

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



**OVARİEKTOMİZE SIÇAN ARKA KÖK GANGLİYON
TRPV1 KANALLARI ÜZERİNDE ÖSTROJENİN ETKİSİNİN
PATCH-CLAMP TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Yener YAZĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 4135-YL2-14 proje numarası ile
desteklenmiştir
Tez. No: 141**

ISPARTA-2016

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/07/2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyofizik AD

Üye : Doç. Dr. Nurhan GÜMRAL

Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Abdülhadi Cihangir UĞUZ

Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Cemal KAHYA

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK

Süleyman Demirel Üniversitesi

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

Doç. Dr. Mustafa KAYAN

Enstitü Müdürü

BEYAN

“Ovariectomize Sıçan Arka Kök Ganglion TRPV1 Kanalları Üzerinde Östrojenin Etkisinin Patch-Clamp Tekniği İle Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Yener YAZĐAN

İmza


Danışman

Prof. Dr. Mustafa NAZİROĞLU

İmza


TEŐEKKÖR

Tez çalıőmamda; öncelikle değerli danıőmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa NAZIROğLU hocama ve Biyofizik Anabilim Dalında görev yapan hocalarım ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nöroendokrin Bir Hormon Olarak Östrojen	3
2.2. TRP Kanalları.....	5
2.2.1. TRPV Katyon Kanalları.....	6
2.2.1.1. TRPV1 Katyon Kanalı.....	7
2.3. Östrojen, Kalsiyum Sinyali ve TRPV1 Katyon Kanalı.....	8
2.4. Ağrı ve TRPV1	10
2.5. Ağrı ve Menapoz	11
2.6. Patch Clamp	13
2.6.1. Patch Clamp Setini Oluşturan Temel Malzemeler	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Gereç	28
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	28
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Oluşturulan Gruplar;.....	32
3.2.2. Ovariectomi İşlemi;.....	32
3.2.3. Sıçan Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücreleri İzolasyonu.....	34
3.2.4. Solüsyonların Hazırlanması.....	35
3.2.5. Patch Clamp Deneyleri	37
3.2.6. Kalsiyum Sinyali Analizleri.....	40

3.2.7. Hücre İçi ROT Üretimi Tayini.....	41
3.2.8. Mitokondriyal Zar Depolarizasyonu Analizi.....	41
3.2.9. Apoptozis Testi.....	42
3.3. Etik Kurul İzni.....	42
3.4. İstatistiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Kontrol Kaydı Sonucu.....	43
4.2. Kontrol Grubu Kaydı Sonucu.....	44
4.3. OVX Grubu Kaydı Sonucu.....	46
4.4. OVX + Estradiol Grubu Kaydı Sonucu.....	48
4.5. Kalsiyum Sinyali Analiz Sonuçları.....	51
4.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analiz Sonuçları.....	53
4.7. Hücre İçi ROT Üretim Tayini Sonuçları.....	54
4.8. Apoptozis Testi Sonuçları.....	55
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	63
ÖZET.....	65
ABSTRACT.....	67
KAYNAKLAR.....	69
EKLER:.....	78
Özgeçmiş.....	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin di-fosfat
ADPR	: Adenozin di-fosfat riboz
AKG	: Arka Kök Gangliyonu
ATP	: Adenozin tri-fosfat
BSA	: Bovin serum albümin
Ca	: Kalsiyum
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
CAP	: Kapsaisin
cADPR	: Siklik Adenozin Difosfat <i>Riboz</i>
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
CPZ	: Kapsazepin
DAG	: Diaçilgliserol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimethyl sulphoxide
ERα	: Östrojen Reseptörü alfa
E₂	: 17 β -estradiol
GABA	: Gama amino bütirik asit
GnRH	: <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
GR	: Glutasyon reduktaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GΩ, MΩ	: Giga ohm, Mega ohm
H⁺	: Hidrojen
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
ICHD	: <i>International Classification of Headache Disorders</i>
IP₃	: Inositol trifosfat
mV	: milivolt
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NGF	: Nerve growth factor
NMDG	: N-Methyl D-Glucamine

NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrojen oksidatif stres
PIP₂	: Fosfotidilinositol difosfat
PKA	: Proteinkinaz A
PKC	: Proteinkinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RTX	: Resiniferatoksin
RyR	: Ryanodin reseptörü
SOCC	: <i>Store-operated Calcium channels</i>
SR	: Sarkoplazmik Retikulum
TRP	: <i>Transient receptor potential</i>
TRPM	: <i>Transient receptor potential melastatin</i>
TRPV	: <i>Transient receptor potential vanilloid</i>
VGCC	: Voltaja Duyarlı Kalsiyum Kanalları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Giga seal (mühür) elde edilmesi	16
Şekil 2. Patch clamp tekniğinde kullanılan konfigürasyonların gösterimi.	17
Şekil 3. Kapsaisin ile uyarım yapılmamış sıçan arka kök gangliyon hücrelerinden patch clamp yöntemiyle TRPV1 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı.	43
Şekil 4A. Kapsaisin ile uyarım yapılmış arka kök gangliyon hücrelerinden patch clamp yöntemiyle TRPV1 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı.	45
Şekil 4B. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik	45
Şekil 5A. Ovariectomi grubu kapsaisin ile uyarım yapılarak arka kök gangliyon hücrelerinden patch clamp yöntemiyle TRPV1 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı.	47
Şekil 5B. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik.	47
Şekil 6A. Ovariectomi + Estradiol grubu kapsaisin ile uyarım yapılarak arka kök gangliyon hücrelerinden patch clamp yöntemiyle TRPV1 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı.	49
Şekil 6B. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik.	49

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Pipet ucu hücre teması gösterimleri	20
Resim 2A. Mikropipetin hücrelerin olduğu solüsyona girdiği anda, ekran görüntüsü.....	20
Resim 2B. Mikropipetin hücreye teması anında ekran görüntüsü.....	21
Resim 2C. Hücre ve mikropipet arasında oluşan mühür (giga seal) gösteren ekran görüntüsü.....	21
Resim 2D. Hücrede iyon kanalların açılıp kapanmasını gösteren ekran görüntüsü ..	22
Resim 3. Patch-clamp seti genel görünümü	26
Resim 4. Mikro pipet yapıcısı genel görünümü.....	27
Resim 5. Deney aşamasında sıçanlara uygulanan ovariektomi işlemi aşamaları	33
Resim 6. Sıçanlardan elde edilen arka kök gangliyon hücrelerinin izolasyon işlemi aşamaları.....	34
Resim 7. Arka kök gangliyon hücrelerinin mikroskopik görünümü.	38
Resim 8A. Mikropipetin hücrelerin olduğu solüsyona girdiği anda ekran görüntüsü.....	39
Resim 8B. Mikropipetin arka kök gangliyon hücrelerine teması anındaki ekran görüntüsü.....	39
Resim 8C. Arka kök gangliyon hücresiyle mikropipet arasında oluşan giga seal (mühür).....	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Normal ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü	36
Tablo 2. NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü.....	36
Tablo 3. Hücre içi tampon çözelti hazırlama protokolü.....	36



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Ovariectomi uygulaması yapılan sıçan arka kök gangliyon hücrelerinde TRPV1 kanalları üzerine estradiol, kapsaisin ve kapsazepin etkisi.....	50
Grafik 2. Kapsaisin stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine ovariectomi ve estradiol etkilerinin zamanla değişimi.....	51
Grafik 3. Kapsaisin stimülasyonu ile başlatılan hücre içi Ca^{+2} miktarı üzerine ovariectomi ve estradiol etkilerinin sütun grafiği ile gösterimi.....	52
Grafik 4. Ovariectomi işlemi ve estradiol tedavisinin grupların mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri.....	53
Grafik 5. Ovariectomi işlemi ve estradiol tedavisinin grupların ROT üretimi üzerine etkileri.....	54
Grafik 6. Ovariectomi işlemi ve estradiol tedavisinin grupların apoptozis seviyeleri üzerine etkileri.....	55

1. GİRİŞ

Transient Receptor Potential (TRP) kanalları, başka yerleşimleri yanısıra nosiseptif duyuşal sinir sonlanmalarında konumlanmış, tehdit/rahatsız edici potansiyeli olan termal, mekanik veya kimyasal uyarılara yanıt veren ve seçici olmayan bir katyon kanalı ailesidir. TRP kanalları katyonlara karşı seçici olmamakla birlikte kalsiyum iyonlarını daha seçimli geçirmektedir. TRP kanalları ya direkt olarak plazma zarlarındaki kalsiyum giriş kanalları gibi davranmakta ya da kalsiyum giriş kanallarının modülasyonunu sağlayacak olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest kalsiyum kanalları üzerinde etkili olmaktadır. Farklı TRP proteinleri, uyarının tipi ve şiddetine bağlı olarak kalsiyum iyon geçirgenliklerini değiştirmekte ve hücreşel yanıt kalıplarını modüle etmektedir.

Transient Receptor Potential Vanilloid Reseptör-1 (TRPV1) reseptörleri, bu aile içerisinde ağrı iletim yollarının aktivasyonunda en önemli role sahip olan reseptörlerdir. Vanilloid benzeri kimyasallara, sıcaklığa ($>43^{\circ}\text{C}$) ve düşük pH'ya duyarlıdır. Bu reseptörler çeşitli uyarınlarla aktifleştiiği zaman hücre içine kalsiyum iyonunun akışı uyarılır.

Güncel literatür bilgilerinde, gonadal hormonların yalnız üreme davranışları ve cinsiyetin belirlenmesinde değil, tüm fizyolojik sistemlerde etkin roller aldiiğını göstermektedir. Bu hormonlardan en etkin olduğu bilinen 17β -estradiol (östrojen, E_2), nöron canlılığı, nöronal uyarılabilirlik ve somatoduysal uyarınlarnın algılanması gibi sinir sistemi üzerindeki hayati etkileri nedeniyle çok sayıda araştırmaya konu olmuştur (1, 2). Kalp-damar ve nörolojik sistemlerde E_2 'nin antioksidan rolünün olduğu da iyi bilinmektedir (3). Ayrıca, ağrı yolakları üzerinde de E_2 etkili olduğuna dair bildirimler mevcuttur (4).

Menopoz sonrası dönemde overyan E_2 salınımının azalmasıyla birlikte, oksidatif stres ve apoptozisin tetiklendiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (5, 6). Menopozda, sitozole kalsiyum iyon artışının periferal ağrı oluşumunun yanı sıra, mitokondriyal depolarizasyon artışı oksidatif stres ürünlerinin daha da artmasına, ayrıca kaspaz ve apoptotik yolakların uyarılmasına neden olduğu bilinmektedir (7, 8). E_2 yetersizliğinin, arka kök gangliyon (AKG) ve hipokampus sinir hücrelerinde

voltaja duyarlı kalsiyum kanalları (VGCC) ve kimyasal kapılar aracılı sitozole kalsiyum iyon akışının migren ataklarına, periferal ağrıya ve epilepsi gibi sinirsel hastalıkların oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir (9, 10). Fakat periferal ağrı oluşumunda TRPV1 kanal aracılı Ca^{+2} girişi üzerinde yeterince bilgi yoktur.

TRPV1 kanalları daha ziyade AKG ve hipokampus sinir hücrelerinde eksprese edilmişlerdir. Fakat ovariektomize (OVX) sıçanlarda TRP kanal aracılı kalsiyum iyon girişinin oksidatif stres ve apoptotik yolları etkilediği konusunda bildirim mevcut değildir. TRPV1 ve TRPM2 gibi bir kısım kanalların aktivasyonunda oksidatif stresin rolü olduğu yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (11, 12). Günümüzde bilinen VGCC ve kimyasal kapılı kalsiyum kanal blokerlerinin hiçbirisi TRPM2 ve TRPV1 kanallarını inhibe edememektedir. Çünkü bu kanalların aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları farklıdır. Bu kanallar üzerine yapılan çalışmalar gün geçtikçe çığ gibi büyümektedir. Çünkü bunların düzenlenmesi veya patolojik durumdan fizyolojik duruma döndürülmesi, nöropatik ağrı ve hipokampus patofizyolojisinin neden olduğu hastalıkların tedavisine büyük katkı sağlayacağı bilim insanları tarafından düşünülmektedir.

Nöronların elektriksel olarak aşırı uyarılması “aşırı uyarılma toksisitesi” adı verilen, sitozole aşırı kalsiyum iyon akışı sonucu hücreyi ölüme götüren bir süreci başlatabilir. Bu durum pek çok nörodejeneratif hastalıkta ve travmalar sonrasında gözlenen nöron kaybının patofizyolojisinde sorumlu tutulmaktadır (13). Yeni tanımlanmış olan TRPV1 katyon kanalının bu bağlamda OVX’li sıçanlarda nöronu ölüme götüren süreçlerde ne gibi rolünün olduğunu anlamak bu hastalıkların tedavisinde oldukça önem arz etmektedir. Ayrıca, E_2 yetersizliği bu kanalları açarak sinir hücrelerine zarar verirken, antioksidan özelliğe sahip olan E_2 , vücut antioksidan düzeylerini ve TRPV1 kanal aktivasyonlarını düzenleyerek bu süreçlerde fayda sağlayabilir. E_2 ’nin gerek ağrı modülasyonundaki etkilerine gerekse antioksidan etkilerine başka moleküler mekanizmaların yanı sıra, kalsiyum iyonunun hücre içerisine akışını düzenleyen TRPV1 kanallarının aracılık ediyor olabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmanın amacı, normal sıçan ve ovariektomi uygulanmış sıçanların arka kök gangliyon hücrelerinde, TRPV1 kanal aracılı kalsiyum iyonu girişi üzerinde E_2 ’nin etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöroendokrin Bir Hormon Olarak Östrojen

Östrojenler, temel olarak kolesterolden sentezlenen bir steroid hormon ailesidir (14). Gebe olmayan dişide büyük miktarda overlerden, az miktarlarda da adrenal korteksten; gebelikte ise büyük miktarlarda plasentadan salgılanan diş cinsiyet hormonlarıdır (14). Üç tip östrojen vardır; 17β -estradiol (E_2), erişkin dişide overlerden salınır. Estron (E_1), overlerden salınır, az miktarlarda da adrenal korteksten salınan androstenedionun periferik dönüşümü ile oluşur. Estriyol (E_3), estradiol ve estronun karaciğerde metabolize edilmesi ile oluşur. E_2 en önemli östrojen tipidir. E_1 'den 12, E_3 'ten 80 kat güçlü östrojenik etkileri vardır (14, 15). Androstenedion, overlerde E_1 'e ve kısmen testesterona dönüştürülür. Testesteron ise ya 5α -redüktaz ile 5α -hidrottestosterona ya da aromataz ile E_2 'ye çevrilir. Placenta, adrenal korteks ve testislerde de E_2 sentezi yapılmaktadır. Başta yağ dokusu olmak üzere karaciğer, böbrek, akciğer, deri, beyin gibi bazı dokularda, adrenal korteks kaynaklı androstenedion ve testesterondan, E_1 ve estradiol sentezlenmektedir (16).

E_2 'nin kadın sekonder seks karakterleri, kardiyovasküler sistem, iskelet kas sistemi ve immün sistem başta olmak üzere fizyolojik sistemler üzerinde oldukça etkili bir hormon olduğu yapılan pek çok araştırmayla ortaya konmuştur (3, 15, 17-19). E_2 erkeklerde dişilerden daha düşük düzeyde sentezlenmektedir, ancak her iki cinsiyette de temel hücrel mekanizmalarda önemli roller üstlenmektedir (4).

E_2 merkezi ve periferik sinir sisteminde önemli rollere sahiptir. Bu hormonun reseptörleri, amigdala, hipokampus, korteks, serebellum, spinal kord ve periferik sinirlerde yaygın olarak bulunmaktadır (20). E_2 , nöromodülatör ve nörotransmitter maddelerin sentez, ekspresyon ve reseptör aktivitelerini düzenler. Ayrıca nöronların gelişimi ve sinaptik fonksiyonların düzenlenmesinde görev alır. E_2 düzeyi azaldığında sinaptik ileti azalır ve nöronlarda yapısal değişiklikler oluşur (21). E_2 'nin sinir sistemindeki bir diğer önemli rolü beyin vasküler yapılarındaki endotel hücrelerinde bulunan reseptörler yoluyla total serebral ve serebellar kan akım hızını kontrol ederek glikoz kullanımını düzenlemesidir.

Yapılan çalışmalarda E_2 'nin hipokampal nörogenesis için vazgeçilmez

olduğu gösterilmiştir. İki gün boyunca E_2 uygulanan sıçanlarda hipokampal CA1 piramidal hücrelerinde dendrit sayılarının %30 arttığı ve böylece eksitator sinaptik bağlantı sayısının arttığı belirlenmiştir (21). E_2 β reseptörü bulunmayan farelerle yapılan çalışmada, belirgin morfolojik anomalilerle birlikte, bu farelerin serebral korteks'inde nöronların miktarında ve organizasyonunda eksiklikler belirlenmiştir (22). Nörotransmitter sistemleri üzerinde önemli düzenleyici etkilere sahiptirler (23).

Kalp-damar ve nörolojik sistemlerde E_2 'nin antioksidan rolünün olduğu iyi bilinmektedir. E_2 'nin mitokondriyel fonksiyonları ve kalsiyum girişini düzenleyerek oksidatif stresi ve apoptozisi azalttığı yönündeki kanıtlar gittikçe artmaktadır (5, 6, 24-27). Postmenopozal kadınlarda premenopozal kadınlarla karşılaştırıldığında, okside GSH ve MDA gibi oksidatif stres markırlarının plazma konsantrasyonları daha yüksek bulunmuştur (28). Preklinik çalışmalarda da ovariektomize sıçanlarda ovaryan E_2 çekilmesinin oksidatif stresi ve apoptozisi tetiklediği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (7, 8, 29). Postmenopozal dönemde ovaryumdan E_2 'nin salgılanmasının azalmış olması nedeniyle, postmenopozal kadınlarda oksidatif stresin tetiklediği doku hasarı ve nörodejenerasyonun ve ağrı duyarlılığının arttığı çok sayıda çalışmada rapor edilmektedir (5, 8, 25).

AKG hücrelerinde bulunan TRPV1 kanalları, E_2 ile inhibe edilmektedir (30). E_2 , genomik ve non-genomik mekanizmalarla etkilerini gerçekleştirebilir. Genomik mekanizmalarda hücre içindeki reseptörüne bağlanan hormon, spesifik gen transkripsiyonu ve protein sentezi sağlayarak uzun süreli etki oluştururken, genomik olmayan mekanizmada ise; E_2 birincil haberciyle bağlantı kurarak iyon kanallarının iletkenliğini veya nöronal uyarılabilirliği değiştirir (31). E_2 'nin hücre içi reseptörleri $ER-\alpha$ ve $ER-\beta$ 'dir. Ayrıca hücre membranı üzerinde bulunan G-protein-kenetli reseptör (GPR30), E_2 'nin non-genomik hızlı etkilerine aracılık eder (31). E_2 'nin cAMP/protein kinaz A, protein kinaz C, mitojenle etkileşen protein kinaz (MAPK) ve ekstrasellüller sinyal düzenleyici kinaz (erk) gibi ikinci haberci sistemler üzerinden ağrıyı düzenlediği kabul edilmektedir (3).

Ağrı, çok fazla sayıda nedene bağlı olarak oluşabilen ve birçok fizyolojik mekanizmanın devreye girdiği aşırı derecede karmaşık bir duydur. Uluslararası Ağrı Araştırmaları Birliği (International Association for the Study of Pain = IASP)

ağrıyı; “yaşanmakta olan veya potansiyel doku zedelenmesi ile ilişkilendirilen veya böylesi bir zedelenme bağlamında betimlenen hoş olmayan, rahatsız edici bir duysal ve duygusal deneyimdir” şeklinde tanımlar. Nosisepsiyon ise “duysal reseptörlerin, karşılaştığı zararlı uyarana ile ortaya çıkan bilinçsiz tepkileri” olarak tanımlanmıştır (15).

Son yıllarda E_2 'nin sinir sistemi üzerindeki etkilerine ilgi artmış özellikle ağrı yollarındaki fonksiyonları üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. E_2 reseptörlerinin sinir sisteminde yaygın olarak bulunduğu ve bu hormonun otonom ve duysal sistem üzerinde önemli rol aldığı kabul edilmiştir (32). İmmünohistokimyasal çalışmalar sinir hücrelerinde ve gangliyonlarda ER- α 'nın ER- β 'dan daha yaygın olarak bulunduğunu ve bu reseptörün E_2 'nin sinir sistemi üzerindeki etkilerine daha fazla aracılık ettiğini belirlemiştir (4). Bu nedenle E_2 'nin ağrı modülasyonunu α reseptörü üzerinden yaptığı düşünülmektedir. ER- α -yoksun veya ER- β -yoksun farelerle yapılan çalışmalar, E_2 'nin ER- α üzerinden pro-nosiseptif etkiye neden olabildiğini, ER- β üzerinden ise anti-nosiseptif etkilere neden olabildiğini belirlemiştir. Bunlara ek olarak GPR30 üzerinden E_2 'nin hızlı etkileri olduğu da düşünüldüğünde, literatürde bu hormonun ağrı üzerindeki etkileri ile ilgili farklı sonuçların çıkması olağan karşılanabilir.

Rahatsız edici uyarılarla oluşan nosisepsiyonun E_2 ile modüle edilebildiği ile ilgili çalışmalarının sonuçları yoğunlukla E_2 'nin ağrı düzenlenmesinde etkili olduğunu gösterirken; az sayıda çalışmada ise sonuçlar belirsizdir (3). Deneysel olarak E_2 çekilmesi sağlanan sıçanlarda, E_2 yetersizliğinin rahatsız edici uyarana karşı ağrı eşiğini düşürdüğünü, yanıt hızı ve şiddetini arttırdığı gösterilmişken (33-37), az sayıda çalışmada ise gruplar arasında fark olmadığı bulunmuştur (38, 39).

2.2. TRP Kanalları

Nosiseptif duysal sinirlerin sonlanmalarında konumlanmış, tehdit/rahatsız edici potansiyeli olan termal, mekanik veya kimyasal uyarılara yanıt veren çeşitli reseptörler bulunmaktadır. Bunların çoğu, TRP kanalları denen seçici olmayan bir katyon kanalı ailesinin üyeleridir (15).

Günümüzde memelilerde yaklaşık 30 üye içeren TRP kanalları yeni bir katyon kanalı ailesi olarak tanımlanmaktadır. TRP kanalları kan basıncı ve düz kas tonusunun düzenlenmesi, renal Ca^{+2} / Mg^{+2} iletimi, keskin tad ve kokulu bileşiklerin, mekanik değişikliklerin, ağrının, ısının, tadın, kokunun, sesin, ışığın algılanması gibi çok önemli birçok süreçte rol oynamaktadır (40-42).

Amino asid benzerliklerine göre TRP ailesi 7 alt aileye ayrılmaktadır (43). TRP conancial (TRPC) yedi alt aileden, TRP vanilloid (TRPV) altı alt aileden, TRP melastatin (TRPM) sekiz alt aileden, TRP polisistein (TRPP) üç alt aileden, TRP mukolipin (TRPML) üç alt aileden ve TRP ankirin (TRPA) tek üyeden oluşmaktadır (44, 45). TRP katyon kanallarının çok sayıda hastalığın fizyopatolojisinde önemli rollere sahip oldukları belirlenmiştir. Bu kanalların yapısal olarak ortak yönleri fazla olsa da bu kanalların alt tiplerinin aktivatörleri farklılık göstermektedir.

TRP kanallarının temel yapısını, bazı TRPP'ler hariç, membranı 6 kez geçen bölgelerin oluşturduğu önerilmektedir. 5 ve 6 segmentleri arasındaki hidrofobik halkanın iyon kanalı oluşturan por olduğu ve NH_2 ve $COOH$ uçlarının sitoplazmada bulunduğu düşünülmektedir. TRP alt tipleri homo ya da heterotetramerik yapılar oluşturarak fonksiyon göstermektedirler (40, 46). İnvivo olarak, fonksiyonel TRP kanal komplekslerinin bir araya gelişi homo / hetero multimerleşme ve yapısal proteinler ile kompleks oluşumlar tarafından yönetilmektedir (47). Farklı dokularda önerilen fizyolojik işlevler ile heterolog ekspresyon sistemlerinde gözlenen TRP kanallarının işlevsel özellikleri arasındaki farklılıklar bu oluşumlar ile açıklanabilir.

2.2.1. TRPV Katyon Kanalları

Memelilerde altı üyeye sahip TRPV (vanilloid) ailesi 4 alt gruba ayrılmaktadır: TRPV1/TRPV2, TRPV3, TRPV4 ve TRPV5/6 (48, 49). TRPV ailesinin üyeleri tetramerik kompleks olarak işlev göstermektedir. TRPV kanallarının tümü 3-5 NH_2 -ucu ankryin tekrarlarına sahiptir (50).

