



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SİNİR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

EPİLEPSİ NÖROBİYOLOJİSİNDE TRPM2 KATYON
KANALLARININ ROLÜNÜN SIÇAN HİPOKAMPUS SİNİR
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Mustafa NAZIROĞLU
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 4398-D2-15 Proje numarası ile desteklenmiştir

Tez. No: 174

2018-İSPARTA

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sınır Bilimleri Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/07/2018

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Mehmet KARA
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Ömer ÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cemal KAHYA
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi



ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN

Enstitü Müdürü

BEYAN

“Epilepsi Nörobiyolojisinde TRPM2 Katyon Kanallarının Rolünün Sıçan Hipokampus Sinir Hücrelerinde Araştırılması” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Mustafa NAZIROĞLU



Danışman

Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ



ÖNSÖZ

Epilepsi hastalığı toplumun büyük bir kesimini etkileyen bir nörolojik hastalıktır. Değişik tipleri vardır. Günümüzde mevcut anti-epileptik ilaçlar birçok hastada kısmen tedavi sağlamaktadır. TRPM2 kanalı epilepsi tedavisinde ilaç geliştirmek için potansiyel kaynak olarak gözükmektedir. Bu tez sonuçlarının bu ilaç geliştirme alanına büyük katkı sağlayacağını umuyorum.

Tez çalışmasının yapılmasına yardım eden Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ömer ÇELİK, Araştırma Görevlisi Dr. Bilal ÇİĞ ve Dr. İshak Suat Övey ile teknisyenler Fatih ŞAHİN ve Muhammet ŞAHİN'e teşekkür ederim. Bu projeye maddi katkıda bulunan SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) a teşekkür ederim.

Saygılarımla...

Mustafa NAZIROĞLU

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
BEYAN	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Oksidatif Stres	4
2.2. Epilepsi	7
2.2.1. Epilepsi ve Oksidatif Stres.....	7
2.2.2. Epilepsi ve Ca ⁺²	10
2.3. TRP Kanalları.....	12
2.3.1. TRP Kanal Ailesi	12
2.3.2. TRPM Alt Ailesi.....	14
2.3.3. TRPM2 Kanalı.....	15
2.3.4. Dolaylı TRPM2 Kanal Blokeri Kimyasallar	17
2.3.5. Genetik Yetersiz Fareler Üzerinde TRPM2 Çalışmaları	19
2.3.6. Nörolojik Hücrelerde TRPM2 Kanallarının Rollerini	20
2.3.6.1. Mikroglia ve Astroglia Aktivasyonlarında TRPM2'nin Rolü	21
2.3.6.2. Hipokampus ve TRPM2 Kanalı	22
2.4. Apoptozis	24
2.4.1. Kaspazlar	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	27
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	32
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Deney Hayvanları	34
3.2.2. Çalışma Grupları.....	35

3.2.3. Sıçan Hipokampus ve Arka Kök Gangliyon (AKG) Sinir Hücreleri İzolasyonları	35
3.2.4. Elektrofizyoloji (Patch – Clamp) Analizleri	37
3.2.5. Hücre içi Kalsiyum Ca^{+2} Sinyali Analizleri	38
3.2.6. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi	38
3.2.7. Hücre İçi ROS Üretimi Tayini	39
3.2.8. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini	39
3.2.9. Apoptoz ve Kaspaz Analizleri	40
3.2.10. Western Blot Analizleri	40
3.2.11. Beyin Elde Edilmesi ve Homojenat Hazırlanması	41
3.2.12. Antioksidan Analizleri	41
3.2.12.1. GSH ve GSH-Px Analizleri	41
3.2.12.2. Lipit Peroksidasyon (MDA) Analizi	42
3.2.12.3. Beyin Korteks Beta Karoten, A ve E Vitamini Analizleri	42
3.2.13. Epilepsi Atak Başlangıç Sürelerinin Belirlenmesi	43
3.3. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Hipokampus Hücre İçi Serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) Düzeyleri	44
4.2. Patch-Clamp Analiz Sonuçları	45
4.2.1. Kontrol Kaydı Sonucu	45
4.2.2. ADPR uygulanması ile TRPM2 Kanal Aktivasyonu	46
4.2.3. PTZ Grubu Kaydı Sonucu	48
4.2.4. Epilepsi oluşturmayıp sadece ACA tedavisi alan sıçan patch-clamp sonuçları	50
4.2.5. Epilepsi Oluşturmadan Önce ACA Tedavisinin Patch-Clamp Sonuçları Üzerine Etkisi	50
4.3. Hücre Canlılığı ve Apoptozis Sonuçları	53
4.4. Mitokondriyal Zar Depolarizasyon ve Hücre İçi ROS Üretimi Sonuçları	54
4.5. Kaspaz 3 ve 9 Aktivitesi Sonuçları	55
4.6. Western Blot Analiz Sonuçları	56
4.6.1. Kaspaz 3 ve 9 Ekspresyon Sonuçları	56
4.6.1. PARP1 Ekspresyon Sonuçları	57
4.7. Oksidan ve Antioksidan Sonuçları	58
4.7.1. Epilepsi Oluşturulan Sıçan Hipokampus Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyleri Üzerinde TRPM2 Kanal Blokeri (ACA) Tedavisinin Etkileri	58

4.7.2. Epilepsi Oluşturulan Sıçan Hipokampus GSH Düzeyi ve GSH-Px Aktiviteleri Üzerinde TRPM2 Kanal Blokeri (ACA) Tedavisinin Etkileri.....	59
4.7.3. Beyin MDA, GSH, GSH-Px ve Antioksidan Vitamin Sonuçları	60
4.8. Epilepsi Atak Başlangıcı Üzerinde ACA Tedavisinin Etkileri	62
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71
ÖZET.....	73
ABSTRACT.....	74
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	85



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

·OH	: Hidroksil radikali
¹O₂	: singlet oksijen
ACA	: Antranilik asit
ADP	: Adenozin di-fosfat
ADPR	: Adenozin di-fosfat riboz
AKG	: Arka kök gangliyon
AMP	: Adenozin mono fosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPase	: Adenozin trifosfataz
cADPR	: Siklik adenozin di-fosfat riboz
cGMP	: Siklik guanin mono fosfat
CHPO	: Cumene hydroperoxide
-COOH	: Karboksilik asit
DM	: Diabetes Mellitus
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
HNA	: 4-hidroksinoneal
IP3	: inositol trifosfat
IP3Rs	: inositol trifosfat redüktaz
KAT	: Katalaz
LPO	: Lipit peroksidasyon
MDA	: Malondialdehid
NAC	: N-asetil sistein
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
NMDG⁺	: <i>N-Methyl D-Glucamine</i>
NO·	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NUDT9	: Nudix Box 9
NUDT9-H	: TRPM üzerinde bulunan enzimatik bölge
O₂·	: Süperoksit
OH·	: Hidroksil radikali
ONOO⁻·	: Peroksinitrit
PARG	: Poli-ADPR glikohidrolaz
PARP1	: Poli-adenozin difosfat riboz-polimeraz 1

PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROO·	: Peroksil
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
PTZ	: Pentilen tetrazol
TBARS	: Tiyobarbitürik asit
TRP	: Transient receptor potential
TRPA	: Transient receptor potential ankyrin
TRPC	: Transient receptor potential canonical
TRPM	: Transient receptor potential melastatin
TRPML	: Transient receptor potential mucolipin
TRPN	: Transient receptor no-mechano-potential
TRPP	: Transient receptor potential polycystin
TRPV	: Transient receptor potential vanilloid

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Nörolojik hücrelerde dolaylı TRPM2 kanal blokerlerinin etkisi.	19
Tablo 2. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan beyin antioksidan vitamin düzeyleri üzerinde ACA'nın etkisi	62



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sinir hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üretimi ile NAD ⁺ dan üç farklı yolla ADPR üretiminin şematik gösterimi	6
Şekil 2. Epilepsi oluşumunda oksidatif stresin rolü.....	11
Şekil 3. TRP süper ailesi ve alt tipleri.....	13
Şekil 4. TRPM alt ailesinin yedi alt ailesi ve alt tipleri.	15
Şekil 5. Oksidatif stres ürünleri ve ADP-riboz (ADPR).....	16
Şekil 6. TRPM2 kanallarının, oluşan oksidatif stresle ve bunun neticesi olan, NAD ⁺ dan üç farklı yolla oluşan ADPR ile aktive olma mekanizmalarını gösteren şekil.....	23
Şekil 7. Apoptoziste rol oynayan ekstrensik ve intrensik moleküler yollar.....	26
Şekil 8. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücreleri hücre içi serbest Ca ²⁺ düzeyleri ([Ca ²⁺] _i) üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisinin çizgi (A) ve kolon (B) grafiği olarak gösterimi.....	44
Şekil 9. ADPR ile uyarım yapılmamış sıçan AKG hücrelerinden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı	46
Şekil 10. ADPR ile uyarım yapılmış fakat PTZ ile epilepsi oluşturulmayan AKG nöronlarından patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı..	47
Şekil 10 (I-V). Yukarıdaki (2.2) aynı kaydın akım voltaj (I-V) kaydı değişikliğini gösteren grafik.....	47
Şekil 11. PTZ grubunun sonra ADPR ile uyarım yapılarak sinir hücrelerinde patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı	48
Şekil 11 (I-V). Yukarıdaki (4C) patch-clamp kaydının akım-voltaj I-V değişikliğini gösteren grafik.....	48
Şekil 12. ACA grubunun ADPR ile uyarım yapılarak AKG hücrelerinden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı	50
Şekil 13. ACA+PTZ grubunda AKG hücreleri ADPR ile uyarım yapılarak hücrelerden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı.....	51
Şekil 14. Epilepsi oluşturulan sıçanların AKG sinir hücrelerinde TRPM2 kanal akımları üzerinde ACA tedavisinin etkisi.	52
Şekil 15. PTZ ile Epilepsi oluşturulan sıçan kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesi üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisi.....	53
Şekil 16. PTZ ile Epilepsi oluşturulan sıçan mitokondriyal zar depolarizasyon (JC-1) ve hücre içi ROS üretimi üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisi	55
Şekil 17. PTZ ile Epilepsi oluşturulan sıçan kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesi üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisi.....	56

Şekil 18. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus hücrelerindeki kaspaz 3 ve 9 ekspresyon düzeyleri üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisi.....	57
Şekil 19. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus hücrelerindeki PARP1 ekspresyon düzeyleri üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisi.....	58
Şekil 20. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus lipit peroksidasyon (MDA) düzeyleri üzerinde ACA'nın etkisi.....	59
Şekil 21. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus hücrelerindeki GSH ($\mu\text{mol/g}$ protein) düzeyleri ve GSH-Px (IU/ g protein) aktiviteleri üzerinde ACA'nın etkisi	60
Şekil 22. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan beyin lipit peroksidasyon (MDA) düzeyleri üzerinde ACA'nın etkisi.....	61
Şekil 23. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan beyin GSH ($\mu\text{mol/g}$ protein) düzeyleri ve GSH-Px (IU/ g protein) aktiviteleri üzerinde ACA'nın etkisi.....	61
Şekil 24. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçanlarda epileptik atakların başlaması (Latency time) üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisi.....	63

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1.** A,B: Patch-clamp (Yama-menteşe) seti genel ve yakından görünümüleri (İnverted mikroskop, Motorize manipülatör ve kumandası, Isı kontrollü çember, Titreşimi önleyici masa, Faraday kafesi ve perfüzyon sistemi) C: Mikropipetin Mikroskop altında görünümü..... 29
- Resim 2.** BSN Sağlık Analiz (Isparta, Göller Bölgesi Teknokent) Laboratuvarında mevcut olup kullandığımız Casy TT system hücre sayım cihazı 30
- Resim 3.** Hayvanlardan elde ettiğimiz Primer hipokampus sinir hücrelerinde ve in-vitro hücre hattında kalsiyum sinyali analizleri için kullandığımız floresans spektrofotometre cihazı..... 30
- Resim 4.** Western Blot analizi için kullanılan aletler (A) ve Jel görüntüleme cihazı (B)..... 31
- Resim 5.** Hipokampal hücrelerin konulduğu vücut koşullarında koyduğumuz (37 °C, %5 CO₂) sıvı ceketli steril inkübatör..... 32
- Resim 6.** Epilepsi görüntülerinin alındığı cam kafes ve atak geçirme anları 32

1. GİRİŞ

Oksidatif stres günlük hayatımızın birçok döneminde (konuşurken, koşarken, çalışırken v.b.) hücre içi organellerde fizyolojik bir süreç olarak ortaya çıkmaktadır. Örneğin, mitokondride proteinler, karbonhidratlar ve yağlar ATP sentezlenirken reaktif oksijen türleri (ROS) yan ürün olarak oluşmaktadır. Diğer bir örnek fagositik hücreler ile ilgilidir. Fagositik hücreler bakteri ve virüsleri yok ederken ROS'ni kullanmaktadır (1,2). Tiroit bezinde tiroit hormonlarının sentezlenebilmesi için de ROS üretimine ihtiyaç vardır. Fakat bu ROS'leri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile kontrol edilmezler ise üretildikleri yerlerdeki hücelere zarar verebilmektedirler (3).

Beyin ve periferel sinir sistemi nöronları başta olmak üzere vücuttaki bütün hücreler oksidatif strese karşı aşırı duyarlıdır. Bunun başlıca 3 nedeni vardır; (1) Merkezi sinir sistemi vücuda alınan toplam oksijenin %20 ni harcamaktadır ve ROS ürünleri fazla meydana gelmektedir. (2) Beyin ve periferel sinir sistemi nöronları diğer böbrek ve karaciğer gibi organlara göre düşük miktarda antioksidan savunma sistemi içermektedir. (3) Yine bu nöronlar araşidonik asit ve dokozahekzaenoik asitler gibi ROS ürünlerinin ana hedefleri olan zengin çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) zar yapılarında içermektedirler (4). Çünkü bu yağ asitleri zayıf çift bağlarla birbirine tutunan hidrojen bağları bulundurmaktadırlar. ROS ise bu bağları hedef olarak zarar vermektedir (5). Bu bağlamda, beyin hücrelerinde bulunan fosfolipitlerin değişikliklerine neden olan oksidatif hasarın, nörolojik hastalıklarda rol alabileceği ortaya atılmıştır (2).

Epilepsi, dünya nüfusunun 50 milyondan fazlasını etkileyen ve en sık gözlenen nörolojik hastalıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır. Hastalığın yayılışının 2040 lı yıllarda 100 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (6). Hastalıkta en belirgin klinik gözlem tekrarlanan ataklardır. Hastalığın etiyolojisi üzerinde çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen oluşumunda rol oynayan kesin moleküler mekanizmalar kısmen aydınlatılabilmektedir. Bilindiği gibi hücre içerisine kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) voltaja duyarlı ve kimyasal kapılar gibi kanalların açılması ile girmektedir (3). Ca^{+2} iyonunun önemli görevlerinden bir tanesi girdiği kas hücresinde kasılmalara ve presinaptik nöronun sinaptik çukurluğa aşırı düzeyde

uyarıcı nörotransmitter (örneğin glutamat) salınmasına sebep olmasıdır. Epileptik insanların hipokampus nöron hücreleri içerisinde aşırı düzeyde sodyum iyonu ve Ca^{+2} girmektedir ve epileptik ataklara neden olmaktadır. Mevcut anti-epileptik ilaçların büyük bir kısmı voltaja duyarlı kalsiyum/sodyum kanalları veya kimyasal (glutamat) kanalları inhibe ederek hastalıkta kısmen tedavi sağlamaktadırlar. Etiyolojisi tam kesin olarak kesinleşmediği için, mevcut antiepileptik ilaçlar ile hastalığın bazı tiplerini (örneğin dirençli epilepsi) tamamen tedavi edilememektedir. Bu nedenle, L tipi voltaja duyarlı kapıları inhibe eden pregabalin ve topiramet gibi ilaçların dışında yeni kanal blokerlerinin geliştirilmesi epilepsi tedavisinde kritik bir öneme sahiptir.

Transient reseptör potansiyel (TRP) kanalları süper ailesi, 7 alt aile içermektedir. Memelilerde 6 alt ailesi vardır. TRP Melastatin TRPM alt ailesi 4 grup içermektedir (7-9). TRPM8 ve TRPM2 kanallar bu dört aile den birini oluşturmaktadır. TRPM2 kanalı N ucu, transmembran bölge ve C ucu olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır. C ucunda bulunan adenosin di-fosfat ribozu (ADPR) pirofosfataz enzimleri kanalın açılması için gerekli olan anahtar kilit vazifesini üstlenmektedir. Bu bölge adenosin di-fosfat (ADP) ve ADPR bağlayabilen bir Nudix Hidrolaz türüdür. Bu enzimin ismi ADPR pirofosfatazdır (10). Bu nedenle, TRPM2 kanalı, oksidatif stres veya oksidatif stres redoks sistemleri ile gerçekleşen oksidasyon ürünleri (örneğin ADPR ve hidrojen peroksit) aktive olmaktadır (11,12). Bu dedenle bir kısım antioksidanlar ROS üretimini azaltarak TRPM2 kanalını da inhibe etmektedirler (13,14). Hipokampus epilepsi oluşumunda önemli role sahiptir. Bu kanalların fazlaca varlığı epilepsi etiolojisinde önemli rol oynayan hipokampus CA1 nöronlarında gösterilmiştir (15). Epilepsi etiolojisinde hücre içi aşırı sodyum ile Ca^{+2} artışı ve oksidatif stresin rol oynadığına dair birçok bildirim mevcuttur (3,16). Bu nedenle, oksidatif stres ile aktive edilen TRPM2 kanalları epilepsi etiolojinde rol oynayabilir. Bu kanalın inhibisyonu, deneysel epilepsi modelinde faydalı olabilir. Yakın zamanda grubumuzun sıçanlarda yaptığı bir çalışmada oksidatif stres ve kırmızı acı biber içerisinde bolca bulunan kapsaisin ile aktive edilen TRPV1 kanalının kapsazepin ile inhibisyonun epileptik nöbet geçirme sayısını azalttığını ve sitozolik kalsiyum iyon girişini düzenlediğini gözlemledik (17,18). Benzer etki TRPM2 kanalları için de gözlenebilir. Bu konunun araştırılması gereklidir.

Bu projede deneysel epilepsi modelinde hücre içi serbest kalsiyum ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri, kanal akım yoğunlukları, apoptozis, atak geçirme süre kayıtları, mitokondri fonksiyonları, hücre içi serbest oksijen radikalleri (ROS), kaspaz değerleri üzerinde TRPM2 kanallarının rolünü araştırmayı amaçladık. Bu sonuçlar ile epilepsi etiyolojisinde TRPM2 kanalının rolünü ortaya çıkarmak ve hastalık tedavisi üzerinde potansiyel ilaç geliştirilmesi için kaynak ve veri sağlamayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres sonucu oluşan ROS meydana gelmektedir. ROS ürünleri daima tek elektron transferleri içeren biyolojik redoks tepkimelerinin sık görülen ürünlerindedir. Çevre kirliliği, toksik ilaçlar, iyonize ve iyonize olmayan radyasyon, çevresel ve psikolojik stres gibi birçok faktör değişik organlarda ROS üretimini artırmaktadır (1,2). ROS ürünleri hücre zarı veya hücre içi organellerin zarındaki lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar vermektedir. Özellikle nükleik asitler üzerindeki hasarları, DNA hasarına neden olmakta ve kanser hastalığı oluşumunda önemli rol oynamaktadır (19).

Serbest radikallerin ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olmak üzere iki ana türü mevcuttur. ROS'un üç ana türü mevcuttur. Başlıca ROS ürünleri; Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalidir. Süperoksit bir serbest radikal olmasına rağmen, çok da zararlı tür değildir. Çoğunlukla doğada indirgeyici madde olarak bulunmasının yanı sıra hidrojen peroksit ve geçiş metal iyonlarına kaynak teşkil etmektedir (1,2).

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilebilen oldukça aktif atom veya moleküllerdir. Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Her kimyasal ve biyokimyasal tepkime her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin aktivitesini olağanüstü artırır, dolayısıyla serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (1,2,20). İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan oksijen yapısı gereği radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında 'ROS' ifade edilmektedir. ROS ve serbest radikaller organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile

oluşurlar. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (1,2).

Oksijen ve nitrojen molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır. O₂'nin kısmi indirgenmesinden, ROS'den olan hidroksil radikali ve süperoksit radikali oluşmaktadır. Ayrıca tekli oksijen ve hidrojen peroksit molekülleri, radikal olmayan ROS olarak ifade edilirler. Oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit, peroksinitrit ve lipit peroksidasyon (LP) sırasında oluşan peroksil radikalidir (1,2). Nitrojen radikalleri içerisinde yer alan nitrik oksit ve peroksinitrit radikalleri içerisinde en zararlı olanı, peroksinitrit radikalleridir (Şekil 1). Fakat bunlar zararlı etkilerini saniyeden de az çok kısa süre içerisinde gerçekleştirdikleri için, analizler ile tayinleri yapılamamaktadır. Peroksinitrit radikalleri daha sonra daha stabil olan nitrik oksit radikaline dönüşmektedir (20). Analizlerde peroksinitrit, nitrik oksit analizleri yapılabilmektedir.

Radikal olmayan türler, bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sırayla serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar.

Hücrelerde bu radikallerin oluşumunda rol oynayan başlıca 4 fizyolojik mekanizma mevcuttur;

1- Fagositik hücreler bakteri ve virüsleri öldürmek için bu radikalleri üretmektedirler.

2- Fizyolojik solunum sırasında mitokondri oksijen tüketmekte ve radikal oluşmaktadır.

3- Hücre içi organellerden peroksizomlar yağ asitleri ve diğer moleküllerin indirgenme tepkimeleri sırasında hidrojen peroksit üretirler.

4-Sitokrom P450 enzimleri hücrelere giren yabancı kimyasal maddelerin tahribi sırasında hidrojen peroksit meydana gelmesine neden olmaktadır.

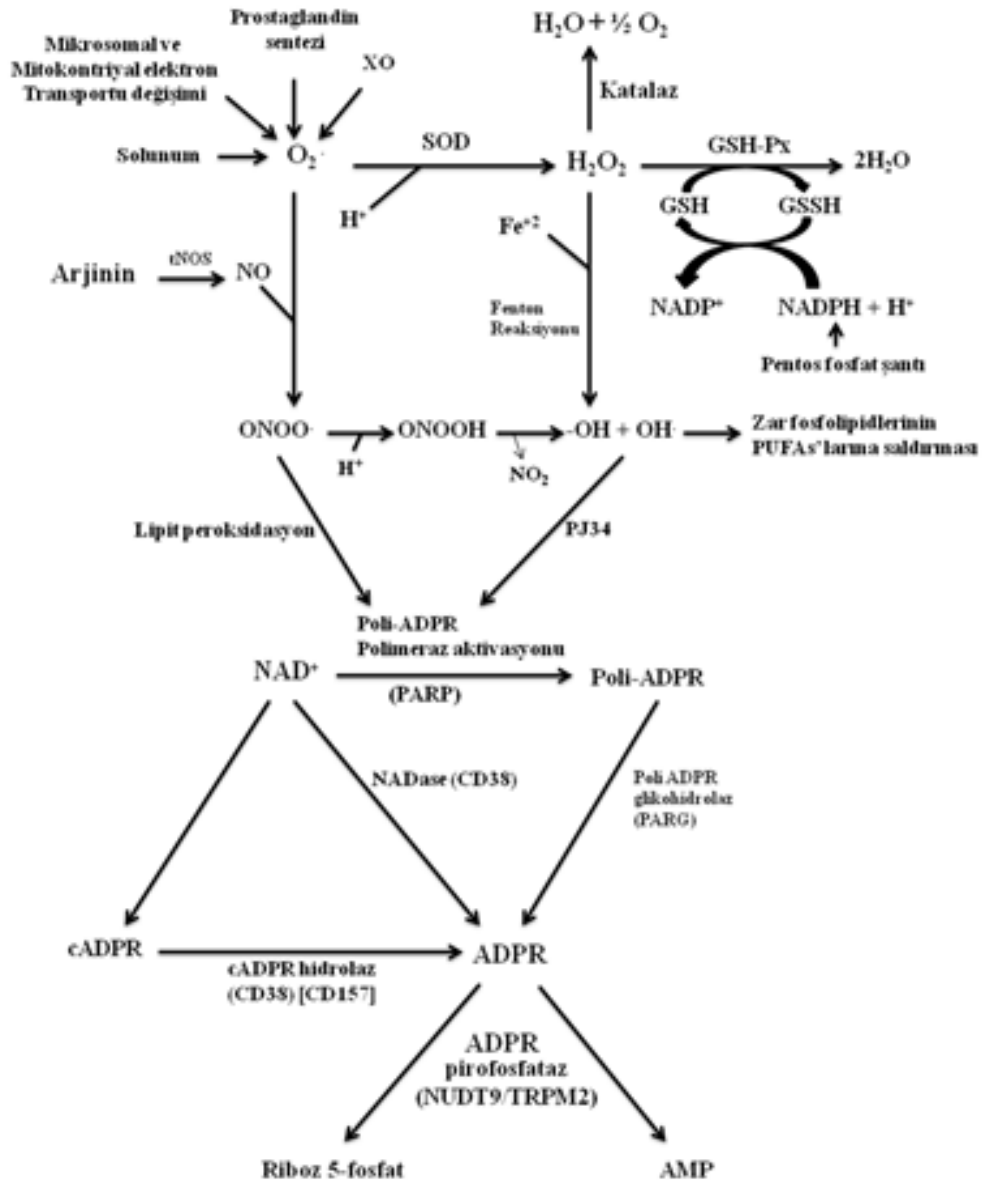
Serbest radikallerin başlıca hedefleri ise;

1- Lipoproteinler ve vücut yağları

2- DNA ve nükleik asitler (Mutasyonlar)

3- Proteinler

4- İkincil haberciler ve sinyal iletim yolları



Şekil 1. Sinir hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üretimi ile NAD⁺ dan üç farklı yolla ADPR üretiminin şematik gösterimi (20).

2.2. Epilepsi

Epilepsi, dünya nüfusunun 50 milyondan fazlasını etkileyen ve en sık gözlenen nörolojik hastalıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır. Hastalığın yayılışının 2040 lı yıllarda 100 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (6). Hastalıkta en belirgin klinik gözlem tekrarlanan ataklardır. Hastalığın etiyojisi üzerinde çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen oluşumunda rol oynayan kesin moleküler mekanizmalar kısmen aydınlatılabilmektedir. Bilindiği gibi hücre içersine Ca^{+2} voltaja duyarlı ve kimyasal kapılar gibi kanalların açılması ile girmektedir (21). Epileptik insanların hipokampus nöronların hücre içersine aşırı düzeyde sodyum iyonu ve Ca^{+2} girmektedir ve epileptik ataklara neden olmaktadır. Hücre içersine aşırı düzeyde sodyum iyonu ve Ca^{+2} girmesine ilave olarak, epilepsi etiyojisinde aşırı oksidatif stresin de önemli rolü vardır (3).

2.2.1. Epilepsi ve Oksidatif Stres

Yukarıda bahsedildiği gibi, vücut hücrelerinde birçok fizyolojik aktiviteler sırasında (örneğin fagositik aktivite ve mitokondriyal faaliyetler) aşırı ROS meydana gelmektedir (1,2,20). Bunların en önemlileri, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve tekli oksijendir. Bunların neden olduğu zararlı aktivitelere ‘oksidatif stres’ denilmektedir. Yakın zamanda hem grubumuz (22-24) hem de diğer grupların (25,26) yaptığı birçok çalışmada oksidatif stresin epilepsi etiyojisinde ve atakların artışında rolü olduğu bildirilmiştir. Bu radikallerin üretilmesi fizyolojiktir. Örneğin, protein, yağ ve karbonhidratların mitokondride sindirilmesi sırasında süperoksit radikali oluşmaktadır (1,2). Fagositoz yapan hücreler bakteri ve virüsleri sindirdikten sonra bunları sindirmede ve etkisiz hale getirmede de ROS ürünlerini kullanmaktadır (27-29). ROS ürünleri de antioksidanlarla düzgün bir şekilde dışarı atılamazlar veya zararsız şekillere dönüştürülemezler ise canlının kendi hücrelerine zarar vermektedirler. Örneğin, fagozom içersinde bakteriler öldürülemeyerek aksine fagositik hücre ölmektedir ve bakteri ve virüsler canlı kalmaktadır (2). Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olamayan olarak başlıca iki gruba ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidanlardan, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin 3

formu vardır ve süperoksit radikalini hidrojen perokside dönüştürmektedir. Hidrojen peroksit radikali ise kalataz ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri vasıtası ile suya kadar parçalanmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanların en önemlileri A vitamini, C vitamini, beta-karoten ve E vitaminidir. Örneğin E vitamini yapısında bulundurduğu H⁺ iyonlarını hidroksil radikallerine vererek onları zararsız şekillere dönüştürmektedir. Bu radikaller fazla üretilip ve antioksidan savunma sistemleri yetersiz ise o hücrelere zarar vermektedir (31). Vücuttaki tüm organlar özellikle beyin oksidatif strese maruz kalabilirler ve çoklu doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonu (self-oksidasyon) yolu ile devamlı olarak üretilen ROS' a maruz kalabilirler. Merkezi Sinir Sistemi serbest radikal hasarına oldukça hassastır. Beynin yüksek oksijen tüketimi, kolayca okside olabilen zengin yağ asitlerini barındırması, diğer organlara göre düşük seviyede antioksidan enzim ve vitamin içermesi onu ROS tarafından birincil hedef haline getirmektedir (2,4). Bu nedenle serbest radikallerin zararı bu beyin ve sinir hücrelerinde daha şiddetli ve çabuk gerçekleşmektedir.

