]Biyomedikal Mühendisliği, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye
[2]Biyomühendislik Bölümü, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye
mustafa.sen@ikc.edu.tr

Özetçe **—PC12 hücreleri nöronal farklılaşma davranışının incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır. Bu hücre hattında sinir büyüme faktörü (NGF) varlığında farklılaşarak nörit, dentrit ve akson olarak adlandırılan çıkıntılar oluşur. İnvazif olmayan elektriksel stimülasyon nöron hücrelerinin aktivitesinin kontrolünde ve rejenerasyonunda kullanım potansiyelinin olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada bir mikroçip yardımıyla uzun süreli elektriksel stimülasyonun PC12 hücrelerinin davranışı ve NGF varlığında farklılaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elektriksel uyarım günde 2 saat olmak üzere 2 gün ve tüm gün (24 saat) şeklinde uygulanmış ve sonuçlar elektriksel stimülasyonun uygulanmadığı koşulla karşılaştırılmıştır. Sonuclar, hucrelerin belirgin bir şekilde uygulanan elektriksel uyarıma bağlı olarak elektrotlara doğru goc ettigini; buna karşı hucre başına duşen nörit sayısında azalma olurken norit yoneliminin arttırdığını gostermiştir. Elde edilen bulgular harici elektriksel uyarımın hücre üzerindeki etkilerinin aydınlatılmasında faydalı olacağı düşünülmektedir.**

Anahtar Kelimeler—Mikroçip, PC12 hücreleri, elektriksel stimülasyon, sinirsel farklılaşma.

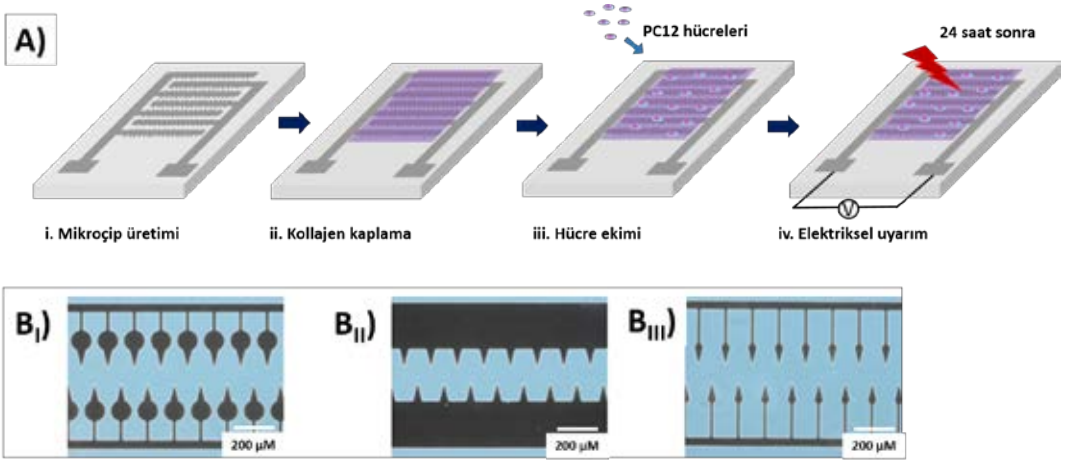
Abstract**—PC12 cell line is widely used to study neuronal differentiation behavior. This cell line differentiates in the presence of nerve growth factor (NGF), resulting in protrusions called neurites, dentrites and axons. Non-invasive electrical stimulation is known to have potential for use in the control of the activity and regeneration of neuron cells. In this study, the effects of long-term electrical stimulation on the behavior of PC12 cells and their differentiation in the presence of NGF were investigated using a microchip. Electrical stimulation was performed 2 hours a day for 2 days and all day (24 hours) and the results were compared to the condition in which no electrical stimulation was applied. The results clearly showed that the cells migrated towards the electrodes and the neurite orientation was promoted due to the electrical stimulation applied. However, the protrusion per cell decreased. The findings are thought to be useful in elucidating the effects of external electrical stimulation on neuron cell.**

Keywords—Microchip, PC12 cells, electrical stimulation, neural differentiation.