TRPV2 gerilim ile aktive olan bir kanaldır ve damar düz kasında mekanosensör olarak işlev göstermektedir (51) ve olasılıkla iskelet kası ve kalp kasının dejenerasyonu ve ağrı yolağında da rol oynamaktadır (52). TRPV4'ün fizyolojik fonksiyonları arasında santral ve periferal termoduyarlık, mekanoduyarlık,

osmoduyarlık ve bazal Ca^{+2} homeostazı yer almaktadır (53, 54). TRP ailesinin en yüksek Ca^{+2} selektif kanalları TRPV5 ve TRPV6 kanallarıdır ve bu kanallar Ca^{+2} ile düzenlenmektedir (55). Bu iki kanal fizyolojik koşullar altında kalsiyumu iletirken, ekstraselüler kalsiyumun yokluğunda tek değerli katyonları iletir. TRPV5 böbrekte Ca^{+2} reabsorpsiyonu için önemli iken TRPV6 bağırsakta önemlidir (56). TRPV1, bu kanallar içinde ağrı modülasyonu ile ilgili olarak ilgiyi en fazla çeken kanal olmuştur.

2.2.1.1. TRPV1 Katyon Kanalı

TRPV1, Kapsaisin (CAP) ve CAP benzeri etki oluşturabilen, yüksek ısı ($>43^{\circ}C$) ve asit ($pH \leq 5$) ile aktive olan bir iyon kanal reseptörüdür. TRPV1, duysal nöronlar ve gangliyonlarda yaygın olarak bulunur. Ayrıca diğer nöronlarda ve nöron içermeyen çeşitli hücrelerde de bulunduğu gösterilmiştir (57, 58). Bu reseptörler çeşitli uyanlarla aktifleştiği zaman hücre içine Ca^{+2} iyonunun akışı uyarılır (59, 60). Vanilloidler ekzojen ve endojen olarak ikiye ayrılırlar (61). Endojen vanilloidlere örnek olarak yangıya bağlı pH değişiklikleri ve yüksek sıcaklık değişiklikleri (62), ekzojen vanilloidlere ise, kaktüsde bulunan reziniferatoksin, anandamide ve acı kırmızıbiberin etken maddesi CAP verilebilir (63). CAP, bu kanalların araştırılmasında en fazla kullanılan ekzojen vanilloiddir (64).

TRPV1, ağrı iletimi ve enflamasyon ile indüklenen termal hiperaljezi aktivasyonundan sorumlu tutulmuştur (61). Ağrı algılamayı sağlayan nosiseptörlerin periferik sonlanmaları üzerinde bulunan TRPV1'in modülasyonu ile somatosensör sistemde ağrı mesajlarının algılanması ve enflamatuvar termal hiperaljezi gelişmesi sağlanabilir. TRPV1'in çeşitli ajanlar tarafından modülasyonunun altında yatan mekanizmaların anlaşılması sayesinde, ağrının azaltılması için yeni tedavi olanakları sunulabilir (65)

TRPV1 kanalları yapısında sistein grupları içermektedirler (66). Sistein'lerin birçok sinir hücresinde antioksidan rolü vardır. Sistein aminoasidi glutatyon (GSH), lipoik asit ve glutatyon peroksidaz gibi birçok antioksidan için kaynak oluşturmaktadır. Yakın zamanda grubumuzun yaptığı çalışmalarda TRPV1 kanal aktivasyonlarında GSH ve N asetil sistein (NAC) antioksidanlarının düzenleyici rolü

gözenmiştir (12, 67). Bu TRPV1 yapısındaki sistein grupları oksidatif stres ve nitrik oksit ile aktive olunca TRPV1 kanalları açılmakta ve Na⁺ ile Ca⁺² akışları gerçekleşmektedir (11).

TRPV1 katyon kanalları nosiseptif ve inflamatuvar ağrılarda önemli bir düzenleyicidir ve TRPV1 ekspresyonu, aktivasyonu ve modülasyonunun ağrı ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (68). Yüksek sıcaklık, ekstrasellüler ve intrasellüler pH dengesizlikleri ve kanalın direk uyararı olan CAP gibi birçok fiziksel ve kimyasal uyararla kanallar aktive olabilir ve nosiseptif yanıt oluşur. AKG ve nöronlarda, özellikle nosiseptif afferent liflerde rahatsız edici uyarıların belirlenmesi ve düzenlenmesinde TRPV1'in önemli rol oynadığı belirlenmiştir (69). TRPV1 geninden yoksun farelerde rahatsız edici uyarana karşı oluşan akut ağrının bu kanallar aracılığıyla düzenlendiği gösterilmiştir (70).

TRPV1 antagonistleri ile yapılan çalışmalarla; çeşitli ağrı modellerinde bu katyon kanalının etkili olduğu, ağrı taşınması ve modülasyonunda önemli rol aldığı belirlenmiştir (71).

TRPV1 yalnız rahatsız edici dış uyarılarla değil düşük pH, yüksek ısı (>43°) ve anandamidler gibi iç uyarılarla da aktive olabilir (72), ayrıca prostaglandinler ve bradikinin gibi inflamatuvar ajanlar da bu kanalları aktive eder (73). TRPV1 gen eksikliği olan farelerde termal nosisepsiyonun ve iltihaba bağlı termal hiperaljezi düzeyinin düşük olduğu; inflamasyon ve sinir hasarına bağlı mekanik allodininin ise farklı olmadığı görülmüştür (61). Honore ve ark. çalışmasında ise ratlarda nöropatiye ve inflamasyona bağlı allodini düzeyinin de azaldığı gösterilmiştir (74).

2.3. Östrojen, Kalsiyum Sinyali ve TRPV1 Katyon Kanalı

Kalsiyum, hücrenin oluşumundan ölümüne kadar bütün hücresel süreçleri yönlendiren bilginin genel taşıyıcısı olarak tanımlanmaktadır (75). Günümüzde hücre bölünmesi, hücre motilite, hormon sekresyonu, metabolizma, sinir sisteminin gelişimi ve sinirsel iletim, protein döngüsü, gen ekspresyonu ve programlı hücre ölümü gibi hücresel süreçlerde kalsiyumun rolü gösterilmiştir (76, 77). Kalsiyum homeostazındaki küçük bir aksaklık önemli hücresel yolların işlevlerinin bozulmasına ve beraberinde birçok hastalığa neden olmaktadır (13). Ca⁺² aktif

hücrelerde oluşturulan bir ikinci haberci olarak rol alırken aynı zamanda bir hormon ya da büyüme faktörü gibi hücre membranının dışında da gerçek bir birinci haberci olarak çalışabilmektedir. Kalsiyumun sinyal üretimine yönelik fonksiyonu sitozolik miktarının artması ile doğru orantılıdır (77). Eş zamanlı birçok zıt yönlü iyon kanalının açılması ya da kapanması sayesinde hücre içerisindeki Ca^{+2} yoğunluğu, artabilmekte veya azabilmektedir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artışı, hücre zarına yerleşik vaziyetteki iyon kanalları ve endoplazmik retikulum (ER) ile sarkoplazmik retikulum (SR) yüzeyindeki iyon kanalları vasıtası ile olmaktadır. Buna zıt olarak Ca^{+2} konsantrasyonu azalması ise hücre zarında ve ER/SR üzerinde yerleşik Ca^{+2} ATPaz'lar vasıtasıyla yoğunluk farkı veya enerji harcanması ile neticelenen bir takım değiş-tokuş mekanizmaları (Na^{+}/Ca^{+2}) tarafından sağlanır (78).

TRP kanalları, endokrin sistem ve çevresel faktörlerin etkisiyle kalsiyumun hücre içine giriş/çıkışını düzenleyerek total kalsiyum miktarını belirler. Aşırı soğuk/sıcak, düşük pH, çeşitli bitki etken maddeleri ile hayvan zehirleri gibi canlı için uygun olmayan koşullarda bu kanallar aktive olarak hücre içine kalsiyum iyonu geçişine neden olur. Kalsiyum iyonu miktarındaki değişim, hücrede fizyolojik veya patolojik süreçlerin başlamasına neden olur. Steroid hormon sentezi ve sekresyonu da bu süreçlere dahildir (79). TRP kanalları steroid hormon sentezinin kontrolünde rol alırken, bu hormonlar da TRP kanallarının aktivitesi üzerinde etkili olmaktadır. Steroid hormonlarla TRP kanalları üzerindeki bu etkileşim, gelişim anomalileri, vücut ısısının düzenlenmesi ve cinsiyet farklılığının duysal uyarı hassasiyetini değiştirmesi gibi çok önemli olaylara neden olmaktadır (79). E_2 uygulaması yapılan OVX ve OVX olmayan sıçanlarla yapılan çalışmada TRPV1 antagonistleri Kapsazepin (CPZ) ve 5-iodoresiniferatoxin'in intrahipokampal enjeksiyonu sonrasında allodini'nin önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir (74).

AKG nöronları TRPV1 reseptörlerinin yanısıra çok sayıda E_2 reseptöründe eksprese etmektedir. AKG nöron kültürünün uzun süre E_2 'ye maruz bırakılmasından sonra, bu nöronlarda majör kimyasal/termal nosiseptif uyarana yanıtın azaldığı görülmüş ve bu durumun TRPV1 kanallarının inhibe edilmiş olmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (30). Benzer şekilde ATP'nin tetiklediği kalsiyum içe akışının da E_2 tarafından inhibe edildiği belirtilmiştir (30).

Selektif E₂ agonisti, TRPV1'in kimyasal aktivasyonunu etkileyerek termal hiperaljezi, nörojenik inflamasyon ve diğer ağrılı durumları azaltmıştır (30).

2.4. Ağrı ve TRPV1

TRPV1'in ağrı duyusunun taşınması ve belirlenmesinde rol alan duysal nöronları stimüle etmesindeki rolü çok sayıda çalışmada ele alınmış ve bu kanalların nosiseptif ve inflamatuvar ağrıda önemli düzenleyiciler olduğu gösterilmiştir (61, 71, 80). Fizyolojik koşullarda TRPV1 katyon kanalları inaktif iken; rahatsız edici kimyasal ve termal uyarıların varlığında aktive olurlar (71, 81). TRPV1 iki yolla aktive olmaktadır. 1. aktive edici fiziksel veya kimyasal bir uyarıcı etkisiyle kanalın direkt olarak açılmasıdır. 2. TRPV1'in aktivasyonunda bir diğer önemli yol ise kanalın prostaglandinler (PG), bradykinin, endojen lipit türevleri gibi inflamatuvar mediyatörlerle allosterik olarak düzenlenmesidir (82). Aktive olan kanaldan sitozole aşırı Ca⁺² geçişi olur ve hücre içi kaspaz yollarının aktivasyonuna neden olarak hücre ölümüne yol açabildiği edilmiştir (81, 83, 84).

TRPV1 kanallarının, AKG, trigeminal gangliyon ve vagal gangliyonlarda, ayrıca bu gangliyonların bipolar duysal nöronlarının periferik ve santral uzantıları üzerinde yoğun olarak eksprese edildiği bildirilmiştir. Primer duysal nöronlar ağrıyı periferden medulla spinalise taşırlar. Primer duysal aferent liflerin periferik uçları (nosiseptör) deri, subkutan doku, periost eklem kapsülü, kas (çizgili kas ve düz kas), adventisya, plevra ve peritonda lokalizedir ve de miyelinsiz sinir uçlarıdır. Santral uçları medulla spinalis arka boynuzunda spinal nöronlarla sinaps yapar. TRPV1 eksprese eden bu nöronlar, C ve A δ olarak sınıflandırılan miyelinsiz veya ince miyelinli sinir lifleridir (69, 85). Bu sinir liflerinin CAP' duyarlı olduğu ve bu lifler üzerindeki TRPV1 kanallarının uyarılması ile substans P (SP) ve kalsitonin gene- ilişkili peptid (CGRP) gibi nöropeptidlerin salınımına neden olarakta ağrıya yol açtığı rapor edilmiştir (86).

TRPV1'in duysal nöronlarda nöropeptidlerin salınımında rol oynadığı son yıllarda yapılan çalışmalar ile saptanmıştır. CAP'ın TRPV1 ile bağlanmasıyla başlıca Ca⁺² olmak üzere Na⁺, ve K⁺ iyonlarının hücre içine akışı şekillenmektedir. Bu

durum nöronlarda depolarizasyona ve nöropeptid maddelerin, salgılanmasına yol açarak ağrıya neden olmaktadır (87, 88).

Nosiseptif sinaptik iletimin düzenlenmesi, patolojik ağrı durumlarının çoğunun gelişiminde ve onarımında, büyük önem arz etmektedir. Nosiseptörlerle periferden algılanan bilgiyi medulla spinalise taşıyan primer duyuşal nöronların santral uçları medulla spinalis arka boynuzunda spinal nöronlarla sinaps yapar. Bu sinapslar ve bu alanda salgılanan nörotransmitterler ağrının modülasyonunu sağlamaktadır. Periakuaduktal gri cevher (PAG) nöronları, formasyo retikularis ve lokus seruleus gibi supraspinal inen kontrol mekanizmaları, medulla spinalis düzeyinde primer afferentleri baskılayıp kontrol altında tutar. TRPV1 kanallarının periakuaduktal gri cevher nöronları, amigdala'da, anterior, cingulat ve insular korteks gibi beynin ağrı iletimi ve düzenlenmesi ile ilgili alanlarında eksprese edildiği (89, 90) ve ağrının inen yollarında glutamaterjik ve glisinerjik, serotonerjik ve noradrenerjik iletimin modülasyonunda da rol aldığının belirlenmesi (91, 92) ağrı ile ilgili son araştırmalarda en çok ilgi gören hedeflerden biri olmasını sağlamıştır (93). Bu yolların aktivasyonu hiperaljeziye neden olurken, desentizasyonu ağrı yanıtının azalmasına neden olmaktadır.

2.5. Ağrı ve Menapoz

Ovaryan hormon seviyelerinin değişiminin, sadece cinsiyet farklılaşması ve üreme üzerinde değil hafıza, duyuş durumu, nöronal canlılık ve transmisyon ile birlikte duyuşal iletişimde de önemli olduğu belirlenmiştir (94). Bu hormon seviyeleri, fizyolojik menopozla veya ovariektomi – gonadoektomi gibi cerrahi işlemler sonucu belirgin olarak değişmektedir. İnsanlarda menopoz, östrojenin belirgin olarak eksikliğine sebep olmaktadır (95). Preklinik çalışmalarda OVX, menopoz modeli olarak kullanılmaktadır.

Menopoz sonrası dönemde overyan E₂ salınımının azalmasıyla birlikte, oksidatif stres ve apoptozisin tetiklendiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (5, 6). Menopozda, sitozole kalsiyum iyon artışının periferal ağrı oluşumunun yanı sıra, mitokondriyal depolarizasyon artışı oksidatif stres ürünlerinin daha da artmasına, ayrıca kaspaz ve apoptotik yolların uyarılmasına neden olduğu bilinmektedir (7,

8). E₂ yetersizliğinin, AKG ve hipokampus sinir hücrelerinde VGCC ve kimyasal kapılar aracılı sitozole kalsiyum iyon akışının migren ataklarına, periferal ağrıya ve epilepsi gibi sinirsel hastalıkların oluşumuna neden olduğu iyi bilinmektedir (9, 10).

Ağrı, duysal ve duygusal boyutları olan kompleks bir durumdur. E₂ birçok karmaşık yolla ağrıyı modüle edebilmektedir. E₂ doğrudan SSS reseptörlerine bağlanır ve ağrı ile ilgili nörotransmitter sistemlerle etkileşerek bunların reseptörlerin nicelik ve niteliksel değişimlerine neden olmaktadır. E₂ serotonin ve beta-adrenerjik reseptörlerinin sayısında düşüşe neden olur (96). E₂ çekilmesi, dopamin reseptör duyarlılığının artması ile ilişkilidir (97).

Östrojen ile serotonin arasındaki ilişki, araştırmaların odaklandığı diğer bir konudur. Serotoninin selektif 5-HT_{1B} reseptör agonistleri olan triptanların, perimenstruel profilaksisinde yararlı olmasının altında yatan mekanizmalar, tam olarak açıklanamamıştır. Seks steroidleri, beyinde, spinal korda ve periferal sinirlerde nörotransmisyonu modüle etmekte ve diğer nörotransmitterlerin reseptör aktivitelerini etkilemektedirler (4). Östrojenin, serotoninin üretilmesini artırdığı, yıkımını ve geri alımını azalttığı ileri sürülmektedir. Progesteron yokluğunda, östrojen çekilmesi migreni tetikleyebilirken, progesteronun Gama-amino bütirik asit (GABA)erjik aktivitesinin ağrı ve ağrı algısını modüle etmesi de olasıdır (98).

Diğer bir varsayıma göre; östrojen ve progesteronun çekilmesinin ardından endometrium dökülür ve prostaglandinler serbestleşerek dolaşıma geçer; bu durum, endometriumda vazokonstriksiyona neden olur ve endometrial hücreler zarar görür. Buna bağlı olarak prostaglandin sentezi devam eder. Aşırı miktarda prostaglandinin dolaşıma geçmesi ile menoraji ve/ veya dismenore ile ilişkili baş ağrısı ve kusma ortaya çıkar (99).

E₂, nosiseptif duysal ağrıda da önemli rol almaktadır. Duysal ağrıyı taşıyan AKG nöronları, E₂ reseptörü yanısıra TRPV1 reseptörü de eksprese etmektedir. Bu nedenle bu kanalların inhibisyonu ve aktivasyonunun nosiseptif ağrıdaki önemi birçok araştırmaya konu olmuştur. Çeşitli deneysel ağrı modellerinde OVX'in ağrı yanıtını arttırdığı (33, 100), azalttığı (101, 102) veya etkilemediği (38) yönünde raporlar vardır.

AKG nöron kültürünün uzun süre E₂'ye maruz bırakılmasından sonra, bu

nöronlarda majör kimyasal/termal nosiseptif uyarana yanıtın azaldığı görülmüş ve bu durumun TRPV1 kanallarının inhibe edilmiş olmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (30). Benzer şekilde ATP'nin tetiklediği kalsiyum içe akışının da E₂ tarafından inhibe edildiği belirtilmiştir (30). Selektif E₂ agonisti, TRPV1'in kimyasal aktivasyonunu etkileyerek termal hiperaljezi, nörojenik inflamasyon ve diğer ağrılı durumları azaltmıştır (30). AKG hücrelerinde bulunan TRPV1 kanalları, E₂ ile inhibe edilmektedir (30).

Sanoja ve Cervero farelerde OVX ile karın bölgesinde visceral hiper sensitivitenin ve duysal hiperaljezinin arttığını belirlemişlerdir (33, 34). Bradshaw ve Berkley OVX ile indüklenen vajinal hiperaljezinin E₂ tedavisi ile düzeldiğinin göstermişlerdir (103) Benzer şekilde, Ceccarelli ve ark. OVX'in formalinle indüklenen duysal ağrının E₂ ile azaldığını rapor etmişlerdir (104). Bir diğer çalışmada E₂ takviyesinin OVX'in indüklediği nosiseptif hipersensitiviteyi düzelttiği belirlenmiştir (94). Tüm bu raporlar, plazma E₂ seviyelerinin azalmasıyla birlikte ağrı duyarlılığının arttığını, E₂ tedavisinin ise durumu düzelttiğini göstermektedir.

2.6. Patch Clamp

1947'de Kenneth Cole tarafından başlatılan çalışmalar, Neher ve Sakman'ın bu çalışmaları devam ettirmesi, neticesinde tek bir iyon kanalına ait akım kaydını almayı başardılar ve bu yöntemi "*patch clamp*" olarak isimlendirdiler. Bu çalışmalarıyla Neher ve Sakmann, 1991 yılı Nobel ödülünü aldılar (105).

Hücre düzeyinde biyoelektriksel sinyallerin kayıt edilmesi uygulama açısından en zor laboratuvar yöntemleri arasında yer almaktadır. Hücre veya hücre kısımlarından kayıt yapılması amaçlandığında bu yöntemler gerçekten çok zorlu hale gelir. Bunun iki temel nedeni vardır, birincisi hücrelerin gözle görülemeyecek kadar küçük olmaları nedeniyle ortaya çıkan manipulasyon güçlüğü ve biyo-elektriksel sinyallerin küçük ve zayıf olmalarıdır (106). Tek kanal akımları, standart bir elektronik devredeki akımdan 10 milyar kez daha küçüktür. Bu durumda sinyal çoğu zaman ortamdaki gürültü içinde kaybolur. Düzgün kayıt yapabilmek için izole ortamlar ve iyi tasarlanmış kayıt sistemlerine ihtiyaç vardır. Elektrofizyolojik deneylerde yaygın olarak iki parametre kayıt edilir, *membran potansiyeli* ve *membran akımları*. Bu parametreler, sırasıyla seçici geçirgen membranın

iki yakası arasındaki asimetrik iyon konsantrasyonu ve iyonların membran üzerinden hareket etmesi sonucu oluşur. Hücre membranının iç kısmı dışa göre daha negatif potansiyele sahiptir. Membran potansiyeli değişiklikleri hücre fonksiyonla ilişkili olduğundan membran potansiyelinin takibi çok önemlidir.

Hücresel elektrik sinyallerini kayıt etmenin en yaygın şekli hücre içine yerleştirilebilen mikro elektrod yöntemlerini kullanmaktır. Bunun için cam pipetler ısıtılıp çekilmek suretiyle uçları çok küçük cam mikro pipetler üretilir. Bunlar iyi iletken sıvılarla doldurulup uygun yardımcı aletler ve kayıt cihazları kullanılarak hücre içine yerleştirilir ve bu sayede membran potansiyeli kayıt edilebilir. Elektrofizyoloji deneylerinde kullanılan mikroelektrodların direnci elektrodun boyutları ve doldurma sıvılarına bağlı olarak değişir. Kayıt cihazları olarak amfiler kullanılmaktadır. Gümüş telin klorla kaplanmasıyla elde edilen $Ag / AgCl$ elektrodları en çok kullanılan elektrodlardır. Ancak uzun süreli kullanımlarda Cl^- kaybı nedeniyle $AgCl$ elektrod bitip gümüş açığa çıkabilir. Bu durum gürültü (noise) oluşumuna neden olur ve kayıt alınmasını engeller. $AgCl$ elektrod üretmek için gümüş tel çamaşır suyu (hipoklorit) içinde 1 gece bekletilir. Kısa sürede gümüş elektrolizle kaplanıp siyah bir renk alır. Üretilen elektrodlar eğip bükmeden kullanılır ve zaman zaman bu işlem tekrarlanır (107).

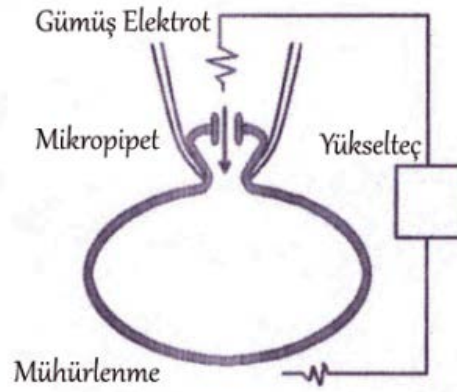
Elektrofizyoloji deneylerinde temel amaç normal ve patolojik şartlarda kayıt edilen biyoelektriksel sinyalin yapısal ve iyonik mekanizmalarını açığa kavuşturmadır. Akım clamp yöntemini kullanarak bu amaca ulaşmak bazı deneyler için mümkün olabilir. Mesela, bazı doğal uyarı formlarının etkisinin kontrollü olarak araştırılması, aksiyon potansiyelinin kaydı ve temel özelliklerinin belirlenmesi, hücrenin giriş direncinin deneysel ölçümü gibi temel bazı deneyler akım clamp yöntemiyle rahatlıkla gerçekleştirilebilir. Ancak membranın doğrusal olmayan özellikleri düşünüldüğünde akım clamp yeterli deneysel imkanı sağlamaz. Örneğin, bu yöntemle bir sinir hücreyi eşik üstü bir uyarıyla uyardığımızda gözlenen aksiyon potansiyelini oluşturan, voltaj bağımlı kanalların davranışını incelemek mümkün değildir. Çünkü akım clampta voltaj, bağımlı değildir dolayısıyla serbest değişir. Örneğin biz -20 mV seviyesinde potasyum kanallarının davranışını incelemek istememize rağmen hücre bu seviyede akım clamp ile belki sadece anlık bir süre için tutulabilir. Hâlbuki bu amaca ulaşmak için membran potansiyelini istediğimiz gibi kontrol etmemize imkân verecek bir sisteme ihtiyaç vardır. Membran potansiyelini istediğimiz potansiyel seviyesinde tutmamıza imkân veren araca

voltage clamp denir. Voltaj clamp uygulamasında amaçlanan hücrenin istenen potansiyele kenetlenmesidir. Zaman içerisinde geliştirilen bu yöntem sayesinde hücre zarı üzerinde bulunan belirli bir bölgeden veya tek bir iyon kanalından elektrik akım kaydı alabilmek mümkün hale gelmiştir. Patch-clamp tekniği voltaj kenetleme tekniğinin geliştirilmiş halidir.

