

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



**SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE CURCUMİNİN
TRPM2 KATYON KANALLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN
PATCH-CLAMP SİSTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ahmi ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi ÖYP Koordinasyon Birimi tarafından
ÖYP6164-YL-13 proje numarası ile desteklenmiştir.
Tez. No: 140**


ISPARTA-2016


KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;


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


Tez Savunma Tarihi: 28/07/2016


Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik AD


Üye : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi

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

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

Doç. Dr. Mustafa KAYAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

“SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Curcuminin TRPM2 Katyon Kanalları Üzerine Etkisinin Patch-Clamp Sistemi ile Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Ahmi ÖZ

İmza



Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK

İmza



TEŐEKKÖR

Tezimin hazırlanmasında ve Yüksek Lisans Eğitimimde bende emeği büyük olan danışmanım Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK'e, bu süreçte karşılaştığım her durumda bana yardımcı olan, fikirlerinden ve çalışmalarından ilham aldığım kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ'a ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU hocamıza şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında benden yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen asistan arkadaşım İshak Suat ÖVEY'e ve değerli çalışma arkadaşlarım Muhammet ŞAHİN ve Fatih ŞAHİN beylere teşekkür borçluyum.

Eğitim hayatıma başladığım ilk günden bu tezin sunulduğu güne kadar manevi desteklerini hep gönlümde hissettiğim ve haklarını asla ödeyemeceğimi düşündüğüm muhterem Annem ve Babam'a minnettarım...

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oksidatif Stres.....	3
2.2. Antioksidanlar	6
2.2.1. Curcumin.....	7
2.3. Transient Receptor Potential (TRP) Kanalları	8
2.3.1. TRPM Katyon Kanal Alt Ailesi.....	9
2.3.1.1. TRPM2 Katyon Kanalları	10
2.4. Patch-Clamp Tekniği	11
2.4.1. Hücre Üzerinde Kayıt Konfigürasyonu (On-cell, Cell-attached)	12
2.4.2. Tüm Hücre Kayıt Konfigürasyonu (Whole-cell)	13
2.4.3. İçi Dışarıda Kayıt Konfigürasyonu (Inside-out)	13
2.4.4. Dışı Dışarıda Kayıt Konfigürasyonu (Outside-out)	14
2.4.5. Patch-Clamp Sisteminin Ana Elemanları	15
2.4.6. Patch-Clamp Sistemine Ek Cihazlar	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler	21
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.2. Yöntem.....	25

3.2.1. Hücrelerin Çoğaltımı ve Grupların Oluşturulması.....	25
3.2.2. Hücre Canlılığı (MTT) Testi ile Curcuminin Doz Tayini.....	27
3.2.3. Grupların Oluşturulması	28
3.2.4. TRPM2 pcDNA'sının SH-SY5Y Hücrelerine Transfeksiyonu	29
3.2.5. Patch-Clamp Analizleri.....	32
3.2.6. Kalsiyum Sinyali Analizleri.....	35
3.2.7. Western Blot Analizleri.....	35
3.2.8. Hücre İçi ROT Üretimi Tayini.....	36
3.2.9. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analizi	37
3.2.10. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Analizleri	37
3.2.11. Apoptozis Testi	38
3.3. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR	39
4.1. Curcuminin Doz Tayini Bulguları	39
4.2. Patch-Clamp Sonuçları.....	40
4.3. Kalsiyum Sinyali Analiz Sonuçları.....	45
4.4. Western Blot Analiz Sonuçları.....	47
4.5. Hücre İçi ROT Üretim Tayini Sonuçları.....	51
4.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analiz Sonuçları.....	52
4.7. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Analiz Sonuçları	53
4.8. Apoptozis Testi Sonuçları.....	55
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	61
7. ÖZET.....	62
8. KAYNAKLAR	66
BEYAN.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACA	: Anthranilic acid
ADP-Riboz	: Adenozin difosfat riboz
cADP-Riboz	: Halkasal adenozin difosfat riboz
cAMP	: Halkasal adenozin mono fosfat
2-APB	: 2-Aminoethyl diphenylborinate
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu
CCl₃•	: Triklorometil
CCl₄	: Karbon tetraklorür
Caspase (Kaspaz)	: Cysteine-aspartic proteases
CHO	: Chinese Hamster Ovary
CHPx	: Kümen hidroperoksid
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimethyl sulphoxide
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
HEK-293	: Human Embryonic Kidney - 293
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
KAT	: Katalaz
LP	: Lipid peroksidasyonu
NAC	: N-asetil sistein
NADPH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDG⁺	: N-methyl D-glucamine
NO•	: Nitrik oksit
¹O₂	: Singlet oksijen
O₂⁻•	: Süperoksit
•OH	: Hidroksil radikali
ONOO⁻•	: Peroksinitrit