978-1-7281-2420-9/19/$31.00 ©2019 IEEE

I. GİRİŞ

Günümüz teknolojisi hücrelerin tek hücre seviyesinde veya doku olarak analizinde yeni cihazların üretimine ve geliştirilmesine olanak vermektedir [1]–[5]. Nöral hücrelerin, hücre-hücre etkileşimi odaklı araştırılmasının bu hücrelerin ve oluşturdukları nöral ağların daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı düşünülmektedir [6]. Bu amaç için geliştirilecek platformların birçok bilim dalında önemli etkilerinin olacağı düşünülmektedir. Örneğin ilaç endüstrisinde ilaçların dizaynı ve etkilerinin incelenmesinde bu ilaçların aynı model üzerinde test edilmesi büyük bir öneme sahiptir. Böylece farklı aktif bileşenlerin oluşturdukları farklı etkiler daha detaylı bir şekilde incelenebilmekte ve ilaç geliştirmede geçen süre önemli bir ölçüde kısaltılabilmektedir. Nöral ağlar aynı zamanda biyobilgisayarların geliştirilmesinde de hayati bir öneme sahip olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, akson ve dentrit oluşumunu ve yönlendirilmesini, diğer bir ifadeyle nöron hücreleri arası bağlantının nerede ve ne şekilde olacağını sağlayacak yeni teknolojilerin geliştirilmesi, tedavisi zor veya şu an mümkün olmayan parkinson, alzheimer, huntington gibi nörodejeneretif hastalıkların tedavisinde yeni ve daha etkili yöntemlerin bulunmasında büyük katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Literatürde nöron ve nöronlardan uzayan yapıların (nörit) yönlendirilmesiyle ilişkili çalışma sayısı her geçen gün artmakta ve henüz tedavisi olmayan birçok nörodejeneratif hastalık nedeniyle uzun yıllar bu konunun popülerliğini koruyacağı düşünülmektedir. Bu kapsamda sinir büyüme faktörüne (NGF) cevap verme, nispeten kolay kültürlenebilme ve tipik bir nöron hücresi fenotipi sergileme gibi nedenlerden dolayı sıçan feokromositoma (PC12) hücreleri nöronal farklılaşmayı incelemek için model olarak kullanılmıştır [7]. Elektromanyetik alanların biyolojik sistemler üzerindeki etkisi son yıllarda gittikçe daha fazla bilim insanının ilgisini çekmektedir. Doğru akım ile elektriksel stimülasyonun nöral hücre proliferasyonunu [8], hücre göçünü [9] ve hücre içi kalsiyum dinamiğini etkilediği gösterilmiştir [10]. Harici elektrik stimülasyonunun ayrıca nörit büyümesini [11] arttırdığı, hücreleri hizaladığı ve anot, katot veya her ikisine [12] doğru nörit büyümesini arttırdığı, dallanmayı arttırdığı [13] veya hiçbirine cevap vermediği gösterilmiştir [14]. Bildirilen farklılıklar, süre ve akım gibi değişken stimülasyon parametrelerinden, farklı hücre tiplerinin doğal farklılıklarından ve hatta farklı hücresel mikro-ortamdan



Şekil 1: Mikroçip üzerinde hücre büyütülmesi ve elektriksel uyarım için uygulanan adımlar (A). Üretilen mikroçpler üzerinde bulunan farklı şekiller ($B_{I,II,III}$)

kaynaklanabilmektedir [15].

Bu çalışmanın temel odak noktası mikro üretim tekniğiyle üretilen farklı konfigürasyonlara sahip mikroçiplerin PC12 hücrelerinin NGF varlığında elektriksel uyarmada kullanımı ve hücrelerin davranışının incelenmesidir. Uygulanan elektriksel akım literatürde var olan çalışmalarda en uygun nöronal büyümeyi ve yönlendirmeyi sağlayan voltaj seviyesine göre belirlenmiştir. Analizde kullanılan ana parametreler nörit sayısı, nörit yönü ve hücre göçüdür. Elektriksel uyarı kısa süreli ve uzun süreli uygulanmış ve sonuçlar kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular harici elektriksel uyarımın hücre üzerindeki etkilerinin aydınlatılmasında faydalı olacağı düşünülmektedir.