Voltaj clamp yöntemlerinin temel amacı hücre membranının tamamının komut voltajı seviyesine getirilerek oluşan makroskopik membran akımlarını kayıt etmektir. Eğer membranın bütünü tam kontrol edilemezse bu durum hata kabul edilir. Voltaj clamp kayıtlarından ilgili kanal grubunun genel davranışını belirlemek mümkündür. Ancak, tek bir kanala ait birim iletkenliği kayıt etmeye imkân vermez. Bunun için tek kanal kayıtlarını mümkün kılan patch clamp tekniğini kullanmak gerekir. Bu teoride kolay gözükse de pratikte çok zorlu bir işlemdir. Normalde hücreden hücreye değişmek üzere makro akımlar pA düzeyindedir. Bu küçüklükte bir akımı temiz kaydetmek gerçekten çok zordur. Bir direnç üzerinde dış yörüngelerdeki labil elektronlar termal etkilerle hareket ederler. Bu hareketleri termal gürültü denilen istenmeyen gürültüye neden olur.

Hücreler küçüldükçe dirençleri arttığından küçük bir membran parçasından kayıt yapılabilirse bu koşulun sağlanabileceğini hesaplayan Neher ve Sakmann cam bir pipetin altına bir membran parçasını hapsedip pipet voltajını kontrol etmek yoluyla bu amaca ulaşmayı düşündüler. Bunun için mekanik yöntemler ve proteolitik enzimler kullanarak hücre membranını temizleyip küçük uçlu pipetleri membrana bastırarak GΩ'luk bir kayıt düzeni oluşturmaya çalıştılar. Ancak, elektrod uç halkasının membrana değdiği yerde oluşan şant yolu nedeniyle en iyi durumda bile direnç 10-20 MΩ kadar oluyordu. Bu şekilde yapılan kayıtlarda sinyal gürültü içinde bazen zor da olsa görülebiliyordu ama çok fazla deforme olduğundan ikna edici analiz ve yorumlar mümkün olmuyordu.

Şekil 1'de gösterildiği üzere pipet içine negatif basınç uygulandığında, membran pipete doğru emilince cam duvar ile hücre membranı arasında sıkı bir kaynaşma sonucu ideal GΩ dirençli mühürlenme (*giga seal*) oluştuğu görülmektedir.



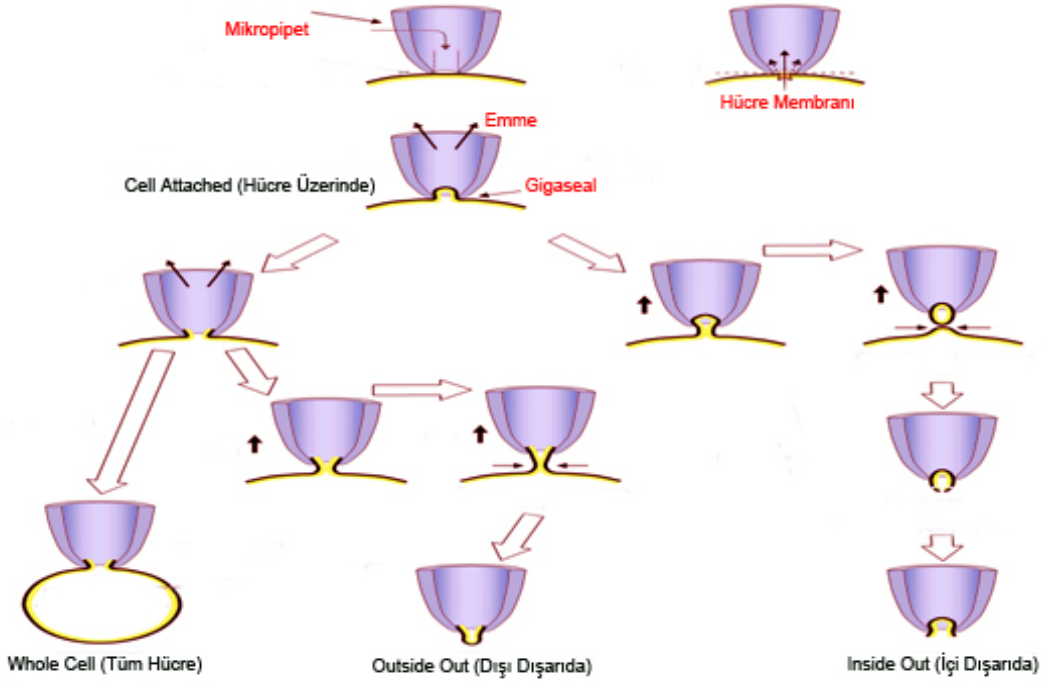
Şekil 1. Giga seal (mühür) elde edilmesi

Bu kayıt sisteminin temel amacı, elektrodun ucundaki membran parçasını küçük tutarak tek bir iyon kanalı içeren bir membran alanı bulmak ve pipet voltajını kontrol ederek oluşan akımları kayıt etmektir. Pipet ucunun açıklığı genelde 1 μm civarında tutulur. Bu durumda membranın kendisinden geçen akımlar çok az olduğundan kayıt edilen akım direkt tek iyon kanalından geçen akıma eşit olur. Giga seal konfigürasyonu oluşturulduktan sonra elde edilen kayıt pozisyonuna hücre üzerinde (*cell attached*) konfigürasyonu denir. Bu pozisyon diğer kayıt pozisyonlarına geçiş pozisyonunun öncülüdür. Kayıt yaparken giga seal ne kadar iyi olursa o kadar iyi sonuçlar alınır. Eğer bu pozisyon yetersiz veya eksikse diğer pozisyonlara geçmeye çalışmanın, hatta deneye devam etmenin anlamıda yoktur. Ancak, bu işlem bazen çok zor elde edilir. Solusyonları filtrelemek, her deneme için yeni pipet kullanmak bu işlemi kolaylaştırabilir.

Kayıt elektrodu banyo sıvısına daldırıldıktan sonra çok hızlı hareket etmek gereklidir. Kısa sürede ucu kirlenip bozulabilir. Bunu önlemek için pipet içine hafif bir basınç uygulanır. Böylece banyo sıvısı pipeti kontamine edemez. Pipet sürekli olarak 1-5 Hz, 1-2 mV kare voltaj pulsu ile voltaj kenetlenirken akım cevabı monitorize edilir. Eğer pipet direnci 1 $\text{M}\Omega$ ise bu durumda 1 nA akım kayıt edilecektir. Pipet hücreye yanaştırıldığında pozitif basınç kesilir ve pipet direnci %50 artıncaya kadar pipet hücreye bastırılır. Bu aşamada pipete nazikçe negatif basınç uygulanır. Bu işlem için enjektör kullanılır. Hızla pipet direncinin arttığı akım cevabındaki azalmadan anlaşılacaktır. Eğer giga seal oluşursa akım cevabı bin kez azalıp 1 pA düzeyine düşeceğinden

neredeyse tamamen ortadan kalkacaktır. Bu aşamadan sonra eğer bir potansiyel uygulanmayacak ise pipet o mV seviyesine ayarlanıp membran parçası hücre istirahat halindeyken bulunduğu potansiyel seviyesinde tutulur.

Patch clamp uygulamasında ise Şekil 2'de gösterildiği üzere, çok farklı kayıt konfigürasyonları olduğundan, akımın işareti ve anlamı ayrı ayrı düşünölmek zorundadır. Göröldüğü gibi kayıt konfigürasyonlarının çeşitliliği durumu daha da karmaşık hale getirmektedir. Pipetin potansiyelini arttıran yöndeki potansiyel değışiklikleri pozitif potansiyel olarak adlandırılır. Ancak, bunun depolarize veya hiperpolarize edici olup olmadığı kullanılan yöntemle bağıdır. Eğer, akım patch clamp amfisinden elektrod boyunca akıp membrandan geçiyorsa bu pozitif akımdır. Bu yaklaşımla *cell attached* uygulamasında (pipetin içine) pozitif potansiyel uygulaması, membran parçasını hiperpolarize edip negatif içe akım oluşturacaktır.



Şekil 2. Patch clamp tekniğinde kullanılan konfigürasyonların gösterimi.(108)'den değıştirilerek.

Şekil 2'de bilenen patch clamp kayıt konfigürasyonları özetlenmiştir. Görüldüğü üzere giga seal konfigürasyonu diğer konfigürasyonlara geçişin öncülüdür. Hücre üzerinde (*Cell-attached*) yöntemi tam bir patch clamp tekniğidir ve en temel uygulamasıdır. Mikropipet yardımıyla hücre zarına temas edilir ve negatif basınç uygulanarak bu giga seal konfigürasyonu elde edilir. Mikropipet içerisine ekstraselüler tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Bu konfigürasyonda ekstraselüler olarak uygulanan hormon veya kimyasal maddelerin mikropipet ile yakalanan hücre zarı parçasında bulunan iyon kanal akımları üzerine etkisinin ölçülmesi mümkündür. Kayıt esnasında pipet halen hücre ile temas ettiğinden hücre içi organellerin kanal üzerine olan etkileri devam etmektedir. (109-111)

Eğer cell attached konfigürasyondayken kayıt pipetini çekersek pipetin ucunda hücre zarına ait fakat zardan bağımsız bir yama kalır. Genelde bu parça tekrar organize olup pipetin ucunda küçük bir vezikül oluşturur. Bunu önlemek için ya ortamdaki kalsiyum miktarı düşürülür ya da pipet yukarı çekilip havada tutulduktan sonra tekrar banyo sıvısına daldırılır. Bu manevralarla vezikül açılıp membranın iç yüzü dış ortama gelecek şekilde “*içi dışarıda (inside out)*” kayıt düzeni elde edilir. Hücre zarının hücreler arası boşluğa bakan yüzü, mikropipetin içerisinde bulunan sıvıya temas ederken intraselüler ortama bakan yüzü, banyo ortamına temas etmektedir. Bu nedenle, hücre üzerinde konfigürasyonunda olduğu gibi, mikropipet içerisine ekstraselüler tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Kalsiyum ve cAMP gibi intraselüler ikincil habercilerin, izole edilmiş zar parçasında bulunan kanallar üzerine etkilerinin araştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Hücre içi organeller olmaksızın iyon kanallarının çeşitli kimyasallara karşı verdiği cevapların anlaşılması için kullanılan önemli bir araştırma metodudur (112).

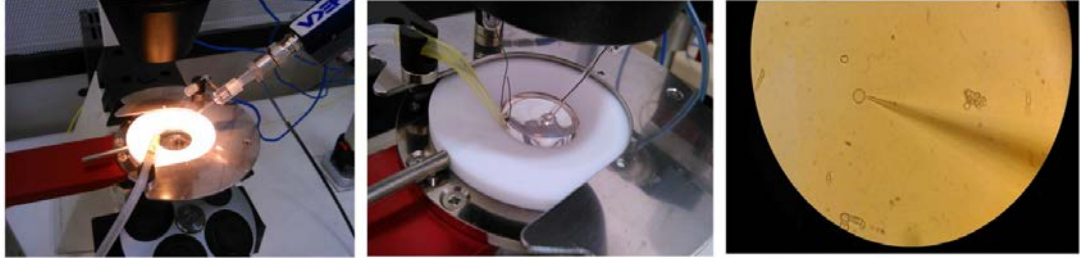
Giga seal konfigürasyonundayken, hücreye ani vakum uygulanarak membran kırılır, hücre içine pipet üzerinden elektriksel erişim sağlanır ve Tüm Hücre (*Whole-cell*) konfigürasyonu elde edilir. Mikropipet içerisine, intraselüler tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Bu konfigürasyon ile hücre dışı hormonların plazma zarı üzerinde bulunan tüm kanal akımları üzerine olan etkilerinin incelenmesi mümkündür (113). Yani alınan kayıt, bir hücrenin tüm kanallarıyla verdiği cevabın bir göstergesidir. Pipet hücreden tamamen ayrılmadığı için kayıt esnasında hücre içi organel ile kanal etkileşimi devam etmektedir. Özellikle, çapı 5-20 µm arasında olan küçük çaplı

hücrelerden kayıt almak için kullanılan en uygun patch clamp konfigürasyonudur (114, 115).

Tüm hücre kayıt konfigürasyonundayken kayıt pipeti yavaşça geri çekilirse membrandan elektrod halkasına yapışıp kopan parçalar tekrar birleşeceğinden "*dışı dışarda (outside out)*" dediğimiz durumu elde ederiz. Pipetin ucunda, hücre zarına ait fakat zardan bağımsız bir yama kalır. Hücre içi organellerden bağımsız bir araştırma olanağı sağlamaktadır (110). Böylece hücre zarının hücreler arası boşluğa bakan yüzü, banyo ortamına temas ederken, intraselüler ortama bakan yüzü, mikropipetin içerisinde bulunan sıvıyla temas etmektedir. Bu nedenle tüm hücre konfigürasyonunda olduğu gibi mikropipet içerisine, intraselüler tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Hormonların ve bazı kimyasal maddelerin izole edilmiş zar parçası içerisinde bulunan iyon kanal akımları üzerine etkisinin araştırılması için kullanılan bir yöntemdir (112, 116).

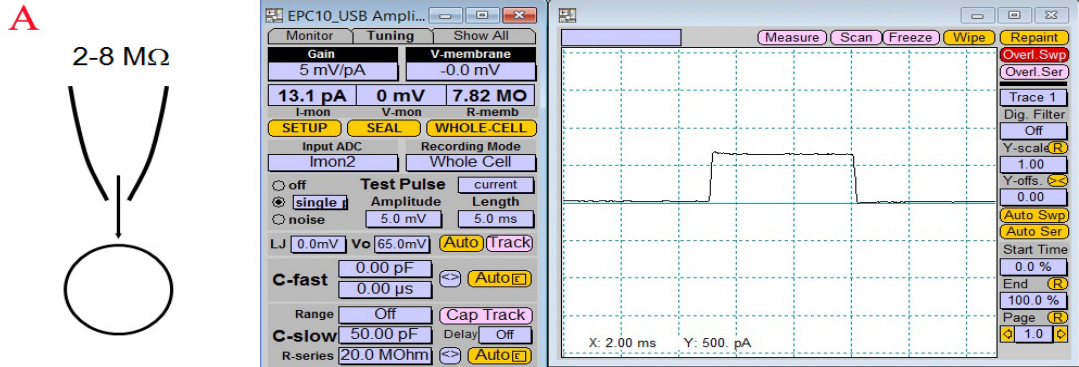
Pipet ucunda hücreden bir membran parçasını izole etme yöntemleri (*İçi dışarıda-dışı dışarıda*) ile suni ortamlarda iyon kanalının davranışını takip etme imkanı vardır. Buna karşın "*cell attached ve whole cell*" tekniklerine hücreye herhangi bir müdahale olmadığından doğal ortama en yakın şartlarda iyon kanalı aktivitesini kayıt etmek mümkün olur. Bundan dolayıdırki en sık kullanılan konfigürasyon "*cell attached ve whole cell*" kayıtlarıdır.

Whole cell yöntemi patch clamp yöntemleri arasında en yaygın olandır. Yöntem tek elektrodla küçük hücreler üzerinde voltaj kontrolü sağlayıp hücre fizyolojisini kültür, beyin dilimi veya hayvanda in situ takip etmemize imkan sağladığından çok yaygın kullanıma sahiptir. Hücre içine yerleştirilen pipet ucu sayesinde giga seal'den whole cell konfigürasyonuna geçildiğinde saniyeler içinde pipet solusyonunu hücre içi sıvısına karıştırıp onu diyaliz eder. Bu yöntemle membrandan geçemeyen kimyasalların kolaylıkla hücre içine uygulanması imkanı sağlanmış olur. Yönteminin temel prensibi; çapı yaklaşık olarak 1 µm çapında olan bir mikropipet ucu ile hücre zarı arasında mühür olarak tabir edilen sıkı bir yapışma sağlanmasının ardından pipet ucu içerisinde kalan hücre zarı parçasında bulunması muhtemel olan iyon kanal akımlarının ölçülmesine dayanmaktadır.



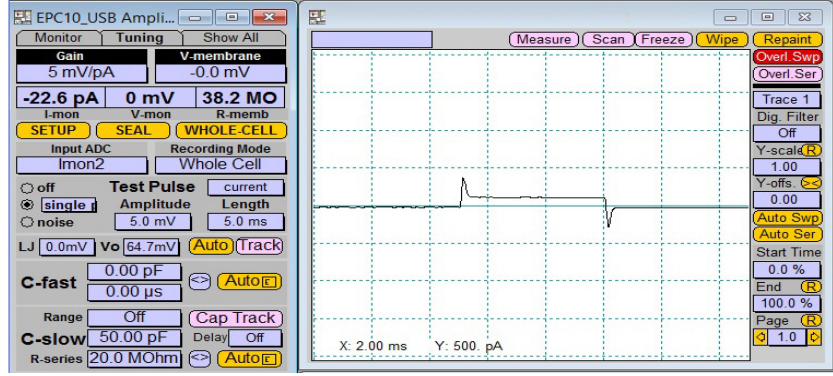
Resim 1. Pipet ucu hücre teması gösterimleri

Resim 1’de görüldüğü gibi pipet ucu, içinde banyo sıvısı bulunan çember içine daldırıldığında 2-8 MΩ luk bir direnç oluşur ve Resim 2A’daki kare dalga ekran görüntüsü elde edilir. Ekranda gördüğümüz kare dalga görüntüsü, akım ve direnç değerleri bizim için takibi önemli parametrelerdir.



Resim 2A. Mikropipetin hücrelerin olduğu solüsyona girdiği anda, ekran görüntüsü

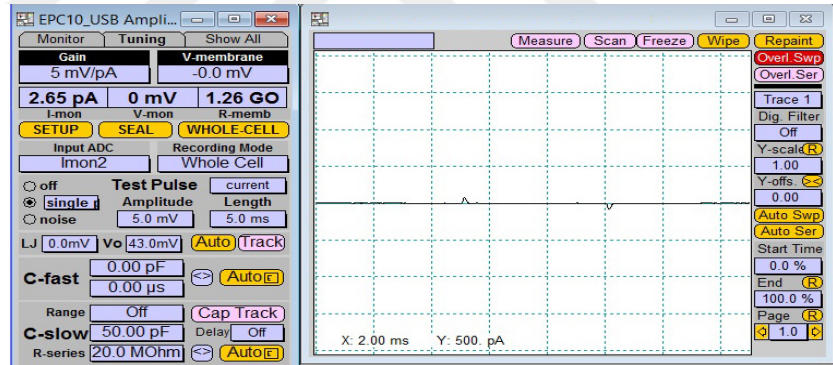
Resim 2B’de ekran görüntüsünde gösterildiği gibi pipete negatif basınç uygulandığında, pipet ucu ile hücre zarı parçası arasında sıkı bir kaynaşma sonucu mühürlenme (seal) oluşumuna neden olur ve ilk etapta yaklaşık 50-80 MΩ’luk bir direnç meydana gelmektedir. Sonrasında GΩ oluşması beklenir.

B**Resim 2B.** Mikropipetin hücreye teması anında ekran görüntüsü

Resim 2C'de ekran görüntüsünde gösterildiği gibi pipete uygulanan negatif basınç sayesinde bu direnç 1-10 GΩ'a ulaşmaktadır. Oluşan bu sıkı yama 'giga seal' olarak adlandırılmaktadır.

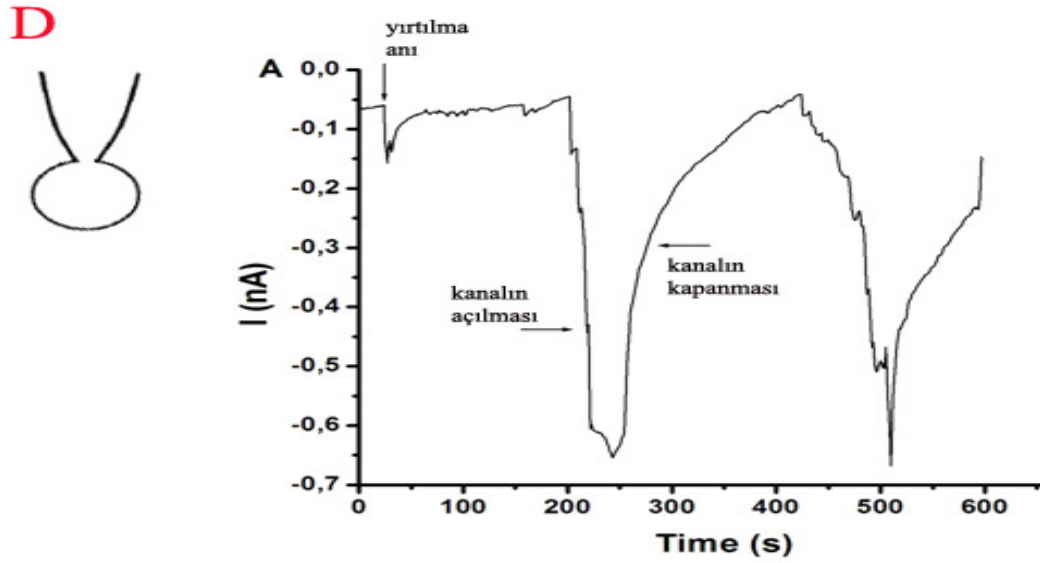
C

Rseal: >1 GΩ

**Resim 2C.** Hücre ve mikropipet arasında oluşan mühürü (giga seal) gösteren ekran görüntüsü

Giga seal konfigürasyonu oluşturulduktan sonra elde edilen kayıt pozisyonuna on cell konfigürasyonu denir. Bu pozisyon diğer kayıt pozisyonlarına geçiş pozisyonunun öncülüdür. Kayıt yaparken giga seal ne kadar iyi olursa o kadar iyi sonuçlar alınır. Eğer bu pozisyon yetersiz veya eksikse diğer pozisyonlara geçmeye çalışmanın, deneye devam etmenin anlamı da yoktur. Hücre içine girer girmez pipet potansiyeli ile hücre içi eşitleneceğinden girmeden önce pipet potansiyelini istirahat

membran potansiyeli seviyesine ayarlamak uygun olacaktır. Pipet voltajı (-60 mV) ayarlanır, kayda başlanır ve akım kaydı takip edilir. Alınan akım kayıtları pipet içerisinde bulunan elektrot tarafından algılanıp amfiye aktarılır, amfide bu akım değerlerini bilgisayara sayısal veri olarak aktarır. Ekranda akım değerlerini sayısal veri olarak, aynı zamanda düz bir çizgi şeklinde görürüz. 10 – 20 sn kayıt aldıktan sonra, Whole cell kayıt düzenine geçmek için pipet içinde mühürlenmiş membran parçasını yırtmak gerekir (Resim 2D). Bu şekilde pipet içi ile hücre içi elektriksel bütünlüğe ulaşacaktır. En sık kullanılan yöntem ikinci bir negatif basınç ile bu membran parçasını mekanik olarak yırtmaktır. Yırılma sırada ekranda akım değerinde ani bir düşüş gözlenir. Yırılma gerçekleştiğinden sonra bir süre hücrenin iyon dengesinin kurulması beklenir. Sonrasında çalışılan kanalın agonisti/antagonisti olan bir madde ile uygulanınca Resim 2D de gösterildiği gibi kanalın voltajını sabit tutup akıma göre kanalın açılıp/kapandığını gözlemleriz.



Resim 2D. Hücrede iyon kanallarının açılıp kapanmasını gösteren ekran görüntüsü

2.6.1. Patch Clamp Setini Oluşturan Temel Malzemeler

Yükselteç (Amplifikatör);

İyi kayıt yapabilmek için izole ortamlar ve iyi tasarlanmış kayıt sistemlerine ihtiyaç vardır. Kayıt cihazları olarak amfiler kullanılmaktadır. Potansiyel kaydı yaparken en etkin kayıt düzenini sağlamak üzere mümkün olduğunca düşük dirençli elektrodlar ve giriş direnci yüksek amfiler kullanılmalıdır. Alınan biyopotansiyel kayıtlar yükseltilerek ekranda sayısal veriler haline gözlemlenir. Amfiler patch clamp tekli kanal ve tek hücre çalışmalarında piko amper düzeyindeki akımları ve milivolt düzeyindeki potansiyelleri, çevreden gelen ve noise olarak adlandırılan parazitlerden arındırarak sadece net kazanç elde edilen sistemlerdir.

İnverted Mikroskop (Floresans);

Bu tip mikroskoplarda; normal ışık mikroskopunun aksine objektifler mikroskop tablasının altına yerleştirilmiş durumdadır. Bu durum hem hücrelerin görüntülenmesi hem de pipetin hareket kabiliyeti ve alanının artırılması adına çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Üzerinde bulunan floresans ekleme ile floresan ışık yayan hücrelerin görüntülenmesi mümkündür (116). Ayrıca deneyler esnasında hücrelerin uygun ortam sıvılarında barındırıldığı ve istenilen kimyasallarla muamele edildiği çember'de mikroskop sistemine dahil edilebilir bir aparatır.

Mikromanipülatör;

Patch clamp deneyleri esnasında inverted mikroskop ile hücreler görüldükten sonra mikroskopun makro ve mikro vidaları ile bir daha oynanmamalıdır. Mikropipetin ucunu hücre zarına temas ettirebilmek için üç boyutlu olarak (önerkaya, sağa-sola ve yukarı-aşağı) hareket ettirilmesini sağlayan mikromanipülatörler kullanılmaktadır (112, 116). Kontrol paneli, kumanda, pipet ucunun bağlı olduğu headstage'den oluşan bir sistemdir.