PARP	: Poly-ADP Ribose-polymerase
PARG	: Poly-ADP Ribose-glycohydrolase
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
Se	: Selenyum
SOD	: Süperoksit dismutaz
TRP	: <i>Transient Receptor Potential</i>
TRPA	: <i>Transient Receptor Potential Ankyrin</i>
TRPC	: <i>Transient Receptor Potential Canonical</i>
TRPM	: <i>Transient Receptor Potential Melastatin</i>
TRPML	: <i>Transient Receptor Potential Mucolipin</i>
TRPP	: <i>Transient Receptor Potential Polycystin</i>
TRPV	: <i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü.....	32
Tablo 2. NMDG ⁺ li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü.....	32
Tablo 3. İntraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü.....	33



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Curcuminin moleküler yapısı	7
Şekil 2. TRP Kanal alt aileleri ve bunların alt tiplerinin moleküler filogenetik dikotomisi.....	8
Şekil 3. TRPM alt ailesinin ihtiva ettiği dört grubu, filogenetik yakınlıkları ve geçmiş literatürdeki adları.....	10
Şekil 4. Curcuminin TRPM2 kanalları üzerinde muhtemel etki yolakları.	11
Şekil 5. Patch-Clamp çalışmalarında kullanılan dört konfigürasyona geçişin çizimi.....	15
Şekil 6. H ₂ O ₂ ile uyarım yapılmamış SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinden alınan kontrol kaydı.....	40
Şekil 7. Kayıt esnasında H ₂ O ₂ ile uyarım yapılan kontrol grubuna ait SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinden alınan kontrol grubu kaydı.	41
Şekil 8. Kayıt esnasında H ₂ O ₂ ile uyarım yapılan 5 µM curcumin ile inkübe edilen SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine ait curcumin grubu kaydı.	41
Şekil 9. TRPM2 kanalı transfecte edilen ve H ₂ O ₂ ile uyarım yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine ait transfecte grubu kaydı ile akım-voltaj ilişkisini gösteren I-V eğrisi.....	43
Şekil 10. TRPM2 transfectiyonunu takiben 24 saat boyunca 5 µM curcumin ile inkübe edildikten sonra H ₂ O ₂ ile uyarım yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine ait Transfecte + Curcumin grubu kaydı.	44
Şekil 11. Grupların TRPM2 kanal ekspresyon düzeylerinin Western Blot sonrası bant görüntüleri ve grafikte gösterimi.....	48
Şekil 12. Grupların PARP1 enzimi ekspresyon düzeylerinin Western Blot sonrası bant görüntüleri ve grafikte gösterimi.....	49
Şekil 13. Grupların prokaspaz 3 ve prokaspaz 9 ekspresyon düzeylerinin Western Blot sonrası bant görüntüleri ve grafikte gösterimi.....	50

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Horizontal gerdirme uygulayan pipet yapıcısı ile patch pipeti yapım aşamalarının görüntüleri.....	17
Resim 2. Patch-Clamp sistemini oluşturan temel donanımların görüntüsü.....	19
Resim 3. Çember ve kayıt alanının yakından görüntüsü.	19
Resim 4. Transfekte hücrelerin mikroskop altında tespiti.....	33