II. MATERYAL VE METOT

A. *Materyal*

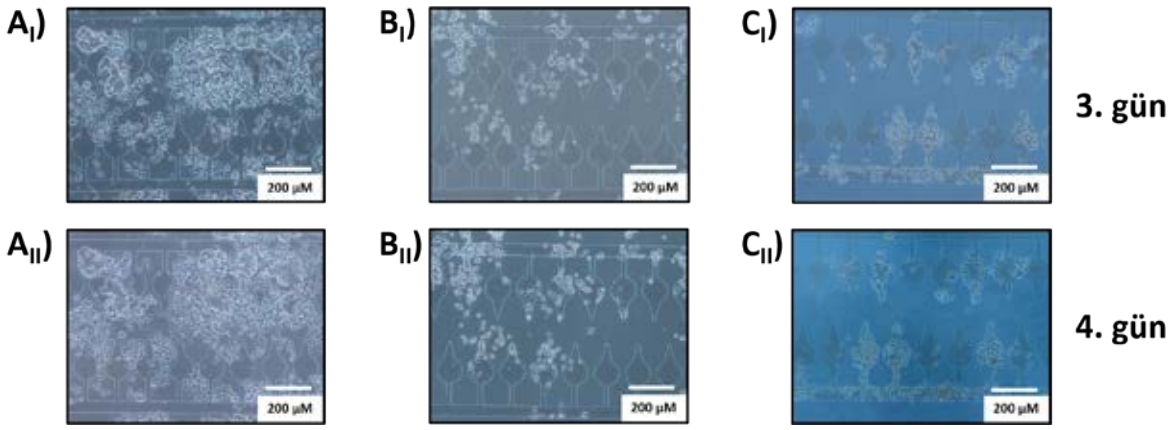
Fosfat tamponlu tuzlu çözeltisi (PBS) (Sigma Aldrich, ABD), AZ5214E reversal fotorezist (MicroChemicals, Germany), NaOH (Sigma-Aldrich, ABD), poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich, ABD), kollajen (Sigma-Aldrich, ABD), RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, ABD), donor horse serum (Capricorn, Germany), fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, ABD), L-glutamin (Gibco, ABD), gentamicin (Gibco, ABD), tripsin (Gibco, ABD), NGF (Vipera lebetina venom) (Sigma-Aldrich, ABD).

B. *Mikroçip üretimi*

Çalışmanın bu kısmında mikroçipler fotolitografik yöntemler kullanılarak üretilmiştir. İlk olarak kullanılacak ITO (Indium Tin Oxide) kaplı cam substratların (lam) yüzeyleri saf su ve aseton ile yıkanmış ve özel toz tutmayan bez yardımıyla kurutulmuştur, daha sonrasında ise oksijen plazmayla temizlenmiştir. Temizliği yapılan ITO kaplı lamların iletken yüzeyi Spin Coater cihazı yardımıyla 2000 rpm'de 60 saniye çalıştırılarak AZ5214E (MicroChemicals, Germany) reversal fotorezist ile kaplanmıştır. Fotorezist ile kaplanan lamlar fırında 90 °C'de 30 dakika bekletilerek fotorezistin polimerizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra biyoçip için özel olarak üretilmiş litografi maskeleri kullanımdan önce saf su ve aseton yardımıyla temizlenip kurutulduktan sonra UV maske hizalayıcısına (UV mask aligner) yerleştirilmiştir. Kullanılacak fotorezist kaplı lam fırından çıkarılıp soğuduktan sonra maskenin altına çift taraflı bant yardımıyla sabitlenmiştir. Maske üzerindeki şekiller UV maske hizalıyıcı yardımıyla 16 saniye UV ışınına maruz bırakılarak fotorezist kaplı lamların üzerine aktarılmıştır. UV ışınına maruz kalmış bölgelerin uzaklaştırılması amacıyla 0.8 gr NaOH ve 100 ml distile su karışımı kullanılarak ucuz yollu ve etkili bir çözücü (developer) hazırlanmıştır. Maskeden ayırılan lamlar sırasıyla hazırlanan developer içerisine koyulmuş ve 7 saniye boyunca hafifçe sallayarak UV ışınına maruz kalarak hassaslaşan bölgelerin (pozitif fotorezist temel anlayışı) uzaklaştırılması sağlanmıştır, böylece mikroçip için gerekli şekiller fotorezist ile lamların üzerine geçirilmiştir. Sonra durulanıp kurutulan lamlar mikroçip için gerekli şekillerin lamların üzerine tam olarak geçirilip geçirilmediğinin kontrolü için mikroskop altında incelenmiştir. Son kontrolü yapılan biyoçipler etching işlemi için Ion Beam cihazına alınmıştır. Cihaz öncelikle Rough Pump ile çalıştırılmış, basınç mtorr seviyesine düşünce bu defa Turbo Molecular Pump basınç torr seviyesine düşene kadar yaklaşık 90 dakika çalıştırılmıştır. Vakum devreye girdikten sonra etching için gerekli parametreler girilmiştir. ITO kaplı camlar için 30 sccm Argon gazı ile 750 V, 49 W, 0.05 A parametreleri kullanılarak 1 saat boyunca ve örnek tutucu 22.5 derece açıyla döndürülerek etching işlemi yapılmıştır. Çiplerin mikroskop altında ve multimetre ile kontrolleri yapılmıştır. Geriye kalan şekiller üzerindeki fotorezistler aseton yardımıyla kaldırılmış (lift-off işlemi) ve böylece biyoçip başarıyla üretilmiştir.