Perfüzyon sistemi;

Patch clamp deneyleri esnasında hücrelerin yerleştirildiği ve çember (chamber) adı verilen kısımda ortama sıvı alış-verişini sağlayan sistemdir. Deneyler esnasında kullanılacak çözeltilerin bulunduğu hazneler çember hizasından daha yüksek bir seviyeye konuşturulmuştur. Bu hazneler ince hortumlar vasıtasıyla çembere bağlanmış durumdadır. Haznelerin çember seviyesinden daha yüksekte olması nedeniyle yer çekimi etkisiyle çembere doğru doğal bir sıvı akışı sağlanmaktadır. Sıvının akış hızı, haznelerin hortumlara bağlandığı noktalara yerleştirilen musluklar sayesinde kolayca kontrol edilebilmektedir. Çembere gönderilen sıvı, yüksek basınç nedeniyle hücrelere ve taşma nedeniyle objektiflere zarar verebilir. Bu nedenle gönderilen sıvının diğer taraftan aynı hızla tahliye edilmesi gerekmektedir. Bu işlemi sıvının iki yönlü hareket etmesini sağlayan peristaltik pompa ile gerçekleştirmek mümkündür. Bazı sistemlerde; sıvının çembere gönderilmesinde ve tahliye edilmesinde sadece peristaltik pompalar kullanılabilir (112, 116).

Faraday Kafesi;

İletken malzemeleri oluşturan atomların en dış yörüngelerindeki değerlik (valans) elektronları, atomlarından kolayca ayrılarak hareket etme yeteneğine sahiptirler. Dolayısıyla; kapalı bir yüzeye sahip olan iletken bir cisim, elektrik alanı içerisine yerleştirildiğinde bu elektronlar, iletkenin içerisindeki elektrik alanı sıfırlanmaya kadar hareket eder ve bir 'yeniden dağılım'a uğramaktadırlar. Elektrik alanın sıfırlanmasıyla birlikte, hareket etmelerinin gerekçesi ortadan kalkmış olur. Faraday kafesi bu ilkeye göre çalışır ve içindeki nesnelere dış elektrik alanlara karşı korur (117). İletken teller ile ağ biçiminde kaplanmış ve topraklanmış tel kafesle bu koruma gerçekleştirilebilir. Ağ gözü sıklığı ve topraklama kalitesi korumayı artırır. Faraday kafesi sayesinde dışarıdaki elektrik alan kafesin içine etki edemez. Böylece Patch clamp deneyleri esnasında sağlıklı kayıtlar alınması sağlanır. Kafesin işlevi için iletkenlerin iyi topraklanmış olması gerekmektedir (112).

Titreşim Önleyici Masa;

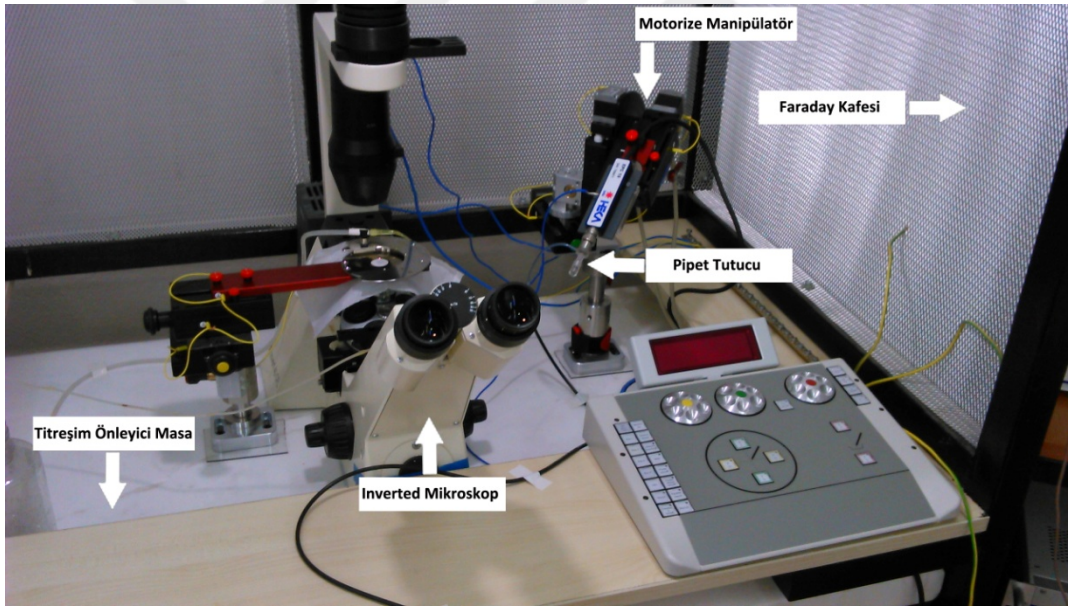
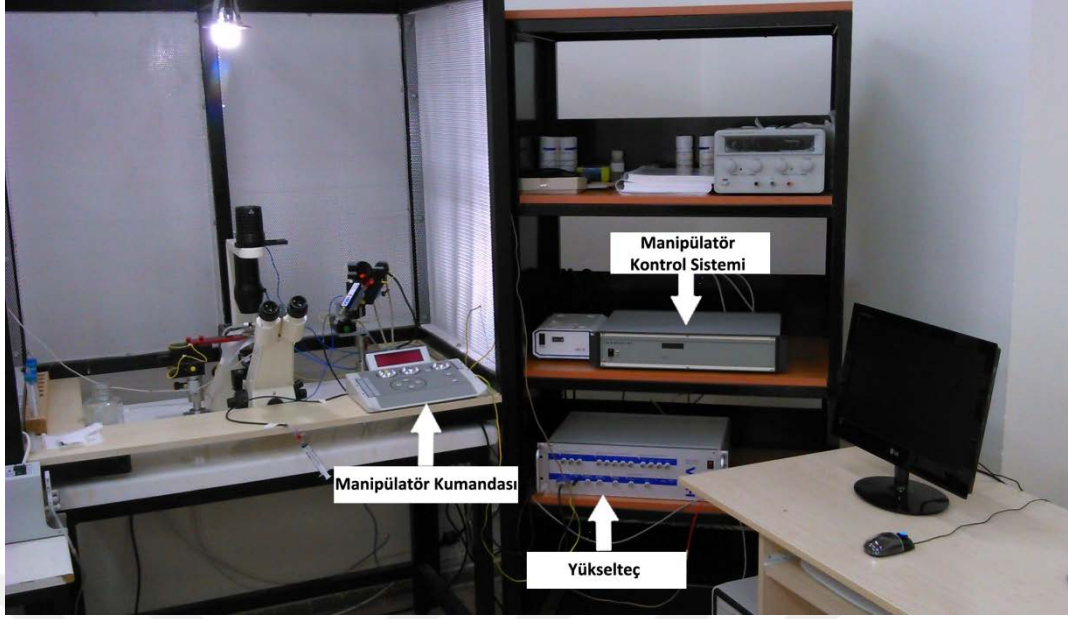
Patch clamp deneyleri hücre ile pipetin temas etmesine dayanan, çalışma esnasında yüksek hassasiyet gerektiren bir yöntemdir. Çalışma esnasında hücre ve pipeti görmemizi sağlayan mikroskop ve pipetin hareketini sağlayan mikromanipülatör sistemi sarsıntı önleyici masa üzerine sabitlenmiş halde bulunmaktadır. Çalışma esnasında oluşabilecek en küçük sarsıntı bile hücre ile pipet arasında kurulan temasın kopmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle darbe emici özel sistemlerle donatılmış, sarsıntı önleyici bir masanın kullanılması bu sistemin olmazsa olmazlarından (118).

Bilgisayar Yazılımı;

Patch master ve Fit master sisteme uygun olan yazılım programıdır. Amfi ile alınan biyopotansiyel kayıtlar anlayabileceğimiz sayısal veriler halinde, yardımcı programlar ile bilgisayara aktarılır.

Borosilikat pipetler;

Cam mikropipetlerin çalışmanın ana konusuna göre değişik tipleri bulunmaktadır. Genellikle borasilikatlı cam pipetler kullanılmaktadır.



Resim 3. Patch-clamp seti genel görünümü

Pipet Yapıcısı (Puller)

Patch clamp setinde kullanılan mikro pipetler, üretici firma tarafından içi boş silindirik tüp şeklinde gelmektedir. Bu tüpleri sivrilterek hücre zarına temas edebilecek duruma getiren alet ise pipet yapıcısı (puller) cihazıdır. Pipet yapıcısının içinde bulunan pipet oluklarına, pipet yerleştirilip, aygıtın ortasında bulunan, ısıtılabilir uygulamalarına yarayan içi boş kare şeklinde olan tungsten rezistansın içinden geçirilecek şekilde ileriye doğru sürülerek, oluk kollarında bulunan kısıcılar sıkılıp, sabitlenir. Daha sonra, önceden ramp testi yapılan cihazın ısı ayarları kullanılarak pipet yapımı işlemi başlatılır. Pipet yapımı esnasında, pipetin ortası ısıtılırken, aynı anda oluklarda sıkıştırılmış pipetin her iki tarafına, aynı doğrultuda fakat zıt yönlerde de çekme kuvveti uygulanır ve pipet ısı, kuvvet etkisiyle yavaş yavaş ortasından incelmeye başlayıp, hücreye temas edebilecek ölçülerde sivrilir. Cihazda bulunan hava soğutma sistemi yardımıyla pipet içi boşluğu, pipetin en sivri yerinde bile kapanmaz, boşluk olarak kalır. Bu da hücreden kayıt alabilmek için gereklidir (119).



Resim 4. Mikro pipet yapıcısı genel görünümü

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)

Çalkalamalı su banyosu: Termal Laboratuvar Aletleri (Türkiye)

Çalkalama cihazı: Biosan (Türkiye)

Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)

Faraday kafesi: SDÜ metal atölyesi (Türkiye)

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

Floresan spektrofotometre: Cary Eclipse, Varian, (Avustralya)

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

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

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

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

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

Mikromanuplasyon: Luigs and Neumann (Almanya)

Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Select BioProducts (ABD)

Peristaltik pompa: Ismatec (İsviçre)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Pipet yapıcı (Puller): Sutter Instruments (ABD)

Plate reader: Infinite 200 Pro, Tecan (Avusturya)

Sarsıntı önleyici sehpa: SDÜ metal atölyesi (Türkiye)

Soğutmalı santrifüj: Kubota (Japonya)

Şarjlı pipet: Hirschmann (Almanya)

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

Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

Yükselteç: HEKA, EPC-10 (Almanya)



3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Aldrich (ABD)

17 β – Estradiol, Cayman (ABD)

Bakır Sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Merck (Almanya)

Calcium Chloride, Merck (Almanya)

Capsaicin, Sigma (Almanya)

Capsazepine, SantaCruz (ABD)

Cesium hydroxide monohydrate, Sigma (Almanya)

DMSO (Dimethyl sulphoxide), Hybri-Max, Sigma (Almanya)

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

Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma (Almanya)

Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (10X), Biochrom KG (Almanya)

EDTA, Merck (Almanya)

EGTA, Merck (Almanya)

Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)

Fura-2 AM, Invitrogen (ABD)

HAM'S F12 Medium (1X), Biochrom KG (Almanya)

HEPES, Sigma (Almanya)

Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Sigma (Almanya)

Ketamin, Bremer Pharma (Almanya)

JC-1 Dye, Santa Cruz Biotechnology (ABD)

L-glutamic Acid, Merck (Almanya)

N-Methyl D-Glucamine (NMDG), Sigma (Almanya)

Penisilin G, Pfizer (Almanya)

Penisilin-Streptomisin, Lonza (Belçika)

Phosphate Buffered Saline (10X, PBS), Biochrom (Almanya)

Sodium Chloride, Merck (Almanya)

Sodyum hidroksit (NaOH), Riedel-de H en (Almanya)

Trypsin-EDTA Solüsyonu (% 0,25), Sigma (Almanya)



3.2. Yöntem

34 adet, 10-12 haftalık ve ortalama 170 ± 10 gr ağırlığında, Wister Albino ırkı dişi sıçan kullanıldı ve 6 hayvan 1 kafese konuldu. Oda sıcaklığı 20°C , nem oranı %50 ve 12 saat karanlık 12 saat aydınlık olacak şekilde ayarlandı, sıçanlara istedikleri kadar su ve yem verildi.

3.2.1. Oluşturulan Gruplar;

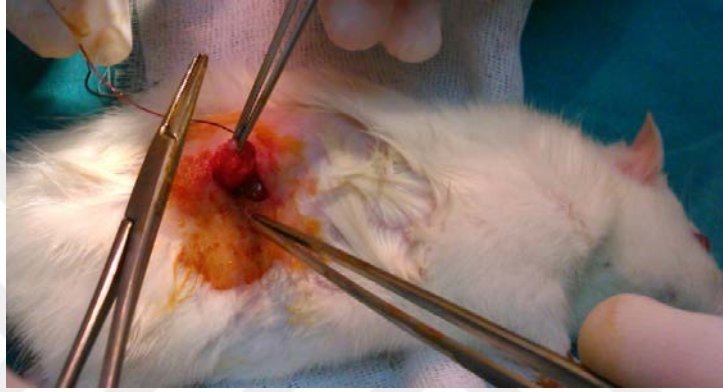
Kontrol grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanlara deney süresince 0,2 ml/sıçan/gün Dimethyl sulphoxide (DMSO) deri altına 14 gün süre ile uygulandı.

OVX grubu (n=12): Bu gruptaki sıçanlar ovariectomize edildi (8)ve 14 gün beklendikten sonra 0,2 ml/sıçan/gün placebo (DMSO) deri altına (subcutan) 14 gün süre ile uygulandı.

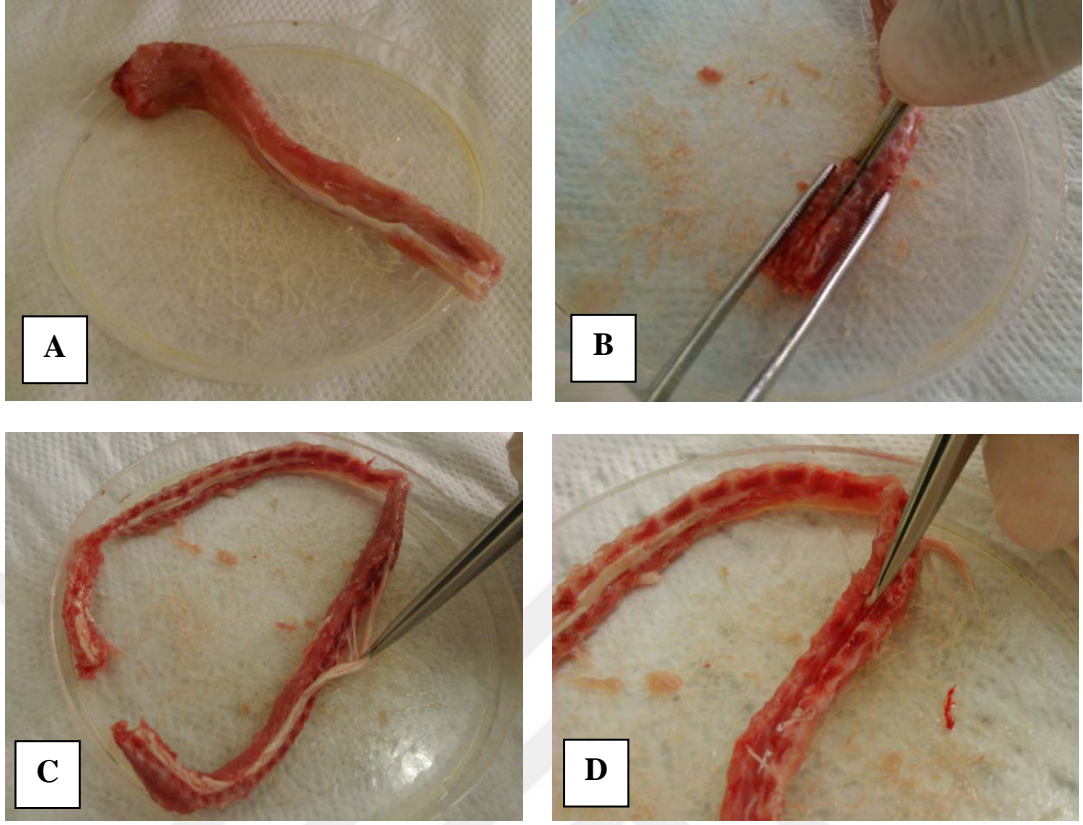
OVX + Estradiol grubu (n=12): Bu gruptaki sıçanlar ovariectomize edildi ve 14 gün beklenip $80 \mu\text{g/kg/gün}$ estradiol, 0,2 ml/sıçan/gün DMSO içinde çözülmüş olarak deri altına 14 gün süre ile uygulandı (120, 121).

3.2.2. Ovariectomi İşlemi;

OVX yapılacak sıçanlara genel anestezi (80 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin) uygulandı. Anesteziyi takiben sıçanların abdomen bölgesi tıraş edilerek insizyonla batına girildi. Fallop tüpleri ve ovaryumlar ipek iplik ile bilateral olarak tüpler bağlanarak ovaryumlar çıkarıldı. İnsizyon bölgesi kapatıldıktan sonra operasyon sonrası beş gün boyunca sıçanlara $60\,000 \text{ IU}$ Penisilin G (Pfizer) kas içi uygulandı.



Resim 5. Deneş aşamasında sıçanlara uygulanan ovariektomi işlemleri aşamaları



Resim 6. Sıçanlardan elde edilen arka kök gangliyon hücrelerinin izolasyon işlemi aşamaları. Sırt omurlarından kas dokusu ayrılması (A), sırt omurlarının medial olarak eşit iki parçaya ayrılması (B,C), her iki vertebra arasında bulunan hücre yumakları (arka kök gangliyonları) uçları ince uçlu pensler vasıtasıyla yerlerinden alınması (D).

3.2.3. Sıçan Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücreleri İzolasyonu

AKG sinir hücreleri sıçanların inhalasyon anestezisi işleminden sonra dekapitasyon işlemini takiben hiç vakit kaybedilmeden sırt omurları bir bütün halinde çıkarıldı (12, 67). Sırt omurlarından kas dokusu ayrıldı (Resim 6A) ve ventral olarak özel olarak silikon maddesi ile kaplanmış yerine hareket etmeyecek şekilde yerleştirildi. Hücrelerin canlılığını kaybetmemesi için bir miktar DMEM medyumu (%89 Dulbecco's Modified Eagle Medium, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin antibiyotik kombinasyonu) konuldu. Bu işlemden sonra omurlar medial hatlarının üzerinden olacak şekilde eşit iki parçaya ayrıldı (Resim 6B, 6C). Spinal kort ve üzerindeki zar stereo mikroskop altında özenle yerleştiği alandan dış kısma

alındı, bu sırada spinal kort ile sinir gruplarının bağlantısı koparılmamaya özen gösterildi. Her iki vertebra arasına özenle yerleştirilmiş olan hücre yumakları uçları ince uçlu pensler vasıtasıyla yerlerinden alındı (Resim 6D) ve içerisinde antibiyotikli medyum bulunan steril petri kaplarına konuldu. Tüm hücre yumakları alındıktan sonra hem AKG hücreler içerisinde antibiyotikli medyum bulunan petri kutusu stereo mikroskop altına alınarak hücre yumaklarının gangliyon uzantılarından ayrıldı ve bir saat süresince inkübatörde (37 °C ve %5 CO₂) kollejenazlı (Tip IV) solüsyon (% 0,25) içerisinde bekletildi. Bir saat sonrasında mekanik parçalama işlemine geçildi ve sırası ile ilk önce 1 ml hacimli (farklı genişliklerdeki uçlarla) pipet uçları ile daha sonra 200 mikrolitre hacimli pipet uçları ile ve en sonunda da steril insülin iğnelerinden geçirilerek mekanik parçalama işlemi tamamlandı. Bu işlemler tamamlandıktan sonra hücreler medyumlarından ayrılmak üzere santrifuj işlemine tabi tutuldu. Bu işlemlerin ardından gerekli inkübasyonlar yapıldıktan sonra hücreler elektrofizyolojik kayıtlar alınmak üzere patch çemberine konuldu.

3.2.4. Solüsyonların Hazırlanması

Patch Clamp deneylerinde kullandığımız tampon çözeltiler, aşağıdaki tablolarda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Çözücü olarak tüm çözeltilerde ultra distile su kullanılmış olup, çözeltilerin osmaolaritesi 310 mosmol/l olacak şekilde ayarlanmıştır (Tablo 1, 2, 3) (43).

Tablo 1. Normal ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü

Kimyasal Madde	Konsantrasyon (mM)
NaCl	140
MgCl ₂ .6H ₂ O ₂	1
CaCl ₂ .2H ₂ O ₂	1
KCl	5
Hepes	10
D-Glukoz.H ₂ O ₂	10

pH KOH ile 7,4 e ayarlandı.

Tablo 2. NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü

Kimyasal Madde	Konsantrasyon (mM)
NMDG	150
MgCl ₂ .6H ₂ O ₂	1
CaCl ₂ .2H ₂ O ₂	1
Hepes	10
D-Glukoz.H ₂ O ₂	10

pH HCl ile 7,4 e ayarlandı.

Tablo 3. Hücre içi tampon çözelti hazırlama protokolü

Kimyasal Madde	Konsantrasyon (mM)
L-Glutamik Asit	145
NaCl	8
MgCl ₂ .6H ₂ O ₂	2
CaCl ₂ .2H ₂ O ₂	10-3
Hepes	8
EGTA	10

pH sezyum hidroksit (CsOH) ile 7,2 ye ayarlandı.

3.2.5. Patch Clamp Deneyleri

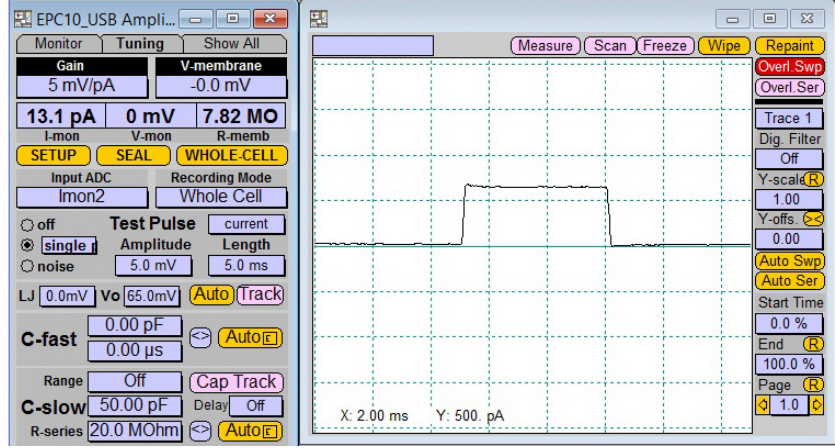
Tüm hücrelerden EPC 10 USB (HEKA, Lamprecht, Almanya) yükseltecinin bağlı olduğu patch master USB yazılımına sahip bir bilgisayar yardımıyla patch clamp tekniğinin tüm-hücre konfigürasyonu kullanılarak kayıtlar elde edildi. Tüm kayıtlar oda sıcaklığında (23–26°C) alındı. Kayıt esnasında hücrelere temas etmek için; dış çapı 1,5 mm, iç çapı 0,86 mm ve uzunluğu 10 cm olan borosilikattan yapılmış tüpler kullanıldı (Sutter Instrument, Novato, ABD). İstenen çap ve dirençteki (2-8 M Ω) uca sahip mikropipetler elde etmek için pipet yapıcı (puller) kullanıldı (Sutter Instrument, Novato, ABD).