Epileptik hastalarda yapılan çalışmalarda, selenyum ve E vitaminini de içerisine alan birçok antioksidanın saç ve kan örneklerinde sağlıklı insanlara kıyasla düşük olduğu bildirilmiştir. Deney hayvanları, hücre kültürü ve insanlara bu antioksidanların verilmesinin epilepsinin semptomlarını azaltmakta önemli rolü olduğu yüzlerce çalışma sonucu ile ortaya çıkarılmıştır (32,33). Örneğin, pentilen tetrazol (PTZ) ile epilepsi oluşturulan fare hipokampuslarının E vitamini ile tedavi edilmesi epileptik atak ve hücreyel bozuklukların düzeldiği rapor edilmiştir (32). PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçanlara E vitamini ve selenyum uygulanmasının epileptik atak sayılarını ve oksidatif stres değerlerini azalttığı gözlenmiştir (34,35). Yine dirençli epilepsi hastalarına selenyum verilmesinin epileptik atak geçirme sürelerini belirgin şekilde uzattığı ve epilepsi tedavisi için faydalı olduğu bildirilmiştir (36).

Beyin, diğer organlarla karşılaştırıldığında vücuda alınan oksijenin büyük bir kısmını (% 20) kullanır. Bu yüksek oksijen kullanımı ve metabolizmasının hızlı oluşu beyinde serbest radikal üretim miktarını artırır (2,31). Beyin proteinlerden ve bol miktarda fosfolipitlerden oluşan zarlardan oluşmuştur. Bu fosfolipitler de araşidonik asit ve *docohexaenoic* asitler gibi okside çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşur (2,31). Bu doymamış yağ asitleri serbest oksijen radikaline karşı savunmasız bir durumdadırlar. Çünkü zayıf çift bağlarla birbirine tutunan hidrojen iyonlarını

içermektedir. ROS da hasar vermek için bu zayıf bağlı hidrojen iyonlarını bir hedef olarak görmektedir (4). Beyin fosfolipitlerinin değişikliklerine neden olabilen oksidatif hasar nörolojik hastalıklarda rol oynuyor olabileceği ileri sürülmüştür (2). Oksidatif stresin hücrenin reaktif oksijen/nitrojen türlerine aşırı düzeylerde maruz kalması ile oluştuğu kabul edilir. Bu durumlar iskemi/reperfüzyon, glutamat, beta-amiloid peptidler, nörotoksinler, immun yanıtın bir parçası olarak oksidatif patlama veya serbest geçişli metal iyonlarının varlığında meydana gelir (31,32).

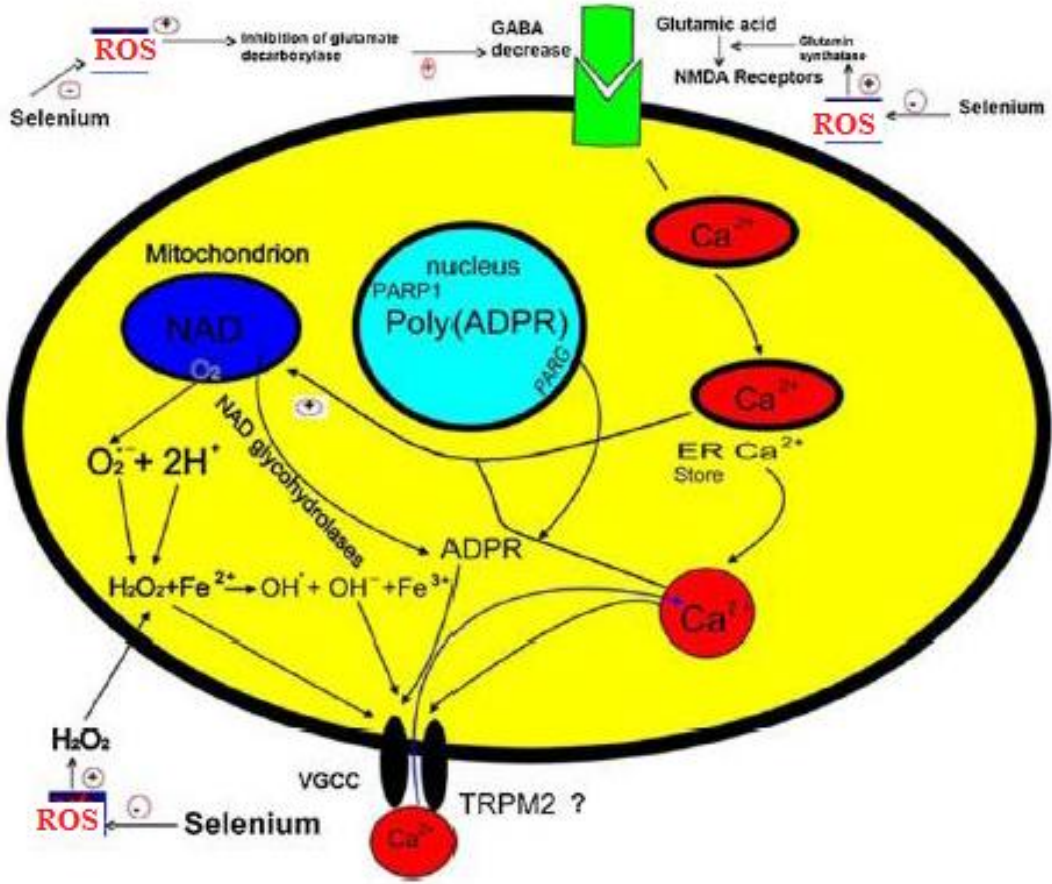
Epilepsi oluşumunda en önemli beyin merkezi hipokampus gözükmektedir. Hipokampus da beyine benzer şekilde doymamış yağ asitleri bakımından zengin fakat antioksidan savunma sistemi bakımından fakirdir. Bu nedenle de oksidatif stresin ana hedeflerinden bir tanesi de hipokampusdur. Bu nedenle epilepsi oluşumunda aşırı ROS artışının önemli role sahip olduğu uzun yıllardır çok iyi bilinmektedir (37-39).

Sistein en önemli esansiyel amino asitlerdendir. Sisteinden glutatyon (GSH) da sentezlenmektedir. GSH memeli hücrelerinde en fazla bulunan antioksidandır (40). GSH birçok antioksidan özelliğe sahip maddenin ön maddesidir. Örneğin, glutatyon peroksidaz enzimi (GSH-Px) ön madde olarak GSH i kullanmaktadır. GSH den sentezlenen GSH-Px enzimi, hidrojen peroksiti suya kadar parçalayarak, serbest oksijen radikallerini inhibe etmektedir (41). Hücrelerde GSH sentezlenebilmesi için, γ -glutamylcysteine synthetase enzimine gerek vardır. DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO), γ -glutamylcysteine synthetase enzimini baskılayarak hücre içi GSH düzeyini baskılamaktadır (40). Hücre içi GSH baskılanması, oksidatif stresin artışına neden olmaktadır (41). Hipokampal hücrelerde, oksidatif stres artışının mitokondriyal Ca^{+2} sinyali bozukluklarına neden olduğu ve bunun sonucunda epilepsi hastalığının etiyolojisinde rol oynayabileceği rapor edilmiştir (42,43). Benzer şekilde, Ono ve arkadaşları (44) antikoagulan ilaçların plazma GSH düzeyini belirgin bir şekilde azaltarak epileptik hastalarda oksidatif stres arttığını bildirmişlerdir.

2.2.2. Epilepsi ve Ca⁺²

Epilepsi; herhangi bir provokatör faktörün eşlik etmediği iki veya daha fazla tekrarlayan, beyindeki nöronların anormal ve yoğun deşarjları sonucu ortaya çıkan, şuur değişiklikleri ile birlikte olan ya da olmayan motor, duyusal, otonomik ya da psişik semptomlarla karakterize bir durumdur. Epilepsi, baş ağrısından sonra nöroloji hekimleri tarafından ikinci en sıklıkla görülen kronik bir nörolojik durumdur (45). Epilepsi dünya üzerindeki toplumun %2-3 ünü etkileyen nörolojik bir hastalıktır. Hastalığın etiyojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte kabul edilen bazı görüşler de mevcuttur (6). Epilepsinin patogenetik mekanizması; eksitatör ve inhibitör sistemler arasındaki dengenin bozulması ile açıklanmaktadır. Bu mekanizmalar kısaca, 1) GABA erjik inhibisyonun kaybı, GABA da fonksiyonel ve yapısal kayıp, 2) glutamaterjik eksitasyonda artış ve 3) intraselüler Ca⁺² düzeyinde artış kabul gören mekanizmalardır (45).

Tedavide kullanılan birçok antiepileptik ilaç olmasına rağmen hiçbirisi kökten tedavi (tekrarlayan epileptik atakların kaybolması) sağlayamamaktadır. Bilindiği gibi hücre içi serbest Ca⁺² miktarı nörolojik hücrelerde 50 nM (50-100 nM) civarında olup hücre dışına (1-3 mM~ 1.2 mM) kıyasla 10 bin-20 bin misli kadar azdır. Hücreye Ca⁺² girişi iyon kanalları hassas sınırlar içinde gerçekleşmektedir (3). Sitozole aşırı miktarda Ca⁺² akışı birçok nörolojik hastalığın oluşumunda temel teşkil etmektedir. Örneğin epilepside aşırı ROS ürünleri glutamat dekarboksilazı ve glutamin sentatazı baskılamakta ve GABA azalışına bağlı Cl⁻ girişi azalmakta ve N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptör düzeyleri bozulmaktadır (Şekil 2). Buna bağlı hücre içerisine aşırı Ca⁺² girişi olmaktadır (21). Epilepsi de en tipik semptom, sitozole aşırı artan sodyum ve Ca⁺² girişi ile en yaygın görülen semptom epileptik ataklar meydana gelmektedir.



Şekil 2. Epilepsi oluşumunda oksidatif stresin rolü.

Oksidatif stres tarafından, glutamin sentetaz enzimi artışına bağlı glutamik asit aracılı NMDA reseptörleri uyarımı bağlı sitozolik Ca^{+2} artışı gerçekleşir. Glutamat dekarboksilaz enzimi GABA salınımından sorumludur ve oksidatif stres ürünleri bu enzimi etkiler ve GABA azalışına bağlı hücre içi Cl^- azalışı da gerçekleşir. Oksidatif stres (örneğin hidrojen peroksit, H_2O_2) etkisi ile açılan TRPM2 kanalı ile sitozolde aşırı Ca^{+2} artışı mitokondride depolarizasyon artışı sonucu hücre içi daha fazla ROS üretilmesine neden olur. ADPR ve ROS, geri bildirim mekanizması ile TRPM2 kanallarının açılması yolu ile sitozole Ca^{+2} akışını artırır. Epilepsi oluşumunda voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının (VGCC) rolü iyi bilinmesine rağmen, TRPM2 kanallarının rolü konusunda henüz bir bildirim yoktur (3)

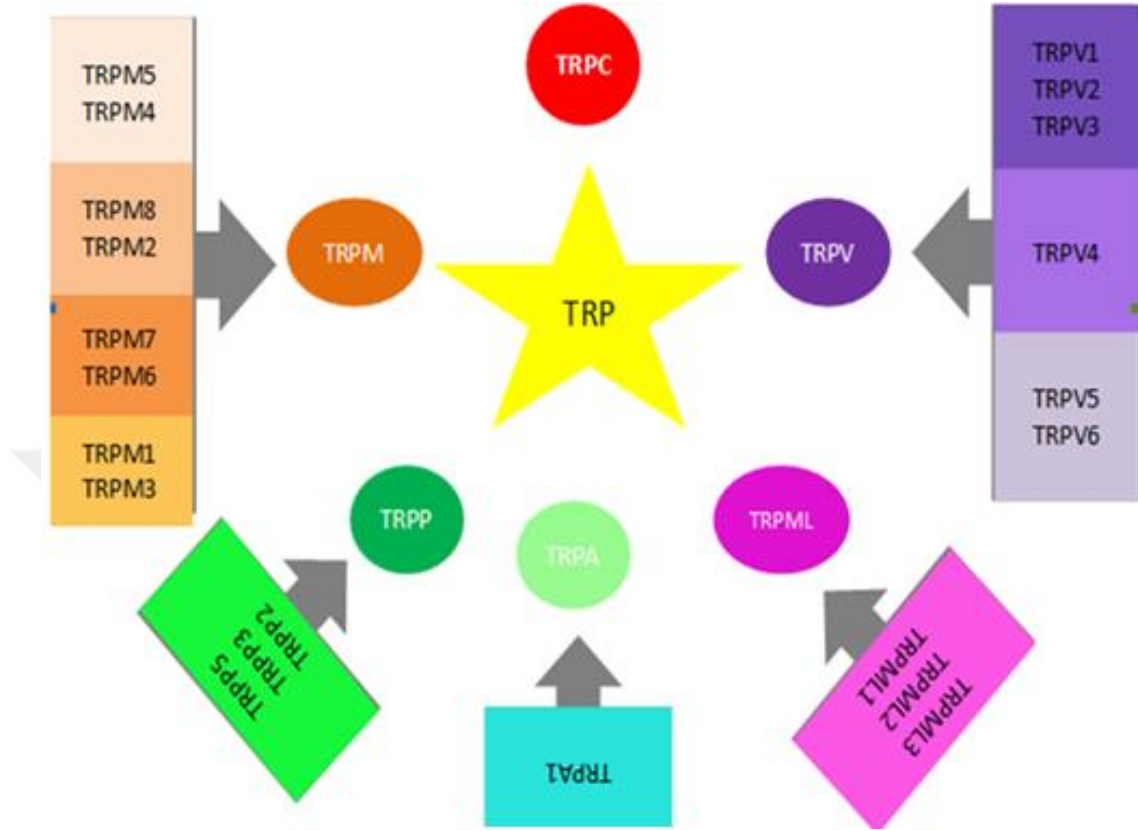
2.3. TRP Kanalları

2.3.1. TRP Kanal Ailesi

Transient reseptör potansiyel (TRP) kanalları ilk defa 1989 yılında *Drosophila* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde genetik çalışmalar sırasında tevafuken tanımlanmıştır (46). *Trp* gen mutasyonuna sahip olan fotoreseptörler sürekli ışığa maruz bırakıldıklarında fazik olarak (transient) voltaj değişikliğine yol açmaları nedeniyle bu isim verilmiştir. Ayrıca, hücre içerisine kıyasla dışında fazla olan Ca^{+2}/Na^{+} iyonlarına aynı anda geçirgen olmalarından dolayı Ca^{+2} kanalları tanımı yerine katyon kanalları tanımı kullanılmaktadır. Memelilerde 6 alt aile içerisinde 28 TRP kanal tipi tanımlanmıştır (47,48). TRP altfamilyasının grupları ve içerdikleri alt grup sayıları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3). TRP *conancial* (TRPC) yedi alt aileden, TRP *vanilloid* (TRPV) altı alt aileden, TRP *melastatin* (TRPM) sekiz alt aileden, TRP *polycystein* (TRPP) üç alt aileden, TRP *mucolipin* (TRPML) üç alt aileden, TRP *ankyrin* (TRPA) ile no-mechano-potential (NOMCP, TRPN) bir alt aileden oluşmaktadır (Şekil 3).

Tüm bu TRP katyon kanalları henüz tam olarak karakterize edilememesine rağmen, birçok insan hastalığı onların katılımıyla ortaya çıktığından bunlara olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Kanal gözeneginin 5. ve 6. segmentleri arasında bulunan bir iletken iyon etrafında homo veya heterotetromerik düzenlemelerle TRP kanalları voltaj-kapılı K^{+} kanallarına benzer olarak basit bir yapıya sahiptir (47,48). Dördüncü transmembran segmenti ise pozitif yüklü değildir. TRPV N ucu ve TRPV tekrarlı bağlayıcı, çoklu *ankyrin* içerir. TRPC ve TRPM kanallarına ait 6. segmentin C terminal kısmı “TRP alanı” içerir. TRPM2 kanallarında iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasında gerçekleşmektedir. Ayrıca, TRPM2 ve TRPC kanallarının C ucu ADPR pirofosfataz (ADPR’yi, riboz 5- fosfat ve adenzin monosfosfata parçalar ve kanal açılır) enzim aktivasyonu içermektedir. ADPR pirofosfataz aktivasyonu TRPV kanallarında yoktur. Buna ilaveten bütün TRP kanalları çok yönlü düzenleyici protein etkileşim alanlarına sahiptir. Çok yönlü Protein Kinaz A (PKA) ve Protein Kinaz C (PKC) varsayılan fosforilasyon alan fonksiyonları tanımlanmış ve kısmen

test edilmiştir. Bir de birkaç TRP kanallarında Phosphatidylinositide 3-kinase SH2-tanım alanları varlığı ispatlanmıştır (49).



Şekil 3. TRP süper ailesi ve alt tipleri (50).

TRP kanalları ya direkt olarak plazma zarlarındaki Ca^{+2} giriş kanalları gibi davranmakta ya da Ca^{+2} giriş kanallarının modülasyonu için itici güç olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarında değişime yardımcı olmaktadır. Karakterize edilmiş tüm işlevsel TRP kanalları (TRPM4 ve TRPM5 kanalları dışında) Ca^{+2} için geçirgendirler. Bu durum sadece monovalent katyonlar için geçerli değil, aynı zamanda Ca^{+2} ve Mg^{+2} içinde geçerlidir. İki memeli TRP'leri (TRPV5 ve TRPV6) Ca^{+2} çok geçirgendir. TRPM6 ve TRPM7 Mg^{+2} 'a çok geçirgen, TRPV1, TRPML1 ve TRPP3 kanalları da H^{+} iyonlarına çok geçirgendir (8).

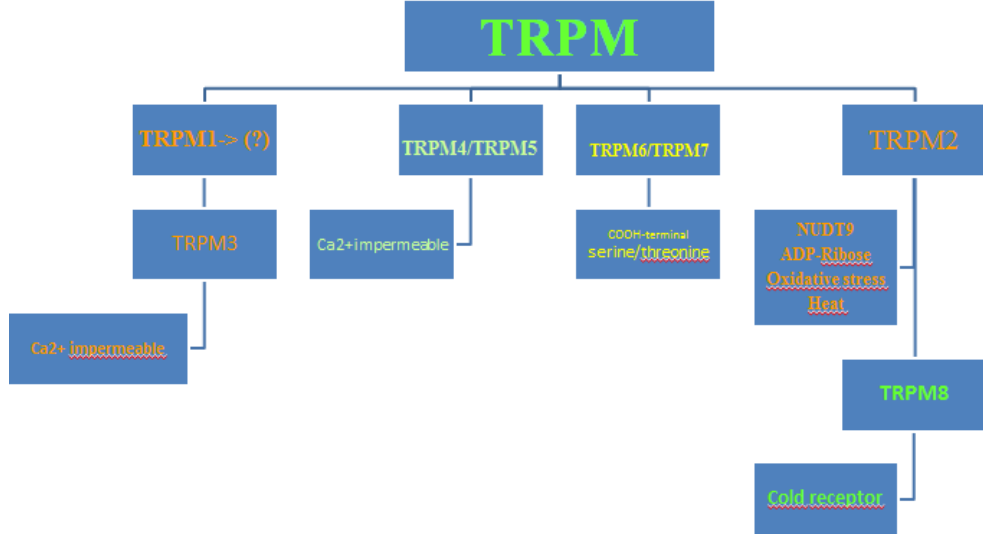
TRPV1 kanalları hakkında en çok araştırma yapılan TRP kanallarından birisidir. TRPV1 kanalı, kırmızı acı biberde bulunan kapsaisin, yüksek ısı ($43\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve proton gibi uyarıcılarla aktive olurken, kapsazepin (CPZ) ve 5'-iodoresiniferatoxin (IRTX) gibi TRPV1 kanal blokeleri vardır. Epilepsi de en iyi araştırılmış TRP kanalı TRPV1 kanalıdır (17,18,51).

2.3.2. TRPM Alt Ailesi

TRPM alt ailesinin sekiz üyesi vardır ve bunlar 4 grup içerisinde yer alırlar. Bunlar; TRPM2/TRPM8, TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5 ve TRPM6/TRPM7 dir (47,48) (Şekil 4).

Hem TRPM6 hem de TRPM7 fonksiyonel COOH terminal *serine/treonin* kinaz içerirken, TRPM2 ADPR pirofosfataz faaliyeti gösteren fonksiyonel NUDT9 homoloji alanı içerir (10). Bu alan ADPRun yanı sıra oksidatif stres ile de aktive olabilmektedir (52,53). Ca^{+2} 'u çok geçirenden (TRPM6/TRPM7 ve TRPM3 'ün ek yerine kadar) Ca^{+2} 'u geçirmeyene kadar (TRPM4 ve TRPM5) Ca^{+2} geçirgenliği farklılıklar gösterir. Buna rağmen TRPM1 kanalı hariç tüm TRPM katyon kanalları bu güne kadar karakterize edilmemişlerdir. TRPM4 ve TRPM5 ısıya duyarlı Ca^{+2} aktif kanallarıdır (7). TRPM3 kanalları, TRPM6 ve TRPM7 kanallarına benzer şekilde hücre içi Mg^{+2} seviyesi vasıtasıyla düzenlenir. Hücre şişmesi ve *sphingosine* olaylarının meydana gelmesi önemli aktivasyon yoluyla TRPM3 aktivasyonunun rapor edildiğini gösterir. TRPM8 ise pek bilinmeyen soğuk reseptördür (29,47,48).

Bazı sinir hücreleri (örneğin arka kök gangliyon hücreleri ve siyatik sinirler) soğuk veya sıcak ile aktive olabildikleri için bunlara termo-reseptör içeren kanallar ismi verilmektedir. Şimdiye kadar 11 TRP kanalının termo-reseptöre sahip olduğu bildirilmiştir (54). Bunlar arasından iki TRP kanalı (TRPV1 ve TRPV2) yüksek ısı (sırası ile $43\text{ }^{\circ}\text{C} \geq$ ve $55\text{ }^{\circ}\text{C} \geq$) ile aktive olurlar. Beş TRP kanalı (TRPV1-4 ve TRPM2) değişik ısı dereceleri ile aktive olmaktadır. , Fakat iki TRP kanalı soğuk (TRPA1) ($\leq 17\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve serin (TRPM8) ($\leq 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) ile aktive olmaktadır (55-58). İlave olarak, 11 termo-reseptör içeren kanaldan geriye kalan iki kanal TRPM3 ve TRPC5 dir. TRPM3 ağır yapıcı düzeyde ısı ile aktive olurken, TRPC5 soğuk sensor içermektedir (59,60). Termo-reseptör içeren, TRPV1, TRPA1 ve TRPV4 kanalları aynı zamanda oksidatif stres ile de aktive olmaktadır. Bu nedenle, TRPA1 ve TRPV4 kanalları ROS ürünleri (örneğin hidrojen peroksit) aktive olmaktadır (61-63). Arka kök gangliyon hücrelerinde oksidatif stres ile aktive olan TRPA1 ve TRPV4 kanalları sistine redoks antioksidan sistem üyeleri (örneğin GSH ve selenyum) inhibe oldukları bildirilmiştir. (62,64).



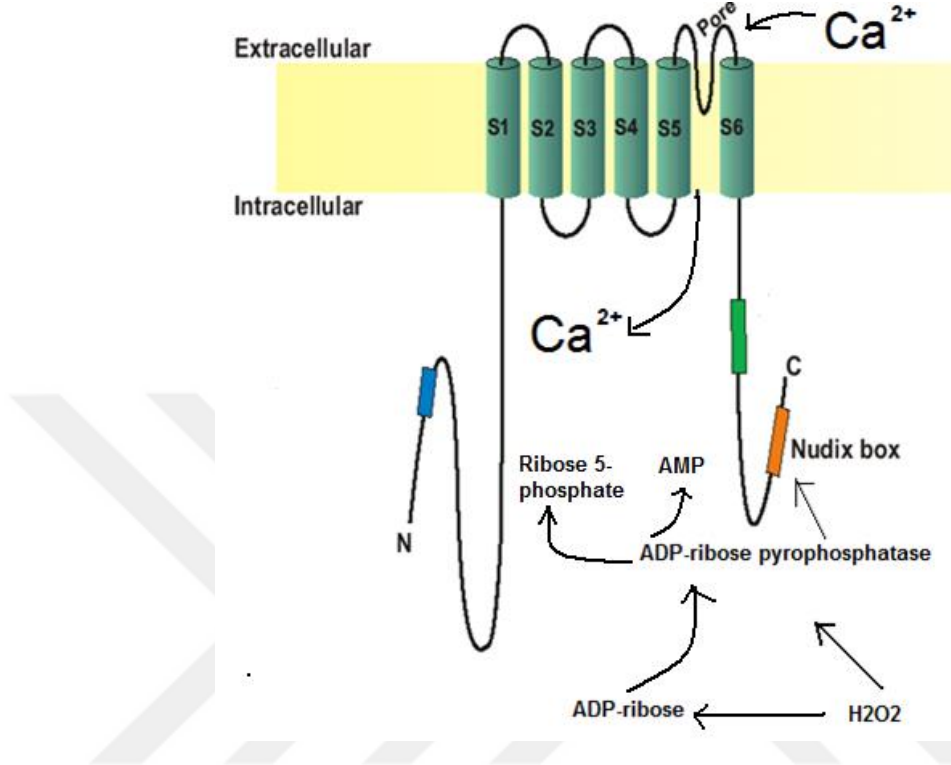
Şekil 4. TRPM alt ailesinin yedi alt ailesi ve alt tipleri.

2.3.3. TRPM2 Kanalı

TRPM2 kanal ekspresyonu 1998 yılında ilk kez kanser (melastatin) hücrelerinde yapılmıştır. Daha sonraki yapılan ekspresyon çalışmalarında beyin ve sinir hücrelerinde de yüksek düzeyde bulunduğu bildirilmiştir (47). Eski ismi LTRPC2 olan TRPM2 kanalı hücre içi çekirdekte üretilen ADPR tarafından dolaylı aktive olduğu bildirilmiştir (10,65). Daha sonra yapılan birçok çalışma sonuçları ile ROS ürünleri ile aktive olduğu da bildirilmiştir (52,53). TRPM2 kanalı oksidatif stres ile aktive olduğu ortaya çıkartılan ilk TRP kanalıdır. Daha sonraları yapılan çalışmalar ile günümüze en az 11 TRP kanalının oksidatif stres ile aktive olduğu bildirilmiştir.

ADPR üretimi G proteine bağlı reseptörlerce kimyasal kanal aktivasyonu ile başlatılır. Reseptör aktivasyonu aynı zamanda hücre içi Ca^{+2} yoğunluğunun yükselmesine ve IP_3 tarafından hücre içi organellerden Ca^{+2} serbest bırakılmasını sağlar. TRPM2 hücre içersinde güçlenen Ca^{+2} akımı bir pozitif geri bildirim mekanizması ile daha fazla TRPM2 aktivasyonunu sağlar. Alternatif kaynaklar ADPR içeren mitokondri ve çekirdektir. ADPR polimerlerinin uyarımı sonrası poli (ADPR) polimeraz-1 (PARP-1)'e ve sonrasında poly (ADPR) glikohidrolaz (PARG) tarafından ADPR'ye hidroliz edilir. Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyabilir (20). Sitolozde Ca^{+2} artışı mitokondride depolarizasyon ve porların

açılması veya hücre dışından sitozole hidrojen peroksit gelişi daha fazla nitrik oksit sentaz (NOS) ve ROS üretilir. ADPR ve ROS, geri bildirim mekanizması ile TRPM2 kanallarının açılması yolu ile sitozole Ca^{2+} akışını artırır (20,27).



Şekil 5. Oksidatif stres ürünleri ve ADP-riboz (ADPR) TRPM2 kanalının C ucu (Nudix box) kısmındaki ADPR pirofosfotaz enzimini aktive ederek kanalı açmaktadırlar. Oksidatif stres ürünleri hem hücre dışında hem de içerisinde üretilmektedir. ADPR, NAD^+ den PARP ve PARG enzimlerince üretilmektedir. (7).

Oksidatif stres ve onun ürünleri olan ROS, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) den 3 yolla ADPR üretimine neden olmaktadır (7,20). TRPM2 kanallarının moleküler yapısına bakıldığı zaman kanalın diğer çoğu kanal gibi 6 segmentten meydana geldiği ve katyon girişlerinin 5. ve 6. segmentler arasından gerçekleştiği gözlenmektedir. Ayrıca kanalın bir C (Nudiks boks) ve N uçları bulunmaktadır (65). Bu kanalın oksidatif stres aracılı aktivasyonu ilk keşfedildiğinde, oksidatif stresin ADPR üretimini artışı sonucu TRPM2 kanallarının aktive olduğunu savunmuştur (52,53). Fakat, daha sonraları yapılan çalışmalarda oksidatif stres ve ADPR'un birbirinden bağımsız bu kanalları aktive edebildikleri tekli kanal patch-clamp kayıtları ile gösterilmiştir (12).

Günümüzde doğrudan bu kanalları doğrudan kapatan bir kanal blokleri mevcut değildir. Ayrıca, mevcut Ca^{2+} kanal blokerleri de bu kanalları bloke

edememektedir. Patch-clamp çalışmaları önderliğinde TRPM2 kanallarını doğrudan bloke eden maddelerin araştırılması önem arz etmektedir. Epilepsi etiyojisinde oksidatif stresin rolünü araştıran yayınlar oldukça fazladır. Fakat oksidatif stres aracılı TRPM2 kanal aktivasyonunun epileptik nöronlarda etkisi hakkında literatürde yeterince bilgi mevcut değildir. Bu nedenle bu tez çalışması planlanmıştır.