C. *Hücre kültürü*

Hücre kültürü için PC12 (ECACC) sinir hücreleri kullanılmıştır. PC12 hücreleri yarı süspanse hücreler olduğu için büyütülecek flaskların yüzeyi kollajen ile kaplanmıştır. Kollajen kaplaması için flaskların içerisine öncelikle 2 mL kollajen konulup inkübatörde (%5 CO_2, 37 °C) 2 dakika inkübe edilip daha sonra fazlası pipet yardımıyla çekilmiştir. Bu işlem sonrasında kollajen kaplı flasklar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. PC12 hücreleri flasklarda RPMI 1640 (% 10 DHS %1FBS + % 1 L-Glutamin %0.1 Gentamicin)



Şekil 2: Mikroçip üzerinde elektriksel stimülasyon olmadan büyütülen PC12 hücrelerinin 3. ve 4. günlere ait resimleri (kontrol) ($A_{I,II}$) ile günde sadece iki saat olmak üzere iki gün ($B_{I,II}$) ve tüm gün (24 saat) ($C_{I,II}$) elektriksel stimüle ile mikroçip üzerinde büyütülen PC12 hücrelerine ait resimler. Elektriksel uyarım her iki koşulda da sadece 2 ile 3. günler arasında uygulanmıştır.

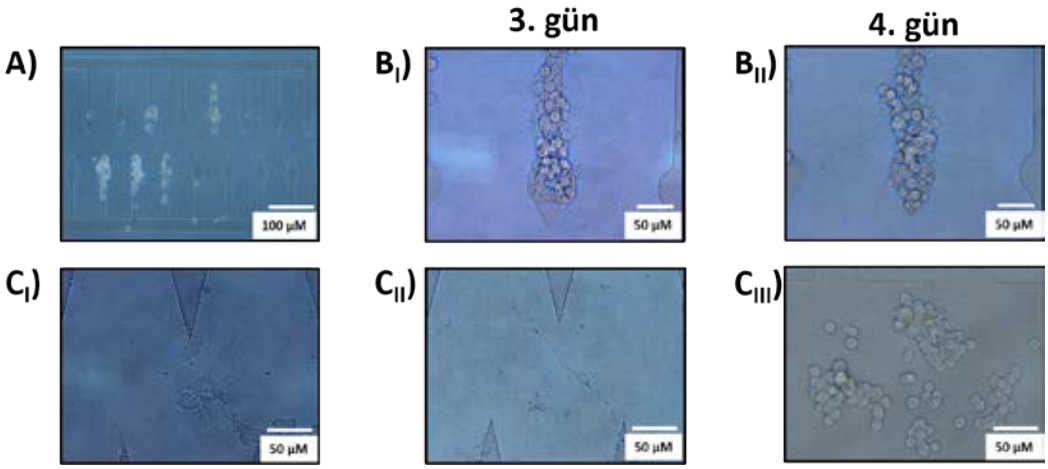
besiyerinde 37 °C'de %5 CO_2'de kültürlenmiştir. 2-3 günde bir hücre kültürünün devamlılığı için besiyeri değiştirilip hücrelerin inkübasyonuna devam edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden kaldırılma işlemi tripsin ile gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürlemenin tüm aşamaları santrifüj ve inkübasyon kısımları hariç olası kontaminasyon olasılığına karşı temiz biyogüvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir.