Tüm gruplar için alınan kayıtlarda, mikropipetin içerisine normal intraselüler tampon çözeltisi dolduruldu. Pipet içerisinde hava boşluğu kalmaması için; parmak ile duvarlarına çok hafifçe vuruldu. Mikropipet, kayıt elektrotunun üzerine kılıf gibi giydirilerek sıkıştırıldı. Kültür kabı içerisinde bulunan AKG hücreleri patch çemberine alındı. Hücrelerin üzerine 1 mL normal ekstraselüler tampon çözeltisi eklendi. İverted mikroskop (Zeiss, Axiovert 40 CFL, Germany) ile hücreler tespit edildi. Mikromanipülatör yardımıyla pipet kayıt ortamına daldırılarak veriler patch master (HEKA, Lamprecht, Almanya) yazılımı sayesinde bilgisayar ekranından izlendi. Pipetin direnci kaydedildi. Hücre zarına temas edene kadar mikropipet ilerletildi. Hücre zarı ile temasın sağlandığı hem mikroskop altında gözle görülerek hem de bilgisayar ekranındaki anlık direnç değişiminden kontrol edilerek kesinleştirildi (Resim 8A-8B). Perfüzyon sistemi ile pipete hafif bir emme uygulanarak pipet ile hücre zarı arasında ‘gigaseal’ (1 G Ω) diye tabir edilen sıkı mühür oluşumu sağlandı (Resim 8C). Hücre zarı potansiyeli -60 mV’a kenetlendi. Ve sonrasında pipete bağlı bulunan vakum hortumu yardımıyla daha fazla vakum yapılarak, pipet içine sıkışmış hücre zarı parçasının koparılması sağlandı. Böylece hücre tüm hücre (whole cell) konfigürasyonu pozisyonuna geçilmiş oldu. Hücrenin iç ve dış ortamlarında, farklı konsantrasyonlarda bulunan iyonların, iyon kanalları aracılığıyla geçişi esnasındaki akım değişimlerini ölçmek için kullanılan ve patch clamp tekniği sisteminin bilgisayarında bulunan patch master programı ile akım değişimleri ölçüldü. Peristaltik pompa (Ismatec, İsviçre) ile çemberdeki sıvı bir yandan tahliye edilirken aynı hızda diğer taraftan da perfüzyon sistemi ile 10 μ M CAP çemberde bulunan hücreler üzerine uygulandı. Bu şekilde hücreler uyarılarak

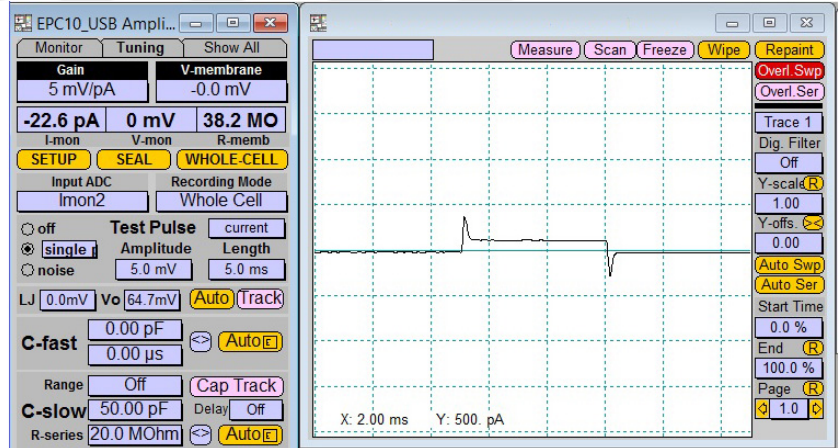
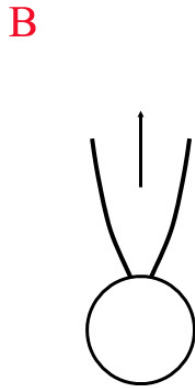
TRPV1 kanallarının aktivasyonu sağlanmaya çalışıldı. Kanalların açılması sonrası kanal aktivitesi belirli bir platoya ulaşınca kadar beklendi. Beklenen plato oluştuğunda; kanalları inaktive ettiğine dair bildirimler olan 100 μM konsantrasyonundaki CPZ patch çemberinde bulunan hücreler üzerine uygulandı (119, 122). Son olarak hücrelerimizin canlılığından emin olmak için NMDG⁺’li ekstraselüler tampon çözelti çembere uygulanarak kayda devam edildi. Canlılığı devam eden hücrelere tekrar sırasıyla CAP, CPZ ve NMDG⁺ uygulamaları yapılarak kayıt sonlandırıldı. Akım voltaj ilişkisi 400 milisaniyeden fazla sürede -90 mV’tan +60 mV’ta kadar uygulanan voltaj rampalarından elde edildi. Analiz için bir AKG hücresindeki maksimum akım genliği o hücreye ait kapasitansı ile oranlanarak bulundu. Deney sonuçları orijinal kayıtların çizgi grafikleri akım kaydı olarak verilirken ve değerler akım yoğunluğu (pA/pF) grafiği şeklinde sunuldu.



Resim 7. Arka kök gangliyon hücrelerinin mikroskopik görünümü.



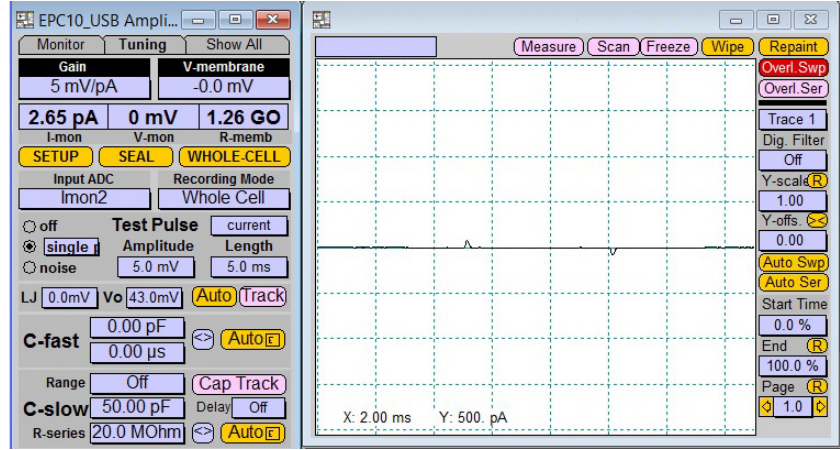
Resim 8A. Mikropipetin hücrelerin olduğu solusyona girdiği anda ekran görüntüsü



Resim 8B. Mikropipetin arka kök gangliyon hücrelerine teması anındaki ekran görüntüsü

C

Rseal: >1 GΩ



Resim 8C. Arka kök gangliyon hücresiyle mikropipet arasında oluşan giga seal (mühür)

3.2.6. Kalsiyum Sinyali Analizleri

Elde edilen AKG hücreleri, santrifüj edilerek süpernatantlar atıldı. 37 °C'de 45 dk çalkalamalı su banyosunda 4μM Fura-2 pentakis (acetoxymethyl) ester (Fura-2 AM, LifeTechnologies, ABD) floresan boyası ile taze medyum içerisinde boyandı. Boyama işleminden sonra 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar atılarak Ca⁺² tamponuna [Na⁺-HEPES [(mM cinsinden); NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; Glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] alınan hücreler manyetik olarak karıştırılan (homojen halde hücrelerin kalmasını sağlayan), şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu yaklaşık 2x10⁶/ml olacak şekilde floresan spektrofloreometredeki (Varian Cary Eclipse, Sydney, Avustralya) küvet haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm'de floresan ışık ile uyarılarak yaklaşık 10 dakika boyunca kayıt alındı. Stimülasyon için CAP (0.1 mM), antagonist olarak CPZ (0.004 mM) kullanıldı ve TRPV1 bağımlı hücre içi serbest Ca⁺² iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm / 380 nm dalga boylarındaki uyarımları kaydedildi. Elde edilen bulgular Grynkiewicz ve arkadaşlarının tanımladığı metoda göre hesaplandı (123).

3.2.7. Hücre İçi ROT Üretimi Tayini

Rhodamine 123(Rh 123) hücre içerisinde stabil yeşil renkte ışımaya yapan ve sitotoksik olmayan bir mitokondri zar floresan boyasıdır. Dihydrorhodamine 123 (DHR-123, Sigma-Aldrich, ABD) hücre içine alındıktan sonra oksidatif ajanlarla oksitlendikten sonra Rh 123'e dönüşür ve hücre içi ROT'un araştırılmasında kullanılan floresan göstergelerden en iyi olanıdır (124). Bu çalışmada da hücre içi ROT'un araştırılmasında floresan boya olarak DHR-123 kullanıldı. AKG hücreleri 1 ml 1x PBS ile sulandırıldı. 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorf tüpe 50 µl olacak şekilde üçe bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 µl taze medyum eklendi ve 15-20 kez pipetaj yapıldı. Üzerine 1µl DHR-123 ROT boyasından koyulup tekrar 15-20 kez pipetaj yapıldı. Eppendorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 1000 rpm devirde 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1x PBS koyuldu ve pipetaj yapıldı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde bölündü. Plate Reader cihazında (Infinite 200 Pro, Avusturya) 488 nm eksitasyon (uyarım) ve 530 ve 590 nm emisyon dalga boylarında okunup aradaki fark değeri olarak belirlendi (125).

3.2.8. Mitokondriyal Zar Depolarizasyonu Analizi

Bir mililitre 1x PBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 µl'si ise mitokondriyal membran depolarizasyonu analizi için ayrıldı. 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 50'şer µl olacak şekilde üçe bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 µl taze medyum koyuldu ve 15-20 kez pipetaj yapıldı. Üzerine 1µl 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Life Technologies, ABD) mitokondriyal zar depolarizasyon boyasından koyuldu ve tekrar 15-20 kez pipetaj yapıldı. Eppendorf tüpler 45 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 1000 rpm devirde 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1x PBS koyuldu ve pipetaj yapıldı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde bölündü. Sağlıklı hücrelerde boya mitokondri matriksinde yoğunlaşır. Burası boyanın kırmızı floresan kümeleşmeleri gerçekleştirdiği yerdir. Boya kırmızıdan (JC-1 kümeleşmeleri) yeşile

(JC-1 monomerleri) dönerek hücrenin bütününe yayılır. Plate Reader cihazında 488 nm eksitasyon, 590 nm (JC-1 kümeleşmeleri) ve 525 nm (JC-1 monomerleri) emisyon dalga boylarında okunup 590/525 emisyon oranıyla sonuçlar hesaplandı. Kontrol grubuna kıyasla nispi artışı şeklinde grafiklendirildi. Mitokondriyal membran potansiyeli önceki çalışmalarda belirtildiği gibi (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) JC-1 boyasıyla tespit edildi (126, 127).

3.2.9. Apoptozis Testi

1 ml 1x PBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 µl'si ise apoptozis testi için ayrıldı. 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 50'şer µl olacak şekilde üçe bölündü. Daha sonra üzerine 950 µl 1x PBS eklendi. Pipetaj işlemi takiben üzerine 3-5µl apoptozis boyasından (APOPercentage, Biocolor, İngiltere) eklendi ve 30 dk süreyle çalkalama cihazına bırakıldı. Çalkalama sonrası 3500 RPM de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Santrifüj edilen hücreler üzerine 1x PBS eklenerek yıkandı ve 200µl APOpercentage Dye Release'den ilave edildi. Pipetaj ve ardından santrifüj yaptıktan sonra süpernatant alındı ve kuyucuklara aktarılıp 550 nm dalga boyunda Plate Reader cihazında okundu. Elde edilen değerler kontrole kıyasla hesaplandı (128).

3.3. Etik Kurul İzni

Çalışma protokolü Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (HADYEK) tarafından 25.11.2014 tarihinde uygun bulunmuştur (Protokol No: 25.11.2014-04).

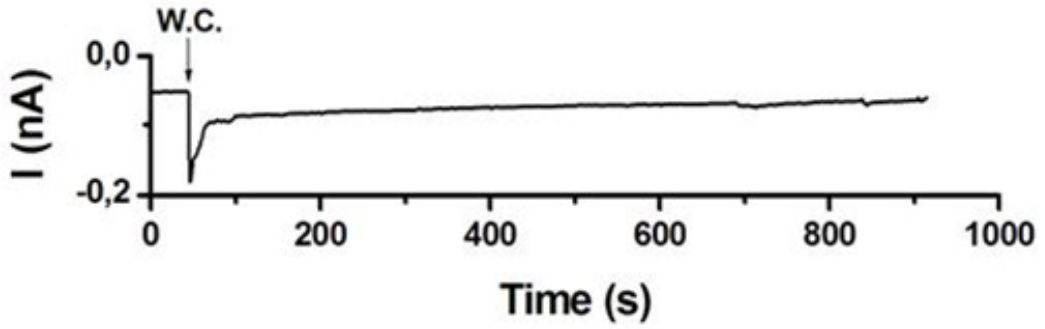
3.4. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. Verilerin ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 17.0 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistikî karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kontrol Kaydı Sonucu

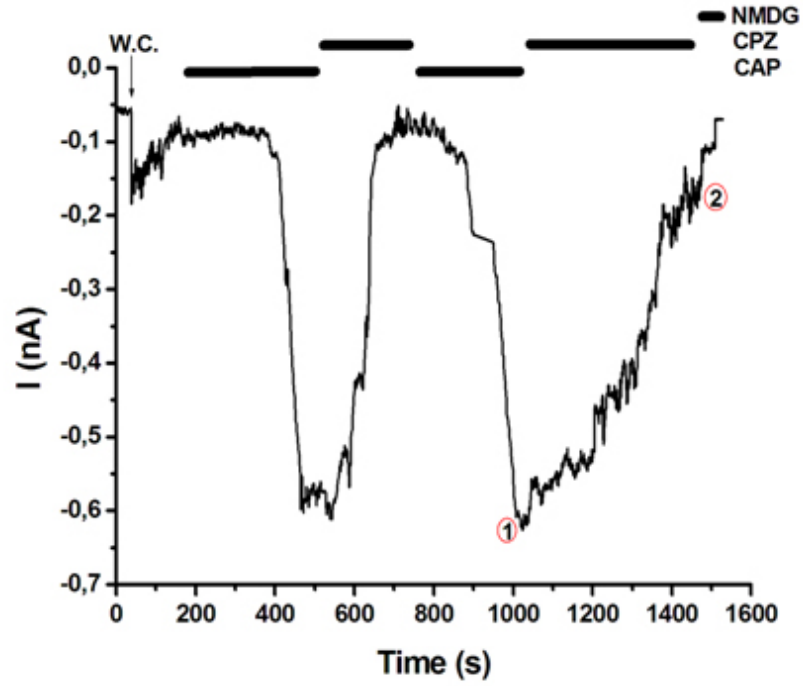
İlk kayıt, hiçbir inkübasyon ve uyarım yapmaksızın alınan patch-clamp kaydıdır, çalışmanın kontrol kaydını oluşturmaktadır. Şekil 3'te görüldüğü gibi hiçbir uyarı yapılmaksızın AKG hücresinden alınan kayıtlarda, akım oluşmayıp, düz bir kayıt alınmıştır. Kontrol kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 3,83 pA/pF (n=4) olarak hesaplanmıştır (Grafik 1).



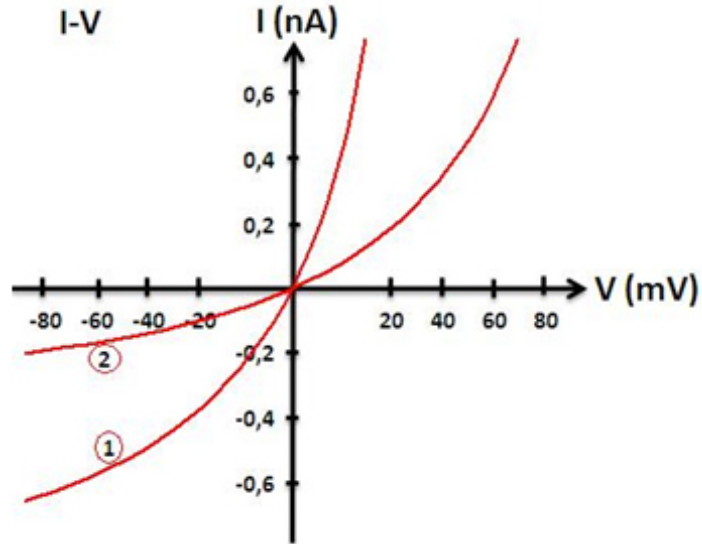
Şekil 3. Kapsaisin ile uyarım yapılmamış sıçan arka kök gangliyon hücrelerinden patch clamp yöntemiyle TRPV1 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı.

4.2. Kontrol Grubu Kaydı Sonucu

Şekil 4A'da gözlemlenen, kontrol grubu kaydında sadece CAP ile uyarım sonucunda negatif yönde akımın arttığı gözlemlenerek TRPV1 katyon kanallarının net 0,52 nA seviyelerinde açıldığı görülmüştür. Kanallar açıldıktan sonra daha fazla açılma olup olmayacağı belirli bir süre beklenilip, grafiğin platoya gelmesi sağlandıktan sonra, kanalları inaktive ettiği düşünülen CPZ maddesi verilerek kanal akımlarının önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Kapanma sonrasında yukarıda anlatılan basamaklar tekrar uygulanıp birbirine paralel grafik elde edildiği gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak sabit voltaja göre akımın değişimi grafiği şekil 4B'de I-V grafiği olarak da gösterilmiştir. Kontrol grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 65,36 pA/pF (n=4) olarak hesaplanmıştır (Grafik 1)



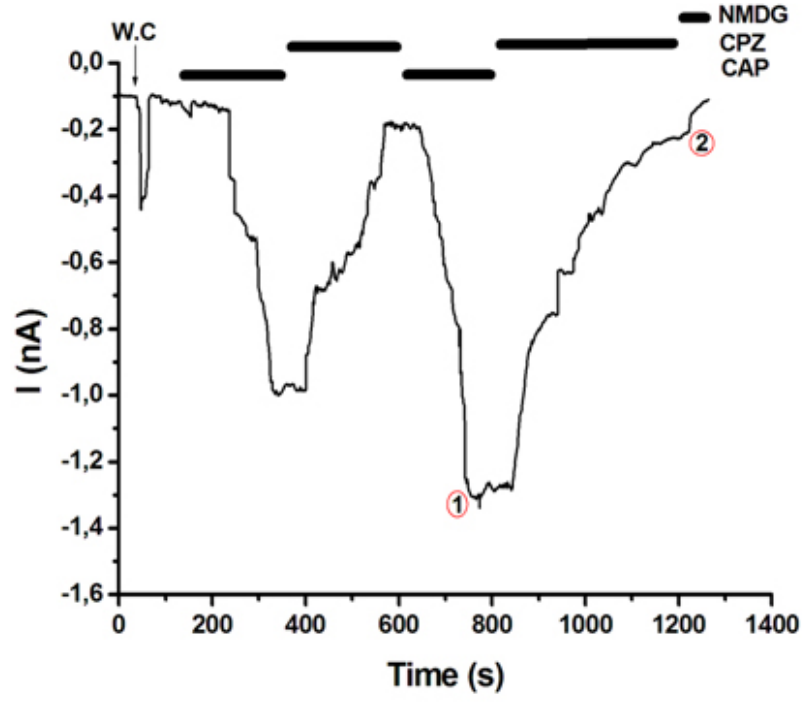
Şekil 4A. Kapsaisin (CAP, 10 μ M) ile uyarım yapılmış arka kök gangliyon hücrelerinden patch clamp yöntemiyle TRPV1 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. Grafikte verilen 1 ve 2 sırasıyla, kapsaisin TRPV1 kanalını açtığı ve kapsazepinin (CPZ, 100 μ M) kapattığı seviyelerdir.



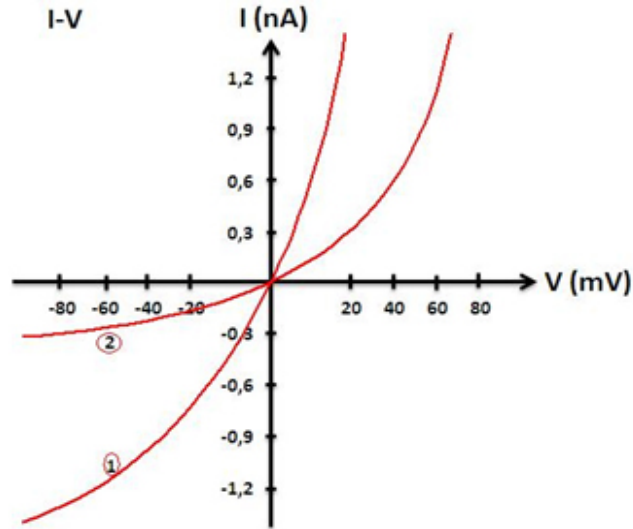
Şekil 4B. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik. I-V grafiğinde verilen 1 ve 2 numaralı hiperbol eğrileri ise sırasıyla kapsaisin TRPV1 kanalını açtığı ve kapsazepinin kapattığı seviyeleri göstermektedir.

4.3. OVX Grubu Kaydı Sonucu

Şekil 5A'da gösterildiği gibi, OVX yapılan sıçanlar 14 gün beklenip E_2 çekilmesi sağlandıktan sonra 0,2 ml/sıçan/gün DMSO deri altına (subcutan) 14 gün süre ile uygulandıktan sonra çıkarılan AKG hücreleri yine patch clamp ortamında CAP ile uyarımı sonucunda, TRPV1 katyon kanallarının, kontrol kayıtlarına kıyasla çok daha fazla açıldığı gözlemlenmiş ve akım zaman grafiğinde de görüldüğü gibi (Şekil 5A) biyopotansiyel akım değişiminin net 1,12 nA seviyelerinde seyrettiği gözlemlenmiştir. OVX işleminin hücre içi ROT üretimi artışına bağlı olarak, kanal duyarlılığını artırıp kanalların çok daha fazla açılmasına sebep olduğu görülmektedir. Kayıt alma esnasında akımın artık değişmediği yani bir platoya ulaştığı anda iyon kanalını kapatıcı olarak CPZ verilmiş ve katyon kanallarını büyük oranda kapandığı gözlemlenmiştir. Yine akım zaman grafiği ile birlikte aynı ölçümün akım voltaj grafiği de verilmiştir. Şekil 5B I-V grafiğinde verilen 1 ve 2 numaralı hiperbol eğrileri ise sırasıyla CAP'ın kanalı açtığı ve CPZ'nin kanalı kapattığı seviyeleri göstermektedir ve akımın voltaja göre değişimini göstermektedir. OVX grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 155,29 pA/pF (n=4) olarak hesaplanmıştır (Grafik 1).



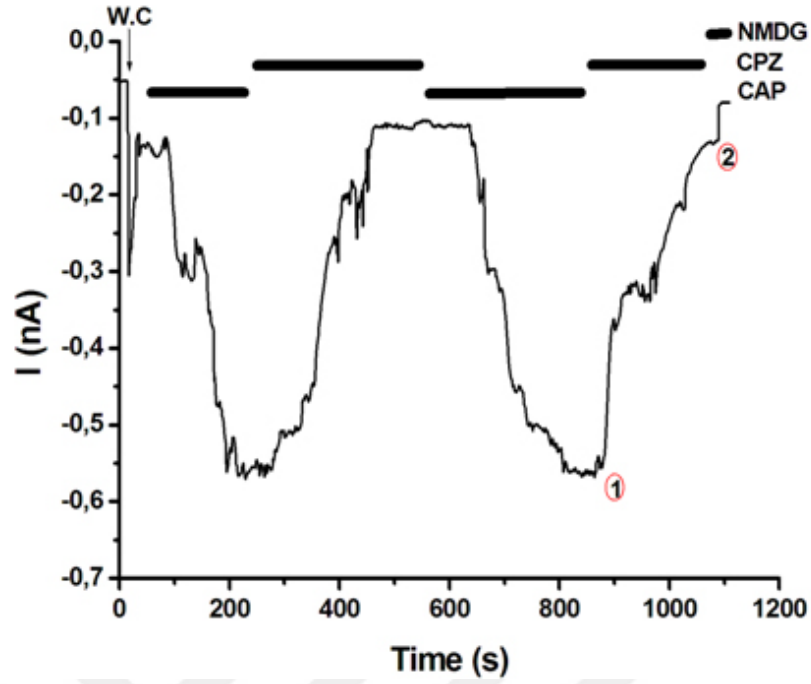
Şekil 5A. Ovariectomi grubu kapsaisin (CAP, 10 μ M) ile uyarım yapılarak arka kök gangliyon hücrelerinden patch clamp yöntemiyle TRPV1 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. Grafikte verilen 1 ve 2 sırasıyla kapsaisinin TRPV1 kanalını açtığı ve kapsazepinin (CPZ, 100 μ M) kapattığı seviyeler.



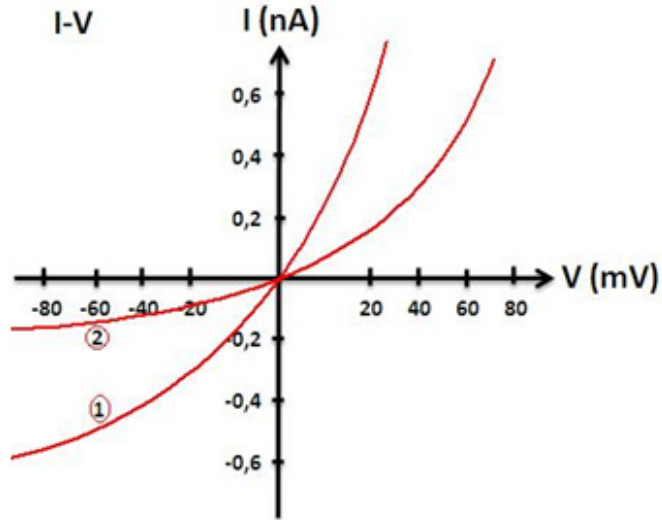
Şekil 5B. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik. I-V grafiğinde verilen 1 ve 2 numaralı hiperbol eğrileri ise sırasıyla kapsaisinin TRPV1 kanalını açtığı ve kapsazepinin kapattığı seviyeleri göstermektedir.