2.3.4. Dolaylı TRPM2 Kanal Blokeri Kimyasallar

Dolaylı TRPM2 kanal blokerleri [miconazole, clotrimazole (CTM), flufenamic acid (FFA), N-(p-amylicinnomoyl)anthranilic acid (ACA)] ve 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) dir. Bilindiği gibi TRPM2 kanallarını doğrudan bloke eden ve klinikte toksik etkisi olmadan kullanabilecek kanal blokörü sayısı sınırlıdır.

1) **CTM:** Bu kimyasallar imidazol türevleri olup antifungal olarak kullanılmaktadırlar. TRPM2 kanallarını geri dönüşümsüz bloke etmektedirler (66,67). Bu nedenle TRPM2 kanallarını bloke etmek amacıyla klinikte kullanılamamaktadır. Sadece araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

2) **FFA:** FFA non steroidal bir inflamasyonu önleyici kimyasal olarak kullanılmaktadır. Fakat alkol veya DMSO da çözünmektedir ve suda çözünmemektedir (66). Ayrıca değişik hücrelerde yapılan birçok çalışmada TRPM2 kanalları üzerinde etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (11,66). FFA'nın diğer dezavantajı, TRPM kanallarını en fazla %88 bloke edebilmesidir (11,20).

3) **ACA:** TRPM2 kanal blokörü olmasının yanı sıra fosfolipaz A2 (PLA) enzimini bloke etmektedir. Bu sayede hücre içerisinde IP3 yolu ile Ca^{+2} salınımını azaltmaktadır. ACA ve ACA benzeri kimyasal yapıların pankreas beta hücreleri ile kalp-damar sistemi hücrelerinde araşidonik asit ve ikincil habercileri bloke ettiği gözlemlenmiştir. 20 μ M ACA'nın çeşitli TRP kanallarını (TRPC6, TRPM2, TRPM8) bloke ettiklerini bildirilmiştir (68). Alkol veya DMSO da çözünmektedir ve suda çözünmemektedir. Spesifik bir kanal inhibitör olması da diğer bir dezavantajdır (69). Bununla beraber sınırlı sayıda TRP kanalını bloke etmesi nedeni ile en spesifik TRPM2 kanal blockeridir. In vitro ortamlarda en fazla tercih edilen

TRPM2 kanal brokeridir (70). Hücre kültürü ortamlarında 0.01-0.1 mM dozlarında (ortalama 0.05 mM) kullanılmaktadır ve deney hayvanı çalışmalarında 10-100 mM dozlarında intraperitoneal enjekte edilmektedir (68,71). Gelderblom ve ark. (72) fare serebral şok modelinde farelere 5 mg/kg ve 25 mg/kg dozlarında iki saat öncesinde ACA enjekte etmişler ve 5 mg/kg lık dozun TRPM2 kanalı inhibisyonunda fayda etmezken, 25 mg/kg dozun fayda sağladığını gözlemlemişlerdir.

4) 2-APB. TRPM2 kanalları keşfedilmeden önce, inositol trifosfat (IP3) inhibisyonu ile Ca^{+2} girişini bloke ettiği bildirilmesine rağmen kesin etkisi belli değildi (73). Çünkü bir kısım araştırmacılar 2-APB nin hücre sitozolüne hücre içi organellerden ve dışından Ca^{+2} girişini plazma zarı Ca^{+2} -ATPaz enzimini bloke ederek gerçekleştirdiğini öne sürmüşlerdir. 2-APB, alkol veya DMSO da çözünmektedir fakat suda çözünmemektedir. Dolaylı TRPM2 kanal blokleri etkisinin varlığı rapor edilmiştir (74). TRPM2 kanalı bloke etmesine rağmen TRPV1 kanalını açmaktadır.

Değişik TRPM2 kanal blokürlerinin nörolojik hücrelerdeki etkileri Tablo 1 de özetlenmiştir. Fenamateler FFA benzeri non steroid antiinflamatuvar özellik göstermektedirler. Buna bağlı olarak kanallardan iyon geçişini düzenlemektedirler. $\geq 50 \mu\text{M}$ FFA yaygın olarak TRPM2 kanallarını bloke etmek amacı ile kullanılmaktadır (20,67). CTM ve econazole, 3-30 μM miktarlarında kullanıldığında TRPM2 kanallarını bloke ettikleri gözlemlenmiştir (67). Olah ve ark. (75) yaptıkları kültür nöronlarındaki bir çalışmada ADPR un neden olduğu TRPM2 aktivasyonu clotrimazole, FFA and ACA ile bloke edilmiştir.

Bai ve Lipski (61) hipokampus kesit kültürlerinde TRPM2 kanal blokörlerinden CMT (20 μM), ACA (25 μM) ve FFA (200 μM) denemişler. Sonuç olarak, premidal nöronlarda TRPM2 kanallarının inhibisyonu üzerinde TRPM2 kanal blokürlerinin etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, antioksidanların (Trolox 500 μM ve MitoE 2 μM) hücre kültürü ortamına eklenmesinin nöronal ve hücre ölümünü bloke ettiklerini gözlemlemişlerdir.

Jia ve ark. (76) erkek farelerde iskeminin neden olduğu şoku önlemede CMT nin TRPM2 kanalını düzenleyerek faydalı olduğunu bildirmiştir. Benzer sonuçlar Shimizu ve ark. (77) tarafından da bildirilmiştir. İki saat önce farelere CMT

uygulanmasının TRPM2 kanalını düzenleyerek iskeminin neden olduğu zararları önlemede faydalı olduğunu göstermişlerdir. PARP-1-KO farelerde, vahşi fare tiplerine kıyasla iskemik hasara daha az maruz kaldıklarını fakat CMT nin PARP-1-KO farelerde, iskeminin neden olduğu zararları önlemede faydasının olmadığını rapor etmişlerdir.

Tablo 1. Nörolojik hücrelerde dolaylı TRPM2 kanal blokerlerinin etkisi.

Blokörü	Hücreler	Etkisi	Kaynaklar
FFA	Sıçan mikroglia	Bloker	Kraft ve ark. [68]
ACA	Sıçan primer striatal nöron	Bloker	Olah ve ark. [75]
ACA	Sıçan AKG ve hipokampus	Bloker	Kahya ve ark. [64]
ACA	Siyatik sinir	Bloker	Yüksel ve ark. [78]
2-APB	Sıçan AKG ve hipokampus	Bloker	Nazıroğlu ve ark. [79]
CMT	Sıçan primer striatal nöron	Bloker	Olah ve ark. [75]
FFA	Sıçan primer striatal nöron	Etkisiz	Olah ve ark. [75]
FFA	Hippocampal nöronlar	Etkisiz	Bai- Lipski [61]
CMT	Fare	Faydalı	Jia ve ark. [76]
CMT	Fare	Faydalı	Shimizu ark. [77]

AKG, arka kök gangliyon hücreleri

2.3.5. Genetik Yetersiz Fareler Üzerinde TRPM2 Çalışmaları

TRPM2 kanalının biyolojik rolünde önemli bir ilerleme TRPM2 genetik yetersiz (TRPM2-KO) fareler üzerinde yapılan bir yeni çalışma tarafından sağlanmıştır (80). TRPM2-KO farelerinden inflamatuvar aktivasyon ve makrofaj üretiminde hidrojen peroksit kademeli sinyal aktivitesi yer alır. TRPM2-KO farelerin CA1 piramidal nöronlarında iskemi/reperfüzyona bağlı sitozolde çinko ve ROS artışında TRPM2 kanalının kritik ve önemli bir rolünün olduğu rapor edilmiştir (81). Bilindiği gibi beyin mikroglia nöronları beyinde artık ürünlerin ve yutulan (fagosite edilen) zararlı ürünlerin uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır. Fakat inflamasyon gibi bazı patolojik durumlarda, mikroglia nöronları aşırı aktive olarak nöronlara zarar verebilmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (82), TRPM2-KO farelerde mikroglia nöronlarının lipopolysaccharide ve interferon γ (LPS/IFN γ) ile uyarılması sonucu NO üretimini artırdığı ve sitozolde artan Ca⁺² ise mikroglia NO, p38 MAPK

and JNK sinyal yollarını uyardığını bildirilmiştir. Sitozole Ca^{+2} girişinden sorumlu olan kimyasal kapılardan bir tanesi glutamat reseptörleridir. NMDA ve benzeri glutamat reseptörleri epilepsi etiyojisinde önemli bir role sahiptir. TRPM2-KO beyin kesitlerinde iskeminin neden olduğu glutamat reseptörlerindeki değişimler araştırılmıştır. Glutamat (NMDA) reseptörlerinin (GluN2A- ve GluN2B) azalmasına bağlı olarak TRPM2 kanalı bulunmayan TRPM2-KO farelerde ateşleme potansiyellerinin ve uyarımın (EPSP) azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre iskeminin zararlı etkisini TRPM2 kanal aracılı gerçekleştirdiği bildirilmiştir (83). İlginçtir ki NMDA reseptörü aracılı sitozolik Ca^{+2} artışı, TRPM2 kanallarını da aktive etmiştir. Bu sonuçlarda sinaptik transmisyonunda TRPM2 kanalının rolünü göstermiştir. TRPM2-KO farelerin hipokampal kesit ve kültürlerinde yapılan çalışmalarda TRPM2 kanalının bulunmaması, NMDA reseptörleri long term potentiation (LTD) potansiyellerinin de bozulduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre de hipokampus sinaptik plastisitesinde TRPM2 kanallarının önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (84). Fakat epileptik TRPM-KO deney hayvanlarında veya insan nöronlarında yapılmış herhangi bir çalışma henüz mevcut değildir. TRPM2-KO farelerin glia ve arka kök gangliyon (AKG) nöronlarında inflamasyonun ve nöropatik ağrı oluşumundaki rolleri araştırılmıştır (85). Bu amaçla Carrageenan ile inflamasyon ve siyatik sinir hasarı oluşturulmuş ve TRPM2 mRNA varlığının arttığı gözlemlenmiştir. TRPM2 genetik yetersiz farelerin nötrofillerin infiltrasyon ve kemokin salgılama yetenekleri azalmıştır. TRPM2-KO farelerde glia aktivitesi de durmuştur. Makrofaj ve mikroglia hücrelerinde fagositik aktivitenin azalmasına bağlı nitrik oksit sentezi de azalmıştır. Sonuçta, nötrofil infiltrasyonu ile aktivitesi ve mikroglia fonksiyonlarını gerçekleştirmede TRPM2 kanal aracılı çalışıklarını ve TRPM2 kanalının periferal ağrı ve inflamasyon oluşumundaki önemine değinmişlerdir.

2.3.6. Nörolojik Hücrelerde TRPM2 Kanallarının Rollerini

İmmunohistokimyasal çalışmalar ve kantitatif PCR teknikleri Merkezi Sinir Sistemin (MSS)'nin çoğunluğunda TRPM2 kanallarının varlığını göstermiştir. Ancak glia içinde kendisinden ayırt edilmek için nöronlarda bu ifadeye izin verilmediği için

homojen doku örneklerinden bu kanıt elde edilmiştir. Serebellar granül ve astrositlerde TRPM2 transkripti veya fonksiyonel kanallarını tanımak için yapılan yeni bir çalışma tarafından böyle bir ayırım yapmanın önemi vurgulanmıştır (86). Nöronal olmayan hücrelerde TRPM2'nin MSS dağılımı kendi ifadesiyle haberleşen ve öneri götürülen mikroglia hücrelerinde TRPM2 varlığı bildirilmiştir (75,77,86).

2.3.6.1. Mikroglia ve Astroglia Aktivasyonlarında TRPM2'nin Rolü

Bakteri ve hücrel atıkları uzaklaştıran mikroglia, diğer aktif makrofajlara benzer şekilde, araşidonik asit türevlerini ve hidrojen peroksit içeren inflamatuvar mediyatörlerini üretir. Bu mikroglia hücreleri MSS' de immün savunması ve doku onarımı için önemli bir faktördür. Kraft ve ark. (86) hücre kültüründe üretilmiş serebellar granül nöronlarında TRPM2'yi saptayamamalarına rağmen, mikroglia hücrelerinde yeni kalsiyum giriş yolunun hidrojen peroksit ve ADPR'yi birleştirdiğini ve bu yolun TRPM2 ile ilgili olduğunu açıkladılar. Ohana ve ark. (87) kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR yardımıyla ratlardaki Ca^{+2} 'a geçirgen kabul edilen TRPM2 kanalları ifadesini kültüre edilmiş mikroglia hücrelerinde araştırdılar ve TRPM2 genleri için kültüre edilmiş rat mikroglia hücrelerinde transkript tespit ettiler.

Nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesinde astroglia hücrelerinin rolü hala bilinmemesine rağmen, normal ve anormal nöronal çevre düzenlemesinde onların rol oynuyor olması dikkat çekicidir. Ca^{+2} sinyal yığını sayesinde, astroglia kontrol gen ekspresyonu, nöronal farklılaşma ve programlı hücre ölümü tüm gelişim ve dejeneratif süreçlerin ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır. Oksidatif stres koşulları altında mikroglia hücreleri ROS temizleyicisi tarafından koruyucu bir işlev göstermesi sebebiyle nöronlar için enerji desteği ve besleyici veya inflamatuvar faktörlerin Ca^{+2} 'a bağımlı salgı yoluyla dejenerasyonuna bağlı direkt nöronal direnç oluşmasını sağlar (88). Astroglia hücrelerindeki TRPM2 kanallarıyla ilgili olarak pek fazla rapor bulunmamaktadır. Bond ve Greenfield (89) oksidatif stresin önemi doğrultusunda protein sentezi baskılanması ve sonraki baskılanmış aşırı protein ekspresyonundan olan düşük voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları (L-VGCC) kuşatmasının etkileri ve TRPM2 inhibisyonunu arttırdığını rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar oksidatif

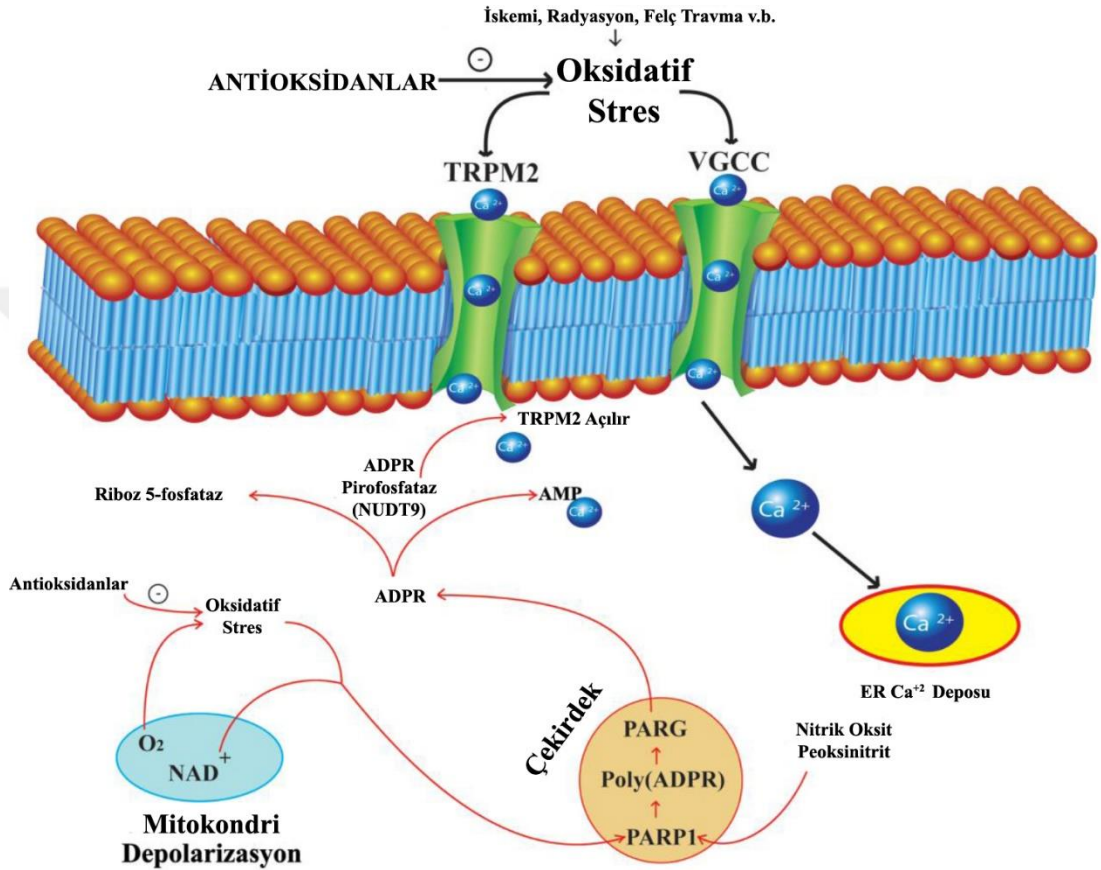
streste Ca^{+2} sinyalizasyonu astroglial transkripsiyon ve translasyon yanıtlarının ayrılmaz bir parçası olduğunu göstermiştir. BSO ile hücre içi GSH yetersizliği oluşturulan glia nöronlarında nöro-inflamasyonu artırırken, GSH ve TRPM2 kanal blokeri CTM ile inkübe edilen glial nöronların inflamasyon yapıcı yeteneğinin düzeldiği bildirilmiştir (90). TRPM2-KO farelerde mikroglia nöronlarının aktivasyonlarının oluşmasında TRPM2 kanal aracılı sitozolde Ca^{+2} akışının ve nitrik oksitin rolü TRPM2-KO fare mikroglia nöronlarında yapılan bir seri çalışma sonucu açık bir şekilde ortaya konmuştur (82,85)

2.3.6.2. Hipokampus ve TRPM2 Kanalı

TRPM2 kanallarının farklı hücre tiplerinde mevcut olduğu bildirilmiştir. Memelilerin beyinlerinde yüksek ekspresyon için ikna edici kanıtların olmasının yanı sıra nöronal olmayan hücrelerde de TRPM2 kanallarının güçlü ekspresyona sahip olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, nöronlarda fonksiyonel TRPM2'nin varlığı en iyi şekilde tartışılmalıdır. Olah ve ark. (75) hipokampal kesitlerdeki CA1 inter nöronlar dahil hipokampus piramidal nöronlarında, fonksiyonel TRPM2 katyon kanallarının varlığının çok fazla olduğunu bildirmiştir (75,91,92). Ayrıca, hipokampal nöronlardaki TRPM2 kanalını açmak için ADPR'nin tek başına yeterli olmadığını ve tam aktif TRPM2 kanalları için voltaja bağımlı Ca^{+2} kanallarında Ca^{+2} girişine eşlik eden akışın ve/veya NMDA reseptörlerinin gerekli olduğu sonucuna varmışlardır (84).

Genç miyoklonik epilepsideki apoptozis oluşumunda TRPM2 kanallarının ekspresyon ve immunohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir (93). Hipokampal nöronlarda iskemi aracılı meydana gelen nöron ölümlerinin TRPM2 kanal aracılı olduğu Wild tip ve KO farelerden elde edilen nöronlarda in vitro olarak elektrofizyolojik analizlerle gösterilmiştir. PARP enziminin aşırı üretiminin nöron ölümlerine neden olduğu iyi bilinmesine rağmen bunun nasıl gerçekleştiği konusunda açık olmayan bildirimler mevcuttur. Bu konuda yapılan bir çalışmada N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine (MNNG, 100 μ M ve 5 dakika inkübasyon) ile PARP enzimi üretimi aşırı artırılmış ve hipokampal nöron ölümü üzerinde TRPM2 kanalının rolü olmadığı bildirilmiştir (94). Serebral şok oluşumunda TRPM2

kanalının rolü yakın zamanda yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (72). Grubumuzun da yakın zamanda yaptığı çalışmalarda yaşlı fare ve beyin hasarı oluşturulan rat hipokampal nöronlarında apoptozis, kaspaz aktivasyonları, mitokondriyal depolarizasyon ve hücre içi ROS üretiminin TRPM2 aracılı gerçekleştiği gösterilmiştir (64,78,95).



Şekil 6. TRPM2 kanallarının, oluşan oksidatif stresle ve bunun neticesi olan, NAD⁺ dan üç farklı yolla oluşan ADPR ile aktive olma mekanizmalarını gösteren şekil. Hücrede lipid peroksidasyon sonucu NAD⁺ dan üç farklı yolla ADPR üretilir. 1. NAD⁺ poli-ADPR polimeraz (PARP) aktivasyonu yoluyla poli-ADPR oluşur. Bu poli ADPR ise poli-ADPR glikohidrolaz (PARG) enzimi vasıtasıyla ADPR dönüşür. 2. NAD⁺ CD38 reseptöründe bulunan NADase enzimi yoluyla, 3. NAD⁺ dan siklik ADPR (cADPR) oluşur ve cADPR hidrolaz enzim aktivasyonu ile de ADPR oluşur. TRPM2 katyon kanallarının C ucunun Nudix alanında bulunan ADPR pirofosfataz enzimi yardımıyla, ADPR, riboz-5 fosfat ve AMP ye parçalanıp TRPM2 kanallarının açılmasına sebep olur (43).

TRPM2 kanallarının açılmasıyla hücre içinde artan kalsiyum ile ilişkili hücrel disfonksiyon ve bir dizi olay yoluyla oluşan amiloid beta, beyin endotel hücrelerini direk bozabilir. Vasküler endoteldeki bu bozulma yeterli kan akışını engelleyebilmekte ve nöronal canlılık üzerinde olumsuz sonuçlar doğurarak

Alzheimer tipi demans patogenezinde rol oynayabilmektedir. Serebral endotel hücrelerine amiloid betanın bağlanması, ROS üretmek için İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aktivitesini uyarmakta, ROS ve NO birleşerek peroksinitrit oluşturmakta ve DNA hasarına sebep olmaktadır (96).

2.4. Apoptozis

Apoptozis morfolojik özellikleri arasında hücre membranı kabarması, hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu ve nükleozomal fragmentasyon sayılabilir. Normal koşullar altında, apoptozise uğrayan hücreler, makrofajlar veya hücrelerin parçalanmış kalıntılarını tüketen komşu hücreler tarafından kabul edilir. Apoptotik yollar, birçok klinik öncesi araştırmaların odak noktasıdır. Apoptoza yol açan iki farklı moleküler sinyal yolağı vardır: İntrensik mitokondri aracılı yolağı ve ekstrinsik hücre dışı aktif yolağı (97,98). İçsel yolağı genellikle, DNA hasarı ve yüksek seviyelerde ROS üretiminin yanı sıra viral enfeksiyon ve onkojenlerin aktivasyonu gibi hücre içi stres sinyallerine tepki olarak aktive edilir. Dışsal yolağı ise hücre dışı bir ligandın plazma membranı üzerindeki bir reseptöre bağlanmasıyla tetiklenir. Her iki yolağı da hücrel organellerin ve yapıların hızla parçalanmasına aracılık eden kaspazlar adı verilen proteolitik enzimleri aktive eder. Kaspazlar, aspartik asit içeren motiflerin bölünmesine katılan bir nükleofilik sistein kalıntısı içeren bir protein ailesidir (99). Kaspazlar, bölünme olaylarını başlattıktan sonra aktif oligomerler oluşturan aktif olmayan öncüler olarak ifade edilir. İki grup kaspaz vardır. Bunlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 10) ve efektör kaspazlardır (kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7). Kanıtlar, başlatıcı kaspazların oto katalitik aktivasyon yeteneğine sahip olduğunu gösterirken, efektör kaspazların başlatıcı kaspaz klevajı ile aktivasyona ihtiyaç duyduğunu göstermektedir (100,101).

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Apoptozis için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye başlar, hücre iskeleti dağılır, çekirdek zarı yer yer erir ve çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır.

Apoptozis, genlerle düzenlenen normal gelişim aşamaları ve doku homeostazinin sağlanmasında hücreler için kritik önemi olan programlanmış hücre ölümüdür. Hücresel apoptotik mekanizmaların en büyüğü kaspazlar (aspartik asitle yönlendirilen sistein proteazlar) olarak bilinen enzimlerin birden çok protein substratının topluca yıkımlanmasıyla hücresel yapı ve fonksiyonun bozulması sonucu hücre ölümüne neden olan enzimatik reaksiyonlardır.

Özetle, apoptozis başlıca 3 yol ile gerçekleşir.

1) Ekstrinsik yol: Hücre yüzeyi apoptozis reseptörü aracılığıyla

2) İntrinsik yol: Mitokondriye bağımlı ölüm (intrinsik yol) tespit edilmiştir

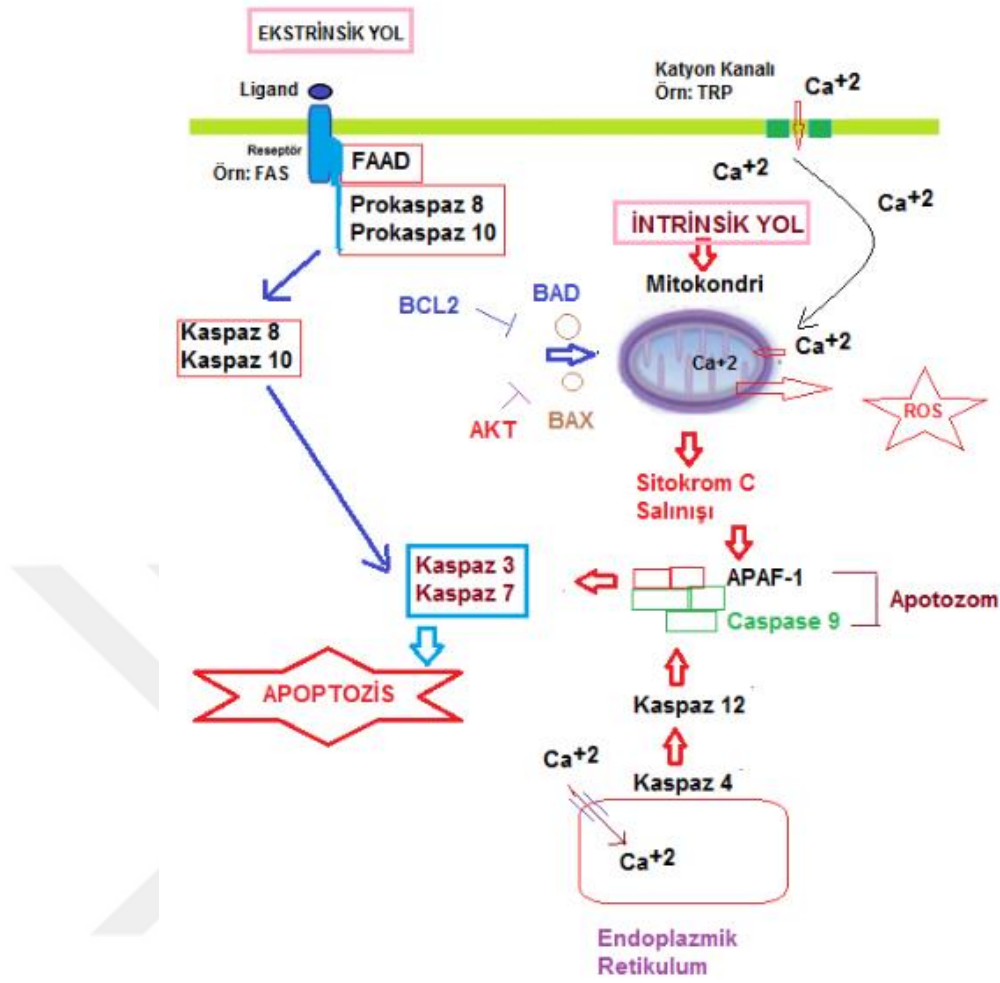
3) Endoplazmik retikulum (ER) üzerinden işleyen üçüncü bir apoptotik yoldan bahsedilmektedir. Bu yolda; azalan serbest Ca^{+2} konsantrasyonunun ER uyarıcı etkisi ile gerçekleştiği hipotezi olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.4.1. Kaspazlar

Memeli hücrelerinde kaspaz ailesi en az 14 enzim içerir. Özellikle bunlar arasında kaspaz 3, 8 ve 9 apoptozis de önemli rol oynarlar. Mitokondriyal yolda kaspaz 3, Fas / D95 yolda ise kaspaz 8 ve kaspaz 3 rol oynar (102,103).

Apoptozis'in düzenlenmesinde görev alan "Cysteine Aspartate Specific Protease'lar" (Caspase/Kaspaz) olarak adlandırılan proteazlar, Apoptozun başlatılması, yürütülmesi ve inflamatuvar sitokinlerin salınımının kontrolünde görevli enzimlerdir (99).

Kaspazlar hücrede inaktif (zimojen) olarak prokaspaz formunda bulunur. Apoptoz sinyalinin alınmasıyla inaktif prokaspaz enzimler aktifleşerek diğer inaktif kaspazları aspartik birimlerinden keserek aktifleştirirler (100).



Şekil 7. Apoptoziste rol oynayan ekstrensik ve intrensik moleküler yollar (Ramazan Çınar, Yüksek Lisans Tezi, 2017. Danışman: Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.).