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. 96'lık plakaya ekilmiş SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine 5 farklı dozda curcumin inkübasyonunun hücre canlılığının MTT testi ile belirlenmesi.....	39
Grafik 2. Grupların akım yoğunluğu grafiği.....	45
Grafik 3. Kümen hidroperoksid (CHPx) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca ⁺² salınımı üzerine curcumin inkübasyonunun etkilerinin zamanla değişimi.....	46
Grafik 4. CHPx stimülasyonu ile indüklenen hücre içi Ca ⁺² miktarı üzerine curcumin inkübasyonunun etkilerinin sütun grafiği ile gösterimi.	47
Grafik 5. Curcumin inkübasyonunun grupların ROT üretimi üzerine etkileri.	51
Grafik 6. Curcumin inkübasyonunun grupların mitokondriyal membran depolarizasyonu üzerine etkileri.	52
Grafik 7. Curcumin inkübasyonunun grupların kaspaz 3 enzimi aktivitesi üzerine etkileri.....	53
Grafik 8. Curcumin inkübasyonunun grupların kaspaz 9 enzimi aktivitesi üzerine etkileri.....	54
Grafik 9. Curcumin inkübasyonunun grupların apoptozis seviyeleri üzerine etkileri.	55

1. GİRİŞ

Hücresinin hayati fonksiyonlarını yerine getirmede iyonların rolü büyüktür ve bu fonksiyonların yürütülmesinde hücre içi iyon konsantrasyonunun belirli bir aralıkta tutulması hücre canlılığının devam ettirilmesi bakımından çok önemlidir. Hücre zarı üzerinde hücreye iyon giriş-çıkışını kontrol eden birçok farklı tipte iyon kanalı bulunmaktadır. Hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonunun ($[Ca^{+2}]_i$) düzenlenmesinde, görev alan iyon kanallarından biri de insan ve birçok memelide de bulunan *Transient Receptor Potential Melastatin* (TRPM) katyon kanal alt ailesidir. Bu ailenin bir üyesi olan *Transient Receptor Potential Melastatin 2* (TRPM2) kanalları, başta kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) olmak üzere katyonların hücre içine girişinden sorumlu, non-selektif bir katyon kanalı olarak tanımlanmaktadır (1). Hücre içi metabolik reaksiyonlar sırasında meydana gelen hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi oksidatif stres ürünleri ve bunların dolaylı etkileriyle oluşan ADP-Ribozun TRPM2 katyon kanal aktivasyonunda ayrı ayrı sorumlu oldukları bilinmektedir. Aktive olan TRPM2 katyon kanalları vasıtasıyla ekstrasellüler aralıktan sitozole yüksek miktarda Ca^{+2} girişi gerçekleşmektedir (2). Fizyolojik sınırları 80-100 nM seviyelerinde olan $[Ca^{+2}]_i$ artışı, başta apoptozis olmak üzere hücreSEL birçok döngünün başlatılmasında önemli bir tetikleyici unsurdur. Güncel çalışmalar, TRPM2 aracılı apoptozisten nöronal hücreyi korumada; selenyum, N-acetylcysteine (NAC), melatonin gibi antioksidanlarla oksidatif dengenin sağlanıp kanal aktivasyonunu dolaylı yoldan düzenlendiği gösterilmiştir (3-5). Kolaylıkla farklılaştırılabilen ve nörolojik hastalıklardan Alzheimer ve Parkinson'a *in vitro* model olarak kullanılan SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri normal koşullarda TRPM2 kanalı ifadelememektedir. Bu nedenle TRPM2 geniyle birlikte haberci genleri barındıran vektör plazmidler ile geçici transfeksiyon işlemi uygulanıp TRPM2 ekspresyonu sağlanarak araştırmalar yapılmaktadır (6). Curcumin, *Curcuma longa* L. (zerdeçal, hint safranı) bitkisi rizomlarından elde edilen sarı-turuncu renkte, toz formunda, polifenolik yapıda bir bileşiktir. Yapılan çalışmalar ile antioksidan ve anti-enflamatuvar etkileri gösterilen bu bitkisel bileşik E vitaminine benzer şekilde hücreSEL membranlarda lokalize olabilmektedir ve neredeyse sekiz kat daha güçlü antioksidan etkiye sahiptir. Lipid