4.4. OVX + Estradiol Grubu Kaydı Sonucu

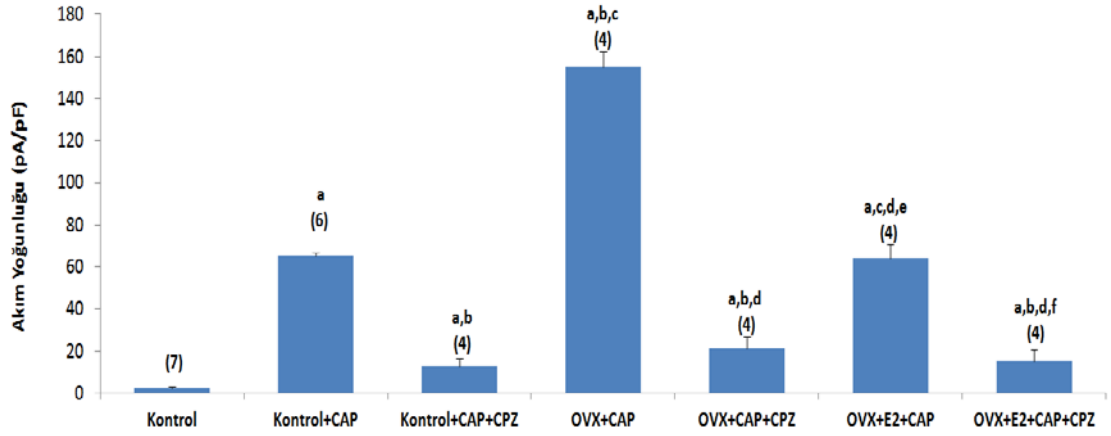
Şekil 6A'da gösterildiği gibi, OVX yapılan sıçanlar 14 gün beklenip E₂ çekilmesi sağlandıktan sonra 80 µg/kg/gün estradiol, 0,2 ml/sıçan/gün DMSO içinde çözülmüş olarak deri altına 14 gün süre ile uygulandıktan sonra çıkarılan AKG hücreleri yine patch clamp ortamında CAP ile uyarımı sonucunda, TRPV1 katyon kanallarının, kontrol kaydına kıyasla daha az açıldığı gözlemlenmiş ve akım zaman grafiğinde de görüldüğü gibi biyopotansiyel akım değişiminin net 0,46 nA seviyelerinde seyrettiği gözlemlenmiştir. OVX yapılmış sıçanlara E₂ uygulaması hücre içi ROT üretiminin azalmasına bağlı olarak, kanal açılmasını azaltıp kanalların kontrol grubuna göre daha az açılmasına neden olduğu görülmektedir. Kayıt alma esnasında akımın artık değişmediği yani bir platoya ulaştığı anda kanalı kapatıcı olarak CPZ verilmiş ve TRPV1 kanalını büyük oranda kapattığı gözlemlenmiştir. Yine akım zaman grafiği ile birlikte aynı ölçümün akım voltaj grafiği de verilmiştir. Şekil 6B I-V grafiğinde verilen 1 ve 2 numaralı hiperbol eğrileri ise sırasıyla CAP'ın kanalı açtığı ve CPZ'nin kanalı kapattığı seviyeleri göstermektedir ve akımın voltaja göre değişimini göstermektedir. OVX grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 64,08 pA/pF (n=4) olarak hesaplanmıştır (Grafik 1).



Şekil 6A. Ovariectomi + Estradiol grubu kapsaisin (CAP, 10 μ M) ile uyarım yapılarak arka kök gangliyon hücrelerinden patch clamp yöntemiyle TRPV1 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. Grafikte verilen 1 ve 2 sırasıyla kapsaisinin TRPV1 kanalını açtığı ve kapsazepinin (CPZ, 100 μ M) kapattığı seviyeleri göstermektedir.



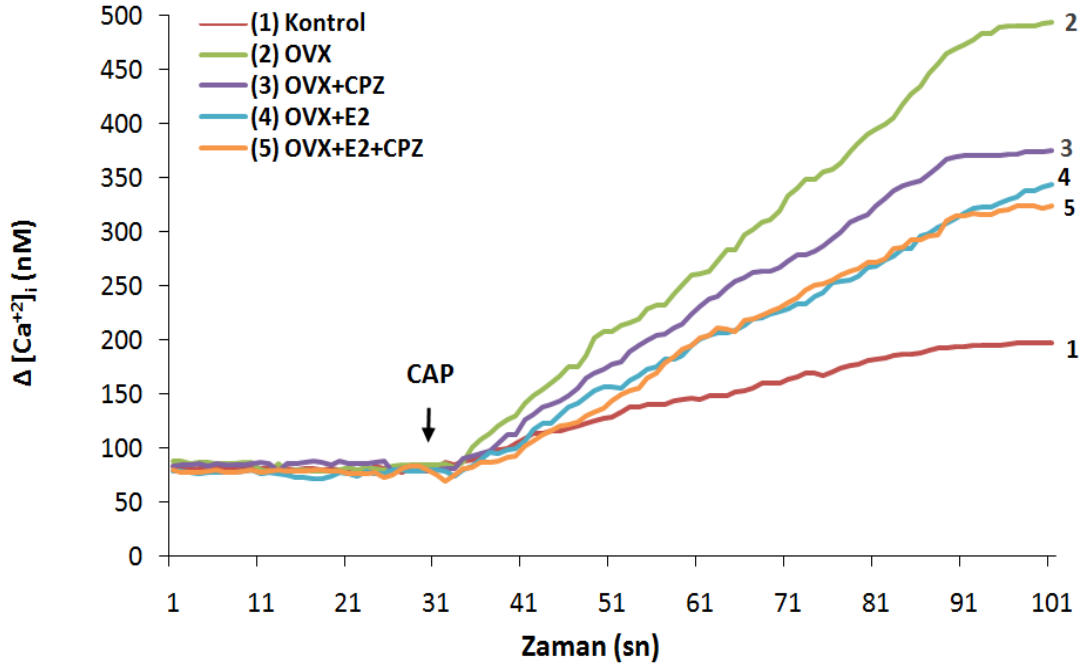
Şekil 6B. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik. I-V grafiğinde verilen 1 ve 2 numaralı hiperbol eğrileri ise sırasıyla kapsaisinin TRPV1 kanalını açtığı ve kapsazepinin kapattığı seviyeleri göstermektedir.



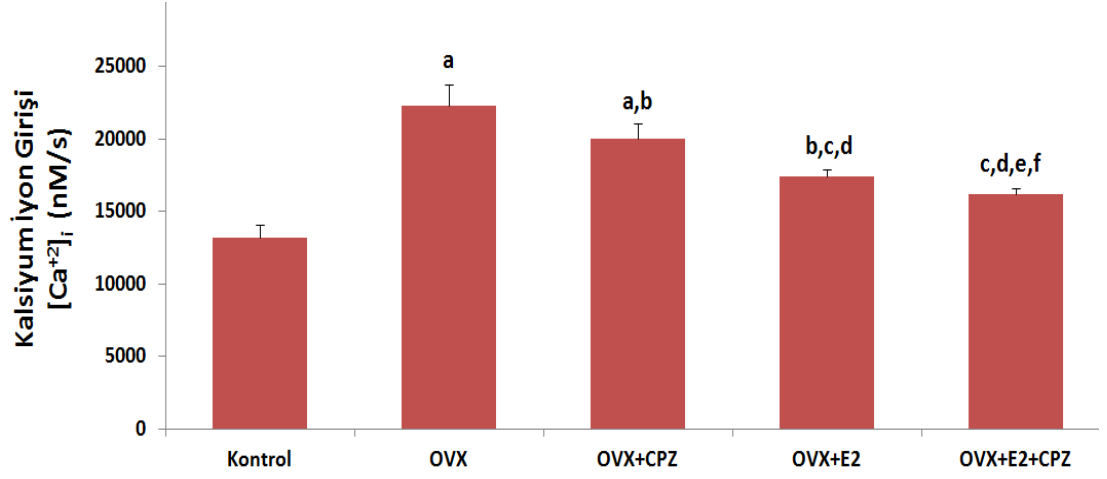
Grafik 1. Ovariectomi (OVX) uygulaması yapılan sıçan arka kök gangliyon hücrelerinde TRPV1 kanalları üzerine estradiol (E_2), kapsaisin (CAP) ve kapsazepin (CPZ) etkisi. Arka kök gangliyon hücreleri için, her grupta incelenen akım yoğunluğu; kapsaisin ile açılmış TRPV1 katyon kanallarının maksimum akım değerlerinin, mikropipetin hücreye temas etmeden hemen önceki direncine bölümüyle hesaplanmıştır. Parantez içindeki sayılar her bir gruptan alınan kayıt sayısını belirtmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı (a; $p < 0.001$ Kontrol grubuna kıyasla, b; $p < 0.001$ Kontrol+CAP grubuna kıyasla, c; $p < 0.001$ Kontrol+CAP+CPZ grubuna kıyasla, d; $p < 0.001$ OVX+CAP grubuna kıyasla, e; $p < 0.001$ OVX+CAP+CPZ grubuna kıyasla, f; $p < 0.001$ OVX+E₂+CAP grubuna kıyasla) akımların uyarım ve inhibisyonları, parantezlerin üstlerinde yer alan harflendirmelerle gösterilmiştir (Ortalama \pm SD).

4.5. Kalsiyum Sinyali Analiz Sonuçları

Tüm gruplara ait hücreler bölüm 3.2.6’de belirtilen şekilde, her gruba ait numunede yaklaşık 2 milyon hücre olacak şekilde dilüe edilip, çalkalamalı su banyosunda 37°C’de Fura-2 AM ile 45 dk boyanarak kalsiyum salınımları spektrofloreometre cihazı vasıtasıyla ölçülmüştür. Stimülatör kimyasal olarak CAP kullanılmıştır. Tüm gruplara ait serbest Ca^{+2} salınımı Grafik 2’de gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla tüm OVX gruplarında, hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyleri artmıştır ($p<0.001$). OVX grubuna kıyasla OVX+CPZ grubundaki hücrelerde sitozole kalsiyum akışının kullanılan TRPV1 kanal blokörü CPZ tarafından engellendiği görülmüştür ($p<0.05$). OVX uygulaması yapılan sıçanlara kıyasla OVX+E₂ tedavisi sonrasında sitozole kalsiyum akışının önemli düzeyde azaldığı ($p<0.05$), hatta TRPV1 kanal blokörü kullanılan OVX+E₂+CPZ grubunda ise E₂ tedavisi uygulanmayan OVX+CPZ grubuna göre daha düşük düzeyde ($p<0.001$) hücre içerisine Ca^{+2} iyonu akışı tespit edilmiştir (Grafik 3).



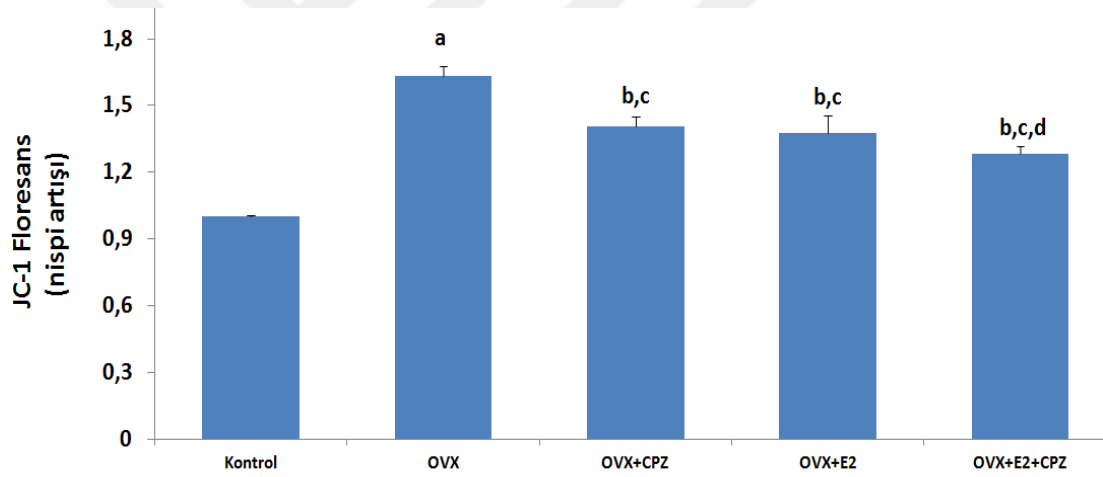
Grafik 2. Kapsaisin (CAP) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine ovariektomi (OVX) ve estradiol (E₂) etkilerinin zamanla değişimi.



Grafik 3. Kapsaisin (CAP) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi Ca²⁺ miktarı üzerine ovariektomi (OVX) ve estradiol (E₂) etkilerinin sütun grafiği ile gösterimi. (a; p<0.001 ve c; p<0.05 Kontrol ile kıyaslandığında, b; p<0.05 ve e; p<0.001 OVX ile kıyaslandığında. d; p<0.05 OVX+CPZ ile kıyaslandığında. f; p<0.05 OVX+E₂ ile kıyaslandığında).

4.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analiz Sonuçları

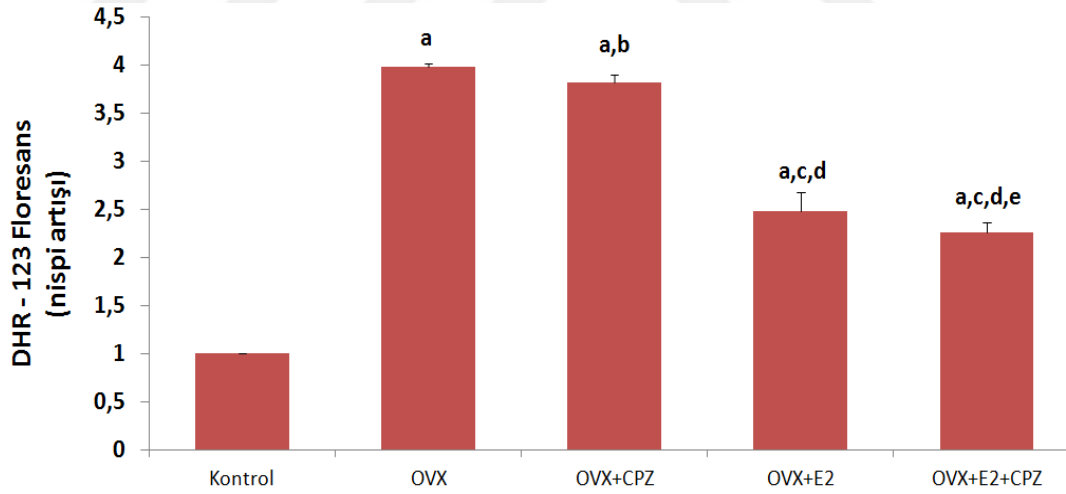
İyon kanallarıyla hücreye düzensiz Ca^{+2} girişi mitokondrinin membran potansiyelini artırmakta ve hücrenin depolarize olmasını sağlamaktadır. Mitokondriyal depolarizasyonun artışı ise hücre içi ROT üretimini arttırmaktadır. OVX grubunda kontrol grubuna kıyasla mitokondriyal membran depolarizasyonu seviyelerinde anlamlı artış olmuştur ($p<0.001$). OVX grubuna kıyasla TRPV1 kanal blokörü kullanılan OVX+CPZ ile E_2 kullanılan OVX+ E_2 gruplarında mitokondriyal membran depolarizasyonunun daha düşük seviyede gerçekleştiği ($p<0.05$), OVX+CPZ grubu ile OVX+ E_2 grubu arasında ise istatistiksel bir fark tespit edilemedi. Yine OVX+ E_2 +CPZ grubunda ise OVX+CPZ ve OVX+ E_2 gruplarına kıyasla düşük düzeyde istatistiksel fark gözlemlenmiştir ($p<0.05$) (Grafik 4).



Grafik 4. Ovariectomi (OVX) işlemi ve estradiol (E_2) tedavisinin grupların mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri. (a; $p<0.001$ ve b; $p<0.05$ Kontrol ile kıyaslandığında, c; $p<0.05$ OVX ile kıyaslandığında, d; $p<0.05$ OVX+CPZ ve OVX+ E_2 grupları ile kıyaslandığında).

4.7. Hücre İçi ROT Üretim Tayini Sonuçları

OVX işlemi ve E₂ uygulamasının hücre içi ROT üretimine etkisi de araştırılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla, OVX grubunda hücre içi ROS üretimini önemli düzeyde (p<0.001) yüksek olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte OVX grubuna kıyasla, OVX+CPZ (p<0.05), OVX+E₂ (p<0.001) ve OVX+E₂+CPZ (p<0.001) önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi. Ayrıca, CPZ uygulanan OVX+CPZ (p<0.05) ve OVX+E₂+CPZ (p<0.05) gruplarının hücre içi ROT düzeylerinin sırası ile OVX ve OVX+E₂ gruplarına kıyasla önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlar TRPV1 kanal aracılı hücre içi Ca²⁺ girişinin ROT üretimindeki önemini göstermiştir. Bu sonuçlara göre, OVX grubunda hücre içi ROT üretimi Kontrol grubuna kıyasla neredeyse üç kat arttığı gözlemlenmiştir. E₂ tedavisi uygulanan OVX grupları, tedavi uygulanmayan diğer OVX gruplarıyla kıyaslandığında hücre içi ROT düzeylerini E₂ tedavisi TRPV1 kanallarını düzenleyerek önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Grafik 5).



Grafik 5. Ovariectomi (OVX) işlemi ve estradiol (E₂) tedavisinin grupların ROT üretimi üzerine etkileri. (a; p<0.001 Kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; p<0.05 ve c; p<0.001 OVX grubu ile kıyaslandığında, d; p<0.001 OVX+CPZ grubu ile kıyaslandığında, e; p<0.05 OVX+E₂ grubu ile kıyaslandığında).

4.8. Apoptozis Testi Sonuçları

Grupların apoptozis seviyeleri Grafik 6'da gösterilmiştir. OVX işlemi hücre içi ROT üretimini arttırmakta bunun sonucu olarak hücreler apoptozise uğramıştır. OVX grubunda kontrol grubuna kıyasla apoptozis seviyelerinde anlamlı artış olmuştur ($p<0.001$). OVX grubuna kıyasla TRPV1 kanal blokörü kullanılan OVX+CPZ ile E₂ kullanılan OVX+E₂ gruplarında apoptozisin daha düşük seviyede gerçekleştiği ($p<0.05$), Yine OVX+E₂+CPZ grubunda ise OVX+CPZ ve OVX+E₂ gruplarına kıyasla düşük düzeyde istatistiksel fark gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Bu sonuçlara göre E₂ uygulamasının apoptozis seviyeleri üzerindeki olumlu etkisi gözlemlenmiştir (Grafik 6).



Grafik 6. Ovariektomi (OVX) işlemi ve estradiol (E₂) tedavisinin grupların apoptozis seviyeleri üzerine etkileri. (a; $p<0.001$ ve c; $p<0.05$ Kontrol ile kıyaslandığında, b; $p<0.05$ OVX ile kıyaslandığında, d; $p<0.05$ OVX+CPZ ile kıyaslandığında, e; $p<0.05$ OVX+E₂ ile kıyaslandığında).

5. TARTIŞMA

TRP, protein olarak uzun onlarca yıllardır biliniyor olmasına rağmen, katyon kanalı olarak ilk defa *Drosophila* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde genetik çalışmalar sırasında tanımlanmıştır (129). 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^{+}/Na^{+} iyonlarına aynı anda geçiren olmalarından dolayı Ca^{+2} kanalları tanımını yerine katyon kanalları tanımını kullanılmaktadır. Günümüzde memelilerde 30'dan fazla TRP kanal tipi tanımlanmıştır (130).

Bütün TRP kanalları yapısal olarak, 6 transmembran segment (S1-S6) içeren voltaj kapılı katyon kanalları ailesinin üyeleridir. Kanalin S5 ile S6 segmentleri arasında bulunan bir por etrafında homo veya heterotetromerik olarak düzenlenmişlerdir. S6 segmentinin C terminal kısmı tüm TRP alt üyelerinde ortak olan "TRP alanı" içerir. Bu temel ortak özellikleri dışında her bir alt üyenin kanalın N ve C terminallerinde kanalı özel kılan yapıları vardır. TRPV1 reseptörlerinin, N terminalleri 6 adet ankrin tekrarı içerirken; C terminalinde bulunan fosfotidilinositol difosfat (PIP_2) bölgesi, kanal desensitizasyon bölgesidir. Ayrıca N ve C terminal bölgelerde bulunan Ca^{+2} - kalmodilin (CaM) bağlanma bölgesi de kanalın desensitizasyon bölgeleridir. TRPV1 kanalları üzerinde kanal agonistleri için bağlanma bölgeleri ve kanalın allosterik düzenleyicileri olan kinaz enzimleri için çok sayıda fosforilasyon bölgesi vardır (45, 131). S5 ve S6 segmentleri arasında bulunan aminoasit rezidüelleri kanalın iyon seçiciliğini kontrol eder ve bu bölge aynı zamanda kanalın esas aktif bölgesidir (132). Kanalin agonistleri olan CAP, resinoferatoksin (RTX) ve kanal antagonisti CPZ'nin transmembran segment 3 ve 4 (S3-S4) arasındaki özel bölgelere bağlandığı, ayrıca CAP ve RTX için çok sayıda başka bağlanma bölgeleri de olduğu rapor edilmiştir (40, 133, 134). Ayrıca, 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- tanıma alanları varlığı ispatlanmıştır (135).

Deneysel modellerde ve menopoz hastalarında sitozolde Ca^{+2} artışından sorumlu olan kimyasal kapılar (örneğin glutamat) ve voltaja duyarlı Na^{+} kanalları konusunda yakın zamanda yapılmış araştırmalar mevcuttur (136, 137). Ovariectomize sıçanlarda AKG nöronlarında sitozole Ca^{+2} girişi ve bu Ca^{+2} girişinde TRPV1 kanallarının rolü konusunda çalışmaya rastlamadık ve bu tez çalışmasını planladık.

Hücre içi ikincil haberci sisteminin en önemli elemanlarından biri olan Ca^{+2} hücrenel birçok hayati fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Kalsiyum, hücrenin oluşumundan ölümüne kadar bütün hücrenel süreçleri yönlendiren bilginin genel taşıyıcısı olarak tanımlanmaktadır (75). Günümüzde hücre bölünmesi, hücrenel motilite, hormon sekresyonu, metabolizma, sinir sisteminin gelişimi ve sinirsel iletim, protein döngüsü, gen ekspresyonu ve programlı hücre ölümü gibi hücrenel süreçlerde kalsiyumun rolü gösterilmiştir (76, 77). Kalsiyum homeostazındaki küçük bir aksaklık önemli hücrenel yolların işlevlerinin bozulmasına ve beraberinde birçok hastalığa neden olmaktadır (13). Ca^{+2} aktif hücrelerde oluşturulan bir ikinci haberci olarak rol alırken aynı zamanda bir hormon ya da büyüme faktörü gibi hücre membranının dışında da gerçek bir birinci haberci olarak çalışabilmektedir. Kalsiyumun sinyal üretimine yönelik fonksiyonu sitozolik miktarının artması ile doğru orantılıdır (77). Sitozoldeki Ca^{+2} düzeyinin azalmasıyla mitokondriyal depolarizasyonun azaldığını ve serbest radikal oluşumunun da azaldığından bahsetmiştir (119). Tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre kontrol grubuna kıyasla tüm OVX gruplarında, hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyleri arttığı, OVX uygulaması yapılan sıçanlara E_2 tedavisi sonrasında sitozole kalsiyum akışının önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir.

Östrojenin hücre içi sinyalleri genomik veya genomik olmayan iki grup yolla aktive ettiği iyi bilinmektedir (138). Genomik yolla, nükleer östrojen α ve β reseptörleri (ER α ve ER β) östrojenle gen ifadesinin kontrolü sonucu aktive edilir (139). Genomik olmayan yolla ise östrojen klasik östrojen reseptörleri veya membrana lokalize yeni östrojen reseptörleri aracılığıyla hem membrana yakın bölgeden hem de membran üzerinden sitoplazmik sinyalleşme olaylarını aktive eder (140, 141). Östrojen reseptörlerinin, AKG primer duysal nöronlarını da içeren nosiseptif yolların çeşitli bölgelerinde eksprese edildiği bilinmektedir (142, 143).

Önceki çalışmalar, östrojenin genomik olmayan etkiyle iyon kanal fonksiyonları ve nöronal uyarılabilirlik üzerinde etkili olabildiğini göstermiştir (144).

CAP, keskin acı biber bileşenidir, primer duyuşal nöronların belli bir alt grubu ile dorsal kök ve trigeminal gangliyon nodlarının somalarını aktive eder. (145). CAP farklı hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterir. AKG nöronları ile yapılan elektrofizyolojik çalışmalar, CAP'ın hücre içine katyonik akımları tetikleyerek nöron depolarizasyonuna sebep olduğunu göstermiştir (64). TRPV1, ağrı iletimi ve enflamasyon ile indüklenen termal hiperaljezi aktivasyonundan sorumlu tutulmuştur (61). Ağrı algılamayı sağlayan nosiseptörlerin periferik sonlanmaları üzerinde bulunan TRPV1'in modülasyonu ile somatosensöryel sistemde ağrı mesajlarının algılanması ve enflamatuar termal hiperaljezisi gelişmesi sağlanabilir. TRPV1'in çeşitli ajanlar tarafından modülasyonunun altında yatan mekanizmaların anlaşılması sayesinde, ağrının azaltılması için yeni tedavi olanakları sunulabilir (65).