Apoptotik yolun daha sonraki aşamalarında görev alan kaspazların diğer üyeleri ise infazcı kaspazlar olarak isimlendirilir. Kaspaz 2, 8, 9 ve 10 başlatıcı kaspazlardandır, kaspaz 3, 6 ve 7 ise infazcı kaspazlardır. Başlatıcı kaspazlar farklı yollarla gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda infazcı kaspaz aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasında rol oynarlar, ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak yer alırlar (103). Kaspaz-3 aktif ölüm proteazı olup birçok hücrenin parçalanması ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile ilişkili apoptozis sürecinde kritik rol oynar (102,103).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

Borosilikat tüpler: Sutter Instruments (ABD)

CO₂ inkübatör: (Heal Force, Smart Cell (Japonya)

Faraday kafesi: Yerli Üretim, Isparta

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

İnverted floresan mikroskop: Zeiss, Axiovert 40 CFL (Almanya)

Isı kontrollü çember ve çember tablası: Luigs and Neumann (Almanya)

Kültür flaskı: Cell Star, Greiner bio-one (Almanya)

Mikromanuplör: Luigs and Neumann (Almanya)

Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya),

Peristaltik pompa: Ismatec (İsviçre)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Pipet yapıcı (Puller): Sutter Instruments (ABD)

Şarjlı pipet: Hirschmann (Almanya)

Sarsıntı önleyici sehpa: Yerli Üretim, Isparta

Soğutmalı santrifüj: Kubota (Japonya)

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

Yükselteç: HEKA, EPC-10 (Almanya)

Şarjlı pipet: Witeg (Almanya)

Steril pipet uçları: LP Italiana 5 ml, 10 ml hacimlerde (İtalya)

Floresan spektrofotometre: Cary Eclipse, Varian, (Avustralya)

Şeffaf küvet: Sarstedt (45mm) Cuvvette (Almanya)

Plate reader: Infinite 200 Pro, Tecan (Avusturya)

Hücre sayım cihazı: Casy TT, Roche, (Almanya)

Jel görüntüleme cihazı: Syngene G:Box, XRQ (İngiltere)

Soğutmalı santrifüj: Kubota 2800 (Japonya)

Derin dondurucu (-80°C): Wisd Persnal Digital (Kore)

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

CO₂ inkübatör: Heal Force HF90, Smart Cell (Japonya)

Çalkalamalı su banyosu: Termal Laboratuvar Aletleri (Türkiye)

Çalkalama cihazı: Biosan Orbital shaker PSU 10i (Türkiye)

Falkon tüpleri: ISOLAB, 15 ml ve 50 ml hacimlerde (Almanya)

Steril 96'lık plakalar: Greiner Bio-One (Almanya)

Buz yapma makinesi: ITV IQ P5C (ABD)

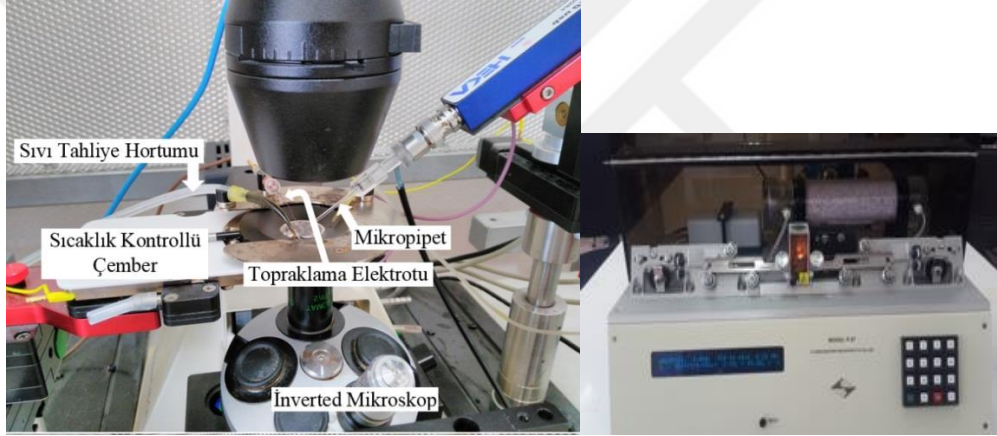
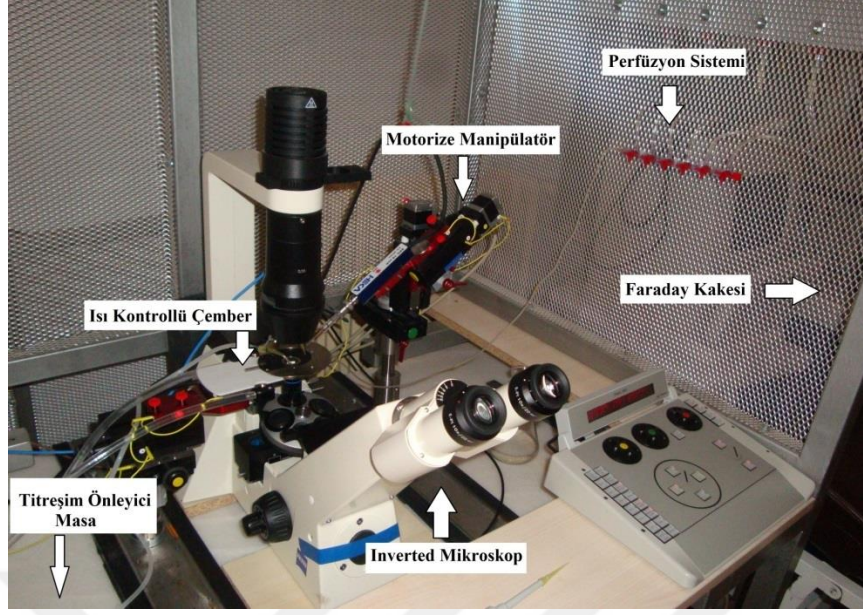
Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı: Variomag Monoterm (Almanya)

Distile ve ultradistile su cihazı: ELGA Purelab option DU25 (ABD)

Western Blot sistemleri: Bio-Rad Mini Protean Tetra System (ABD), Hoeffler
MiniVE PS300-B (ABD)

Ultrasonik doku parçalayıcı: Bandelin Sonoplus HD2070

Stereo Mikroskop: Olympus Corporation T5, SN (Japonya)



Resim 1. A,B: Patch-clamp (Yama-menteşe) seti genel ve yakından görünümüleri (İnverted mikroskop, Motorize manipülator ve kumandası, Isı kontrollü çember, Titreşimi önleyici masa, Faraday kafesi ve perfüzyon sistemi) C: Mikropipetin Mikroskop altında görünümü.



Resim 2. BSN Sağlık Analiz (Isparta, Gller Bölgesi Teknokent) Laboratuvarında mevcut olup kullanılan Casy TT system hücre sayım cihazı (Almanya)



Resim 3. Hayvanlardan elde edilen Primer hipokampus sinir hücrelerinde ve in-vitro hücre hattında kalsiyum sinyali analizleri için kullanılan floresans spektrofotometre cihazı (Cary Eclipse, Varian Inc, Sydney, Avustralya).



Resim 4. Western Blot analizi için kullanılan aletler (A) ve Jel görüntüleme cihazı (B).



Resim 5. Hipokampal hücrelerin konulduğu vücut koşullarında koyduğumuz (37 °C, %5 CO₂) sıvı ceketli steril inkübatör.

1. dakika

5. Dakika

10. dakika



Resim 6. Epilepsi görüntülerinin alındığı cam kafes ve atak geçirme anları.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Firma belirtilmeyen bütün sarf malzemeleri Sigma-Aldrich ve Santa Cruz firmalarından (İstanbul) satın alınmıştır.

Triklor asetik asit
2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB),
Kalsiyum klorür,
Cesium hidroksit monohidrat,
Cumene hydroperoxide (%80) (CHPO)
Dimethyl sulphoxide (DMSO) Hybri-Max,
5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoik acid (DTNB)
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM),
Dulbecco's phosphate buffer saline (10X), Biochrom
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)
Ethylene glikol tetraasetik (EGTA)
İndirgenmiş glutatyon (GSH)
HAM'S F12 medium (1X), Biochrom KG (Almanya)
HEPES
Hidrojen peroksit (%37)
L-glutamic asit
N-asetil sistein
N-Hekzan
N-Metil D-Glucamine katyonu (NMDG⁺)
Potasyum klorür
Potasyum klorür
Sodyum hidroksit (NaOH), Riedel-de H en (Almanya)
Tris-hidroksimetil-aminomethan
Tripsin-EDTA solusyonu (% 0,25)

Plate Reader ve Western Blot Analiz Kimyasalları

Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640), Sigma Aldrich (ABD)

Fetal Bovine Serum (FBS), Life Technologies (ABD)

Anthranilic acid (ACA), Sigma Aldrich (ABD)

Cumene hydroperoxide, Sigma Aldrich (ABD)

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), Merck (Almanya)

Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), Sigma Aldrich (ABD)

HEPES, Sigma Aldrich (ABD)

Fura-2 AM, Invitrogen (ABD)

APOPercentage Apoptosis Kit, Biocolor (Kuzey İrlanda)

Dihydrorhodamine 123 (DHR 123), Molecular Probes (ABD)

JC-1 Dye, Santa Cruz Biotechnology (ABD)

Kaspaz 3 substrat (AC-DEVD-AMC), Bachem, (İsviçre)

Kaspaz 9 (AC-LEHD-AMC) substrat, Bachem, (İsviçre)

Anthranilic Acid (ACA), Sigma Aldrich (ABD)

Cleaved caspase 3 Antibody, Proteintech (ABD)

Cleaved caspase 9 Antibody, Proteintech (ABD)

PARP1 antibody, Proteintech (ABD)

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Hayvanları

48 adet 12 haftalık (180 - 200 gram ağırlıktaki) Wistar albino dişi sıçan Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Deney Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Sıçanlara “*ad libitum*” olarak

yem ve su verilmiş, hayvan refahı kuralları ve SDÜ Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Kılavuzu'na riayet edilmiştir. Çalışma SDÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı (Protokol No: 2015-06-01) tarafından onaylanmıştır.

3.2.2. Çalışma Grupları

Sıçanlar her grupta 12 tane (n=12) olacak şekilde 4 adet grupta toplanmıştır.

1. Kontrol grubu: Bu grup hayvanlarda herhangi bir PTZ enjeksiyonu yapılmamıştır ve intraperitoneal plasebo (0.2 ml DMSO+0.8 serum fizyolojik) dışında tedavi uygulanmamıştır.

2. PTZ grubu: Bu gruptaki hayvanlara PTZ verilmeden 2 saat öncesinde 1 ml plasebo periton içi enjekte edildikten sonra ikinci saatte yine periton içi PTZ (60 mg/kg) uygulanarak epilepsi oluşturuldu. Daha önceki basılmış eserlerimizde deneysel epilepsinin PTZ enjeksiyon sonrası ilk 5-10 dakikalar arasında oluştuğunu ve 10-30 dakikalar sonunda çok şiddetlendiğini gözlemledik (34,104). Bu nedenle sıçanlardan 30 dakika süre ile video kaydı alınmıştır.

3. ACA grubu: ACA dolaylı TRPM2 kanal blokerleri içerisinde en spesifik olanıdır. İn vitro deneyler TRPM2 kanallarını bloke etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (68,71). Bu gruptaki hayvanlara kesilmeden 2 saat önce 25 mg/kg dozunda ACA periton içi verildi (72). İki saat sonunda sıçanlardan 30 dakika süre ile video kaydı alındı ve bu süre sonunda anestezisi altında kesildiler.

4. ACA+PTZ grubu: Bu gruptaki hayvanla PTZ ile epilepsi oluşturmadan 2 saat önce 25 mg/kg dozunda ACA periton içi verildi (72). PTZ enjeksiyonu sonrası 30 dakika süre ile video kaydı alındı ve bu süre sonunda tüm sıçanlar anestezisi altında kesildiler.

3.2.3. Sıçan Hipokampus ve Arka Kök Gangliyon (AKG) Sinir Hücreleri İzolasyonları

Kullanılan bütün cerrahi malzemeler sterilasyona tabi tutularak işlemlere başlandı. Sıçanlar anestezisi (intraperitoneal uygulanan 5–10 mg/kg dozunda

Xylazine, 40 – 80 mg/kg dozunda Ketamin) verilerek hayvanlar dissosiyatif anestezi tekniğiyle genel anestezi altına alınmıştır. Hayvanın ayaklarına pens yardımıyla kısırtma hareketi yapıp tepkileri ölçülerek tepkisiz kaldığı ama kalp atışlarının devam ettiğinden emin olunur ve dekapitasyon yapıldı. İvedilikle Kolona vertebralis bölgesi cerrahi makaslar aracılığıyla alınır ve DMEM besi yeri içerisinde alttan aydınlatmalı (inverted) mikroskop altında kas dokularından iyice temizlendi. Kolona vertebralis bir bistüri aracılığıyla frontalden distale simetrik bir şekilde iki eş parçaya ayrıldı. Karşımıza spinal kord çıkacaktır. Bir pens yardımıyla spinal kord hızlı bir şekilde kaldırıldı. İnter-vertebral oyuklarda karşılıklı dizilmiş arka kök gangliyon nodülleri boynu eğri pens vasıtasıyla taze medium içine alındı. 2,5 mg/ml dozda kolejenaz tip-IX enzimi ile 1 saat inkübatörde enzimatik parçalandı (64,78). Mekanik ayrıştırma ise farklı kalınlıktaki pipet uçlarından defalarca geçirilerek yapıldı. Bu işlemlerin ardından hücreler derhal elektrofizyolojik kayıtlar alınmak üzere patch çemberine konuldu.

Hipokampus izolasyonunda ise hayvanlar yukarıda anlatıldığı gibi anestezi altına alındıktan hemen sonra dekapite edildi. Mikro cerrahi makas ve pens yardımıyla serebral korteks ivedilikle çıkarıldı. Serebral korteks bisturi yardımıyla, beyin sapı ve serebellumdan ayrıldı. Sağ ve sol hemisferler korpus kallozum hizasından iki eş parçaya bölündü. Bu aşamalar neticesinde her bir hemisferde karşımızda hilal şeklinde ve diğer yapılardan daha koyu renkli hipokampus belirdi. Hipokampus örnekleri mikro cerrahi makas yardımıyla disseke edildi ve parçalara ayrıldı. Hayvanların dekapitasyonunu müteakiben uygulanan işlemlerin tamamı Hank'ın tamponlu tuz çözeltisi (HBSS) içinde gerçekleştirildi (64,95). Mekanik parçalanma sürecini takiben enzimatik parçalanma aşamasına geçildi (37 °C'lik çalkalamalı su banyosunda 30 dakika boyunca tripsin ile inkübe edildi ve her 10 dakikada bir alt-üst edildi). Hücreler enzimatik parçalanma süreci sonrasında santrifüj edilerek (5 dakika 500 g'de) supernatant atıldı ve 2 kez HBSS ile yıkama işlemi yapıldı.

3.2.4. Elektrofizyoloji (Patch – Clamp) Analizleri

AKG hücreleri Patch-Clamp setinde bulunan pipet tutucu ve yükselteç (EPC 10 USB – HEKA Almanya) ile bağlı bulunan pipet ve içindeki elektrot yardımıyla tüm hücre konfigürasyonunda kayıtlar alınarak ilgili yükselteç bilgisayar yazılımı yardımıyla değerlendirildi. Hücrelerin içinde bulunan çembere herhangi bir sıcaklık değişimi yapılmamış olup hücreler normal oda sıcaklığında kayıt işlemine tabi tutuldu. Deney esnasında hücrelerden kayıt alınabilmesi için kullanılan pipetler, borosilikat cam tüplerden (dış çap: 1,5 mm, iç çap: 0,86 mm, uzunluk: 100 mm) “*pipet puller*” (Sutter Instrument) yardımıyla ısı altında çekme işlemi uygulanıp elde edildi.

Kayıt alınan dört grup için pipet içi normal hücre içi eşdeğeri tampon ile dolduruldu. Pipet içerisinde hava kalmaması için pipet ucu kırılmayacak şekilde pipet sarsıldı. Mikropipet kayıt elektrotu mikropipetin içerisine gelecek şekilde pipet tutucu takılıp sabitlendi. Kültür kabı içerisinde bulunan AKG hücreleri patch-clamp çemberi içerisinde bulunan hücre dışı eşdeğeri tampona eklendi (12,13). Pipet tutucuda bulunan mikropipet çember içine daldırıldı. Bilgisayar yazılımı üzerinden pipetin direncinin 3-7 M Ω olup olmadığı bakıldı. Bu değerler dışında ise pipet değiştirildi. Pipet uygun değerlerde ise pipet invert mikroskop altında hücre ile temas ettirildi. Pipete hafif bir vakum uygulanarak pipetin ucundaki hücre zarı bölgesinin hücreden kopmadan pipet içine girmesi sağlandı ve “*gigaseal*” (1-10 G Ω) adı verilen pipetin hücreye mühürlenmesi olayı beklendi. Bu oluştuktan sonra hücre zar potansiyeli yazılım yardımıyla -60mV’a sabitlenip tüm hücre konfigürasyon ayarları seçildi. Daha sonra bir kez daha vakum yapılarak pipet içindeki mühürlü hücre zarı kısmının parçalanıp pipetle hücre için aynı ortamda olması sağlandı.

Patch-pipeti yardımı ile TRPM2 kanal açıcı (ADPR ve 1 mM) hücreler içerisine gönderildi (64). TRPM2 kanallarının aktivasyonundan sonra kanal aktivitesi ve akım değişkenliği belirli bir platoya ulaşincaya kadar beklenildi. Plato oluştuğunda ise TRPM2 blokörü olarak bildirilen 0,025 mM konsantrasyonundaki ACA perfüzyon sistemi ile çembere gönderildi (78). Son olarak hücrelerimizin canlılığından emin olmak üzere NMDG⁺ hücre dışı eşdeğer tampon çözelti çembere gönderilerek kayda devam edildi. Canlılığı devam eden hücrelere uygulanan

kimyasalların (ACA ve NMDG⁺) peristaltik pompa ile yıkanarak uzaklaştırılması ile kayıt sonlandırıldı.

3.2.5. Hücre içi Kalsiyum Ca⁺² Sinyali Analizleri

Nöron hücreleri izole edildikten sonra hücre kültürüne alındı ve Ca⁺² sinyali çalışmalarında kullanıldı. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının [Ca⁺²]_i tayini için oda sıcaklığında 45 dakika süreyle 4µM fura-2 AM ile yüklendi (78).

Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler 37 °C'de prob de-esterifikasyona tabi tutuldu (78) ve sonrasında manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2x10⁶ olacak şekilde floresans spektrofotometre (Cary Eclipse, Varian Inc, Sydney, Avustralya) haznesine yerleştirildi. Hücre içi serbest Ca⁺² iyon konsantrasyon düzeyi [Ca⁺²]_i değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm eksitasyon, 505 nm emisyon dalga boylarında yaklaşık 100 saniye süreyle kayıt alındı. Dört gruba ait TRPM2 kanal aktivasyonu aracılığıyla Ca⁺² akışı cumene hydroperoxide (CPx, 1 mM) stimülasyonu ile gerçekleştirildi. CPx, kayıt başladıktan 20 sn sonra küvete ilave edildi ve toplam 80 sn süreyle kanalın aktivasyon durumu incelendi. TritonX 'in 450. sn'de küvete ilavesiyle hücre içi kalsiyum depoları da dahil olmak üzere bütün hücrelerin membranları parçalandı ve maksimum değer belirlendi. EGTA (500. sn) ile açığa çıkan kalsiyum şelatlanarak minimum değer bulundu. Bu değerler Grynkiewicz ve arkadaşlarının (105) geliştirdiği formülde yerine yazılarak hücre içi kalsiyum düzeyleri gruplar arasında değerlendirildi.

3.2.6. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi

MTT analizinde, sarı renkte olan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide maddesi canlı hücreler tarafından mitokondriyal solunum yolu ile mor renkli formozan kristaline dönüştürülmektedir. Eğer hücreler canlı değilse bu reaksiyon gerçekleşmez. Renk oluşumu da spektrofotometrik yöntemle niceliksel kolorimetrik temelde değerlendirildi (106,107). MTT boyası (0,5 mg/ml dozda) ile hücre solüsyonu 37 °C'de 90 dakika karanlıkta inkübe edildi. Ardından, süpernatant uzaklaştırıldı ve formazan kristallerini çözmek için DMSO

eklendi. İşlemler iki kere yapıldı. Bir çoklu kuyucuk okuyucu (plate reader) (Infinite pro200; Tecan Austria GmbH, Groedig, Avusturya) (78) kullanılarak her bir kuyucuk için aynı absorbans değerleri (490 ve 650 nm) kullanılarak hücre canlılığı analizi tamamlandı ve veriler, kontrole kıyasla hesaplanarak değerlendirildi.

3.2.7. Hücre İçi ROS Üretimi Tayini

Hücre içi ROS üretimi çoklu kuyucuk okuyucu (Plate reader, infinite pro200 marka, Avusturya) ile yapılmıştır. DHR 123, hücre zarına kolayca nüfuz edebilen floresans olmayan, yüksüz bir boyadır. Hücrenin içerisine girdikten sonra DHR 123, oksidasyon üzerine floresans özellikli bir boya haline gelir ve rodamin 123 (Rh 123) üretir; floresans miktarı ROS üretimi ile orantılıdır. Bu oksidasyon sırasında yağların oksidasyonu ile oluşmuş hücre içerisindeki serbest oksijen radikallerinin miktarı ölçülebilmektedir. Ne kadar çok floresans yayılırsa o kadar serbest oksijen radikalinin varlığını göstermektedir (108). Rh123'ün floresans yoğunluğu, çoklu kuyucuk okuyucu (Infinite Pro200) içinde ölçülmüştür. Eksitasyon 488 nm'de ve emisyon 543 nm'de (64) olarak belirlendi. Veriler, kontrole kıyasla hesaplanarak değerlendirildi.

3.2.8. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini

Hücreler, daha önce yaptığımız çalışmalarda tarif edildiği gibi (1,2) 37 °C'de 15 dakika süreyle 1µM JC-1 ile inkübe edildi. Katyonik bir boya olan JC-1, mitokondride potansiyele bağımlı birikimi gösterir. Kırmızı-yeşil floresans yoğunluğu oranında ki azalma mitokondri depolarizasyonunu gösterir (109,110). Yeşil JC-1 sinyali, 485 nm eksitasyon dalga boyunda ve 535 nm emisyon dalga boyunda, JC-1 kırmızı sinyali 540 nm eksitasyon dalga boyunda ve 590 nm emisyon dalga boyunda ölçüldü. Floresans değişiklikleri çoklu kuyucuk okuyucu (Infinite pro200; Tecan Austria GmbH, Groedig, Avusturya) kullanılarak analiz edildi. Veriler, kontrole kıyasla hesaplanarak değerlendirildi (78).

3.2.9. Apoptoz ve Kaspaz Analizleri

Apoptoz testi, APOPercentage apoptozis kiti Biocolor Ltd. (Kuzey İrlanda) ile başka çalışmalarda da (64,78) anlatılan talimatlara uygun olarak gerçekleştirildi. Bir apoptotik hücre membranı asimetrisini kaybettiğinde, APOPercentage boyası aktif olarak apoptotik hücreleri kırmızı renkte boyayarak hücre içine taşınır, böylece apoptozun spektrofotometre cihazı ile saptanmasına izin verir. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin belirlenmesi daha önce bildirilen bir yöntem (78,110) temel alınarak yapılmıştır. Kaspaz 3 substratı (AC-DEVD-AMC) ve kaspaz 9 substratı (AC-LEHD-AMC) bölünmeleri 360 nm eksitasyon ve 460 nm'de emisyon dalga boyu ile çoklu kuyucuk okuyucu (plate reader, Infinite pro200) ile ölçülmüştür. Veriler, floresan birim/mg protein olarak kontrole kıyasla hesaplanarak değerlendirildi.

3.2.10. Western Blot Analizleri

Hipokampus örneklerinde Western Blot deneyi için takip edilen bütün işlemler standart prosedürlere uygun olarak yapıldı. β -aktin, PARP1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 protein ekspresyonları için örnekler enzim inhibitörleri kullanılarak hazırlanmış lysis buffer içerisinde mekanik parçalama ve sonikasyon işlemleri uygulanarak homojenize edildi. 12000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilen hipokampal hücrelerinin üzerinden süpernatant uzaklaştırıldı. Total protein miktarı Bradford yöntemine göre belirlendi. Immunoblottlama için %6 ile %13 arasında değişen konsantrasyonlarda Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel (SDS-Page) hazırlandı ve jellere eşdeğer protein (her örnekten $\pm 30 \mu\text{g}$) yüklemesi yapıldı. Elektroforez işlemi ardından jeller nitroselüloz membranlara transfer edildi. Oda sıcaklığında 1 saat boyunca %5 yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye) ve %1 Tween 20 içeren Tris Buffered Saline (TBS) ile bekletildi ve 3 defa 5 dakika süreyle TBST buffer ile yıkandı. Daha sonra membran primer [Caspase 9/p35/p10 Polyclonal Antibody (Proteintech, ABD); Caspase 3, p17-specific Polyclonal Antibody (Proteintech, ABD); Beta Actin Polyclonal Antibody (Abcam Biochemicals, İngiltere); PARP1 Polyclonal Antibody Proteintech, ABD)] ve sekonder antikor (Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab, İngiltere) ile inkübe edildi.

İşlem sonunda β -aktin, PARP1, aktif (bölünmüş) kaspaz 3, aktif (bölünmüş) ve kaspaz 9 proteinlerine ait ekspresyon çalışmalarında elde edilen bantlar, hassas jel görüntüleme cihazı (Syngene G:Box, İngiltere) kullanılarak görüntülendi (78).

3.2.11. Beyin Elde Edilmesi ve Homojanat Hazırlanması

Beyin orta düzlükten bölündükten sonra korteks dışarıya çıkarıldı. Beynin çıkarılmasına müteakiben beyin korteksi elde edildi. (35). Beyin korteksi soğuk Serum fizyolojik ile iki kez yıkandıktan sonra cam şişelere alındı ve etiketlenerek derin dondurucuda (-33°C) en fazla 2 hafta olacak şekilde saklandı. Tartımdan sonra beynin yarısı buzun üzerine konarak makas yardımıyla küçük parçalara ayrılarak 1/10 oranında soğuk Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) ile seyreltilip ultrasonik homojenizatör kullanarak homojenize edildi (2 dakika ve 1500 g). Bütün işlemler buz altında yapıp antioksidan analizlerinde kullanıldı.

3.2.12. Antioksidan Analizleri

3.2.12.1. GSH ve GSH-Px Analizleri

Beyin korteksi ve hipokampus GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (112) tarafından bildirilen yönteme göre spektrofotometrede belirlendi. Oda ısısında 5 sn beklendi. Oluşan sarı renk, saf tampona karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

Beyin korteksi ve hipokampus GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in bildirdikleri yönteme göre spektrofotometre cihazı ile 412 nm dalga boyunda belirlendi (113).

GSH-Px ve GSH analizleri ile ilgili detaylı bilgiler daha önceki çalışmalarımızda mevcuttur (34-36).

3.2.12.2. Lipit Peroksidasyon (MDA) Analizi

Hipokampus ve beyin lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve ark. (114) bildirdikleri yönteme göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) 532 nm dalga boyunda yapıldı. MDA analizleri ile ilgili detaylı bilgiler daha önceki çalışmalarımızda mevcuttur (34-36).

3.2.12.3. Beyin Korteks Beta Karoten, A ve E Vitamini Analizleri

A vitamini (retinol) analizleri Suzuki ve Katoh (115) tarafından tarif edilen metodun modifikasyonu ile yapılırken E vitamini (α -tokoferol) analizleri Desai (116) tarafından belirtilen metodun modifikasyonu ile yapılmıştır. Bu amaçla, 250 mgr beyin dokusu alınarak su banyosunda 2-3 dakika ısıtılmıştır. Daha sonra üzerlerine 0,3 ml doymuş (% 60) KOH ilavesi ile kırmızı renk oluşmuştur. Daha sonra üzerine oksidasyon önlemek amacıyla etanolda hazırlanmış 1 ml antioksidan özelliğe sahip pregallol asit eklenip, 70°C'de 30 dakika ısıtılarak sabunlaştırıldı. Örnekler buz üzerinde soğutulduktan sonra üzerlerine 1 ml su ve 1 ml n-hekzan eklenip fazların ayrılması için 10 dakika beklendi. A vitamini için, üstte oluşan n-hekzan ekstratından 0,5 ml'lik bir kısmı alınarak spektrofotometrede 325 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. K r olarak 0.5 ml saf hekzan temiz bir tüpe konuldu. Standart olarak 0,5 ml saf hekzan üzerine 1 mikromol E vitamini (α -tokoferol) eklendi. Daha sonra k r, standart ve örnekleri içeren tüplerdeki hekzan üzerine reaktantlar (demir klorür ve orto fosforik asit) eklenip vorteksde karıştırıldı. Oluşan kiremit kırmızısı renk E vitamini değerleri olarak kabul edildi ve 535 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) okundu. Standart olarak hekzanda çözülmüş retinol ve α -tokoferol  zeltilleri kullanılmıştır.

Beyin homojenatındaki β -karoten düzeyleri daha önce aıklanđıęı yöntemdeki gibi yapıldı (115). Beyin  rnekleri dondurucudan çıkartılarak erimesi sağlandı. 1 ml n-hekzan ve 250 mgr beyin  rneği karıştırıldı. Üstteki hekzan fazından 0.5 ml temiz bir tüpe alınarak gerekli reaktanlar üzerine konulduktan sonra k re (saf

hekzana) karşı spektrofotometrede 453 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

3.2.13. Epilepsi Atak Başlangıç Sürelerinin Belirlenmesi

Sıçanlara PTZ enjekte edilmeden önce epilepsi kayıtlarının alınacağı geniş ölçülerdeki üstü açık cam kap içerisine konuldular ve kamera ile 30 dakika süre ile kamera kayıtları alındı (üstte kamera ve altta şeffaf 2x2 m şeffaf cam havuz içerisinde). Gerekli analizler yapılarak hem gözlemsel ve hem de bu analiz sonuçlarına göre atak başlangıç süreleri gözlemlendi (35,104).