peroksidasyonuna karşı hücrel savunmada oldukça etkili olduğu bilinmektedir (7). Hücrel antioksidan savunma, membranlardan başlayarak sitozolik bileşenlerin eriyik bulunduğu sıvı fazında glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimatik, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi non-enzimatik antoksidanlar ile güçlendirilir. Membran lipidlerinin peroksidasyonu ve sitozolik oksidatif stres bu lipid-sıvı faz antioksidanlarının işbirliğinde elimine edilmektedir. Antioksidan savunmanın, aktivasyonu oksidatif stresin doğrudan veya dolaylı ürünlerine bağlı olan TRPM2 kanal davranışı üzerinde etkili olabileceği hipotezi ile bu tez çalışmasında nörolojik hastalıklara *in vitro* model olarak kullanılan SH-SY5Y hücrelerinde TRPM2 katyon kanal akımları üzerine curcumin uygulamasının etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres

Serbest oksijen radikalleri veya daha bilinen adıyla reaktif oksijen türleri (ROT) ile reaktif nitrojen türleri (RNT) hücrel metabolizma süreçlerinde normal seviyelerde üretilmektedir. ROT'un normal seviyeleri hücrelerin enfeksiyon ajanlarına karşı mücadelesinde, fizyolojisi anormalleşen hücrelerin apoptoza sevkinde ve aynı zamanda mitojenik yanıtın geliştirilmesinde önemli yarar sağlar. Hücrel denge seviyelerinin çeşitli etkenlerle ROT üretimi yönünde artmasıyla karbohidratlar, lipidler, nükleik asitler ve proteinler üzerinde gerçekleşen tahribat sonucu ortaya çıkan olguya oksidatif stres denilmektedir (8, 9).

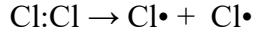
Serbest radikaller atomik veya moleküler yapılarında bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron ihtiva ederler ve hücrel solunum süreçlerinde (elektron transportu) oksijenin son elektron alıcısı olması ve bu nedenle radikal oluşturmaya meyilli olması itibarıyla genelde oksijenden üretilirler (10). Serbest radikaller son yörüngelerinde ihtiva ettikleri fazla elektronu/elektronları bir başka molekülle reaksiyona girerek paylaşma eğilimindedirler. Böylesine kararsız ve reaktif moleküller bu yüzden normal denge sınırlarını aşan her şekilde üretilmediklerinde tehlikeli olmaktadır.

Serbest radikal üretimini teşvik eden eksojen (çevresel) nedenler; hava kirliliği, pestisitler, sigara, alkol ve bağımlılık yapan madde tüketimi ve bazı antineoplastik ilaçlar şeklinde sayılırken, endojen (selüler) kaynaklar arasında; mitokondriyal elektron transportu, membran lipidlerinin peroksidasyonu ve peroksizomlar yer almaktadır.

Serbest radikal oluşumu üç başlık altında toplanmaktadır:

1. *Kovalent bağ kırılması*: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar, yüksek sıcaklık veya mor ötesi ışınlar kimyasal bağların kırılmasına neden olabilir. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri atomlar arasında eşit paylaşılınca, her iki atom üzerinde eşlenmemiş elektron bulunur. Sonuç olarak, iki adet yüksek

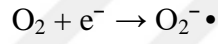
reaktivite gösteren serbest radikal oluşur (11). Örneğin; klor gazının (Cl_2) ultraviyole ışınlarla iki radikal klor atomuna parçalanması.



2. *Molekülün heterolitik bölünmesi veya radikal olmayan molekülün bir elektron kaybı:* Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı olursa veya molekülün heterolitik bölünmesiyle dış orbitalinde eşlenmemiş elektron kalınca radikal formu oluşur. Örneğin; Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metal iyonları ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'in eksik indirgenmesi.