D. Hücrelerin elektrik yardımıyla hizalanması büyütülmesi ve farklılaştırılması

Önceden hazırlanmış mikroçiplerin üzeri flaskların kaplanmasındaki prosedür kullanılarak kollajen ile kaplanmıştır. Gece boyunca UV ışığı (260 nm) ile sterilize edilmiştir. Hücrelerin kültürlenmesi esnasında cm^2'ye 2000 hücre gelecek şekilde hücreler sayılıp besiyeri içeren hücre süspansiyonu ile çipin üzerine ekim yapılmıştır. Çipin üzerine tutunmaları için %5 (CO_2) içeren 37 °C inkübatörde 2 saat boyunca bekletilmiştir. 2 saatin sonunda çipin yerleştirildiği 60 mm'lik petri dish içerisine 5 mL besiyeri eklenmiştir ve 3 tane çip kullanılarak farklı parametrelerle hücre davranışları gözlemlenmiştir. İlk olarak her gün 2 saat boyunca 100 mVpp/mm'te 100 Hz'te elektrik akımı verilmiştir. Diğerine ise aynı parametreler kullanılarak gün boyu elektrik akımı uygulanmıştır. Üçüncü çip ise kontrol olarak kullanılmıştır. Kulturleme esnasında besiyeri değiştirilirken, ciplerin uzerinde 100ng/mL NGF (Nerve Growth Factor) iceren besiyeri kullanılmıştır.

III. SONUÇLAR

Mikroçip üzerinde birden fazla şekilde elektrotlar üretilmiştir. Mikroskop altında yapılan ölçümlerde karşılıklı bir birine bakan elektrotlar arasındaki mesafeler sırasıyla 93,5 μm (B_I), 110,1 μm (B_{II}), 107,1 μm (B_{III}), şeklinde ölçülmüştür. Bu işlem sonrasında iletken teller lehim yardımıyla mikroçipler üzerinde bulunan kontakt pedlerine bağlanmış ve sonrasında bu bağlantı noktaları bir epoksi yapıştırıcı ile sağlamlaştırılmıştır. Elektriksel uyarım bu teller aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. PC12 hücrelerinin mikroçip yüzeylerine tutunması ve yayılması için mikroçiplerin üzeri kollajen tip IV ile kaplanmıştır. Ayrıca, hücrelerin mikroçip üzerinde istenilen seviyede tutunması ve yayılmasını sağlamak için sinirsel farklılaşma faktörünün besiyerine eklenmesi ve elektriksel uyarım hücrelerin mikroçip üzerine ekiminden 48 saat sonra gerçekleştirilmiştir. Hücreler mikroçip üzerine istenilen seviyede tutunduğu ve büyüdüğü gözlemlenmiştir. Örneklerin tümüne 100 ng/mL NGF eklenerek bu örnekler üzerinde bulunan hücrelerin farklılaşması indüklenmiştir. Kontrol gurubunda herhangi bir elektriksel uyarım gerçekleştirilmemiştir. Örneklerin birine 100 mV/mm seviyesinde günde iki saat olmak üzere iki gün boyunca diğerine ise aynı seviyede 24 saat boyunca elektriksel uyarım uygulanmıştır. Elektriksel uygulama sonrası tüm örneklerin besiyeri değiştirlmiş ve aynı seviyede NGF bu besiyerlerine eklenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda hücreler elektriksel uyarımın olmadığı kontrol gurubunda rastgele büyüdüğü gözlemlenmiş, buna karşın elektriksel uyarımın olduğu test guruplarında elektriksel uyarımın süresiyle ilişkili bir biçimde elektrotlara doğru göç ettikleri gözlemlenmiştir. Hatta Şekil 2 (C_I), 3A, (B_I)'de görüldüğü gibi hücreler farklı boyut ve şekildeki elektrotlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Şekil 2(C_{II}) ve 3(C_{II})'de görüldüğü üzere elektriksel uyarımdan 24 saat sonra bile bu etkinin devam ettiği belirlenmiştir. Şekil 3($B_{I,II}$)'de görüldüğü gibi hücreler elektrotlar üzerinde tek tabakadan ziyade çoklu tabaka halinde büyümüştür. Ayrıca, elektriksel uyarımın süresine bağlı olarak hücre başına nörit sayısı ve uzunluğunda azalma fark edilmiş, buna karşın bu hücresel çıkıntıların uygulanan elektriksel alana bağlı olarak yönlenmelerinde nispeten artış gözlemlenmiştir. Literatürde var olan çalışmalara göre 100 mV/mm seviyesinde elektriksel uyarımın PC12 hücrelerinde nörit büyümesini indüklediği gözlemlemiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında bu seviyede uyarım mikroçip ile hücreler üzerinde beklenenden daha farklı bir etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Kullanılan parametreler ile elde edilen sonuçlara göre hücresel çıkıntılardan ziyade hücrelerin kendilerinin elektrotlara doğru yönlendiği saptanmıştır, dolayısıyla daha düşük seviyede ve kısa süreli elektriksel uyarımla bu çıkıntıların belirli bir yönde uzaması indüklenebilir.