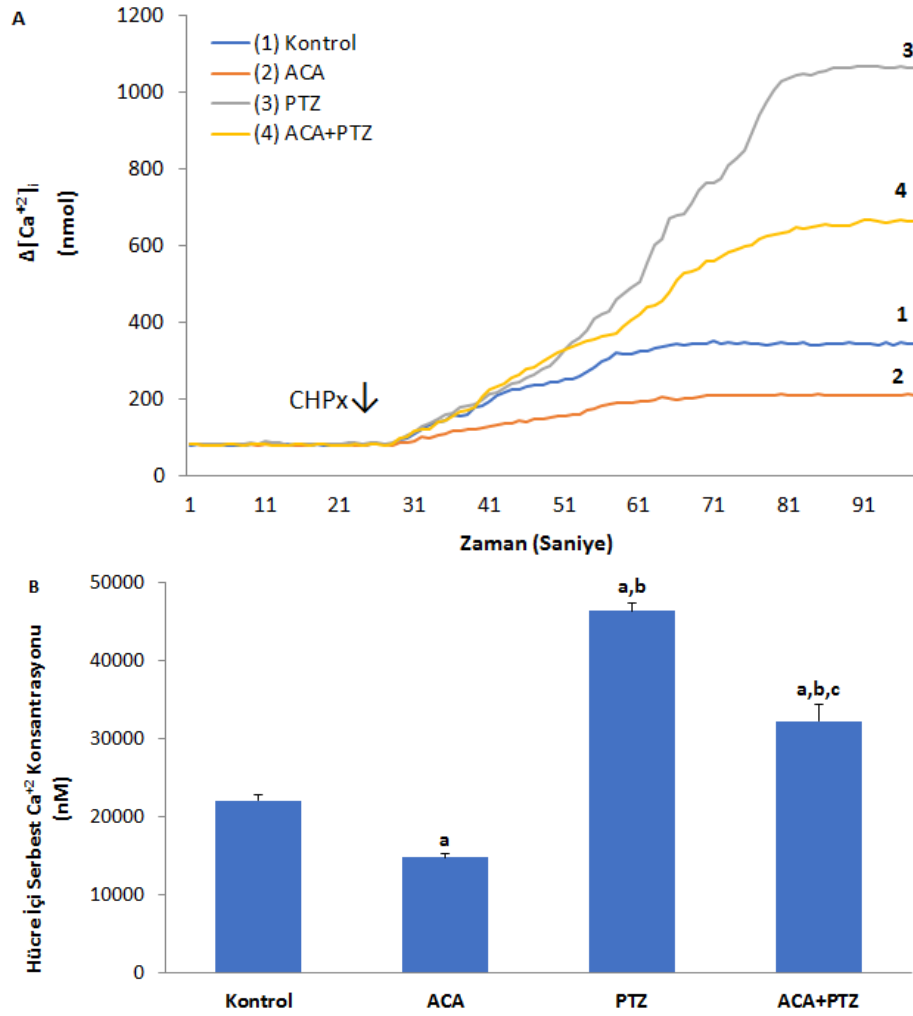
3.3. İstatistiksel Analizler

Veriler, SPSS istatistik programı (sürüm 17.0, yazılım, SPSS, Chicago, IL) kullanılarak analiz edildi. Tüm sonuçlar, ortalama \pm standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Varyans analizi (ANOVA) ve eşlenmemiş Mann-Whitney U-testi yapıldı ve p değerlerinin 0.05'den küçük ve eşit olduğu kabul edildi. Anlamlı değerler, en düşük önemlilik farkı testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Hipokampus Hücre İçi Serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) Düzeyleri

PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücreleri hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyleri ($[Ca^{+2}]_i$) üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisi çizgi grafiği olarak şekil 4.1.1 (A) gösterilirken, hücre içeresine Ca^{+2} akışı kolon grafiği olarak 4.1.1 (B) de gösterilmiştir.



Şekil 8. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücreleri hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyleri ($[Ca^{+2}]_i$) üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisinin çizgi (A) ve kolon (B) grafiği olarak gösterimi (ortalama± standart sapma ve n=12). (^ap<0,001 ve kontrole kıyasla. ^bp<0,001 ve ACA grubuna kıyasla. ^cp<0,001 ve PTZ grubuna kıyasla). (Cumene hyperoxide (CPx ve 1 mM).

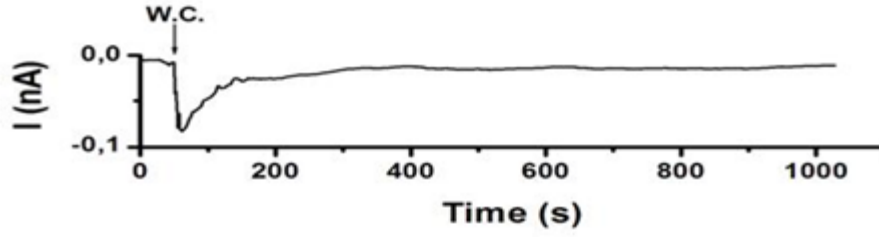
Şekil 8 (A) ve (B) incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla, epilepsi oluşturulmayan sıçanların hipokampus sinir hücrelerinde (ACA grubu), $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunun belirgin bir şekilde ($p<0,001$) azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte, hem kontrol ($p<0,001$) ve hem de ACA grubuna ($p<0,001$) kıyasla, epilepsi oluşturulan (PTZ) grupta, $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunun önemli düzeyde ($p<0,001$) arttığı gözlemlendi. Epilepsi oluşturulmadan öncesi uygulanan TRPM2 kanal blokeri (ACA) tedavisini takip eden epilepsi oluşturulması ile $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunun belirgin düzeyde azaldığı gözlemlendi. Diğer bir ifade ile ACA+PTZ grubuna kıyasla sadece PTZ grubunda $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğunun çok önemli düzeyde ($p<0,001$) azaldığı gözlemlendi.

4.2. Patch-Clamp Analiz Sonuçları

4.2.1. Kontrol Kaydı Sonucu

İyon kanalları araştırmalarında en uygun metotlardan bir tanesi patch-clamp tekniğidir. Bu teknik vasıtası ile mikroskop altında tek bir hücrede birçok kanalın bir anda açılma veya kapanma mekanizmaları incelenebileceği gibi (örneğin tüm hücre kaydı tekniği), hücre zarının dışarı alınması ile sadece bir kanaldaki değişiklikleri (tekli kanal kaydı) araştırabilmek mümkündür. Patch-clamp kayıtları 1-3 günlük yavrulardan elde edilen ve hücre kültürü ortamında gelişebilen hipokampus kültürü örneklerinde kolayca uygulanabilmektedir. Fakat, gelişimini tamamlayan hipokampus sinir hücre örnekleri patch pipetinin uç kısmına (1-5 μ M) kıyasla çok küçüktürler. Bu nedenle, patch-clamp kaydı alabilmek için gerekli olan Gega seal (Gega ohm) oluşturabilmek için gerekli olan emdirme olayı sırasında erişkinlerden elde edilen hipokampus sinir hücreleri pipet ucu tarafından yutulmaktadır ve patch kaydı alınamamaktadır. Fakat AKG sinir hücreleri erişkin hipokampus sinir hücrelerine kıyasla büyük olduğu için rahat bir şekilde patch kayıtları alınabilmektedir. Bu nedenle, patch kayıtları AKG sinir hücrelerinde alınmıştır.

Şekil 9 da görüldüğü gibi ADPR uyarısı veya ACA inhibisyonu yapılmaksızın AKG hücresinden alınan kayıtlarda, akım oluşmayıp, düz bir kayıt alınmıştır. Kontrol kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 2,41 pA/pF ($n=12$) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4A).

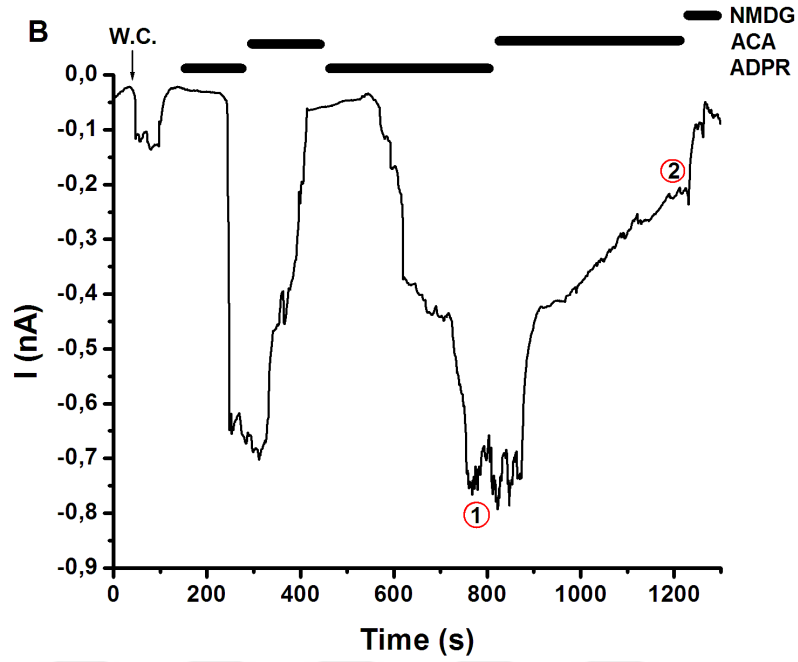


Şekil 9. ADPR ile uyarım yapılmamış sıçan AKG hücrelerinden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (W.C. tüm hücre).

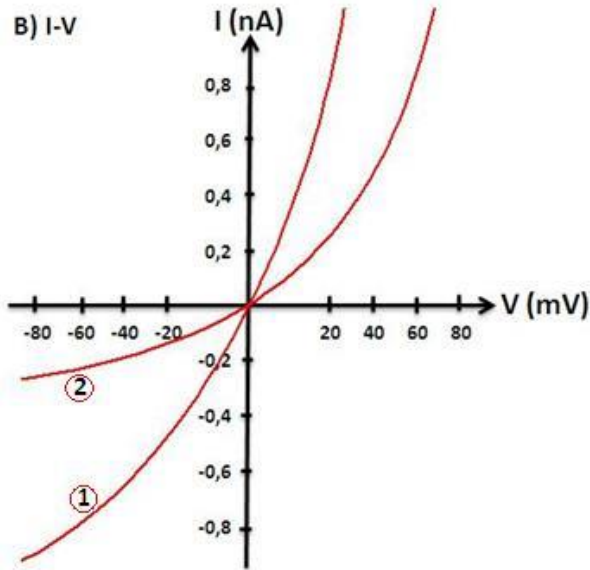
4.2.2. ADPR uygulanması ile TRPM2 Kanal Aktivasyonu

Şekil 10 da gösterilen kontrol grubu kaydında sadece hücre içi ADPR (1 mM) ile uyarım sonucunda yaklaşık 150-200 saniyeler arasında negatif yönde akımın arttığı gözlemlenerek TRPM2 katyon kanallarının 0,73 nA seviyelerinde açıldığı gözlemlenmiştir. Kanallar açıldıktan sonra, grafiğin düzleşmesi (plato oluşumu) gözlemlendikten sonra (500-600 saniyeler arası), kanalları inhibe etmek için ACA (0.025 mM) verilmiştir. Patch çemberindeki ACA (0,025 mM) peristaltik pompa yardımı ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan, hiçbir şey verilmeden pipet içerisinde hücre içi tamponda mevcut iken kanal açılması beklenmiştir. Bu ikinci açılışı inhibe etmek için tekrar ACA verildiğinde kanal akımlarının azaldığı ve kanalın kapandığı gözlemlenmiştir. Sadece TRPM2 ye has bir kanal blokeri olmayan ACA TRPM2 kanalını tamamen kapatmadığı için, bu uygulamaların en sonunda kanalların tamamen kapatılması için çembere Na^+ yerine kullanılan ve kanalı Ca^{+2} bağlayıcı olarak bilinen NMDG^+ katyonu içeren hücre dışı sıvı verilmiştir.

Akım önceki seviyelere yakın geldiğinde kapandığı varsayılmış, sonrasında yukarıda anlatılan basamaklar tekrar uygulanıp birbirine paralel grafik elde edildiği gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak sabit voltaja göre akımın değişimi grafiği Şekil 10'da I-V grafiği olarak da gösterilmiştir. Yani 10 ile I-V grafiği aynı kaydın farklı iki gösterimidir. Kontrol+ADPR grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 110,73 pA/pF (n=8) olarak hesaplanmıştır (Şekil 10). Bu değerler, kontrol+ADPR grubuna kıyasla, PTZ+ADPR grubunda önemli düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,001$).



Şekil 10. ADPR ile uyarım yapılmış fakat PTZ ile epilepsi oluşturulmayan AKG nöronlarından patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. (W.C. tüm hücre).

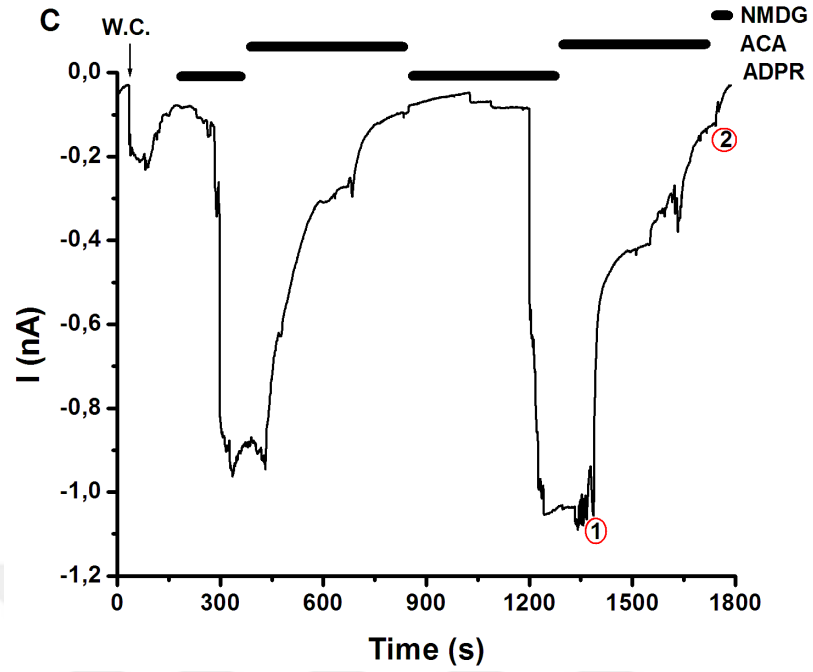


Şekil 10 (I-V). Yukarıdaki (2.2) aynı kaydın akım voltaj (I-V) kaydı değişikliğini gösteren grafik. Her iki grafik için, (1) ADPR ile TRPM2 kanallarının açılışını, (2) NMDG⁺ ile kanalların kapanışının gösterimi.

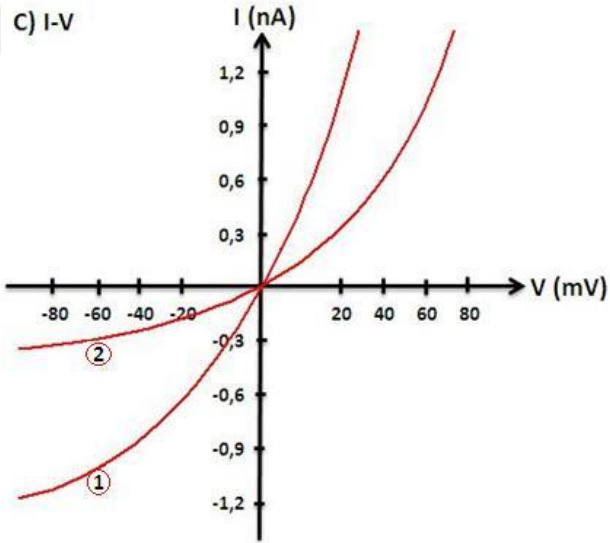
4.2.3. PTZ Grubu Kaydı Sonucu

PTZ ile epilepsi oluşturulmuş grubun AKG hücrelerinin patch-clamp analizleri sırasında ADPR ile uyarımı neticesinde, TRPM2 kanalının, kontrol+ADPR grubuna (Şekil 11) kıyasla çok daha fazla açıldığı ve akım zaman grafiğinde de görüldüğü üzere biyopotansiyel akım değişiminin 1.15 nA seviyelerinde seyrettiği belirlendi (Şekil 11). PTZ+ADPR grubundaki bu açılmanın kapasitans değerlerinin 134,44 pA/pF olduğu gözlemlenmiştir ve bu değer kontrol grubuna (110,73 pA/pF) kıyasla istatistiksel olarak önemli ($p<0,001$) düzeyde yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebi olarak ise epilepsinin neden olduğu oksidatif stresin hücre içi serbest radikallerin çoğalmasına bağlı olarak, TRPM2 kanalı çok daha fazla açılmasına sebep olduğu görülmektedir. Kayıt alma sırasında akımın bir platoya ulaştığı saniyelerde ACA (0,025) verilmiş ve TRPM2 kanalının büyük oranda kapanmıştır. Tam kapatma ise NMDG⁺ li tampon ile sağlanmıştır. Yine akım zaman grafiği ile birlikte aynı ölçümün akım voltaj grafiği de verilmiştir [Şekil 11 (I-V)]. Bu I-V grafiğinde verilen 1 ve 2 numaralı hiperbol eğrileri ise sırasıyla ADPR nun açtığı ve NMDG⁺ nın kapattığı seviyeleri göstermektedir ve akımın voltaja göre değişimini göstermektedir.

PTZ+ADPR grubu kapasitans ortalama değerine (134,44 pA/pF) kıyasla, PTZ+ACA+ADPR (21.99 pA/pF) gruplarının kapasitans değerlerinin önemli düzeyde ($p<0,001$) azaldığı gözlemlendi.



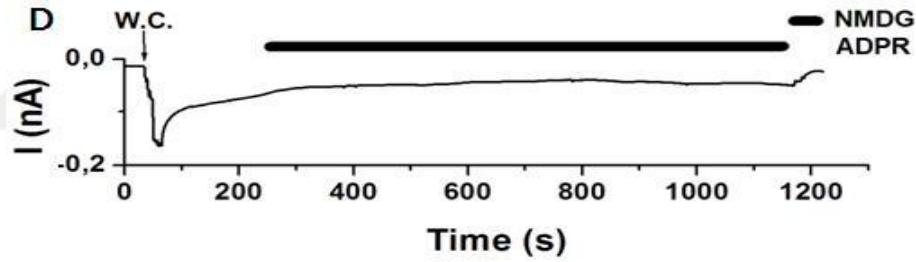
Şekil 11. PTZ grubunun sonra ADPR ile uyarım yapılarak sinir hücrelerinde patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. (W.C. tüm hücre).



Şekil 11 (I-V). Yukarıdaki (4C) patch-clamp kaydının akım-voltaj I-V değişikliğini gösteren grafik. Her iki grafikte için, (1) ADPR ile TRPM2 kanallarının açılışını, (2) NMDG⁺ ile kanalların kapanışının gösterimi (W.C. tüm hücre).

4.2.4. Epilepsi oluşturmayıp sadece ACA tedavisi alan sıçan patch-clamp sonuçları

ACA grubunda hayvanlara kesilmeden 2 saat önce 25 mg/kg dozunda ACA periton içi verildi fakat PTZ ile epilepsi oluşturulmadı. Sonrasında bu gruptan alınan kayıtlarda (Şekil 4D), AKG nöronları patch-clamp tekniği yardımıyla yine ADPR ile uyarım yapılmış, uzun süre bekletilmesine rağmen, kontrol kaydına benzer şekilde akımda herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu durum ACA'nın TRPM2 kanal blokeri özelliğinden kaynaklandığı düşünülebilir. ACA grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 29.59 pA/pF (n=4) olarak hesaplanmıştır (Şekil 12). Bu değerler, PTZ+ADPR grubuna kıyasla, ACA+PTZ+ADPR grubunda önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0,001$) (14).

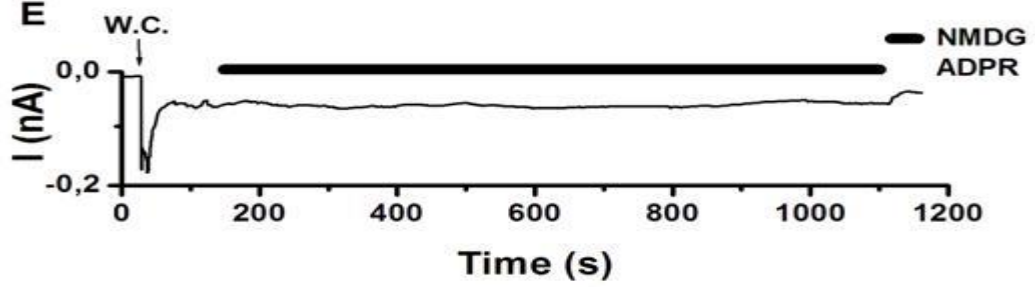


Şekil 12. ACA grubunun ADPR ile uyarım yapılarak AKG hücrelerinden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (W.C. tüm hücre).

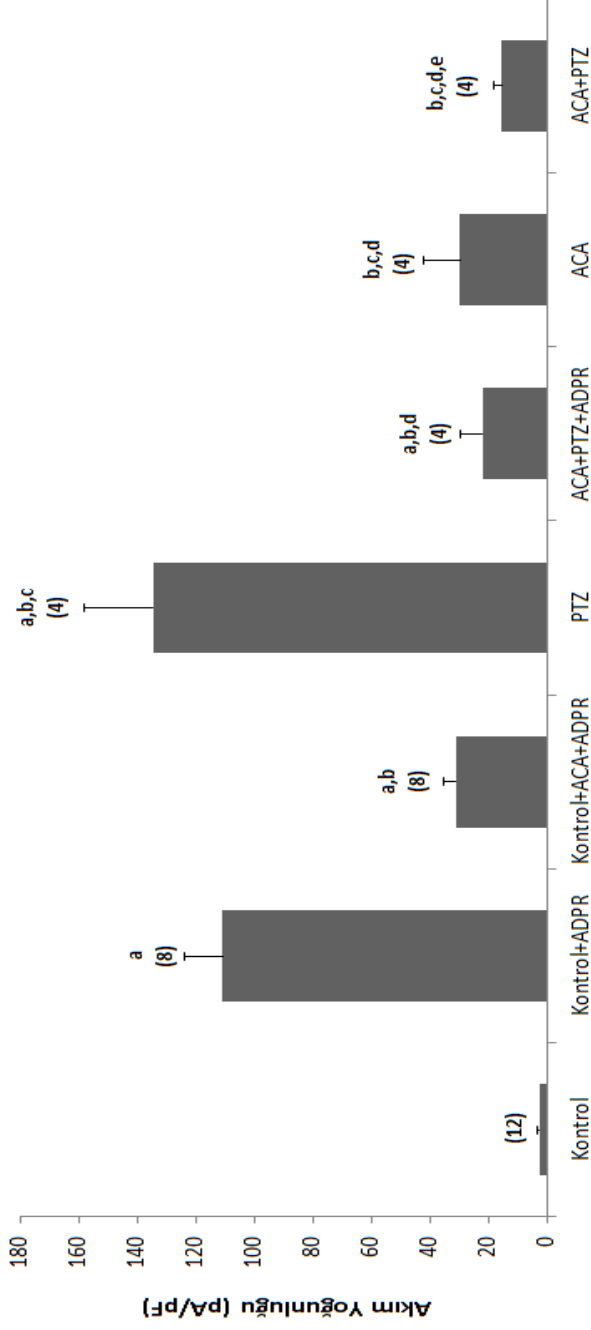
4.2.5. Epilepsi Oluşturmadan Önce ACA Tedavisinin Patch-Clamp Sonuçları Üzerine Etkisi

ACA grubunda hayvanlar kesilmeden 2 saat önce 25 mg/kg dozunda ACA periton içi verildi ve sonrasında PTZ ile epilepsi oluşturuldu. ACA+PTZ grubunda AKG hücrelerinden alınan kayıtlarda patch-clamp tekniği yardımıyla 1 mM ADPR ile uyarım yapılmış ve TRPM2 kanalının açılmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 13). Buradan PTZ ile epilepsi yapılmış sıçanlarda ACA'nın TRPM2 katyon kanalları açmayacak ölçüde koruyucu etkisi olduğu gözlemlenmektedir. PTZ+ACA grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 15,24 pA/pF (n=4)

olarak hesaplanmıştır (Şekil 13). Kontrol, kontrol+ADPR, kontrol+ADPR+ACA ve PTZ gruplarına kıyasla, ACA+PTZ grubunda bu akım yoğunlukları önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0,001$) (Şekil 13).



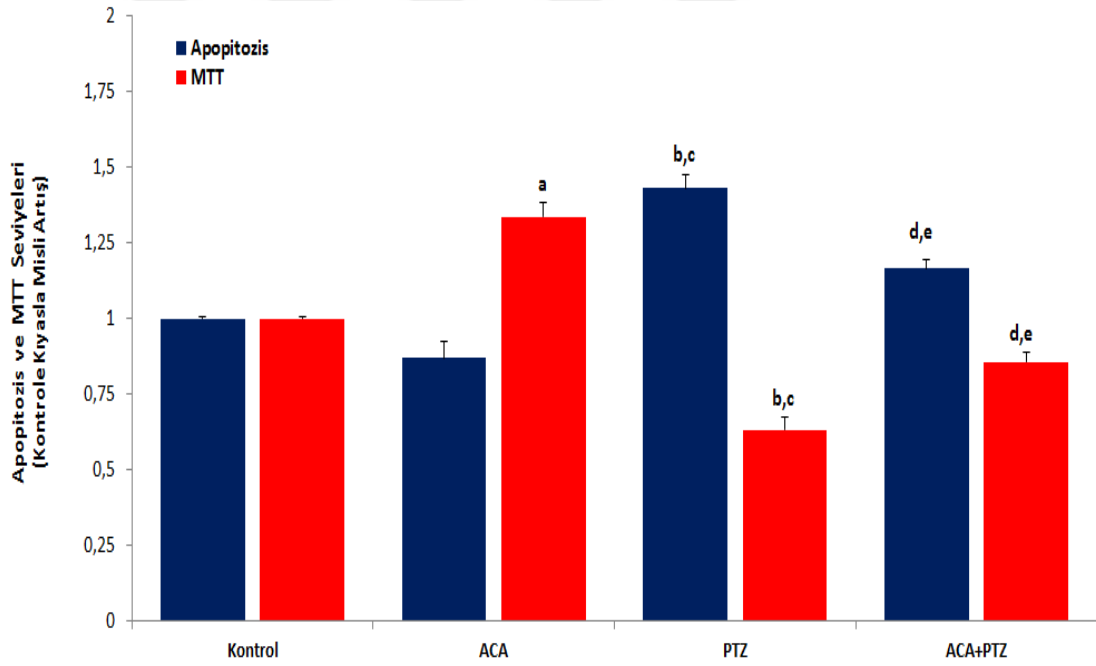
Şekil 13. ACA+PTZ grubunda AKG hücreleri ADPR ile uyarım yapılarak hücrelerden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (W.C. tüm hücre).



Şekil 14. Epilepsi oluşturulan sıçanların AKG sinir hücrelerinde TRPM2 kanal akımları üzerinde ACA tedavisinin etkisi. AKG hücreleri için, her dört grupta incelenen akım yoğunluğu; ADPR ile açılmış TRPM2 katyon kanallarının maksimum akım değerlerinin, mikropipetin hücreye temas etmeden hemen önceki direncine bölümüyle hesaplanmıştır. Parantez içindeki sayılar her bir gruptan alınan kayıt sayısını (n sayısı) göstermektedir. (^ap<0,001 kontrol grubuna kıyasla. ^bp<0,001, kontrol+ADPR grubuna kıyasla. ^cp<0,001, kontrol+ACA+ADPR grubuna kıyasla, ^dp<0,001, PTZ grubuna kıyasla ve ^ep<0,001, PTZ+ACA+ADPR grubuna kıyasla. (Ortalama ± SD).

4.3. Hücre Canlılığı ve Apoptozis Sonuçları

Apoptozis programlı hücre ölümü demektir. Apoptozis 'in başlıca 3 yolağı bulunmaktadır. Bunlar, ekstrinsik yol, intrinsik yol ve Ca^{+2} bağımlı yoldur (99). Bu yollarda önemli bileşenler kaspaz 3 ve kaspaz 9 dur. Aşırı hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi artışına bağlı olarak, mitokondriyal zarlar artışının ROS üretimi artışının yanı sıra kaspaz yolaklarını aktive ederek, apoptozisi artırırken, hücre canlılığı (MTT) değerlerini azaltmaktadır. Epilepsi de hücre içi serbest $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi artışını gözleyince, apoptozis, MTT, kaspaz 3 ve 9 değerlerini araştırmayı amaçladık. Apoptozis düzeyleri Apopercantage ticari kiti kullanılarak yapılırken, kaspaz 3 ve kaspaz 9 floresan ışık yayan substratları (AC-DEVD-AMC Kaspaz-3 ve AC-LEHD-AMC Kaspaz-9 için) kullanılarak yapılmıştır. Hücre canlılığı analizleri ise MTT testi kullanılarak yapılmıştır.