3. *Radikal olmayan moleküle bir elektron eklenmesi:* Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron eklenince, bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Örneğin; oksijen (O_2)'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksit radikali ($\text{O}_2^-\cdot$)'in oluşumuna neden olur.



Bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda radikal olmayan türlerden radikaller ortaya çıkar (12). Serbest radikaller ile radikal olmayan moleküllerin tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sırayla serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (13). O_2 'nin kısmi indirgenmesinden en potent reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) ile $\text{O}_2^-\cdot$ oluşmaktadır. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ve H_2O_2 molekülleri ise serbest radikal olmayan ancak serbest radikal oluşum mekanizmalarına öncülük eden ROT türleridir (14). Oksijenden üretilmeyen diğer serbest radikallere lipid peroksidasyonu (LP) esnasında oluşan peroksil ($\text{ROO}\cdot$), karaciğerde karbon tetraklorür (CCl_4) metabolizmasında oluşan triklorometil ($\text{CCl}_3\cdot$), nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) ve peroksinitrit ($\text{ONOO}^-\cdot$) örnek verilebilir (15).

Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$): Hidrojen peroksit (H_2O_2) geçiş metal iyonlarıyla indirgenince veya suyun iyonize edici radyasyonla parçalanmasıyla $\cdot\text{OH}$ ortaya çıkar. Hücrenin tüm organik bileşenleriyle reaksiyona girerek en çok zarar veren ve

en kararsız radikal türüdür. Diğer ROT'un da tahribat gücü •OH radikaline dönüşebilme kapasitesiyle doğru orantılıdır (16).

Süperoksit radikali ($O_2^- \cdot$): Oksidatif fosforilasyonla mitokondrilerde kullanılan oksijenin neredeyse %2'si ile indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimi vasıtasıyla $O_2^- \cdot$ meydana getirilir. İmmün hücrelerde mikroorganizmaların tahribi için özel olarak üretilir. Hidrojen peroksitin dismutasyonu ile $O_2^- \cdot$ üretildiği gibi, $O_2^- \cdot$ de en potent radikal özelliği gösteren •OH radikaline metal iyonlarıyla girdiği fenton reaksiyonları sonucu dönüşebilir. Organizmalar için daha reaktif türlere kolaylıkla dönüşebildiğinden tehlike arz eder. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından radikal olmayan H_2O_2 'ye dönüştürülür (17).

Singlet oksijen (1O_2): Oksijenin bir elektronunun çevreden enerji alarak kendi dönme yönünün aksine bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Son yörüngesinde eşlenmemiş elektron barındırmadığından radikal olarak sınıflandırılmayan oksijenin yüksek enerjili reaktif bir formudur. Serbest radikal oluşumu esnasında meydana gelmesine rağmen başka serbest radikal oluşturan reaksiyonlarda başlatıcı faktör olarak da çalışır. Uyarılmış elektronu, daha düşük enerji seviyesine inmesiyle elektromanyetik enerji yayar. Ayrıca bazı kimyasallarla etkileşimi sonucu ışığa yaptığından serbest radikal tayininde kullanılabilir (18).

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Organizmada $O_2^- \cdot$ dismutasyonu ile, yani iki $O_2^- \cdot$ molekülünün iki proton (H^+) almasıyla moleküler oksijen (O_2) ile birlikte H_2O_2 oluşur. Serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri arasında sayılmasının nedeni $O_2^- \cdot$ ile reaksiyona girip en reaktif radikal olan •OH oluşumunda rol oynamasıdır (18).