Şekil 3: Mikroçip üzerinde 24 saat boyunca elektriksel stimülasyon sonrası farklı bir dizayn üzerinde büyütülen PC12 hücrelerine ait bir resim (A_I). Aynı dizayn üzerinde bulunan bir elektrot üzerinde büyütülen hücrelerin 3. ve 4. günlerine ait yakından çekilmiş resimleri ($B_{I,II}$). 100 ng/mL NGF varlığında üç farklı koşulda (kontrol, günde sadece iki saat olmak üzere iki gün ve tam gün (24 saat) elektriksel stimülasyon) elde edilen ve nöritlerin sayısını ve yönünü gösteren resimler ($C_{I,II,III}$). Elektriksel uyarım her iki koşulda da sadece 2 ile 3. günler arasında uygulanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 215E003 nolu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir..

KAYNAKÇA

[1] M. Şen, K. Ino, J. Ramón-Azcón, H. Shiku, and T. Matsue, "Cell pairing using a dielectrophoresis-based device with interdigitated array electrodes," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 18, pp. 3650–3652, 2013.

[2] M. Şen, K. Ino, H. Shiku, and T. Matsue, "Accumulation and detection of secreted proteins from single cells for reporter gene assays using a local redox cycling-based electrochemical (lrc-ec) chip device," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 21, pp. 4328–4335, 2012.

[3] M. Şen, K. Ino, K. Y. Inoue, A. Suda, R. Kunikata, M. Matsudaira, H. Shiku, and T. Matsue, "Electrochemical evaluation of sarcomeric α-actinin in embryoid bodies after gene silencing using an lsi-based amperometric sensor array," *Analytical Methods*, vol. 6, no. 16, pp. 6337–6342, 2014.

[4] M. Şen, K. Ino, K. Y. Inoue, T. Arai, T. Nishijo, A. Suda, R. Kunikata, H. Shiku, and T. Matsue, "Lsi-based amperometric sensor for real-time monitoring of embryoid bodies," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 48, pp. 12–18, 2013.

[5] K. Ino, M. Şen, H. Shiku, and T. Matsue, "Micro/nanoelectrochemical probe and chip devices for evaluation of three-dimensional cultured cells," *Analyst*, vol. 142, no. 23, pp. 4343–4354, 2017.

[6] D. Banciu, A. Marin, and B. Radu, "Methods for neuronal guiding and synapse formation," *Journal of medicine and life*, vol. 5, no. 2, p. 242, 2012.

[7] L. A. Greene and A. S. Tischler, "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 73, no. 7, pp. 2424–2428, 1976.

[8] B. Song, M. Zhao, J. V. Forrester, and C. D. McCaig, "Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no. 21, pp. 13 577–13 582, 2002.

[9] M. Zhao, H. Bai, E. Wang, J. V. Forrester, and C. D. McCaig, "Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through vegf receptors," *Journal of cell science*, vol. 117, no. 3, pp. 397–405, 2004.

[10] D. Wu, X. Ma, and F. Lin, "Dc electric fields direct breast cancer cell migration, induce egfr polarization, and increase the intracellular level of calcium ions," *Cell biochemistry and biophysics*, vol. 67, no. 3, pp. 1115–1125, 2013.

[11] A. N. Koppes, A. M. Seggio, and D. M. Thompson, "Neurite outgrowth is significantly increased by the simultaneous presentation of schwann cells and moderate exogenous electric fields," *Journal of neural engineering*, vol. 8, no. 4, p. 046023, 2011.

[12] R. Cork, M. McGinnis, J. Tsai, and K. Robinson, "The growth of pc-12 neurites is biased towards the anode of an applied electrical field," *Journal of neurobiology*, vol. 25, no. 12, pp. 1509–1516, 1994.

[13] L. Hinkle, C. McCaig, and K. Robinson, "The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field." *The Journal of physiology*, vol. 314, no. 1, pp. 121–135, 1981.

[14] P. Cormie and K. R. Robinson, "Embryonic zebrafish neuronal growth is not affected by an applied electric field in vitro," *Neuroscience letters*, vol. 411, no. 2, pp. 128–132, 2007.

[15] M. D. Wood and R. K. Willits, "Applied electric field enhances drg neurite growth: influence of stimulation media, surface coating and growth supplements," *Journal of neural engineering*, vol. 6, no. 4, p. 046003, 2009.