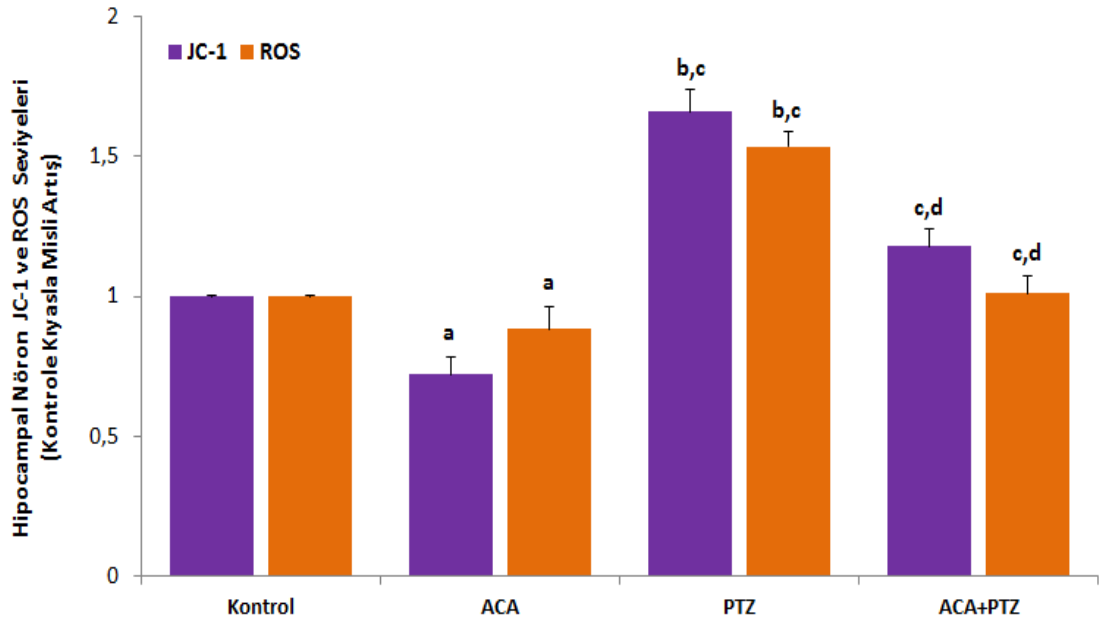
Şekil 15. PTZ ile Epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus apoptozis ve hücre canlılığı (MTT) değerleri üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisi (ortalama± standart sapma ve n=12). (^ap<0,05 ve ^bp<0,001 kontrole kıyasla. ^cp<0,001 ve ^dp<0,001 ACA grubuna kıyasla. ^ep<0,001 ve PTZ grubuna kıyasla).

Apoptozis ve MTT sonuçları Şekil 15 de gösterilmiştir. Kuyucuk okuyucu (Plate reader) de belirlenen optik yoğunluk absorbans değerleri kontrole kıyasla misli artış şeklinde belirtilmiştir. Protein düzeyleri spektrofotometre cihazı (Shimadzu,

UV-1800) kullanılarak Bradford yöntemine göre yapılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla, ACA grubunda apoptozis değerlerinin önemli düzeyde ($p<0,001$) azaldığı gözlenirken, MTT değerlerinin önemli düzeyde ($p<0,001$) yüksek olduğu gözlemlendi. Bunun ile birlikte, epilepsi oluşturulması ile (PTZ grubunda) apoptozis değerleri önemli düzeyde arttığı gözlenirken ($p<0,001$), MTT değerlerinin önemli düzeyde ($p<0,001$) azaldığı gözlemlendi. İlave olarak, ACA ile tedavi grupta apoptozis değerlerinin önemli düzeyde azaldığı gözlenirken ($p<0,05$ ve $p<0,001$), MTT değerlerinin ise arttığı gözlemlendi. Diğer bir ifade ile, PTZ grubuna kıyasla ACA+PTZ grubunda, apoptozis değerleri önemli düzeyde azaldığı gözlenirken ($p<0,05$ ve $p<0,001$), MTT değerlerinin önemli düzeyde ($p<0,05$ ve $p<0,001$) artarak kontrol değerlerine yaklaştığı gözlemlendi.

4.4. Mitokondriyal Zar Depolarizasyon ve Hücre İçi ROS Üretimi Sonuçları

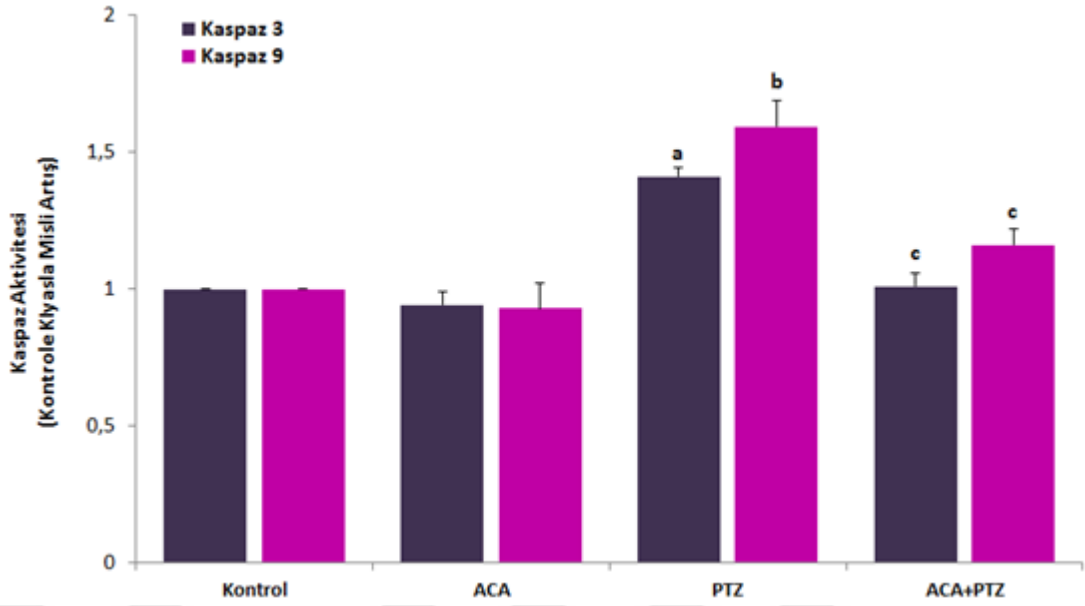
Şekil 16 da görülen sonuçlarda epilepsi oluşturulan sıçanlardan elde edilen hipokampal nöronların kontrol grubuna kıyasla, ACA grubunda mitokondriyal zar depolarizasyon (JC-1) ve ROS düzeylerinin düzeyi istatistiksel olarak önemli ölçüde ($p<0,05$) düşük bulunurdu. Bununla birlikte, kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, PTZ grubunda, JC-1 ve ROS düzeylerinin önemli düzeyde ($p<0,001$) arttığı gözlemlendi. PTZ grubuna kıyasla, ACA+PTZ grubunda JC-1 ve ROS düzeylerinin önemli düzeyde ($p<0,001$) azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, epileptik sıçan hipokampal nöronları mitokondriyal zar depolarizasyon (JC-1) ve hücre içi ROS üretimi değerlerinin epilepsi oluşumu ile önemli düzeyde arttığı gözlemlenirken, ACA grubunda bu değerlerde azalma gözlenmesinin TRPM2 kanalının önemli bir rolünün olduğunu göstermiştir.



Şekil 16. PTZ ile Epilepsi oluşturulan sıçan mitokondriyal zar depolarizasyon (JC-1) ve hücre içi ROS üretimi üzerinde TRPM2 kanal blokörü ACA'nın etkisi (Ortalama± standart sapma ve n=12). (^ap<0,05 ve ^bp<0,001 kontrole kıyasla. ^cp<0,001 ACA grubuna kıyasla. ^dp<0,001 ve PTZ grubuna kıyasla).

4.5. Kaspaz 3 ve 9 Aktivitesi Sonuçları

Apopitotik yolağın göstergelerinden olan kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivite sonuçları Şekil 17 de gösterilmiştir. Kontrol ve ACA grupları arası kaspaz 3 (p<0,05) ve kaspaz 9 (p<0,01) aktiviteleri bakımından farklılık gözlenmedi. Epilepsi oluşturulması ile (PTZ grubunda) kaspaz 3 ve 9 değerlerinin önemli düzeyde arttığı, ACA ile tedavi edilen grupta (ACA+PTZ grubunda) ise önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi (p<0,01), MTT değerlerinin önemli düzeyde (p<0,05) artarak kontrol değerlerine yaklaştığı gözlemlendi.



Şekil 17. PTZ ile Epilepsi oluşturulan sıçan kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesi üzerinde TRPM2 kanal blokörü ACA'nın etkisi (ortalama± standart sapma ve n=12). (^ap<0,05 ve ^ap<0,01 kontrole ve ACA gruplarına kıyasla. ^cp<0,01 ve PTZ grubuna kıyasla).

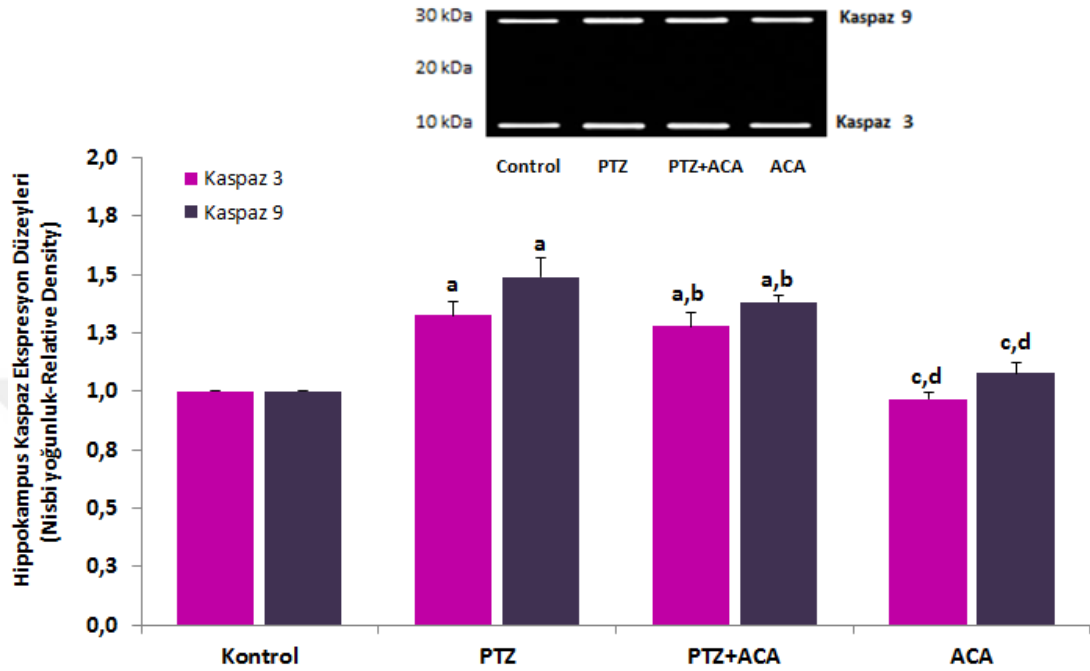
Kontrol grubuna kıyasla PTZ grubunda kaspaz 3 ve 9 aktivite değerleri önemli düzeyde ($p<0,001$) arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte, ACA ile inkübe edilen PTZ grubu (PTZ+ACA) hipokampal sinir hücresi kaspaz 3 ve 9 aktivite değerleri önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$ ve $p<0,001$). Benzer şekilde ACA ile tedavi edilen sıçanlara sonradan epilepsi oluşturulması ile de MTT değerlerinin azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$ ve $p<0,001$).

4.6. Western Blot Analiz Sonuçları

4.6.1. Kaspaz 3 ve 9 Ekspresyon Sonuçları

PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus kaspaz 3 ve 9 ekspresyon düzeyleri üzerinde TRPM2 kanal blokörü ACA'nın etkisi Şekil 18 de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla PTZ grubunda kaspaz 3 ve 9 ekspresyon düzeylerinin önemli düzeyde ($p<0,001$) yüksek olduğu gözlemlenirken, bu değerlerin PTZ grubuna kıyasla PTZ+ACA grubunda önemli düzeyde ($p<0,05$) azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte, sadece ACA ile tedavi edilen sıçanların

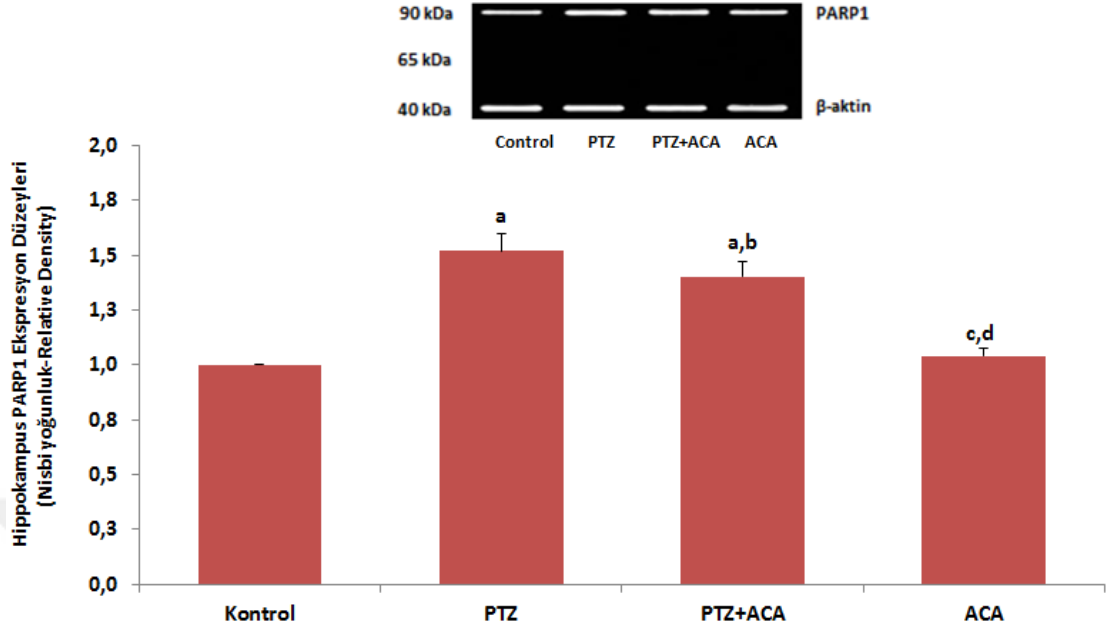
hipokampus kaspaz 3 ve 9 ekspresyon düzeylerinin hem PTZ ve hem de PTZ+ACA grubuna kıyasla önemli düzeyde ($p<0,001$) düşük olduğu gözlemlendi.



Şekil 18. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus hücrelerindeki kaspaz 3 ve 9 ekspresyon düzeyleri üzerinde TRPM2 kanal blokörü ACA'nın etkisi (ortalama± standart sapma ve n=3). (^a $p<0,001$ ve kontrole kıyasla. ^b $p<0,05$ ile ^c $p<0,001$ ve PTZ grubuna kıyasla. ^d $p<0,001$ ve PTZ+ACA grubuna kıyasla).

4.6.1. PARP1 Ekspresyon Sonuçları

PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus PARP1 ekspresyon düzeyleri üzerinde TRPM2 kanal blokörü ACA'nın etkisi Şekil 19 de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla PTZ ile epilepsi oluşturulan grupta PARP1 ekspresyon düzeyinin belirgin düzeyde ($p<0,001$) yüksek olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, PARP1 ekspresyon düzeylerinin PTZ grubuna kıyasla, PTZ+ACA grubunda önemli düzeyde ($p<0,05$) azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte, sadece ACA ile tedavi edilen sıçanların hipokampus PARP1 ekspresyon düzeylerinin kontrol düzeylerinde olduğu ve bu değer ACA grubunda, hem PTZ ve hem de PTZ+ACA grubuna kıyasla önemli düzeyde ($p<0,001$) azaldığı gözlemlendi.

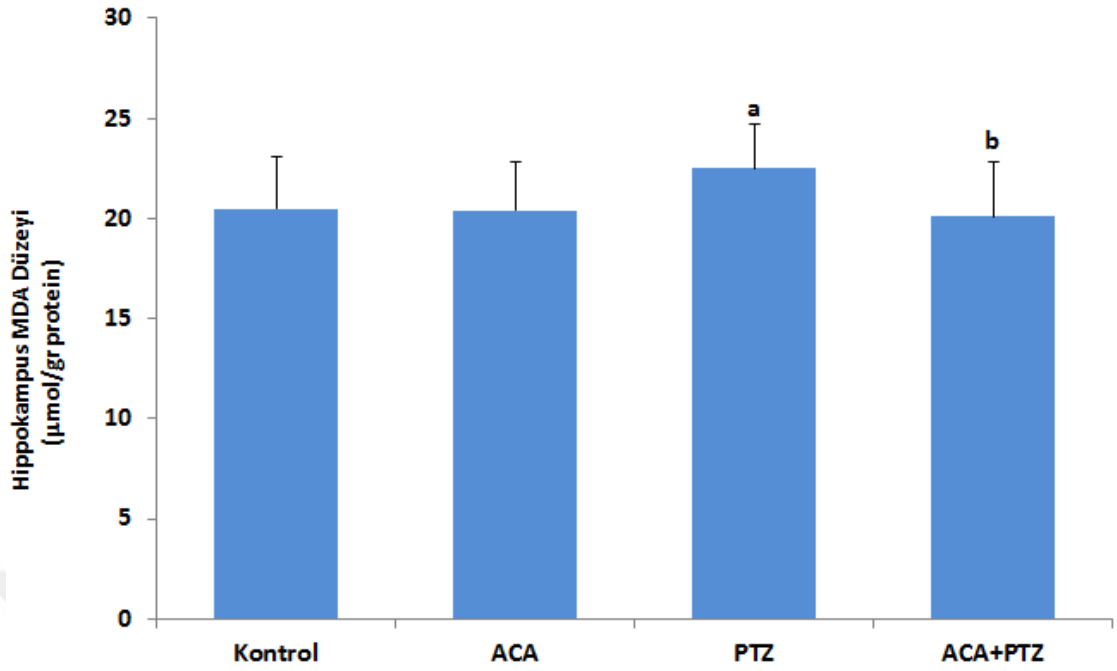


Şekil 19. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus hücrelerindeki PARP1 ekspresyon düzeyleri üzerinde TRPM2 kanal blokörü ACA'nın etkisi (ortalama± standart sapma ve n=3). (^ap<0,001 ve kontrole kıyasla. ^bp<0,05 ile ^cp<0,001 ve PTZ grubuna kıyasla. ^dp<0,001 ve PTZ+ACA grubuna kıyasla).

4.7. Oksidan ve Antioksidan Sonuçları

4.7.1. Epilepsi Oluşturulan Sıçan Hipokampus Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyleri Üzerinde TRPM2 Kanal Blokörü (ACA) Tedavisinin Etkileri

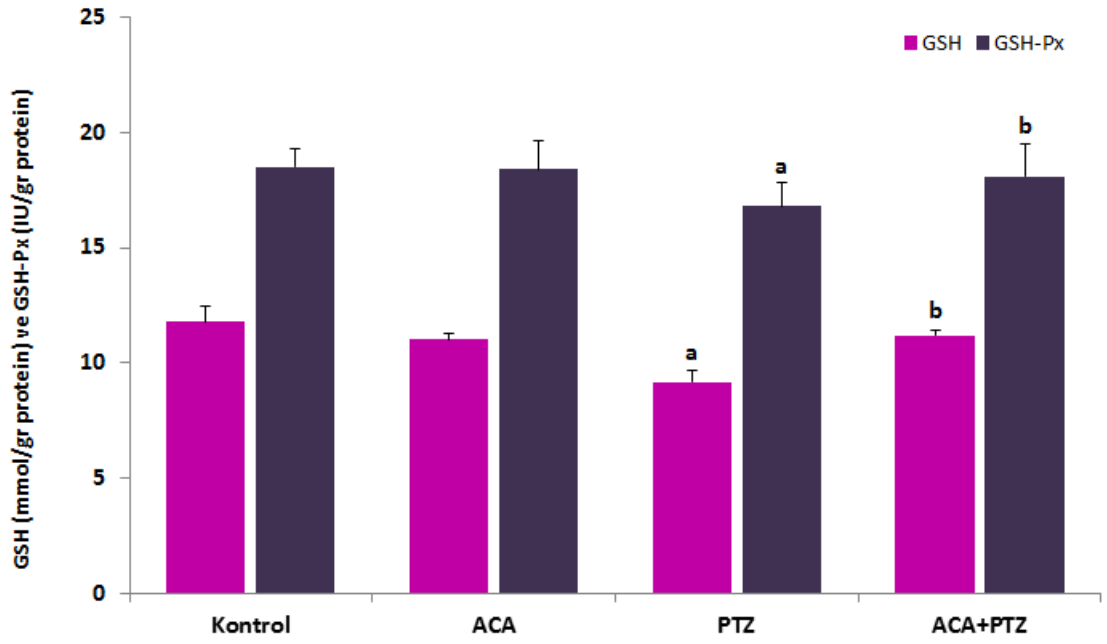
Hipokampus MDA düzeyleri Şekil 20 de gösterilmiştir. Kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, PTZ grubunda MDA düzeylerinin önemli düzeyde (p<0,05) yüksek olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, PTZ grubuna kıyasla, PTZ+ACA grubunda MDA düzeyinin önemli düzeyde (p<0,05) düşük olduğu gözlemlendi.



Şekil 20. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus hücrelerindeki lipid peroksidasyon (MDA) değerleri üzerinde ACA'nın etkisi (ortalama± standart sapma ve n=12). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve PTZ grubuna kıyasla).

4.7.2. Epilepsi Oluşturulan Sıçan Hipokampus GSH Düzeyi ve GSH-Px Aktiviteleri Üzerinde TRPM2 Kanal Blokeri (ACA) Tedavisinin Etkileri

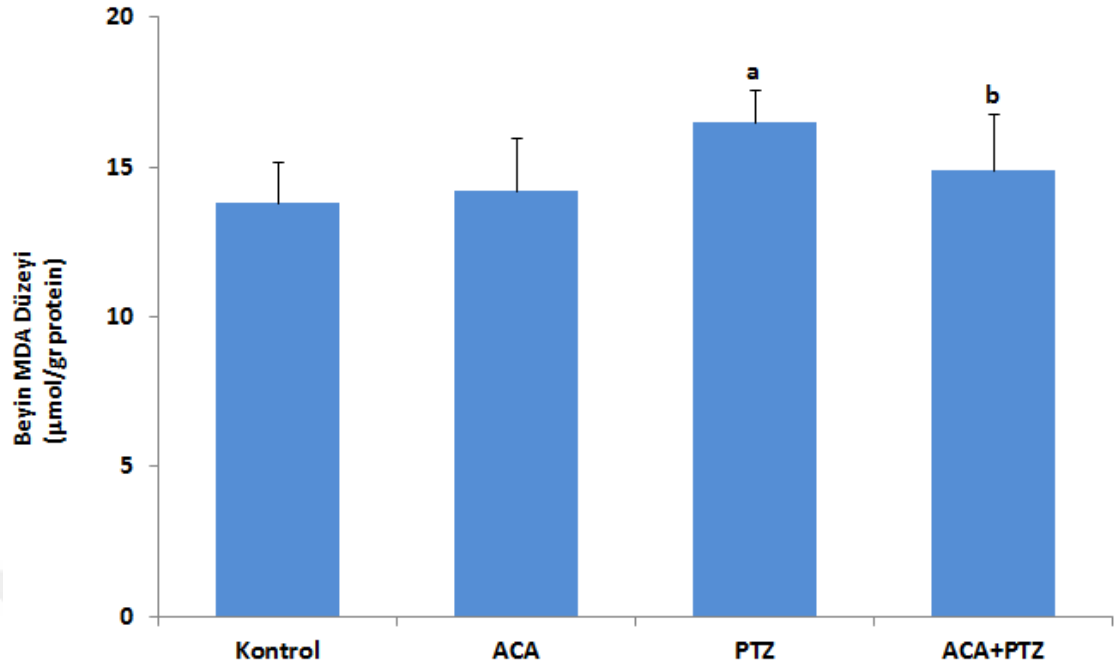
Hipokampus GSH düzeyleri ile GSH-Px aktiviteleri Şekil 21 de gösterilmiştir. Kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, PTZ grubunda GSH düzeyleri ile GSH-Px aktiviteleri önemli düzeyde (p<0,05) düşük olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, PTZ grubuna kıyasla, PTZ+ACA grubunda GSH düzeyleri ile GSH-Px aktiviteleri belirgin seviyede (p<0,05) yüksek olduğu gözlemlendi.



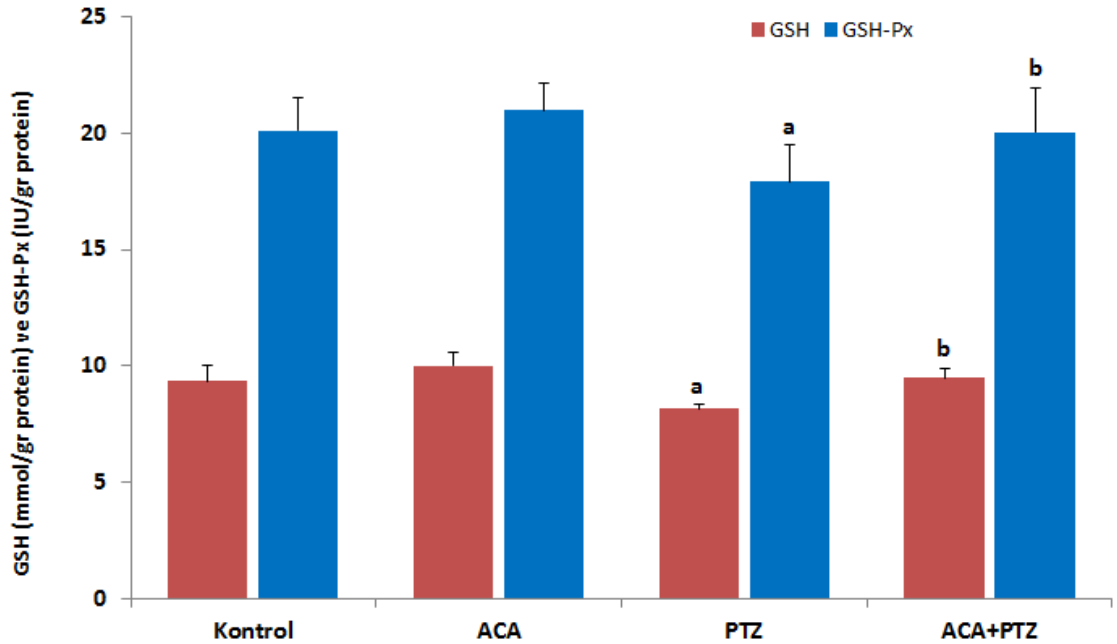
Şekil 21. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus hücrelerindeki GSH ($\mu\text{mol/g}$ protein) düzeyleri ve GSH-Px (IU/ g protein) aktiviteleri üzerinde ACA'nın etkisi (ortalama \pm standart sapma ve n=12). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve PTZ grubuna kıyasla).

4.7.3. Beyin MDA, GSH, GSH-Px ve Antioksidan Vitamin Sonuçları

Beyin MDA, GSH ve GSH-Px ve MDA değerleri sırası ile Şekil 22 ve 23 de gösterilmiştir. Yapılan bu tez proje çalışmasında, PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçanların hipokampus ve beyin örneklerindeki GSH ve GSH-Px değerlerinin önemli düzeyde azaldığı gözlemlenirken, MDA değerlerinin azaldığı gözlemlendi. ACA verilen PTZ (PTZ+ACA) grubunda ise GSH düzeylerinin ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Hem TRPM2 kanal sonuçları, hem de GSH sonuçları birlikte dikkate alındığında tiyol gruplarının Ca^{+2} iyonları geçişi ile ilgili etkisi olabileceği düşünülmektedir. ACA tedavisinin hipokampus sinir hücrelerinde GSH düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Bundan dolayı, hipokampal nöronlarda sitozolik tiyol düzeylerinin bir TRPM2 kanal düzenleyicisi olarak rol oynadığı anlaşılmaktadır (117,118).



Şekil 22. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan beyin lipid peroksidasyon (MDA) düzeyleri üzerinde ACA'nın etkisi (ortalama± standart sapma ve n=12). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve PTZ grubuna kıyasla).



Şekil 23. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan beyin GSH (µmol/g protein) düzeyleri ve GSH-Px (IU/ g protein) aktiviteleri üzerinde ACA'nın etkisi (ortalama± standart sapma ve n=12). (^ap<0,05 ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^bp<0,05 ve PTZ grubuna kıyasla).

Deneysel epilepside oluşan oksidatif stres ürünlerinin temizlenmesinde antioksidan vitaminlerdeki değişiklikleri belirlemek amacıyla, dört grubun beyin beta karoten A vitamini ve E vitaminin düzeyleri belirlendi. Beyin, beta karoten ile A vitamini ($p<0,05$) ve E vitaminin ($p<0,01$) düzeylerinin kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, PTZ grubunda önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi (Tablo 2). Beyin beta karoten, A vitamini yoğunluğundaki bu düşüşün ACA tedavisi ile önemli düzeyde ($p<0,05$) arttığı belirlendi.