AKG nöronlarının TRPV1 kanal aktivatörü CAP ile uyarılması sonucu TRPV1 kanalının açıldığını ve akım yoğunluklarının istatistiksel olarak kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğunu gözlemledik. Dolayısıyla CAP'ın TRPV1 kanal aktivasyonunda önemli olduğunu literatüre uyumlu olarak gözlemledik. Bununla beraber, CAP ile aktive olan TRPV1 kanal inhibisyonunda TRPV1 kanal antagonisti olan CPZ'nin kanalı kapatıcı rolünün olduğunu gözlemledik. Bu CPZ sonucumuzunda mevcut literatür bildirimleri ile uyumluydu.

Normal fizyolojik şartlar altında hücreşel reaksiyonlar sonucunda oluşan serbest radikaller, ROT olarak adlandırılmaktadır. ROT'lar birçok antioksidan tamponlama mekanizması tarafından etkisiz hale getirilebilmekte ve ROT'lar ile tamponlama mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması ise oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (119).

Yapılan bazı çalışmalarda OVX uygulaması da ROT üretiminin arttığı bildirilmiştir. E₂'nin antioksidan özelliğı ROT'ların zararlı etkilerinden koruduğı belirlenmiştir. Menopoz sonrası dönemde overyan E₂ salınımının azalmasıyla birlikte, oksidatif stres ve apoptozisin tetiklendiğı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (5, 6). Menopozda, sitozole kalsiyum iyon artışının periferal ağrı oluşumunun yanı

sıra, mitokondriyal depolarizasyon artışı oksidatif stres ürünlerinin daha da artmasına, ayrıca kaspaz ve apoptotik yolların uyarılmasına neden olduğu bilinmektedir (7, 8). E₂ yetersizliğinin, AKG ve hipokampus sinir hücrelerinde VGCC ve kimyasal kapılar aracılı sitozole kalsiyum iyon akışının migren ataklarına, periferel ağrıya ve epilepsi gibi sinirsel hastalıkların oluşumuna neden olduğu iyi bilinmektedir (9, 10).

Yine tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre kontrol grubuna kıyasla OVX grubunda sitozole Ca⁺² girişinin arttığı gözlemlenirken buna paralel ROT üretiminde arttığı gözlemlendi. Ca⁺² girişinin TRPV1 kanal aracılı mı olduğunu belirlemek için CAP ile inkübe edilip CPZ ile bloke edilen AKG sinir hücreleri OVX grubuna kıyasla, OVX+CPZ, OVX+E₂ ve OVX+E₂+CPZ önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi. Ayrıca, CPZ uygulanan OVX+CPZ ve OVX+E₂+CPZ gruplarının hücre içi ROT düzeylerinin sırası ile OVX ve OVX+E₂ gruplarına kıyasla önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlar TRPV1 kanal aracılı hücre içi Ca⁺² girişinin ROT üretimindeki önemini göstermiştir. Literatürde OVX uygulaması yapılmış sıçan AKG hücreleri ROT ve TRPV1 aracılı kalsiyum girişinin birlikte araştırıldığı çalışmalara rastlamadık.

E₂'nin antioksidan rolünün olduğu iyi bilinmektedir. Hatta menopoza giren kadınlarda, yaşlanmaya bağlı oksidatif stres sonucunda demansa neden olan hastalıkların oranının arttığı da bilinmektedir (146, 147). Yukarıda bahsedildiği gibi TRPV1 ve TRPM2 gibi bir kısım kanallarının aktivasyonunda oksidatif stresin rolü olduğu yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (127, 148). Menopozda, sitozole kalsiyum iyon artışının periferel ağrı oluşumunun yanı sıra, mitokondriyal depolarizasyon artışı ile; (a) oksidatif stres ürünlerinin daha da artmasına neden olduğu (b) kaspaz ve apoptotik yolların uyarılmasına neden olduğu da bilinmektedir (8, 146, 147). Voltaja duyarlı ve kimyasal kapılar aracılı sitozole kalsiyum iyon akışının migren ataklarını tetiklediği iyi bilinmektedir. E₂ düzeylerinin en aza indiği menstrual siklusta migren ataklarının arttığı bildirilmiştir. Fakat OVX sıçanlarda TRP kanal aracılı kalsiyum iyon girişinin oksidatif stres ve apoptotik yolları etkilediği konusunda bildirimler mevcut değildir. Ayrıca, antioksidan özelliğe sahip olan E₂, vücut antioksidan düzeylerini ve TRPV1 kanal aktivasyonlarını düzenleyebilir (136, 137).

Bu çalışmamızda OVX oluşturulan sıçanların AKG nöronlarının CAP ile uyarılması sonucu, hücre akım yoğunluklarının OVX oluşturulmayan gruba kıyasla önemli düzeyde yüksek olduğunu gözlemledik. Benzer şekilde hücre içi ROT üretimi ve mitokondriyal depolarizasyon düzeylerinin yüksek olduğu bu çalışmayla gösterildi. Bununla beraber, OVX oluşturulan sıçan AKG nöronlarının CAP aktivasyonu sonrası CPZ ile inhibe edilmeleri sonucunda, akım yoğunluklarının kontrol düzeylerine doğru önemli düzeyde azaldığını gözlemledik. Dahası, OVX uygulamasının hücreye TRPV1 aracılı Ca^{+2} girişinde önemli artışa sebep olduğu Ca^{+2} sinyali analizi sonuçlarıyla da gösterilmiştir.

Çalışma sonuçları ile aynı olmamakla birlikte fakat çalışma sonuçlarını destekler nitelikte, E_2 yetersizliğinin, AKG hücreleri dışındaki sinir hücrelerinde migren ataklarına, periferik ağrıya ve Alzheimer gibi sinirsel hastalıkların oluşumuna neden olduğu da iyi bilinmektedir (149-152). TRPM2 ve TRPV1 kanalları daha ziyade AKG ve hipokampus sinir hücrelerinde ekspres edilmişlerdir. Fakat OVX sıçanlarda TRP kanal aracılı kalsiyum iyon girişinin etkilendiği konusunda henüz bildirim mevcut değildir.

Yeni tanımlanmış olan TRPV1 katyon kanalının bu bağlamda OVX'li sıçanlarda nöronu ölüme götüren süreçlerde ne gibi rolünün olduğunu anlamak birçok hastalığın tedavisinde oldukça önem arz etmektedir. E_2 yetersizliği bu kanalları aktive ederek sinir hücrelerine zarar verirken, antioksidan özelliğe sahip olan E_2 , vücut antioksidan düzeylerini ve TRPV1 kanal aktivasyonlarını düzenleyerek bu süreçlerde fayda sağlayabilir.

Ovaryan hormon seviyelerinin değişiminin, sadece cinsiyet farklılaşması ve üreme üzerinde değil hafıza, duygu durumu, nöronal canlılık ve transmisyon ile birlikte ağrı duyarlılığında da önemli olduğu belirlenmiştir (94). Bu hormon seviyelerinin değişimi, fizyolojik menopoza veya ovariektomi – gonadoektomi gibi cerrahi işlemler sonucu belirgin olarak değişmektedir. İnsanlarda menopoza, östrojenin belirgin olarak eksikliğine sebep olmaktadır (95). Preklinik çalışmalarda OVX modeli, menopoza modeli olarak kullanılmaktadır.

Ovaryan hormonların ağrıyı modüle ettiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Çeşitli deneysel ağrı modellerinde OVX'in ağrı yanıtını arttırdığı (33, 100) azalttığı (101, 102) veya etkilemediği (38) yönünde raporlar vardır.

Bu bağlamda OVX ile E₂ çekilmesinin AKG hücrelerinin TRPV1 kanalı üzerindeki etkilerini araştırmayı planladığımız tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ağrı tedavisi yaklaşımlarına katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmamızda, OVX yapılan sıçanlarda AKG hücreleri patch-clamp yöntemiyle CAP ile uyarımı sonucunda, TRPV1 katyon kanallarının, kontrol kayıtlarına kıyasla çok daha fazla kanal akımlarının arttığı gözlemlenmiş olup bu bulgular konu ile ilgili literatür ile uyumludur (30).

Ayrıca OVX yapıldıktan sonra E₂ ile tedavi edilen sıçanların AKG sinir hücrelerinin (OVX+ E₂+CAP grubu) CAP ile uyarımı sonucunda, TRPV1 katyon kanallarının, (Kontrol+CAP grubu) kaydına kıyasla daha az açıldığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olan bu verilerin, E₂'nin Ca⁺² kanallarını inhibe ettiğine dair literatür bildirimleri ile uygun olduğu gözlemlendi (153).

Çalışma sonuçlarını destekler nitelikte, AKG nöron kültürünün uzun süre E₂'ye maruz bırakılmasından sonra, bu nöronlarda majör kimyasal/termal nosiseptif uyarana yanıtın azaldığı görülmüş ve bu durumun TRPV1 kanallarının inhibe edilmiş olmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (30). Benzer şekilde ATP'nin tetiklediği kalsiyum içe akışının da E₂ tarafından inhibe edildiği belirtilmiştir (30). Ayrıca Wang ve arkadaşları, sıçan kortikal sinir hücrelerinde E₂'nin voltaja duyarlı Ca⁺² kanalları üzerindeki etkilerini araştırmışlardır ve E₂'nin TRPV1 kanallarını PKC ve PKA moleküler yolları ile inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (154).

E₂ ve ağrı modülasyonu sayısız araştırmacının ilgilendiği bir konu olmuştur. Ağrı konusunun karmaşıklığı, çok-nedenli ve çok-odaklı olması, farklı ağrı türlerinin mevcudiyeti gibi nedenlerden dolayı ağrı ile ilgili çalışmalar da çok yönlü olmuştur. E₂'nin antioksidan etkilerinin yanı sıra, cinsiyet farklılığının ağrı duyarlılığı üzerindeki etkileri ile ilgili yapılan gerek insan deneylerinde gerekse hayvan deneylerinde çelişkili sonuçlar elde edilebilmiştir. Literatürde yer alan bazı raporlarda, ağrı eşiğinin dişilerde erkeklere oranla daha düşük, ağrı yanıt şiddeti ve süresinin ise erkeklerden daha yüksek olduğu; ayrıca kadınlarda kronik ağrı

sendromları sıklığının erkeklerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (3). Cinsiyete bağlı ağrı duyarlılığının farklı olmasının tek nedeninin östrojen hormonu olmayabileceği, ayrıca bu hormonun farklı tip reseptörler üzerinden birbirinden farklı etkiler oluşturduğu göz önüne alındığında bizim bulgularımızla uyuşmayan bu sonuçlar olağandır. Sıçan AKG'de CAP etkilerinin erkek cinsiyet hormonu olan testosteron tarafından hafif bir şekilde inhibe edildiği, ancak dişi cinsiyet hormonu olan E₂ tarafından ise önemli ölçüde güçlendirildiği (65), CAP deri içine enjeksiyonun doz bağımlı olarak erkek ve kadında ağrı duyarlılığını indüklediğini ve erkeklerde dişilere oranla 3-4 kat daha yüksek dozda ağrının başladığını (155) bildiren bazı çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalar birebir bizim çalışmamızla aynı olmadığından farklı sonuçların elde edilmesi de olağan karşılanabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ağrının fizyopatolojisi oldukça karmaşıktır, ağrının nedeninin belirlenmesi, doğru tedavi yaklaşımlarının bulunması ve uygulanan tedavilerin etkin bir şekilde sürdürülebilmesinde de zorluklar yaşanmaktadır. TRPV1'in ağrının belirlenmesi ve modülasyonundaki önemli rolleri nedeniyle, bu kanalların ağrı tedavisinde yeni ve etkili hedefler olabileceği öngörülmekte ve çok sayıda araştırmacıyı bu konuya yönlendirmektedir. Günümüze dek yapılan çalışmalarla bu kanalları hedef alan prelinik ve klinik tedavi modellerinde elde edilen veriler TRPV1 kanallarının gerek rahatsız edici iç ve dış etkenlere bağlı olan ağrılarda, gerekse inflamatuvar ve nörojenik yangı sonucu oluşan ağrılarda etkili sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. TRPV1 kanallarını aktive eden faktörlerin daha detaylı olarak belirlenmesi, bu kanalların etkili bir şekilde modüle edilmesi, tedavi edici etkinliği güçlü yeni ajanlar geliştirilmesi veya geliştirilen ajanların güçlendirilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında sonuçlar incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla OVX grubunda hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, OVX uygulamasının hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerini arttırdığı ve bu artışın TRPV1 kanalları aracılığı ile gerçekleştiği gözlemlendi. Bu tez çalışmasında OVX uygulaması yapılan sıçanlarda E_2 tedavisinin, oksidatif stres, kalsiyum sinyali, hücre içi ROT üretimi üzerinde nasıl bir etkisi olduğunu ve TRPV1 kanallarının bu etkideki rolünü gösterdik.

TRPV1 kanalları yüksek ısı ve oksidatif stresle aktive oldukları iyi bilinmesine rağmen, bizim yaptığımız literatür taramalarında, OVX uygulaması yapılan sıçanların AKG nöronlarında sitozole Ca^{+2} girişi ve bu Ca^{+2} girişinde TRPV1 kanalları arasındaki etkileşime dair bir bildirim mevcut değildi. Bu çalışmamızda, oksidatif strese bağlı sitozole Ca^{+2} akışında TRPV1 kanallarının da rolünün olduğu gözlemlendi.

Bu sonuçlara göre OVX uygulamasıyla TRPV1 kanallarının aktive olduğu gözlemlendi. Çalışmada Ca^{+2} ve hücre içi ROT sonuçları incelendiğinde uyum içerisinde olduğu gözlenmektedir. Diğer bir ifadeyle, hücre içi aşırı Ca^{+2} iyon akışının ROT üretimini artırdığı ve hücre ölümünü tetiklediği gözlemlendi.

Kalsiyum homeostazının bozulması önemli hücre yolaklarının işlevlerinin değişmesine ve nekrotik ya da apoptotik hücre ölümü veya karsinogenez ile sonuçlanan durumlara neden olmaktadır. TRPV1 kanallarının ve tüm TRP üst ailesinin fizyolojik olmayan durumlarda aktive olduğu ve özellikle Ca^{+2} hücre içi akışına neden olarak dengenin bozulmasına yol açtığı göz önüne alındığında bu kanalların daha fazla araştırılması gerektiği açıkça görülmektedir.

Bu kanalların önemi, günümüzde bilinen voltaja duyarlı Ca^{+2} kanal blokerlerinin hiçbiri bu kanalları inhibe edememektedir. Bu kanalların fonksiyonu bozulacak olursa hücre içi Ca^{+2} miktarı patolojik düzeylerde seyredip hücrenin ölümüne sebebiyet verebilmektedir. Konuya bu noktadan bakılacak olursa, bu kanallar üzerine yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Çünkü bunların düzenlenmesi veya patolojik durumdan fizyolojik duruma döndürülmesi, nöropatik ağrı tedavisine büyük katkı sağlayacağı bilim insanları tarafından düşünülmektedir.

Bu çalışmada, E_2 tedavisinin AKG sinir hücrelerinde TRPV1 kanalları aracılığıyla Ca^{+2} girişini nasıl etkilediği ve E_2 'nin AKG sinir harabiyetini önlemedeki ve periferik TRPV1 kanal ağrı yolağı üzerindeki rolü deneysel menopoz modelinde patch-clamp tekniği kullanılarak araştırıldı.

Sonuç olarak, sıçan AKG hücrelerinde E_2 uygulaması ile OVX'in neden olduğu TRPV1 katyon kanal aktivasyonu ve dolayısıyla TRPV1 aracılı katyon kanal akımları azaltılmıştır. Elde edilen bu bulgular, E_2 'nin TRPV1 kanallarının aktivasyonunu azaltıp Ca^{+2} girişini düzenleyerek gerçekleştirebildiğini gösterdiği için önemlidir. OVX'in neden olduğu TRPV1 aktivasyonu üzerindeki bu inhibitör etkisi nedeniyle, E_2 OVX kaynaklı AKG hasarı ve ağrı için güçlü bir farmakolojik hedef olarak dikkate alınabilir. Ayrıca E_2 tedavisinin nöroprotektif etkisi nedeniyle deneysel bir menopoz modeli olan OVX'in indüklediği nöronal ölümü önlediği önerilebilmekle birlikte bu konuda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Arka kök gangliyon (AKG) hücrelerine aşırı kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) girişi, periferik ağrıyı tetikler. AKG nöronlarında çok miktarda eksprese edilen transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), Ca^{+2} için geçirgen bir katyon kanalıdır. Bu kanallar AKG hücrelerinde oksidatif stres ve kapsaisini (CAP) de içeren farklı uyarılarla aktive edilebilir. 17β -estradiol (E_2)'nin beyinde nörolojik sistem üzerinde antioksidan etkilere sahip olduğu iyi bilinmektedir. Sıçanların sinir hücrelerinde E_2 'nin voltaj kapılı kalsiyum kanallarını güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bağlamda antioksidan E_2 , güçlü bir TRPV1 kanal antagonisti olarak ovariektomi uygulanan sıçanların AKG hücrelerine Ca^{+2} girişini bu kanal aracılığıyla düzenleyebileceği düşünüldüğünden bu çalışmada ovariektomi (OVX) uygulanan sıçanların primer AKG hücre kültüründe, hücre içine Ca^{+2} girişi ile ilgili E_2 'nin etkileri path-clamp tekniği ile araştırılmıştır.

Otuz dört adet dişi sıçan rastgele üç gruba ayrıldı. Birinci grup (n=10) kontrol grubu, ikinci grup (n=12) OVX uygulanan grup olarak belirlenirken, üçüncü gruba (n=12) OVX uygulamasından sonra, 14 gün süreyle deri altına (80 μ g/kg/gün) E_2 verildi. Tüm deneylerin tamamlanmasının ardından, üç deney grubunun primer AKG hücrelerinin whole cell patch-clamp tekniğiyle kayıtları alındı. Ayrıca bu hücrelerde hücre içi ROT üretimi ve mitokondriyal depolarizasyon düzeyleri analiz edildi.

Kapsazepin (CPZ), TRPV1'e özgü reseptör antagonisti iken, CAP TRPV1'e özgü reseptör agonistidir. TRPV1 reseptörünün AKG'de Ca^{+2} birikimine katıldığını göstermek amacıyla AKG hücreleri, CAP ile uyarılırken CPZ ile inhibe edildi. CAP normal AKG hücrelerinde bir akımı indükledi, patch çemberi medyumuna CAP ilavesini takiben artan şiddette 0.52 nA üzerinde akımlar aşamalı olarak gelişti (0.83 \pm 0.20 dakika). Akım CPZ ve NMDG⁺ tarafından geri dönüşümlü ve kısmi olarak bloke edildi. CAP yokluğunda akım oluşmadığını gözlemlendi. AKG hücrelerinde akım yoğunlukları kontrol+CAP ve OVX+CAP gruplarında CPZ uygulamasıyla önemli derecede (p<0.001) azaldı. OVX grubunda akım yoğunlukları OVX+ E_2 grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede (p<0.001) daha yüksek bulundu. Ek olarak, OVX'in indüklediği hücre içi ROT üretimi ve mitokondriyal depolarizasyonun

tamamen azaldığı belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları, sıçanların AKG hücrelerinde OVX nedeni ile artan TRPV1 kanal aktivasyonu aracılığıyla yükselen akımların, E₂ uygulamasıyla azaldığını göstermiştir. Elde edilen bu bulgular, OVX sonucu oluşan ROT ve oksidatif stres ajanların nöronal ölüm ve periferik ağrının oluşumunu tetiklediği, E₂ uygulamasının Ca⁺² girişi üzerinde etki etmesi açısından büyük öneme sahiptir. OVX kaynaklı TRPV1 aktivasyonu üzerindeki inhibitör etkisi ile AKG hasarlarının ve ağrının azaltılmasında E₂ potansiyel farmakolojik hedef olarak düşünülmelidir.

Anahtar Kelimeler: Östrojen; Arka Kök Ganglion; Ovariectomi; Ağrı; Patch-clamp

ABSTRACT

Overload calcium ion (Ca^{2+}) entry into dorsal root ganglion (DRG) neuron induce peripheral pain. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) is Ca^{2+} permeable cation channels and they are many expressed in DRG. The channel is activated in the DRG by different stimuli including oxidative stress and capsaicin (CAP). It is well known that 17β -estradiol (E_2) has an antioxidant role on neurological systems in the brain. E_2 was recently demonstrated to potently inhibit voltage gated calcium channels in the neurons of rats. Therefore, it is hypothesized that antioxidant E_2 as a potent TRPV1 channel antagonist may modulate Ca^{2+} entry via TRPV1 channel in the DRG of ovariectomized (OVX) rats. Hence, in the current study, we investigated the neuroprotective properties of E_2 in primary DRG neuron cultures of OVX rats by using patch-clamp technique.

Thirty-four female rats were divided into three groups. The first group (n=10) was used as a control group. The second group was the OVX group (n=12) although the third was OVX+ E_2 (n=12). E_2 (80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) was given subcutaneously to the third group for 14 days after the ovariectomy. At the end of the experiments, whole cell patch-clamp experiments were performed in the primary DRG of three groups. Intracellular ROS production and mitochondrial depolarization levels were analyzed in cells also.

Capsazepine (CPZ) is a specific TRPV1 receptor-antagonist although capsaicin is TRPV1 receptor-agonist. In order to identify the TRPV1 receptor involved in Ca^{2+} accumulation in the DRG neurons, they were stimulated by capsaicin (CAP) although they were inhibited by CPZ. CAP induced a current in native DRG neurons. Reaching amplitudes of well above 0,52 nA, the currents induced by CAP developed gradually (0.83 ± 0.20 minute) following the addition of CAP to the patch chamber medium. These currents were reversibly and partially blocked by CPZ and NMDG^+ . We observed no current in the absence of CAP. Current densities and cytosolic Ca^{2+} accumulation the neurons of the DRG neurons were significantly ($p < 0.001$) decreased in the control+CAP and OVX+CAP groups by CPZ treatments. The current densities and cytosolic Ca^{2+} accumulation were also

significantly ($p < 0.001$) lower in the OVX+E₂ group compared to the OVX-only group. In addition, E₂ completely reduced ovariectomy-induced intracellular ROS production and mitochondrial membrane depolarization.

In conclusion, results of current study suggest that OVX-induced intracellular Ca²⁺ signaling and mitochondrial oxidative stress through activation of TRPV1 channels is decreased in the DRG neurons of rats by E₂ treatment. These findings hold particular significance and may provide an explanation for OVX-induced neuronal death and peripheral pain and E₂ treatment may account for their Ca²⁺ entry. Its inhibitory effect on OVX-induced TRPV1 activation should be considered a potential pharmacological target for itching caused by OVX-mediated activation of pain and DRG oxidative injuries.

Key Words: Estrogen; Dorsal root ganglion; Ovariectomy; Pain; Patch-clamp.

KAYNAKLAR

1. Chakrabarti M, Das A, Samantaray S, Smith JA, Banik NL, Haque A, et al. Molecular mechanisms of estrogen for neuroprotection in spinal cord injury and traumatic brain injury. *Rev Neurosci*. 2016;27(3):271-81.
2. Engler-Chiurazzi EB, Singh M, Simpkins JW. From the 90's to now: A brief historical perspective on more than two decades of estrogen neuroprotection. *Brain research*. 2016;1633:96-100.
3. Craft RM. Modulation of pain by estrogens. *Pain*. 2007;132 Suppl 1:S3-12.
4. Amandusson A, Blomqvist A. Estrogenic influences in pain processing. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2013;34(4):329-49.
5. Moreira PI, Custodio JB, Nunes E, Oliveira PJ, Moreno A, Seica R, et al. Mitochondria from distinct tissues are differently affected by 17beta-estradiol and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;123(1-2):8-16.
6. Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM, Jr., Valencia T, et al. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(12):4130-5.
7. Lamas AZ, Caliman IF, Dalpiaz PL, de Melo AF, Jr., Abreu GR, Lemos EM, et al. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. *Life sciences*. 2015;124:101-9.
8. Dilek M, Naziroglu M, Baha Oral H, Suat Ovey I, Kucukayaz M, Mungan MT, et al. Melatonin modulates hippocampus NMDA receptors, blood and brain oxidative stress levels in ovariectomized rats. *The Journal of membrane biology*. 2010;233(1-3):135-42.
9. Ripa P, Ornello R, Degan D, Tiseo C, Stewart J, Pistoia F, et al. Migraine in menopausal women: a systematic review. *Int J Womens Health*. 2015;7:773-82.
10. Zhang Y, Huang Y, Liu X, Wang G, Wang X, Wang Y. Estrogen suppresses epileptiform activity by enhancing Kv4.2-mediated transient outward potassium currents in primary hippocampal neurons. *Int J Mol Med*. 2015;36(3):865-72.
11. Takahashi N, Kozai D, Mori Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front Physiol*. 2012;3:324.
12. Naziroglu M, Cig B, Ozgul C. Neuroprotection Induced by N-Acetylcysteine against Cytosolic Glutathione Depletion-Induced Ca(2+) Influx in Dorsal Root Ganglion Neurons of Mice: Role of Trpv1 Channels. *Neuroscience*. 2013;242:151-60.
13. Targos B, Baranska J, Pomorski P. Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells. *Acta biochimica Polonica*. 2005;52(2):397-409.
14. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Inc. 2006;11th ed.
15. Kim E, M. Susan, Scott B, Heddwen L. *Ganong'un Review of Medical Physiology*. New York McGraw-Hill. 2011;23th Ed:416-18.
16. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Human reproduction update*. 2000;6(3):225-36.
17. Shaw ND, Histed SN, Srouji SS, Yang J, Lee H, JE. H. Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(4):1955-61.
18. Genazzani AR BF. Estrogen effects on neuroendocrine function: the new challenge of pulsed therapy. *Climacteric*. 2002;5(Suppl 2):50-6.
19. Berridge MJ BM, Roderick HL. . Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev. Mol Cell Biol*. 2003;4(7):517-29.