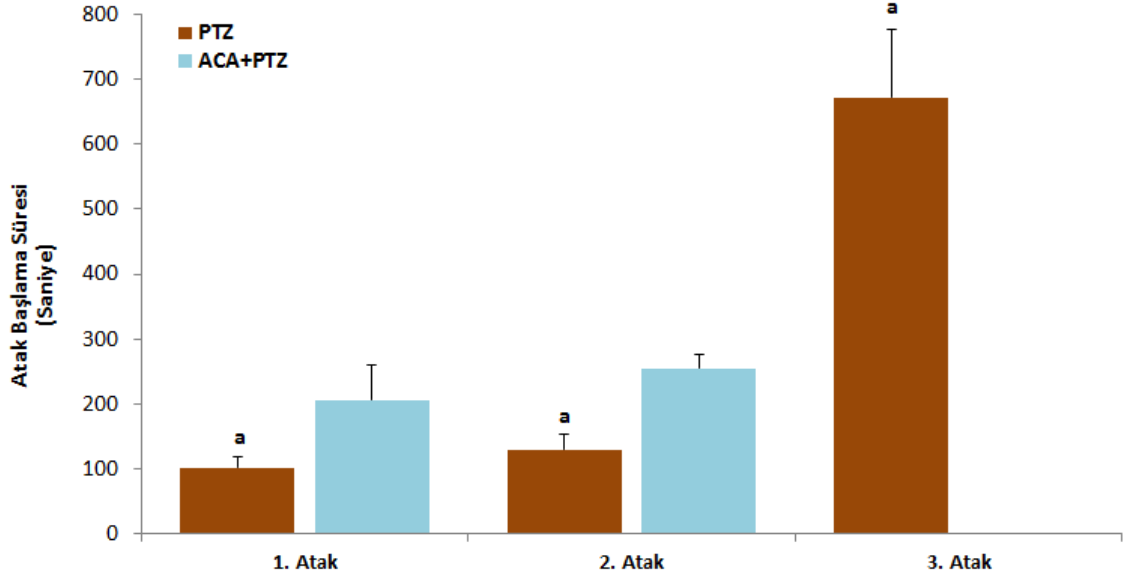
Tablo 2. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan beyin antioksidan vitamin düzeyleri üzerinde ACA'nın etkisi (ortalama± standart sapma ve n=12). (^a $p<0,05$ ile ^b $p<0,01$ ve kontrol ile ACA gruplarına kıyasla. ^c $p<0,05$ ve PTZ grubuna kıyasla).

Değerler	Kontrol	ACA	PTZ	PTZ+ACA
Vitamin A ($\mu\text{mol/gr doku}$)	3,96 ± 0,25	4,08 ± 0,35	3,44 ± 0,17 ^a	4,05 ± 0,47 ^c
Beta karoten ($\mu\text{mol/gr doku}$)	1,08 ± 0,20	1,17 ± 0,14	0,98 ± 0,11 ^a	1,16 ± 0,11 ^c
Vitamin E ($\mu\text{mol/gr doku}$)	17,11 ± 0,52	17,41 ± 1,35	14,52 ± 1,34 ^b	16,85 ± 1,29 ^c

4.8. Epilepsi Atak Başlangıcı Üzerinde ACA Tedavisinin Etkileri

Metot kısmında belirtildiği gibi, sıçanlar PTZ enjekte edilmeden önce epilepsi kayıtlarının alınacağı geniş ölçülerdeki üstü açık cam kap içerisine konuldular ve kamera ile 30 dakika süre ile kamera kayıtları alındı (üstte kamera ve altta şeffaf 2x2 m şeffaf cam havuz içerisinde) (Resim 6). Toplam 30 dakika süre içerisinde en fazla 3 atak gözlemlendi. İlk atak PTZ ve ACA+PTZ gruplarındaki tüm sıçanlarda gözlemlendi. İkinci atak PTZ grubundaki sıçanların tamamında gözlenirken, ACA+PTZ grubunda sadece 4 sıçanda gözlemlendi. 3. Atak ise PTZ grubunda 6 sıçanda gözlenirken, ACA+PTZ grubunda hiçbir sıçanda atak gözlenmedi.

PTZ grubuna kıyasla, ACA+PTZ grubundaki atakların başlaması (Latency time) önemli düzeyde ($p<0,001$) erken başladığı gözlenirken, ACA tedavisi epileptik atakların başla süresini geciktirmiştir. Üçüncü atak oluşumunu ise tamamen önlemiştir (Şekil 24).



Şekil 24. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçanlarda epileptik atakların başlaması (Latency time) üzerinde TRPM2 kanal blokleri ACA'nın etkisi. (Ortalama± standart sapma ve n=12). (^a $p<0,001$ ve ACA+PTZ grubuna kıyasla).

5. TARTIŞMA

Hücre içerisinde voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları veya kimyasal kapıların (örneğin glutamat) aktivasyonuna bağlı hücre içerisinde Ca^{+2} iyon artışının epilepsi oluşumunda önemli rolü olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, günümüzde epilepsi tedavisinde kullanılan birçok ilaç bu kanalları bloke ederek tedavi sağlamaktadır. Fakat mevcut ilaçların hiçbirisi tam tedavi sağlayamamaktadır. Bunun başlıca iki nedeni, epilepsinin etiolojisinin tam açığa çıkartılamamış olması, ikincisi ise mevcut ilaçların hiç birisinin TRP kanallarını bloke edememesidir. TRP kanallarından TRPM2 oksidatif stres ile aktive olmaktadır ve epilepsi etiolojisinde oksidatif stresin rolü birçok çalışma sonucu ile gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında, epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus sinir hücrelerinde TRPM2 kanallarının aktivasyonuna bağlı hücre içi serbest Ca^{+2} iyon artışının olduğu literatürde ilk defa gösterilmiştir.

Nöronların elektriksel olarak aşırı uyarılması “aşırı uyarılma toksisitesi” adı verilen, hücreyi ölüme götüren bir süreci başlatabilir. Bu durum pek çok nörodejeneratif hastalıkta ve travmalar sonrası gözlenen nöron kaybı patofizyolojisinde sorumlu tutulmaktadır. Aşırı uyarılma toksisitesinde hücre ölüm sürecini başlatan hücre içinde yükselen Ca^{+2} seviyesidir (20). Yeni tanımlanmış olan TRPM2 Ca^{+2} kanallarının bu bağlamda epilepsi hastalığında nasıl rol oynadığı, nöronu ölüme götüren süreçlerde ne gibi rolünün olduğunu anlamak oldukça önem arz etmektedir.

TRPM2, ağırlıklı olarak beyin ve nöronal hücrelerde yerleşmiş olmasına rağmen, kemik iliği, dalak, kalp, lökosit, karaciğer ve akciğeri de kapsayan diğer birçok farklı dokuda varlığı tanımlanmıştır. (47,48). ADPR oksidatif stres ve onun ürünleri olan ROT’dan ve bunun neticesi olan NAD^{+} dan 3 yolla üretilmektedir (10). TRPM2 kanalları 6 segmentten oluşmaktadır ve katyon girişleri 5. ve 6. segmentler arasından gerçekleşmektedir (47). Ayrıca kanalın bir C (Nudix homoloji alanı) ve N uçları bulunmaktadır. Bu nudix homoloji alanında, ADPR pirofosfataz enzimi bulunur ve kanalın açılmasından bu enzimin aktivasyonu sorumludur. ADPR pirofosfataz enzimi ADPR’nin yanı sıra oksidatif stresle de aktive olabilmektedir.

2002 yılında Kyoto'dan Prof. Dr. Yasuo Mori (52) ile Aachen Prof. Dr. Andreas Lückhoff'un (53) grubu birbirinden bağımsız olarak, ilk defa bir TRP kanalının oksidatif stres ile aktive olduklarını gösterdiler. Bu kanalın ismi TRPM2 dir. TRPM2 kanallarının N ucundaki ADP-riboz pirofosfataz enzimi oksidatif stres ve/veya ADPR ile aktive olduğunda kanal açılmaktadır. ACA tarafından da kanal inhibe olmaktadır. Yakın zamanda, yaptığımız bir çalışmada (17) oksidatif stres ile de aktive olan TRPV1 kanallarının deneysel epilepsi modelinde önemli rolü olduğunu gözlemledik. Yaptığımız literatür taramalarında TRPM2 ve epilepsi konusunda hiçbir çalışma yoktu. Bu nedenle, bu projede deneysel rat, TRPM2 hipokampal hücre kültürü ortamında TRPM2 kanalının epilepsi oluşumundaki rolünü inceleyerek literatüre katkıda bulunulması amaçlandı. .

Tez çalışmasında, kontrol grubuna kıyasla, PTZ ile epilepsi oluşturulan grupta hidrojen peroksit ile aktive edilen hipokampus TRPM2 kanalları ile ADPR ile aktive edilen AKG hücrelerinin TRPM2 kanallarının kontrol grubuna kıyasla daha fazla açıldığını gözlemledik. Ayrıca, AKG ve beyin örneklerinde PTZ grubunun hücre içi ROS üretimi ve lipid peroksidasyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu gözlemlendi. Bu nedenle de, araştırma sonuçlarına göre epilepsi sonucu oluşan oksidatif stres ürünlerinin, TRPM2 kanalının C ucundaki ADPR pirofosfataz enzimi ile etkileşerek kanalı daha fazla açtığı fikrini doğrulamıştır. Ayrıca tez çalışma sonuçlarının, TRPM2 kanallarını aktive ettiğini bildiren epilepsi dışındaki araştırma sonuçlarıyla uyum göstermektedir (46,52,53,78).

Epilepsi, toplumun büyük bir kesimini (%2-3) etkileyen nörolojik bir hastalıktır (6). Epilepsi insidensinin, 2050 li yıllarda günümüzdeki sayıların çok üstüne çıkacağı anlaşılmaktadır. Hastalığın oluşumunda epileptik deşarjlar önemli rol oynamaktadır. Epileptik atakların meydana gelmesinde oksidatif strese bağımlı/bağımsız hücre içi Ca^{+2} aşırı artışının önemli bir rolü vardır. Günümüzdeki topiramet ve valproik asit gibi birçok epileptik ilaç hücre içi serbest Ca^{+2} girişini düzenleyerek tedavide fayda sağlamaktadır (21,120). Fakat günümüzdeki mevcut epilepsi ilaçlarının hiçbirisi hastalıkta kökten tedavi sağlayamamaktadır. Hatta bazı hastalarda (dirençli epilepsi) ilaçlar tedavide fayda sağlamadığı için cerrahi yollara başvurulmaktadır.

Ca^{+2} iyon miktarı hücre dışında içine kıyasla 10 bin-20 bin (hücre tipine bağlı olarak) daha fazladır. Hücre içerisine Ca^{+2} iyonu voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları ve kimyasal kapılar ile girmektedir. Bu katyon kanalları dışında son 20 yıl içerisinde TRP kanalları keşfedilmiştir. Bu kanalların aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları ve kimyasal kapılardan çok farklıdır. Diğer bir ifadeyle bu kanalların çoğunun aktivasyonunda nörotransmitter madde adı verilen kimyasallar ve voltaj değişikliklerinin etkisi yoktur. Örneğin TRPV1 kanalı kırmızı acı biberde bolca bulunan kapsaisin, TRPA1 kanalı hardal özütüyle, TRPM8 ise mentol ile aktive olmaktadır. Günümüzdeki mevcut kimyasal ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanal blokerlerinin hiçbirisi bu kanalları bloke edememektedir. Bu günümüzdeki birçok epileptik ilacın epileptik hastaları tamamen tedavi edememesinin bir nedeni olabilir.

Mitokondri hücre içerisinde protein, karbonhidrat ve yağların değerlendirilerek ATP üretilmesinde rol oynayan önemli bir hücre içi organelidir. Nasıl bir araçta hareket enerjisi üretmek için benzin veya mazot yanınca artık ürünler çıkmakta ve egzoz ile atılmakta ise, mitokondride de ATP üretimi sırasında artık ürünler meydana gelmektedir. Bunlardan bir tanesi hücre içi ROS dur. Aşırı hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi artışına bağlı olarak, mitokondriyal zarlar daha fazla depolarize olmakta ve aşırı hücre içi ROS üretimi gözlenmektedir. Ayrıca, epileptik ataklarda sitozolik Ca^{+2} artışını izleyen mitokondriyal Ca^{+2} artışına bağlı mitokondriyal zar depolarizasyon oluşumunun artışı olduğu da bildirilmiştir (32,33). Fakat bu durumun TRPM2 kanal aracılığıyla oluşup oluşmadığı konusunda bir bilgi yoktur. Bu nedenle, mitokondriyal zar depolarizasyon tayininin yapılması bu halkadaki zinciri tamamlayarak moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Mitokondriyal zar üretimi ve hücre içi ROS üretiminde kullanılan en önemli kimyasallar floresan boylardır. Mitokondriyal zar depolarizasyon agregalarını gösteren en iyi boya JC-1 boyasıdır. Hücre içi ROS üretimini gösteren en iyi floresan boya ise DHR123 dür. Epilepsi de hücre içi serbest $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi artışını gözleyince, mitokondriyal zar üretimi ve hücre içi ROS üretimini araştırmayı amaçladık.

Çalışma sonucunda, PTZ enjekte edilen grupta kontrol grubuna kıyasla hücre içi ROS üretimi ve mitokondriyal zar depolarizasyon düzeylerini yüksek olarak gözlemledik. Bununla beraber TRPM2 kanal blokeri ACA tedavisi sonrası bu iki

değerinde ACA+PTZ grubunda, ACA grubuna kıyasla belirgin bir şekilde azaldığını gözlemledik. TRPM2 kanal veya diğer Ca^{+2} kanallarının blokajı ile hücre içersine Ca^{+2} girişinin azalmasının hücre içi ROS üretimi ve mitokondriyal zar depolarizasyon düzeylerini azalttığı çok iyi bilinmektedir. ACA tedavisi ile hücre içi ROS üretimi ve mitokondriyal zar depolarizasyon düzeylerinin azalması, hücre içersine Ca^{+2} girişinin azalmasına bağlanmıştır. Bu sonucun epilepsi dışında diğer nörolojik hastalıklarda yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu gözlemlendi (64,78,106,107,110,111).

Çalışmamızda, daha önceki çalışmalarda (54) pankreatik β -hücrelerinde ortaya konulduğu gibi epilepsi AKG nöronlarında TRPM2 kanal ilişkili ROS üretimi ve hücre içine Ca^{+2} akışının olduğu gözlemlendi. Duyusal sinirlerde TRPM2 agonisti (H_2O_2)-aracılı hücre içine yine TRPM2 kanalları üzerinden Ca^{+2} akışı hücre içindeki ROS miktarını ve mitokondriyal geçirgenliği arttırmakta, mitokondriyal bozukluklara sebep olmaktadır (33,34). TRPM2 kanallarının aktivasyonu ile hücre içi Ca^{+2} miktarının artması Ca^{+2} bağımlı mitokondriyal oksijen tüketimine bağlı ROS üretimi ACA ve GSH gibi antioksidanlar tarafından azaltılmaz ise TRPM2 kanal ve Ca^{+2} girişi arttırmaktadır (20). Bu güne kadar epilepsi hastalığı olmayan AKG nöronları, TRPM2 ve ACA arasındaki ilişki ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen (64,78), epileptik AKG nöronlarında TRPM2 kanalları etkileşimi konusunda bir çalışma bulunmamaktadır. Bu teze benzer şekilde, kültüre edilmiş nöronlarda TRPM2 aktivasyonu ROS üretiminin ACA ve GSH tedavisiyle engellenmesi sebebiyle durdurulmasına rağmen, AKG ve hipokampal nöronlarda TRPM2 kanalları hücre içi glutatyon tükenmesi kaynaklı ROS üretimi sebebiyle aktive olur (117,118).

Aşırı ROS üretimine bağlı olarak oluşan oksidatif stres hücre hasarı ve apoptozis başlatılmasında potansiyel bir faktördür (28). Yukarıda da belirtildiği gibi, nörolojik hastalıklarda sitozolde Ca^{+2} aşırı artışı mitokondriyal zar depolarizasyonu artışına neden olarak üç yolağı tetiklemektedir. A) Kaspaz aktivasyonları ile apoptozis oluşumu, B) hücre içi ROS üretiminin artışı C) Mitokondride daha fazla üretilen oksidatif stres ürünleri ile aktive olan kanalların daha fazla açılması. Hidrojen peroksit stabil bir molekül olup hücrelerde normal olarak üretilen ROS hücre zarından geçebilen bir formudur. Bu nedenle hidrojen peroksit maruziyeti oksidatif stres modellemede bir kanal açıcı model olarak kullanılır (52,53,119).

Hidrojen peroksit üretimi ile nörodejeneratif hastalıklar arasında etiyolojik ilişkinin varlığı üzerine çok sayıda bildirim bulunmaktadır (121,122). Kültür nöronlarının oksidatif stres ve hidrojen peroksite maruz kalması durumunda hücre içi Ca^{2+} artışına, mitokondri fonksiyon bozulmasına ve PARP1 aktivasyonuna neden olarak hem apopitozis benzeri gecikmeli nöron ölümü hem de nekrozu başlattığı gösterilmiştir (123,124). Bu çalışma sonuçlarında da benzer şekilde epileptik hipokampal nöronlarda oksidatif stres artışına bağlı kaspaz 3, kaspaz 9 ve PARP1 ekspresyon düzeyinde bir artış gözlemlendi. Bu artış ACA tedavisi ile azaldı. Bu sonuçlar, hücre içi mitokondriyal ROS üretimi azalmasının, çekirdekte DNA tahribi azalması ve apoptotik yolların engellenmesi ve PARP1 ekspresyon düzeylerinde de azalma gözlenmesine neden olmuştur.

Aşırı TRPM2 kanal ekspresyonu ve aktivasyonu artışı, hücre içerisine aşırı Ca^{2+} girişine neden olmaktadır. Artan aşırı hücre içi serbest Ca^{2+} düzeyi mitokondriyal zar depolarizasyon artışı ile aşırı ROS üretimi ve DNA tahribine neden olmaktadır (20). DNA tahribi sonucu NAD^+ den PARP1 aktivasyonu aracılı meydana gelen ADPR TRPM2 kanalını aktive etmektedir (10). Tez çalışmamız sonuçları içerisinde, hücre içi ROS ile mitokondriyal zar depolarizasyon üzerinde PTZ ile oluşturulan epilepsi ve TRPM2 kanal blokeri ACA tedavisinin etkisi gösterildi. PARP1 yolağının TRPM2 kanal aracılı epilepsi oluşumu üzerinde henüz bir bildirim yoktur. Bu yolağı aydınlatmak amacı ile tez projemizde PARP1 ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçan hipokampus PARP1 ekspresyon düzeyleri üzerinde TRPM2 kanal blokeri ACA'nın etkisi sonuçlar kısmında gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla PTZ ile epilepsi oluşturulan grupta PARP1 ekspresyon düzeyinin belirgin düzeyde ($p<0,001$) yüksek olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, PARP1 ekspresyon düzeylerinin PTZ grubuna kıyasla, PTZ+ACA grubunda önemli düzeyde ($p<0,05$) azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte, sadece ACA ile tedavi edilen sıçanların hipokampus PARP1 ekspresyon düzeylerinin kontrol düzeylerinde olduğu ve bu değerlerin ACA grubunda, hem PTZ ve hem de PTZ+ACA grubuna kıyasla önemli düzeyde ($p<0,001$) azaldığı gözlemlendi.

Beyin MDA, GSH ve GSH-Px ve MDA değerleri sonuçlar kısmında gösterilmiştir. GSH ve ürünlerinin (örneğin GSH-Px enzimi) eksikliği oksidatif stresi

arttırarak hipokampus TRPM2 kanalları üzerinden Ca^{+2} akışını arttırdığı iyi bilinmektedir. Duyusal nöronların hastalıkları içerisinde sistin ile sistein dönüşümleri arasındaki herhangi bir bozukluğun GSH in eksikliğine sebep olacağı bilinmektedir (40). Bu duruma benzer şekilde, GSH in sentezlenmesinde, onun spesifik üretim destekleyicisi olarak bilinen NAC, sıçanlara verildiğinde GSH eksikliğini gidererek ve diğer antioksidan sistemleri destekleyerek TRPM2 kanal inhibisyonuna neden olduğu yakın zamanda yapılan çalışmalarda gözlemlendi (125-127). Proje çalışmamızda, PTZ ile epilepsi oluşturulan sıçanların hipokampus ve beyin örneklerindeki GSH ve GSH-Px değerlerinin önemli düzeyde azaldığı gözlemlenirken, MDA değerlerinin azaldığı gözlemlendi. Bunun ile birlikte ACA verilen PTZ (PTZ+ACA) grubunda ise GSH düzeylerinin ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Hem TRPM2 kanal sonuçları, hem de GSH sonuçları birlikte dikkate alındığında tiyol gruplarının Ca^{+2} iyonları geçişi ile ilgili etkisi olabileceği düşünülmektedir. ACA tedavisi hipokampus sinir hücrelerinde GSH düzeyini artırdığı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı, hipokampal nöronlarında sitozolik tiyol düzeylerinin bir TRPM2 kanal düzenleyicisi olarak rol oynadığı anlaşılmaktadır (117,118).

Başta beyin olmak üzere tüm sinir hücrelerinde yağ fazında en önemli antioksidan E vitamini. Yine lipit fazda antioksidan özellik göstererek başta tekli oksijen olmak üzere radikallerin inhibisyonunda rol oynayan, beta karoten ve A vitamini. Hücrenin sıvı fazında (örneğin sitozolde) antioksidan özelliğe sahip olan ve E vitaminin radikallerden temizlenmesinde rol oynayan C vitamini. Bu nedenle, deneysel epilepside oluşan oksidatif stres ürünlerinin temizlenmesinde antioksidan vitaminlerdeki değişiklikleri belirlemek amacıyla, dört grubun beyin beta karoten A vitamini ve E vitaminin düzeyleri belirlendi. Beyin, beta karoten, A vitamini ve E vitamini ($p < 0,01$) düzeylerinin kontrol ve ACA gruplarına kıyasla, PTZ grubunda önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi (Tablo 2). Beyin beta karoten ve A vitamini ($p < 0,05$) konsantrasyonlarındaki bu düşüş ACA tedavisi ile önemli düzeyde artmış olarak belirlendi.

Sonuç olarak, bu tezin bulguları benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında epilepsi bağlantılı aşırı ROS üretiminin hipokampus hücrelerinde TRPM2 aktivasyonu yoluyla epilepsi ataklarına neden olduğu söylenebilir (10, 11). Epilepsi

bağlantılı AKG TRPM2 akımları ve beyin oksidatif toksisite üzerine ACA'ın koruyucu etkisi vardır. Oksidatif stres ve aşırı Ca^{+2} girişinin epilepsinin ortak nedenleri olduğu iyi bilinmektedir. Epilepsi kaynaklı beyin hasarı ve epileptik atakların oluşum nedeni olan beyin oksidatif toksisite ve hipokampus TRPM2 kanal aktivitelerinin ACA tedavisiyle azaltılabileceğini önermekteyiz.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

NMDA reseptörleri ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanal aktivasyonuna bağlı aşırı hücre içi Ca^{+2} artışı sinir hücresi ölümü ve epileptik atakların oluşumuna neden olduğu iyi bilinirken, epilepsi hastalığı oluşumunda ve tedavisinde TRPM2 kanallarının etkisi henüz bilinmemektedir. TRPM2 katyon kanallarının epilepsi oluşumuna neden olan hipokampus süreçlerde ne gibi rolünün olduğunu anlamak epilepsi hastalığı tedavisinde oldukça önem arz etmektedir. Tez çalışmamızda, epilepsi oluşturulan sıçanlardan edilen hipokampal nöronlarda TRPM2 kanal aktivasyonunun rolü araştırılmıştır. Yapılan analizler neticesinde TRPM2 kanallarının daha fazla aktivasyonuna neden olduğu, TRPM2 kanal blokleri ACA enjeksiyonun veya inkübasyonunun ise epilepsinin neden olduğu TRPM2 kanal aracılı aşırı Ca^{+2} girişini önlediği sonucu elde edilmiştir. Hipokampal hücrelerde oksidatif stresle veya ADPR ile TRPM2 kanallarının aktive olması hücreye Ca^{+2} girişini artırmaktadır. Sitozolik Ca^{+2} seviyelerinin artışı mitokondriyal membran potansiyelini artırdığı ve mitokondriyal depolarizasyon neticesinde hücrel apoptozis süreçlerinin aktiflenmesine sebep olduğu bilinmektedir. Bu çalışmayla epilepsi oluşumu kaspaz 3 ve 9 enzimlerinin aktivasyonuna ve apoptozise neden olurken, TRPM2 kanal blokleri ACA'nın ise kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu azalttığı ve hücrenin ölüme gitmesine engel olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Nörolojik bir hastalık olan epilepsi hastalığında apoptozis, beraberinde beyin hipokampus dokusunun zarar görmesi ile sonuçlanan bir süreçtir. Epilepsi tedavisi prensipleri kalıcı bir çözümden ziyade, pahalı, hastalara daha çok semptomatik bir tedavi sunan ve hastalığın ilerlemesini geciktiren prensip ile hastalara uygulanmaktadır. Elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre TRPM2 (ACA) kanal blokleri bu kanalın aktivasyonunu baskılamak, bir dizi hücrel moleküler apoptotik reaksiyonu sonucunda nöron ölümünü dikkat çekici bir şekilde azaltmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, günümüzde epilepsi hastalığı için tercih edilen pahalı tedavi yaklaşımları yerine kalsiyum kanal bloklerinin TRPM2 kanalları aktivasyonları üzerine etkileri bilindiğinden *in vivo* deney hayvanı modellerinde de benzer şekilde bu çalışmanın keşfini gerekli kılmıştır. Elde edilen veriler, başta ülke ekonomisi üzerine bir yük olan pahalı epilepsi hastalığı tedavi yaklaşımlarına ucuz bir alternatif olabilmesinin

yanı sıra, tedavisine yönelik *in vivo* ve *in vitro* çalışma planlayan araştırmacılara, epilepsi oluşumunda TRPM2 kanallarının fonksiyonunu anlatan bir potansiyel kaynak olarak geleceğe ışık tutacak niteliktedir.

Sonuç olarak, epilepsi oluşumunda oksidatif stresin zararlı etkisini TRPM2 kanalını aşırı aktive ederek gerçekleştirirken, incelenen değerler üzerinde TRPM2 kanal inhibisyonunun olumlu etkisini bu kanalları düzenleyerek katkı sağlamıştır. Epilepsi tedavisinde NMDA reseptör blokerleri ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanal inhibitörleri yaygın olarak kullanılıyor olmasına rağmen, epilepsi oluşumunda TRPM2 kanalının rolü ve bu kanalın inhibisyonunun epilepsi tedavisinde kullanılabilirliği konusunda literatürde yapılmış bir deneysel çalışma yoktu. Tez çalışma sonuçlarımız bu boşluğu doldurmuştur. Sonuçlarımız TRPM2 kanal aktivasyonuna bağlı gelişen hipokampal nörolojik hastalıkların tedavisinde TRPM2 kanal blokerlerinin potansiyel ilaç olarak kullanılabileceğini gerçeğini de ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçların insan klinik çalışmaları doğrulanması, TRPM2 kanal inhibisyonunun epilepsi ve benzer hastalıkların tedavisinde kullanılması için önemli kaynak oluşturulacaktır.

ÖZET

Epilepsi Nörobiyolojisinde TRPM2 Katyon Kanallarının Rolünün Sıçan Hipokampus Sinir Hücrelerinde Araştırılması

Epilepsi oluşumunda hücre içi Ca^{+2} artışı ve aşırı oksidatif stresin rolü iyi bilinmektedir. TRPM2 kanalı oksidatif stres ile aktive olan Ca^{+2} geçirgen bir kanaldır. Epilepsi de reaktif oksijen türleri (ROS) ile aktive olan TRPM2 kanalı hastalığın oluşumunda rol oynayabilir. Bu çalışmada, TRPM2 blokeri N-(p-amylicinnamoyl) antranilik asit (ACA)'ın pentilen tetrazol (PTZ) ile epilepsi oluşturulan sıçanların hipokampus TRPM2 aktivasyonu, oksidatif stres ve apoptozis değerleri üzerinde etkileri araştırıldı.

Sıçanlar kontrol, PTZ, ACA ve ACA+PTZ olarak dört gruba ayrıldı. Periton içi PTZ (60 mg/kg) verilerek, PTZ ve PTZ+ACA grupları epilepsi oluşturuldu ve 30 dakika süre ile epilepsi atak geçirme kayıtları alındı. ACA gruplarında PTZ veya plasebo verilmeden 2 saat önce periton içi ACA enjeksiyonları (25 mg/kg) yapıldı. PTZ enjeksiyonundan 30 dakika sonra tüm gruplardan hipokampus ve beyin korteksi örnekleri alındı. Hücre içi serbest Ca^{+2} yoğunluğu, TRPM2 akım yoğunlukları, hücre içi ROS üretimi, mitokondriyal zar depolarizasyonu, apoptozis, kaspaz 3, kaspaz 9 ile PARP1 ekspresyon düzeyleri PTZ grubunda, kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde yüksekti. Hipokampus ve beyin hücre canlılığı, lipit peroksidasyon, indirgenmiş glutatyon, glutatyon peroksidaz, vitamin A, vitamin E ve beta karoten düzeyleri ile epilepsi atak geçirme süreleri PTZ grubunda, kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde düşüktü. Bütün bu değerler, ACA tedavisi ile düzeldi. ACA tedavisi ile atak geçirme süreleri de uzadı.

Sonuç olarak, literatürde ilk kez epilepsi oluşumunda TRPM2 kanalından Ca^{+2} girişinin önemli olduğu ve hipokampus mitokondriyal oksidatif stres ile apoptozise neden olduğu gözlenirken, TRPM2 inhibisyonun bu değerler üzerinde düzenleyici rolü gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis; Kalsiyum iyonu; Epilepsi; Hipokampus; TRPM2 kanalı; Mitokondriyal oksidatif stres.

ABSTRACT

Investigation of Role of TRPM2 Channel on Neurobiology of Epilepsy in Hippocampus of Rat

Calcium ion (Ca^{2+}) accumulation into the cytosol of hippocampus through oxidative stress seems to be a main reason in the etiology of epilepsy. TRPM2 channel is a cation-permeable Ca^{2+} channel and high expression level of the channel was found in the hippocampus. Although previous studies implicate reactive oxygen species (ROS) dependent channel activation in the generation of epilepsy, suppression of ongoing seizures by TRPM2 antagonist (N-(p-amylicinnamoyl) antranilik asit (ACA) has not yet been clarified. We tested the effects of TRPM2-specific antagonist (ACA) on the modulation of Ca^{2+} accumulation, apoptosis and anticonvulsant properties in hippocampus of pentylenetetrazole (PTZ) and ACA administrated rats.

All rats were divided into four groups as control, PTZ, ACA and ACA+PTZ. Epilepsy was induced in the PTZ and ACA+PTZ groups by intraperitoneal injection of PTZ (60 mg/kg) and then epilepsy records were taken within 30 minutes. ACA (25 mg/kg) was administrated to ACA and ACA+PTZ groups 2 hours before the injections of PTZ. Brain cortex and hippocampus samples were taken. PTZ administration increased intracellular free Ca^{2+} concentrations, TRPM2 current densities, mitochondrial membrane depolarization, intracellular ROS production, apoptosis, PARP1, caspase 3 and 9 expression values, although the values were reduced in the ACA+PTZ group by ACA treatment. In the hippocampal neuron and brain, cell viability, lipid peroxidation, reduced glutathione, glutathione peroxidase, vitamin A, vitamin E and beta carotene values were decreased by the PTZ administration. However, the values were modulated by the ACA treatment. Latency time was also extended by application ACA.

In conclusion, these results support a role for TRPM2 channels in inhibition of apoptosis, epileptic seizures, mitochondrial oxidative stress, and calcium accumulation, indicating that TRPM2 inhibition may possibly be a novel target in the hippocampus for prevention of epileptic seizures.

Key words: Apoptosis; Calcium ion; Epilepsy; Hippocampus; TRPM2 channels; Mitochondrial oksidatif stress.

KAYNAKLAR

1. Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci.* 2006;31(9):509-515.
2. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-1658.
3. Nazıroğlu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res* 2009; 34:2181–219.
4. Ozmen I, Nazıroğlu M, Alici HA, Sahin F, Cengiz M, Eren I. Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by increasing oxidative stress. *Neurochem Res.* 2007; 32(1):19-25.
5. Sen CK, Packer L. Role of glutathione on antioxidant redox systems *Am J Clin Nutr* 2000;72(suppl):653S–669S.
6. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 2017;88(3):296-303.
7. Nazıroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: Where are we now? *Neurochem Res.* 2011;36:355-366.
8. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient Receptor Potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007;87:165-217.
9. Nilius B. TRP channels in disease. *Biochem Biophys Acta* 2007;1772:805-812.
10. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* 2001;411(6837):595-9.
11. Nazıroğlu M, Lückhoff A, Jüngling E. Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25(4):383-387.
12. Nazıroğlu M, Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res.* 2008;33(7):1256-1262.
13. Nazıroğlu M, Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J Neurol Sci.* 2008;270:152-158.
14. Nazıroğlu M, Braidı N. Thermo-Sensitive TRP Channels: Novel targets for treating chemotherapy-induced peripheral pain. *Front Physiol.* 2017;8:1040.
15. Ratnam M, Chan J, Lesani N, Sidorova-Darmos E, Eubanks JH, Aarts MM. mRNA Expression of Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM) Channels 2 and 7 in Perinatal Brain Development. *Int J Dev Neurosci.* 2018 May 26.

16. Geronzi U, Lotti F, Grosso S. Oxidative stress in epilepsy. *Expert Rev Neurother.* 2018;18(5):427-434
17. Nazıroğlu M, Övey İS. Involvement of apoptosis and calcium accumulation through TRPV1 channels in neurobiology of epilepsy. *Neuroscience.* 2015;293:55-66.
18. Nazıroğlu M. TRPV1 Channel: A potential drug target for treating epilepsy. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(2):239-247.
19. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev.* 2018;pii:S0047-6374(18)30052-6.
20. Nazıroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res.* 2007;32(11):1990-2001.
21. Armijo JA, Shushtarian M, Valdizan EM, Cuadrado A, de las Cuevas I, Adın J. Ion channels and epilepsy. *Curr Pharm Des.* 2005;11(15):1975-2003.
22. Demirci S, Kutluhan S, Nazıroğlu M, Uğuz AC, Yürekli VA, Demirci K. 2013. Effects of selenium and topiramate on cytosolic Ca(2+) influx and oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Neurochem Res.* 38(1):90-97.
23. Nazıroğlu M, Ozkan FF, Hapil SR, Ghazizadeh V, Ciğ B. Epilepsy but not mobile phone frequency (900 MHz) induces apoptosis and calcium entry in hippocampus of epileptic rat: Involvement of TRPV1 channels. *J Membr Biol.* 2015; 248:83-91.
24. Ghazizadeh V, Nazıroğlu M. Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis.* 2014;29(3):787-799.
25. Sashindranath M, McLean KJ, Trounce IA, Cotton RG, Cook MJ. Early hippocampal oxidative stress is a direct consequence of seizures in the rapid electrical amygdala kindling model. *Epilepsy Res.* 2010;90(3):285-294.
26. Hsieh PF, Hou CW, Yao PW, Wu SP, Peng YF, Shen ML, Lin CH, Chao YY, Chang MH, Jeng KC. Sesamin ameliorates oxidative stress and mortality in kainic acid-induced status epilepticus by inhibition of MAPK and COX-2 activation. *J Neuroinflammation.* 2011;8:57.
27. Heiner I, Eisfeld J, Lückhoff A. Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium* 2003; 33(5-6):533-40.
28. Carrasco C, Nazıroğlu M, Rodríguez AB, Pariente JA. Neuropathic Pain: Delving into the oxidative origin and the possible implication of transient receptor potential channels. *Front Physiol.* 2018;9:95.
29. Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y. Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium.* 2011;50:279-287.
30. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:136-147.

31. Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1742(1-3):81-87.
32. Kovács R, Schuchmann S, Gabriel S, Kann O, Kardos J, Heinemann U. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 2002;88:2909-2918.
33. Kovács R, Kardos J, Heinemann U, Kann O. Mitochondrial calcium ion and membrane potential transients follow the pattern of epileptiform discharges in hippocampal slice cultures. *J Neurosci*. 2005;25(17):4260-4269.
34. Kutluhan S, Nazıroğlu M, Celik O, Yilmaz M. Effects of selenium and topiramate on lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in blood of pentylentetrazol-induced epileptic rats. *Biol Trace Elem Res*. 2009;129:181-189.
35. Nazıroğlu M, Kutluhan S, Uğuz AC, Celik O, Bal R, Butterworth PJ. Topiramate and vitamin E modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redox system in pentylentetrazol-induced seizure of rats. *J Membr Biol*. 2009;229(3):131-140.
36. Yürekli VA, Nazıroğlu M. Selenium and topiramate attenuates blood oxidative toxicity in patients with epilepsy: a clinical pilot study. *Biol Trace Elem Res*. 2013;152(2):180-186.
37. Ashrafi MR, Shams S, Nouri M, Mohseni M, Shabanian R, Yekaninejad MS, Chegini N, Khodadad A, Safaralizadeh R. A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia* 2007;48:1750-1755.
38. Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clinica Chimica Acta* 2001;303:19-24.
39. Agarwal NB, Agarwal NK, Mediratta PK, Sharma KK. (2011) Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. *Seizure* 20:257-262.
40. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interac*. 1998; 111-112: 1-14.
41. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(2 Suppl):653S-69S.
42. Saija A, Princi P, Pisani A, Lanza M, Scalese M, Aramnejad E, Ceserani R, Costa G. Protective effect of glutathione on kainic acid-induced neuropathological changes in the rat brain. *Gen Pharmacol*. 1994;25(1):97-102
43. Sleven H, Gibbs JE, Heales S, Thom M, Cock HR. Depletion of reduced glutathione precedes inactivation of mitochondrial enzymes following limbic status epilepticus in the rat hippocampus. *Neurochem Int*. 2006;48(2):75-82.
44. Ono, H, Sakamoto, A, Sakura N. Plasma total glutathione concentrations in epileptic patients taking anticonvulsants. *Clin Chim Acta* 2000;298:135-143.

45. Cheong E, Shin HS. T-type Ca²⁺ channels in absence epilepsy. *Pflugers Arch*. 2014; 466:719-734.
46. Montell C, Rubin GM. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989;2: 1313-1323.
47. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426:517-524.
48. Clapham DE. Snapshot: mammalian TRP channels. *Cell* 2007;129:220.
49. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP Channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Therap* 2008;118:337-351.
50. Nazıroğlu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca²⁺ signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012;32(3):134-141.
51. Gonzalez-Reyes LE, Ladas TP, Chiang CC, Durand DM. TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity in vitro and electrographic seizures in vivo. *Exp Neurol*. 2013;250:321-332.
52. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*. 2002;9(1):163-173.
53. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide, A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose, *J Biol Chem*, 2002;277:23150-23156.
54. Uchida K, Dezaki K, Yoneshiro T, Watanabe T, Yamazaki J, Saito M. Involvement of thermosensitive TRP channels in energy metabolism. *J Physiol Sci*. 2017;67: 549-560.
55. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 1999;398(6726):436-441.
56. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 2002;418: 181-186.
57. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;11:819-8129.
58. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004;41:849-857.
59. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, et al. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 2011;70:482-494.

60. Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Kaczmarek JS, Delling M, et al.. Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:18114-18119.
61. Bai JZ, Lipski J. Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. *Neurotoxicology* 2010;31:204-214.
62. Materazzi S, Fusi C, Benemei S, Pedretti P, Patacchini R, Nilius B, et al. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflugers Arch*. 2012;463:561-569.
63. Toda T, Yamamoto S, Yonezawa R, Mori Y, Shimizu S. Inhibitory effects of Tyrphostin AG-related compounds on oxidative stress-sensitive transient receptor potential channel activation. *Eur J Pharmacol*. 2016;786:19-28.
64. Kahya MC, Nazıroğlu M., Övey İS. Modulation of diabetes-induced oxidative stress, apoptosis, and Ca(2+) entry through TRPM2 and TRPV1 channels in dorsal root ganglion and hippocampus of diabetic rats by melatonin and selenium. *Mol Neurobiol*. 2017;54:2345-2360.
65. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferraris D, Li W, Zhang J, Stoddard BL, Scharenberg AM. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 2005;280:6138-6148.
66. Hill K, Benham CD, McNulty S, Randall AD. Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology* 2004;47(3):450-460.
67. Hill K, McNulty S, Randall AD. Inhibition of TRPM2 channels by the antifungal agents clotrimazole and econazole. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;370(4):227-237.
68. Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-amylcinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol*. 2006;148(3):264-273.
69. Harteneck C, Frenzel H, Kraft R. N-(p-amylcinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase A(2) inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007;25(1):61-75.
70. Chung KK, Freestone PS, Lipski J. Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol*. 2011;106(6):2865-2875.
71. Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kuhn FJ, Gustafsson AJ, Lückhoff A, Islam MS. H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and its inhibition by N-(p-amylcinnamoyl) anthranilic acid in the beta-cells: involvement of TRPM2 channels. *J Cell Mol Med* 2009;13:3260–3267.

72. Gelderblom M, Melzer N, Schattling B, Göb E, Hicking G, Arunachalam P, Bittner S, Ufer F, Herrmann AM, Bernreuther C, Glatzel M, Gerloff C, Kleinschnitz C, Meuth SG, Friese MA, Magnus T. Transient receptor potential melastatin subfamily member 2 cation channel regulates detrimental immune cell invasion in ischemic stroke. *Stroke* 2014;45(11):3395-402.
73. Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem.* 1997;122(3):498-505.
74. Xu SZ, Zeng F, Boulay G, Grimm C, Harteneck C, Beech DJ. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol.* 2005;145(4):405-414.
75. Olah ME, Jackson MF, Li H, Perez Y, Sun HS, Kiyonaka S, Mori Y, Tymianski M, MacDonald JF. Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *J Physiol.* 2009;587(Pt 5):965-979.
76. Jia J, Verma S, Nakayama S, Quillinan N, Grafe MR, Hurn PD, Herson PS. Sex differences in neuroprotection provided by inhibition of TRPM2 channels following experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(11):2160-2168.
77. Shimizu T, Macey TA, Quillinan N, Klawitter J, Perraud AL, Traystman RJ, Herson PS, Androge A. PARP-1 regulation of TRPM2 channels after ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33:1549-1555.
78. Yüksel E, Nazıroğlu M, Şahin M, Çiğ B. Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels on hyperalgesia, apoptosis and oxidative stress in rat fibromyalgia model: Protective role of selenium. *Sci Rep.* 2017;7(1):17543.
79. Nazıroğlu M, Çiğ B, Özgül C. Modulation of oxidative stress and Ca²⁺ mobilization through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neuron by *Hypericum perforatum*. *Neuroscience* 2014;263:27-35.
80. Yamamoto, S., et al., Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2007;1772(8): 958-967.
81. Ye M, Yang W, Ainscough JF, Hu XP, Li X, Sedo A, Zhang XH, Zhang X, Chen Z, Li XM, Beech DJ, Sivaprasadarao A, Luo JH, Jiang LH. 2014. TRPM2 channel deficiency prevents delayed cytosolic Zn²⁺ accumulation and CA1 pyramidal neuronal death after transient global ischemia. *Cell Death Dis.* 5:e1541.
82. Miyake T, Shirakawa H, Kusano A, Sakimoto S, Konno M, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S. TRPM2 contributes to LPS/IFN γ -induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;444(2):212-217.
83. Alim I, Teves L, Li R, Mori Y, Tymianski M. Modulation of NMDAR subunit expression by TRPM2 channels regulates neuronal vulnerability to ischemic cell death. *J Neurosci.* 2013;33(44):17264-17277.

84. Xie YF, Belrose JC, Lei G, Tymianski M, Mori Y, Macdonald JF, Jackson MF. Dependence of NMDA/GSK-3 β mediated metaplasticity on TRPM2 channels at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Mol Brain*. 2011;4:44.
85. Haraguchi K, Kawamoto A, Isami K, Maeda S, Kusano A, Asakura K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J Neurosci*. 2012;32(11):3931-3941.
86. Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286(1):C129-C137.
87. Ohana L, Newell EW, Stanley EF, Schlichter LC. The Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current (I_{CRAC}) mediates store-operated Ca²⁺ entry in rat microglia. *Channels* 2009;3:129-139.
88. Morale MC, Serra PA, L'episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 2006;138:869-878.
89. Bond CE, Greenfield SA. Multiple cascade effects of oxidative stress on astroglia. *Glia* 2007;55:1348-1361.
90. Lee M, Cho T, Jantaratnotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J*. 2010;24(7):2533-2545.
91. Lipski J, Park TI, Li D, Lee SC, Trevarton AJ, Chung KK, Freestone PS, Bai JZ. Involvement of TRP-like channels in the acute ischemic response of hippocampal CA1 neurons in brain slices. *Brain Res*. 2006;1077(1):187-199.
92. Cook NL, Vink R, Helps SC, Manavis J, van den Heuvel C. Transient receptor potential melastatin 2 expression is increased following experimental traumatic brain injury in rats. *J Mol Neurosci*. 2010;42(2):192-199.
93. Katano M, Numata T, Aguan K, Hara Y, Kiyonaka S, Yamamoto S, Miki T, Sawamura S, Suzuki T, Yamakawa K, Mori Y. The juvenile myoclonic epilepsy-related protein EFHC1 interacts with the redox-sensitive TRPM2 channel linked to cell death. *Cell Calcium* 2012;51(2):179-185.
94. Gerace E, Masi A, Resta F, Felici R, Landucci E, Mello T, Pellegrini-Giampietro DE, Mannaioni G, Moroni F. PARP-1 activation causes neuronal death in the hippocampal CA1 region by increasing the expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Neurobiol Dis*. 2014;70:43-52.
95. Övey IS, Nazıroğlu M. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience* 2015;284:225-233.

96. Park, L., et al., The key role of transient receptor potential melastatin-2 channels in amyloid-beta-induced neurovascular dysfunction. *Nat Commun*, 2014;5:5318.
97. Cummings, MC, Winterford CM, Walker NI. *Apoptosis*. *Am J Surg Pathol*, 1997;21:88-101.
98. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in cell biology*, 1998;8(7):267-271.
99. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004;5(11):897-907.
100. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007;35(4):495-516.
101. Sakamaki K. Satou Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J Fish Biol*, 2009;74(4):727-753.
102. Yi CH, Yuan Y. The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Dev Cell* 2009;16(1):21-34.
103. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 1999;6(2): 99-104.
104. Naziroğlu M, Kutluhan S, Yilmaz M. Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca²⁺-ATPase activity, and EEG records in pentylentetrazol-induced seizures in rats. *J Membr Biol*. 2008;225(1-3):39-49.
105. Grynkiewicz C., Poenie M., Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem*. 1985;260:3440-3450.
106. Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodriguez AB, Pariente JA. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res* 2012;53(1):91-8.
107. Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez AB, Pariente JA. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol* 2009;232(1-3):15-23.
108. Joshi DC, Bakowska JC. Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. *J Vis Exp*. 2011;51:pii: 2704.
109. Keil VC, Funke F, Zeug A, Schild D, Müller M. Ratiometric high-resolution imaging of JC-1 fluorescence reveals the subcellular heterogeneity of astrocytic mitochondria. *Pflugers Arch*. 2011;462:693-708.
110. Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA. 2011. Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J Pineal Res*. 2011;51: 195-206.

111. Espino J., Bejarano I., Redondo P.C., Rosado J.A., Barriga C., Reiter R.J., Pariente JA, Rodríguez AB. 2010. Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J Membr Biol.* 2010;233:105-118.
112. Lawrence, R.A., Burk, R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;71; 952-958.
113. Sedlak, J., Lindsay, R.H.C. Estimation of total, protein bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann' s reagent. *Anal Biochem.* 1968;25:192-205.
114. Placer, Z.A., Cushman, L., Johnson, B.C. Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. *Anal Biochem.* 1966;16:359-364.
115. Suzuki J, Katoh N. A simple and cheap method for measuring vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn J Vet Sci* 1990;52:1282-1284.
116. Desai ID. Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Methods Enzymol* 1984;105:138-147.
117. Ogawa N, Kurokawa T, Mori Y. Sensing of redox status by TRP channels. *Cell Calcium.* 2016;60:115-22.
118. Mei ZZ, Mao HJ, Jiang LH. Conserved cysteine residues in the pore region are obligatory for human TRPM2 channel function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(5):C1022-C1028.
119. Kühn FJ, Kühn C, Naziroglu M, Lückhoff A. Role of an N-terminal splice segment in the activation of the cation channel TRPM2 by ADP-ribose and hydrogen peroxide. *Neurochem Res.* 2009;34(2):227-233.
120. Zhang Y, Yang C, Yuan G, Wang Z, Cui W, Li R. Sulindac attenuates valproic acid-induced oxidative stress levels in primary cultured cortical neurons and ameliorates repetitive/stereotypic-like movement disorders in Wistar rats prenatally exposed to valproic acid. *Int J Mol Med.* 2015;35(1):263-270.
121. Pacifico S, Piccolella S, Marciano S, Galasso S, Nocera P, Piscopo V, Fiorentino A, Monaco P. LC-MS/MS profiling of a mastic leaf phenol enriched extract and its effects on H₂O₂ and A β (25-35) oxidative injury in SK-B-NE(C)-2 cells. *J Agric Food Chem.* 2014;62(49):11957-66.
122. Liu Y, Zeng X, Hui Y, Zhu C, Wu J, Taylor DH, Ji J, Fan W, Huang Z, Hu J. Activation of α 7 nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: Implications for Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 2015;91:87-96.
123. Jangra A, Datusalia AK, Khandwe S, Sharma SS. Amelioration of diabetes-induced neurobehavioral and neurochemical changes by melatonin and nicotinamide: implication of oxidative stress-PARP pathway. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;114-115:43-51.
124. Myers SA, Andres KR, Hagg T, Whittemore SR. CD36 deletion improves recovery from spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2014;256:25-38.

125. Belrose JC, Xie YF, Gierszewski LJ, MacDonald JF, Jackson MF. Loss of glutathione homeostasis associated with neuronal senescence facilitates TRPM2 channel activation in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Mol Brain*. 2012;5:11.
126. Nazıroğlu M, Özgöl C, Çiğ B, Doğan S, Uğuz AC. Glutathione modulates Ca(2+) influx and oxidative toxicity through TRPM2 channel in rat dorsal root ganglion neurons. *J Membr Biol*. 2011;242(3):109-118
127. Özgöl C, Nazıroğlu M. 2012. TRPM2 channel protective properties of N-acetylcysteine on cytosolic glutathione depletion dependent oxidative stress and Ca²⁺ influx in rat dorsal root ganglion. *Physiol Behav*. 2012;106(2):122-128.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı:	Mustafa	Soyadı:	NAZIROĞLU
Doğum Yeri:	Gelendost-Isparta	Doğ. Tarihi:	14.02.1968
Uyruğu:	T.C.	Tel:	02462113614
Email:	mustafanaziroglu@sdu.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora	Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fiziyojji A.D.	1996
Yüksek Lisans	-	-
Lisans	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi	1991
Lise	Gelendost Lisesi	1985

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Prof. Dr.	Süleyman Demirel Üniversitesi	2005- Devam Ediyor
Prof. Dr.	RWTH-Aachen	2004-2005
Doç. Dr.	RWTH-Aachen	2002-2004
Doç. Dr.	Fırat Üniversitesi	1997-2002
Araş. Gör.	Fırat Üniversitesi	1993-1997

Yabancı Dilleri	İNGİLİZCE KPDS Puanı	ALES
İngilizce ve Almanca	76,00	72.00

Detaylı Özgeçmiş: http://w3.sdu.edu.tr/sdu.aspx?dosya=abs_personel&sicil_no=03635

Eğitim: 1968 yılında Isparta'nın Gelendost ilçesinde doğdum. 1991 Yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldum. Aynı üniversitede, 1996 Yılında Fiziyojji Doktorası, 1997 yılında doçent oldum. 2002-2005 yılları arası RWTH-Aachen (Almanya'dan maaşlı) Tıp Fakültesi Fiziyojji Anabilim Dalında bulundum ve 2004 (Nisan) yılında Profesör oldum. Eylül 2005 tarihten itibaren Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı Başkanlığımı yürütmekteyim. Aynı zamanda 2008 yılından beri Nörolojik Bilimler Uygulama

Araştırma Merkezi (NÖROBAM) kurucusu ve müdürüyüm.

Yurt Dışı Burslar:

- 1- 1996 Kasım- 1997 Mart tarihleri arasında Macaristan Hükümetinin Kültür Bakanlığı bursuyla Budapest Üniversitesi Beslenme Fizyolojisi Bölümünde antioksidanlar konusunda araştırma tamamladım.
- 2- Kasım 1999- Haziran 2000 Dönemleri arasında NATO-B2 bursu ile Almanya'nın Martin Luther Üniversitesi Beslenme Bilimleri Enstitüsünde proje tamamladım.
- 3- 2002-2005 Yılları arası Almanya'dan maaşlı (Alexander von Humboldt Bursu), Almanya'nın RWTH (Aachen) Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Enstitüsünde çalıştım. Ayrıca, araştırma öncesi Humboldt desteği ile Haziran-Ekim 2002 dönemleri arası 4 ay süreli Goethe Enstitüsünde (Düsseldorf) yoğun Almanca dil kursu aldım.
- 4- Temmuz, 2005 de Oxford (İngiltere) 'Gordon Research Conferance' konferansına burslu katıldım.
- 5- 'Howard Huges Tıp Enstitüsü (HHMI, USA)' Bursuyla Nisan-Mayıs 2009 aylarında Brezilya'nın Belo Horizonte Üniversitesinde kaldım.
- 6- TÜBİTAK 2219 Bursu ile Temmuz-Ekim 2010 Tarihleri arası 3 ay İngiltere'nin Leicester Üniversitesine misafir profesör olarak çalıştım.
- 7- 'Weill Cornell Medical College in Doha' Katarda 2013 yılında 3 ay misafir profesör olarak çalıştım.
- 8- Davetli Konuşmacı ve destekli olarak birçok [Çin'in Enshei (2011), Fas'ın Marekesh (2011), Malezya'nın Kula Lumpur (2016)] kongrelere katıldım.
- 9- Haziran-Ekim 2017 Tarihleri Arası Okazaki (Japonya) Fizyolojik Bilimler Araştırma Merkezine (NIPS) Japonya dan maaşlı Misafir profesör olarak çalıştım.

ÖDÜLLER:

- 1- Haziran 2002 de University of California (Berkeley, USA) de TEMA 11 kongresinde 'Investigative Scientist Award' ödülüne layık görüldüm.
- 2- 'Hücre zarı kalsiyum kanalları alanında antioksidan ve oksidan sistemi üzerindeki üzerinde ki elektrofizyolojik araştırmalar konusunda uluslararası düzeyde üstün nitelikli çalışmalarım nedeniyle 2006 TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Teşvik Ödülüne Layık görüldüm.
- 3- Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri En iyi Bilim insanı Ödülünde - 2007 de ikincilik, 2008 üçüncülük, 2009 ve 2010 da birincilik ödülüne layık görüldüm.
- 4- İran Hükümeti tarafından 25 yıldır verilmekte olan 'Khwarizmi' bilim ödülünü ilk Türk araştırmacı olarak 5 şubat 2012 de Tahran da yapılan ödül töreniyle İran Devlet Başkanı Mahmut Ahmed-i Necat'tan aldım.
- 5- Türk Nöroşiruji Derneği Derneği Bilim Ödülü, 8-12 Nisan 2016, Antalya.
- 6- Türk Nöroşiruji Derneği Hakan Caner Bilimsel Çalışma Ödülü, 20-23 Eylül 2016.

Eser sayısı ve atıflar: Haziran 2018 tarihi itibari ile **232 adet** uluslararası dergilerde basılmış ya da kabul edilmiş düzeyde bilimsel eserim-derlemem, 6 adet uluslararası kitap bölümü ve bu eserlere 'Web of Science'de de 5215 atıfım mevcut. **H faktörüm 38 dir.**

Patent: Kırmızı acı biberin içerisindeki kapsaisin maddesinin TRPV1 kanallarını aktive ederek epilepsi ataklarını oluşumunu hızlandırdığı.

Yayın kurulu, bilim kurulu ve hakemlikler:

Editörlük görevleri:

- 1- İngiltere'nin hücre biyokimyası ve görevi (Cell Biochemistry and Function). 2002-2009
- 2- Amerikanın biyolojik eser element araştırmaları dergisi (Biological Trace Element Research (Springer)). 2008- Devam ediyor
- 3- Baş Editör. Journal Cellular Neuroscience and Oxidative Stress. 2008-Devam ediyor
- 4- TÜBİTAK Turkish Journal of Medical Science. 2008-2016.
- 5- Amerika'nın Hücre Zarı Fizyolojisi ve Biyofiziğinin Sınırları (Frontiers in Membrane Physiology and Biophysics) uluslararası Tıp dergisinin derleme (Review) bölümü editörüyüm. 2009-Devam ediyor.
- 6- Journal of Clinical Toxicology. 2012-Devam ediyor.
- 7- Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism. 2012-Devam ediyor
- 8- TÜBİTAK Turkish Journal of Biology. 2013-2016.
- 9- Misafir Editör- Current Neuropharmacology. 2015
- 10- Misafir Editör- Frontiers in Physiology- 2017-2018.

Ayrıca, birçok ulusal ve uluslararası derginin yayın kurulundayım.

Uluslararası Kitap Bölümü Yazarlıkları: 5 adet uluslararası kitap bölümü yazdım.

Dernek üyelikleri: 'Türk Fizyolojik Bilimler Derneği', 'Türk Biyofizik Derneği', 'Türk Beyin Araştırmaları Derneği' ile 'Japon Sinir Bilimleri Derneği' isimli bilimsel derneklerinin aktif üyesiyim. 2008 yılında Isparta Merkezli kurulan Hücrel Sinir Bilimleri ve Oksidatif Stres Derneği' derneği kurucusu ve başkanıyım.

Kongre Düzenleme Kurulu Başkanlığı: 2006, 2008, 2010 ve 2012, 2014, 2016 ve 2018 yılları Isparta da düzenlenen 'Oksidatif Stres, Kalsiyum Sinyali ve TRP Kanalları Dünya Kongresi' (www.cmos.org.tr) başlıklı kongrelerinin düzenleme kurulu başkanlığını yaptım. 1. (2015), 2. (2017) ve 3. (2018) Uluslararası Beyin Araştırmaları Okulu Düzenleme Kurulu başkanlığı (<http://2018.brs.org.tr/>).

İyi düzeyde İngilizce ve Almanca bilmekteyim ve KPDS belgesi sahibiyim. Evli ve iki çocuk babasıyım.

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
05.03.2015	06	01

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05 MART 2015 tarihinde Saat 09:00'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dişhekimliği A.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa NAZIMOĞLU'nun yürütücüsü olduğu PROF. DR. BAHARIN DÖL, DOÇ. DR. YIGİT AKI YÖREKLİ, YRD. DOÇ. DR. ÖMER ÇELİK, AŞ. GÖR. BİLAL ÇİĞ, Doktora Öğrencisi İbrahim SAAT ÖVEY'in yardımı anesteziyi olanak yaratan, "TRPM2 Kanallarıyla Epilepsi Nörobiyolojisindeki Rolünün Anlatılması" başlıklı çalışması;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sarımsı	Yaşı
	Seymen (Wistar Albino)	Erkek	48 yetişkin 22 yemeyen	10-12 haftalık 1-2 grama.
Fare (C57BL/6)	Erkek	30	10-12 haftalık	

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oybirliği ile UYGUN görülmüştür.

Doç. Dr. Etkan UZ BAŞKAN	Prof. Dr. Minire ÇAKIR BAŞKAN YARDIMCISI	Doç. Dr. İ. Mevlan ÇİRİŞ ÜYE
		
Yrd. Doç. Dr. Pinar ASLAN KOŞAR ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Gülşen ÖZGÜNER ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Merve ÇİNA AKSOY ÜYE
KATILMADI		
Öğr. Gör. İbrahim ONARAN ÜYE	Vet. Hekim İsmail UZ ÜYE	Ecz. Mustafa Selim DERYAL ÜYE
		KATILMADI