20. Rossetti MF, Cambiasso MJ, Holschbach MA, Cabrera R. Estrogens and progestagens: synthesis and action in the brain. *J Neuroendocrinol.* 2016.
21. Yankova M, Hart SA, Woolley CS. Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(6):3525-30.
22. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(2):703-8.
23. McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behavioral neuroscience.* 2012;126(1):4-16.
24. Moreira PI, Custodio JB, Oliveira CR, Santos MS. Brain mitochondrial injury induced by oxidative stress-related events is prevented by tamoxifen. *Neuropharmacology.* 2005;48(3):435-47.
25. Moreira PI, Custodio JB, Nunes E, Moreno A, Seica R, Oliveira CR, et al. Estradiol affects liver mitochondrial function in ovariectomized and tamoxifen-treated ovariectomized female rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;221(1):102-10.
26. Yu X, Rajala RV, McGinnis JF, Li F, Anderson RE, Yan X, et al. Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(13):13086-94.
27. Altmann JB, Yan G, Meeks JF, Abood ME, Brailoiu E, Brailoiu GC. G protein-coupled estrogen receptor-mediated effects on cytosolic calcium and nanomechanics in brain microvascular endothelial cells. *J Neurochem.* 2015;133(5):629-39.
28. Doshi SB, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause. *J Midlife Health.* 2013;4(3):140-6.
29. Naziroglu M, Simsek M, Kutlu M. Moderate exercise with a dietary vitamin C and E combination protects against streptozotocin-induced oxidative damage to the blood and improves fetal outcomes in pregnant rats. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(5):511-7.
30. Xu S, Cheng Y, Keast JR, Osborne PB. 17beta-estradiol activates estrogen receptor beta-signalling and inhibits transient receptor potential vanilloid receptor 1 activation by capsaicin in adult rat nociceptor neurons. *Endocrinology.* 2008;149(11):5540-8.
31. Martin VT, Behbehani M. Ovarian hormones and migraine headache: understanding mechanisms and pathogenesis--part I. *Headache.* 2006;46(1):3-23.
32. Lee DT, Chai YG, Lee EB, Kim KW, Nah SY, Oh TH, et al. 17b-Estradiol inhibits high-voltage-activated calcium channel currents in rat sensory neurons via a non-genomic mechanism. *Life sciences.* 2002;70:2047-59.
33. Sanoja R, Cervero F. Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. *European journal of pain.* 2008;12(5):573-81.
34. Sanoja R, Cervero F. Estrogen-dependent abdominal hyperalgesia induced by ovariectomy in adult mice: a model of functional abdominal pain. *Pain.* 2005;118(1-2):243-53.
35. Fischer L, Torres-Chavez KE, Clemente-Napimoga JT, Jorge D, Arsati F, de Arruda Veiga MC, et al. The influence of sex and ovarian hormones on temporomandibular joint nociception in rats. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society.* 2008;9(7):630-8.
36. Mannino CA, South SM, Quinones-Jenab V, Inturrisi CE. Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society.* 2007;8(4):334-42.
37. Forman LJ, Tingle V, Estilow S, Cater J. The response to analgesia testing is affected by gonadal steroids in the rat. *Life sciences.* 1989;45(5):447-54.

38. Beatty WW, Fessler RG. Gonadectomy and sensitivity to electric shock in the rat. *Physiology & behavior*. 1977;19(1):1-6.
39. Gaumont I, Arsenault P, Marchand S. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain research*. 2002;958(1):139-45.
40. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003;426(6966):517-24.
41. Minke B, Cook B. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological reviews*. 2002;82(2):429-72.
42. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2005;2005(272):re3.
43. Naziroglu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochemical research*. 2011;36(3):355-66.
44. Ozgül C, Naziroglu M. Role of TRPM2 cation channels on molecular pathways in neurological cells. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2010;27,144-151.
45. Feng Z, Pearce LV, Xu X, Yang X, Yang P, Blumberg PM, et al. Structural Insight into Tetrameric hTRPV1 from Homology Modeling, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulation, Virtual Screening, and Bioassay Validations. *Journal of chemical information and modeling*. 2015.
46. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(11):7461-6.
47. Dietrich A, Chubanov V, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T. Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;112(3):744-60.
48. Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends in pharmacological sciences*. 2002;23(4):183-91.
49. Benham CD, Davis JB, Randall AD. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology*. 2002;42(7):873-88.
50. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell calcium*. 2005;38(3-4):233-52.
51. Beech DJ, Muraki K, Flemming R. Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. *The Journal of physiology*. 2004;559(Pt 3):685-706.
52. Iwata Y, Katanosaka Y, Arai Y, Komamura K, Miyatake K, Shigekawa M. A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *The Journal of cell biology*. 2003;161(5):957-67.
53. O'Neil RG, Heller S. The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2005;451(1):193-203.
54. Nilius B, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T. TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;286(2):C195-205.
55. Nilius B, Voets T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2005;451(1):1-10.
56. den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell calcium*. 2003;33(5-6):497-507.
57. Zhang Y, Xiang B, Li YM, Wang Y, Wang X, Wang YN, et al. Expression and characteristics of vanilloid receptor 1 in the rabbit submandibular gland. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;345(1):467-73.

58. McIntyre P, McLatchie LM, Chambers A, Phillips E, Clarke M, Savidge J, et al. Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br J Pharmacol.* 2001;132(5):1084-94.
59. Karai LJ, Russell JT, Iadarola MJ, Olah Z. Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(16):16377-87.
60. Marshall IC, Owen DE, Cripps TV, Davis JB, McNulty S, Smart D. Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores. *Br J Pharmacol.* 2003;138(1):172-6.
61. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitl KR, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 2000;288(5464):306-13.
62. Szallasi A. Vanilloid receptor ligands: hopes and realities for the future. *Drugs & aging.* 2001;18(8):561-73.
63. Szallasi A, Blumberg PM. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life sciences.* 1990;47(16):1399-408.
64. Heyman I, Rang HP. Depolarizing responses to capsaicin in a subpopulation of rat dorsal root ganglion cells. *Neuroscience letters.* 1985;56(1):69-75.
65. Chen SC, Liu BC, Chen CW, Wu FS. Intradermal pregnenolone sulfate attenuates capsaicin-induced nociception in rats. *Biochemical and biophysical research communications.* 2006;349(2):626-33.
66. Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature chemical biology.* 2006;2(11):596-607.
67. Ovey IS, Naziroglu 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;284:225-33.
68. Adcock JJ. TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes. *Pulmonary pharmacology & therapeutics.* 2009;22(2):65-70.
69. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 1998;21(3):531-43.
70. Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual review of neuroscience.* 2001;24:487-517.
71. Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, et al. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2006;26(37):9385-93.
72. Szallasi A, Szabo T, Biro T, Modarres S, Blumberg PM, Krause JE, et al. Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. *Br J Pharmacol.* 1999;128(2):428-34.
73. Ferreira J, da Silva GL, Calixto JB. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol.* 2004;141(5):787-94.
74. Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM, et al. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2005;314(1):410-21.
75. Martonosi AN, Pikula S. The network of calcium regulation in muscle. *Acta biochimica Polonica.* 2003;50(1):1-30.
76. Berridge MJ. The versatility and complexity of calcium signalling. *Novartis Foundation symposium.* 2001;239:52-64; discussion -7, 150-9.

77. Saygin M, Naziroğlu M. Role of TRPM cation channels on molecular Ca²⁺ signaling pathways in heart. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2011;29:83-90.
78. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(1):11-21.
79. Kumar A, Kumari S, Majhi RK, Swain N, Yadav M, Goswami C. Regulation of TRP channels by steroids: Implications in physiology and diseases. *General and comparative endocrinology*. 2014.
80. Summ O, Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. TRPV1 receptor blockade is ineffective in different in vivo models of migraine. *Cephalalgia : an international journal of headache*. 2011;31(2):172-80.
81. Ghazizadeh V, Naziroglu 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):787-99.
82. De Petrocellis L, Harrison S, Bisogno T, Tognetto M, Brandi I, Smith GD, et al. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem*. 2001;77(6):1660-3.
83. Cig B, Naziroglu M. Investigation of the effects of distance from sources on apoptosis, oxidative stress and cytosolic calcium accumulation via TRPV1 channels induced by mobile phones and Wi-Fi in breast cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2015.
84. Kose SA, Naziroglu M. Selenium Reduces Oxidative Stress and Calcium Entry Through TRPV1 Channels in the Neutrophils of Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Biol Trace Elem Res*. 2014;158(2):136-42.
85. Steenland HW, Ko SW, Wu LJ, Zhuo M. Hot receptors in the brain. *Molecular pain*. 2006;2:34.
86. Feng NH, Lee HH, Shiang JC, Ma MC. Transient receptor potential vanilloid type 1 channels act as mechanoreceptors and cause substance P release and sensory activation in rat kidneys. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;294(2):F316-25.
87. Vyklícký L, Lyfenko A, Kuffler DP, Vlachova V. Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly. *Neuroreport*. 2003;14(7):1061-5.
88. Kilo S, Harding-Rose C, Hargreaves KM, Flores CM. Peripheral CGRP release as a marker for neurogenic inflammation: a model system for the study of neuropeptide secretion in rat paw skin. *Pain*. 1997;73(2):201-7.
89. Yee JR, Kenkel W, Caccaviello JC, Gamber K, Simmons P, Nedelman M, et al. Identifying the integrated neural networks involved in capsaicin-induced pain using fMRI in awake TRPV1 knockout and wild-type rats. *Frontiers in systems neuroscience*. 2015;9:15.
90. Moylan Governo RJ, Morris PG, Prior MJ, Marsden CA, Chapman V. Capsaicin-evoked brain activation and central sensitization in anaesthetised rats: a functional magnetic resonance imaging study. *Pain*. 2006;126(1-3):35-45.
91. Starowicz K, Maione S, Cristino L, Palazzo E, Marabese I, Rossi F, et al. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(50):13739-49.
92. Palazzo E, Rossi F, Maione S. Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008;286(1-2 Suppl 1):S79-83.
93. Palazzo E, Luongo L, de Novellis V, Berrino L, Rossi F, Maione S. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Molecular pain*. 2010;6:66.
94. Li LH, Wang ZC, Yu J, Zhang YQ. Ovariectomy results in variable changes in nociception, mood and depression in adult female rats. *Plos One*. 2014;9(4):e94312.
95. Zhao H, Tian Z, Feng Y, Chen B. Circulating estradiol and hypothalamic corticotrophin releasing hormone enhances along with time after ovariectomy in rats: effects of electroacupuncture. *Neuropeptides*. 2005;39(4):433-8.

96. MacGregor EA. Migraine headache in perimenopausal and menopausal women. *Curr Pain Headache Rep.* 2009;13(5):399-403.
97. Yi H, Bao X, Tang X, Fan X, Xu H. Estrogen modulation of calretinin and BDNF expression in midbrain dopaminergic neurons of ovariectomised mice. *J Chem Neuroanat.* 2016;77:60-7.
98. Macgregor EA. Menstrual migraine: therapeutic approaches. *Therapeutic advances in neurological disorders.* 2009;2(5):327-36.
99. Allais G, Bussone G, De Lorenzo C, Castagnoli Gabellari I, Zonca M, Mana O, et al. Naproxen sodium in short-term prophylaxis of pure menstrual migraine: pathophysiological and clinical considerations. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology.* 2007;28 Suppl 2:S225-8.
100. Ma B, Yu LH, Fan J, Cong B, He P, Ni X, et al. Estrogen modulation of peripheral pain signal transduction: involvement of P2X(3) receptors. *Purinergic Signal.* 2011;7(1):73-83.
101. Ji Y, Murphy AZ, Traub RJ. Estrogen modulates the visceromotor reflex and responses of spinal dorsal horn neurons to colorectal stimulation in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2003;23(9):3908-15.
102. Krzanowska EK, Bodnar RJ. Morphine antinociception elicited from the ventrolateral periaqueductal gray is sensitive to sex and gonadectomy differences in rats. *Brain research.* 1999;821(1):224-30.
103. Bradshaw HB, Berkley KJ. Estrogen replacement reverses ovariectomy-induced vaginal hyperalgesia in the rat. *Maturitas.* 2002;41(2):157-65.
104. Ceccarelli I, Fiorenzani P, Massafra C, Aloisi AM. Long-term ovariectomy changes formalin-induced licking in female rats: the role of estrogens. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:24.
105. Sakmann B, Neher E. .Single channel recording. Plenum, New York. 1983.
106. Neher E, Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am.* 1992;266(3):44-51.
107. Purali N. Hücre Elektrofizyolojisi ve Görüntülemenin Temelleri. *Veri Medikal Yayınları.* 2008.
108. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 1981;391(2):85-100.
109. Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual review of physiology.* 1984;46:455-72.
110. Davie JT, Kole MH, Letzkus JJ, Rancz EA, Spruston N, Stuart GJ, et al. Dendritic patch-clamp recording. *Nature protocols.* 2006;1(3):1235-47.
111. Chen K, Featherstone DE, Broadie K. Electrophysiological recording in the *Drosophila* embryo. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2009(27).
112. Molleman A. *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology.* England: West Sussex, John Wiley & Sons Ltd. 2003.
113. Wilders R. Dynamic clamp: a powerful tool in cardiac electrophysiology. *The Journal of physiology.* 2006;576(Pt 2):349-59.
114. Monen SH, Schmidt PH, Wondergem R. Membrane potassium channels and human bladder tumor cells. I. Electrical properties. *The Journal of membrane biology.* 1998;161(3):247-56.
115. Quinn K, Beech DJ. A method for direct patch-clamp recording from smooth muscle cells embedded in functional brain microvessels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 1998;435(4):564-9.
116. Sakmann B, Neher E. *Single-Channel Recording.* 2nd Ed., Newyork: Springer. 2009.
117. Garudadri S, Gallarda B, Pfaff S, Alaynick W. Spinal cord electrophysiology II: extracellular suction electrode fabrication. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2011(48).

118. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd Ed., Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 1992.
119. Naziroglu M, Ozgul C, Celik O, Cig B, Sozbir E. Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca²⁺ influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. *The Journal of membrane biology*. 2011;241(2):69-75.
120. Kuba T, Wu HB, Nazarian A, Festa ED, Barr GA, Jenab S, et al. Estradiol and progesterone differentially regulate formalin-induced nociception in ovariectomized female rats. *Horm Behav*. 2006;49(4):441-9.
121. Yazgan B, Yazgan Y, Ovey IS, Naziroglu M. Raloxifene and Tamoxifen Reduce PARP Activity, Cytokine and Oxidative Stress Levels in the Brain and Blood of Ovariectomized Rats. *J Mol Neurosci*. 2016.
122. Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol*. 2008;153(6):1324-30.
123. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(6):3440-50.
124. Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*. 1988;75(7):354-5.
125. Uguz AC, Naziroglu M. Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress. *Neurochemical research*. 2012;37(8):1631-8.
126. Bejarano I, Espino J, Gonzalez-Flores D, Casado JG, Redondo PC, Rosado JA, et al. Role of Calcium Signals on Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells. *Int J Biomed Sci*. 2009;5(3):246-56.
127. Kahya MC, Naziroglu M, Ovey IS. Modulation of Diabetes-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca²⁺ Entry Through TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion and Hippocampus of Diabetic Rats by Melatonin and Selenium. *Mol Neurobiol*. 2016.
128. Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *The Journal of membrane biology*. 2009;232(1-3):15-23.
129. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989;2(4):1313-23.
130. Clapham DE. SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell*. 2007;129(1):220.
131. Gunthorpe MJ, Chizh BA. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug discovery today*. 2009;14(1-2):56-67.
132. Bevan S, Quallo T, Andersson DA. Trpv1. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;222:207-45.
133. Chou MZ, Mtui T, Gao YD, Kohler M, Middleton RE. Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain. *Biochemistry*. 2004;43(9):2501-11.
134. Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, et al. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(19):20283-95.
135. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2008;118(3):337-51.
136. Naderi A, Asgari AR, Zahed R, Ghanbari A, Samandari R, Jorjani M. Estradiol attenuates spinal cord injury-related central pain by decreasing glutamate levels in thalamic VPL nucleus in male rats. *Metab Brain Dis*. 2014;29(3):763-70.
137. Wang Q, Cao J, Hu F, Lu R, Wang J, Ding H, et al. Effects of estradiol on voltage-gated sodium channels in mouse dorsal root ganglion neurons. *Brain research*. 2013;1512:1-8.

138. Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;274(1-2):1-7.
139. Beckett EA, McCloskey C, O'Kane N, Sanders KM, Koh SD. Effects of female steroid hormones on A-type K⁺ currents in murine colon. *The Journal of physiology.* 2006;573(Pt 2):453-68.
140. Micevych PE, Dewing P. Membrane-initiated estradiol signaling regulating sexual receptivity. *Frontiers in endocrinology.* 2011;2:26.
141. Zhang Y, Lu N, Zhao ZQ, Zhang YQ. Involvement of estrogen in rapid pain modulation in the rat spinal cord. *Neurochemical research.* 2012;37(12):2697-705.
142. Takanami K, Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Prossnitz ER, et al. Expression of G protein-coupled receptor 30 in the spinal somatosensory system. *Brain research.* 2010;1310:17-28.
143. Taleghany N, Sarajari S, DonCarlos LL, Gollapudi L, Oblinger MM. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res.* 1999;57(5):603-15.
144. Vasudevan N, Pfaff DW. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Frontiers in neuroendocrinology.* 2008;29(2):238-57.
145. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological reviews.* 1999;51(2):159-212.
146. Grimm A, Lim YA, Mensah-Nyagan AG, Gotz J, Eckert A. Alzheimer's disease, oestrogen and mitochondria: an ambiguous relationship. *Mol Neurobiol.* 2012;46(1):151-60.
147. Sandhir R, Sethi N, Aggarwal A, Khera A. Coenzyme Q10 treatment ameliorates cognitive deficits by modulating mitochondrial functions in surgically induced menopause. *Neurochem Int.* 2014;74:16-23.
148. Ogawa N, Kurokawa T, Fujiwara K, Polat OK, Badr H, Takahashi N, et al. Functional and Structural Divergence in Human TRPV1 Channel Subunits by Oxidative Cysteine Modification. *The Journal of biological chemistry.* 2016;291(8):4197-210.
149. Chen BL, Li YQ, Xie DH, He QL, Yang XX. Blocking TNF-alpha with infliximab alleviates ovariectomy induced mechanical and thermal hyperalgesia in rats. *Neurol Sci.* 2012;33(3):527-33.
150. Shivers KY, Amador N, Abrams L, Hunter D, Jenab S, Quinones-Jenab V. Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Cytokine.* 2015;72(2):121-9.
151. Wang C, Zhang F, Jiang S, Siedlak SL, Shen L, Perry G, et al. Estrogen receptor-alpha is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2016;6:20352.
152. Tschiffely AE, Schuh RA, Prokai-Tatrai K, Prokai L, Ottinger MA. A comparative evaluation of treatments with 17beta-estradiol and its brain-selective prodrug in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Horm Behav.* 2016;83:39-44.
153. Sanchez JC, Lopez-Zapata DF, Pinzon OA. Effects of 17beta-estradiol and IGF-1 on L-type voltage-activated and stretch-activated calcium currents in cultured rat cortical neurons. *Neuro Endocrinol Lett.* 2014;35(8):724-32.
154. Wang Q, Ye Q, Lu R, Cao J, Wang J, Ding H, et al. Effects of estradiol on high-voltage-activated Ca(2+) channels in cultured rat cortical neurons. *Endocrine research.* 2014;39(2):44-9.
155. Lu YC, Chen CW, Wang SY, Wu FS. 17Beta-estradiol mediates the sex difference in capsaicin-induced nociception in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2009;331(3):1104-10.

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

BEYAN

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

Tezi Hazırlayan

Yener YAZĞAN

İmza

Danışman

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

İmza

EKLER:**Özgeçmiş****Kişisel Bilgiler**

Adı	Yener	Soyadı	Yazğan
Doğ. Yeri	İstanbul	Doğ. Tarihi	24.04.1975
Uyruğu	T.C.	Tel	0 246 211 3654
e-mail	yener8275@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Old. Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora		
Yük. Lis.		
Lisans	Dicle Üni. Fen-Edebiyat Fak. Fizik Bölümü	2001
Lise	Atatürk Lisesi - Diyarbakır	1993

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre

Yabancı Dilleri	ÜDS/KPDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Orta (40)	

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

Yayınlar:

1. Yazğan B, **Yazğan Y.** Importance of Relationship Metallothioneins and Zinc on the Antioxidant Redox System. Med J SDU / SDÜ Tıp Fak. Dergisi [Epub ahead of print].
2. Yazğan B, **Yazğan Y**, Nazıroğlu M. Importance of TRPV1 Cation Channel on Molecular Pathways of Pain. Fırat Tıp Derg/Fırat Med J 2016; 21(1): 1-10

3. Yazgan B, **Yazgan Y**, Övey İ.S, Nazıroğlu M. Raloxifene and tamoxifen reduce PARP activity, cytokine and oxidative stress levels in the brain and blood of ovariectomized rats. Journal of Molecular Neuroscience. [Epub ahead of print].

Bildiriler;

1. Nazıroğlu M, **Yazgan Y**, Yazgan B. Selenium and TRPV1 channels are lacking role on calcium accumulation in trigeminal ganglion of diabetic rats: A patch-clamp study. Cell Membranes and Free Radical Research 2014, 6; 396-97.
2. **Yazgan Y**, Nazıroğlu M, Yazgan B. The Effect of Estrogen on TRPV1 Cation Channel in Rat Hippocampus Cells. Sakarya Medical Journal 2014; 76
3. **Yazgan Y**, Yazgan B, Övey İ.S, Nazıroğlu M. Raloxifene and tamoxifen reduces oxidative stress in brain of ovariectomized rats. Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress 2015, 7; 426.
4. Yazgan B, **Yazgan Y**, Övey İ.S, Nazıroğlu M. Protective effect of tamoxifen and raloxifene on oxidative stress in liver, heart and kidney of ovariectomized rats. Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress 2015, 7; 428.
5. **Yazgan Y**, Nazıroğlu M. Modulator role of non-steroidal selective estrogen receptor modulators on TRPM2 and TRPV1 channels in the hippocampus and dorsal root ganglion neurons of ovariectomized rats: Patch-clamp results. Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress 2016, 8; 567.
6. **Yazgan Y**, Nazıroğlu M. Effects of estradiol, raloxifene and tamoxifen on caspase, PARP, TRPM2 and TRPV1 channel expression in hippocampus of ovariectomized rats. Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress 2016, 8; 579.

Sertifikalar;

1. Süleyman Demirel Üniversitesi 1. Bilimsel Araştırmalar Kursu – Isp. - 2013
2. Elektrofizyoloji Kursu, Süleyman Demirel Üniversitesi – Isparta – 2014
3. Hücre Kültürü Kursu, Süleyman Demirel Üniversitesi – Isparta - 2014
4. Western Blot Kursu, Süleyman Demirel Üniversitesi – Isparta – 2014

5. Uluslararası Beyin Araştırmaları Okulu - Isparta – 2015
6. Optogenetik Kursu, Medipol Üniversitesi – İstanbul – 2015

Ödüller:

1. **Yazğan Y.**, Yazğan B., Övey İ.S., Nazıroğlu M. Raloxifene and tamoxifen reduces oxidative stress in brain of ovariectomized rats. Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress 2015, 7; 426. 1st International Brain Research School Isparta, 24 August-4 September 2015, **Poster Award**
2. **Yazğan Y**, Nazıroğlu M. Modulator role of non-steroidal selective estrogen receptor modulators on TRPM2 and TRPV1 channels in the hippocampus and dorsal root ganglion neurons of ovariectomized rats: Patch-clamp results. Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress 2016, 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, 24 – 27 May 2016, **Poster Award**