Hücrel redoks dengesinin önemi oksidatif stresle ilişkilendirilen hastalık sayısının günden güne artmasıyla anlaşılabilir. Buna binaen hücrel redoks seviyelerinin belirli denge sınırlarında kontrol edilmesi hastalıkları önlemede veya azaltmada etkili olabileceğini yani '*redoks homeostasis*' fikrini doğurmuştur (14, 19). Hücrelerde oksidatif stres aracılı hasardan korunmak için redoks denge durumu dört ana yolla sağlanmaya çalışılır. Bunlar; önleyici mekanizmalar, fiziksel savunma

mekanizmaları, hasarı tamir mekanizmaları, antioksidan savunma mekanizmalarıdır (20).

2.2. Antioksidanlar

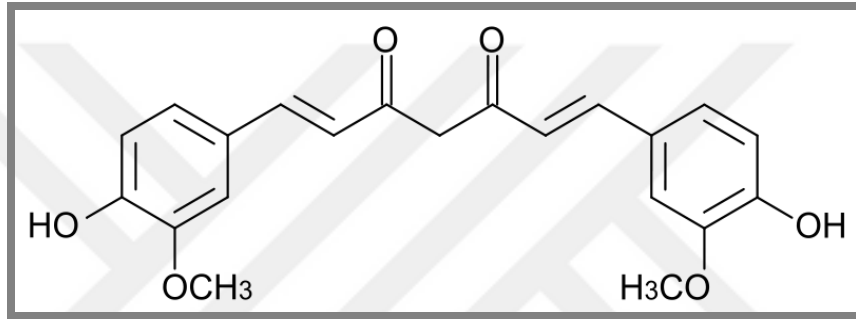
ROT'un hücresel denge sınırlarında kalması hücre yaşamının sürdürülebilmesi için gereklilik arz eder. Hücresel redoks dengesinin oksidatif ajanlar yönüne kaymasıyla hücresel metabolik süreçlerin yerine getirilmesine mani olan oksidatif stres durumu başlar. Oksidatif hasarın önlenmesinde veya zararlarının azaltılmasında rol oynayan maddelere genel olarak antioksidan denilmektedir. Antioksidanlar oksidatif strese sebep olan başlıca ROT ve RNT'yi çeşitli mekanizmalarla devre dışı bırakarak hasar boyutunun azaltılmasına yardımcı olurlar (21, 22).

a) Enzimatik antioksidanlar veya antioksidan enzimler: Hücrede doğal metabolik süreçlerde rol alan, mevcut veya potansiyel oksidatif stres parametrelerini düşük seviyelere çekmekle görevli enzimlerdir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) başlıca antioksidan enzimlerdir.

b) Enzimatik olmayan antioksidanlar: İnsan vücudunda nadiren üretilen, çoğunluğu gıdalarla temin edilen ve vücudun biyokimyasal süreçlerinde çeşitli amaçlarla görev alan birçoğu bitkisel kaynaklı maddelerdir. Bunlara vitaminlerden askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), β -karotenden sentezlenen A vitamini, peptid antioksidanlardan glutasyon (GSH), bitkilerle alınan flavonoidler, özellikle sarı-turuncu bitkilerden elde edilen karotenoidler örnek gösterilebilir (23). Antioksidanlar serbest radikallerin hücresel organik moleküllere zararlı etkilerini radikal oluşum süreçlerinin başlangıcında veya ilerleme aşamasında baskılama (primer antioksidanlar) ya da zararlarını önleme (sekonder antioksidanlar) kabiliyetlerine sahip moleküllerdir.

2.2.1. Curcumin

Curcumin (1,7-bis[4-hydroxy 3-methoxy phenyl]-1,6-heptadiene-3,5-dione) sarı-turuncu renkte, *Curcuma longa* L. (zerdeçal, hintsafran) bitkisinin rizomlarından elde edilen, yağda çözünebilen polifenolik yapıda bir bileşiktir (PubMed CID: 969516). Geleneksel Hint tıbbında anti-enflamatuvar özelliğinden dolayı yüzyıllardır kullanılan bu bitkinin yiyeceklere baharat katkısı olarak da kullanıldığı bilinmekle birlikte kimyasal yapısı ilk kez 1910 yılında ortaya çıkarılabilmıştır (24).



Şekil 1. Curcuminin moleküler yapısı (25).

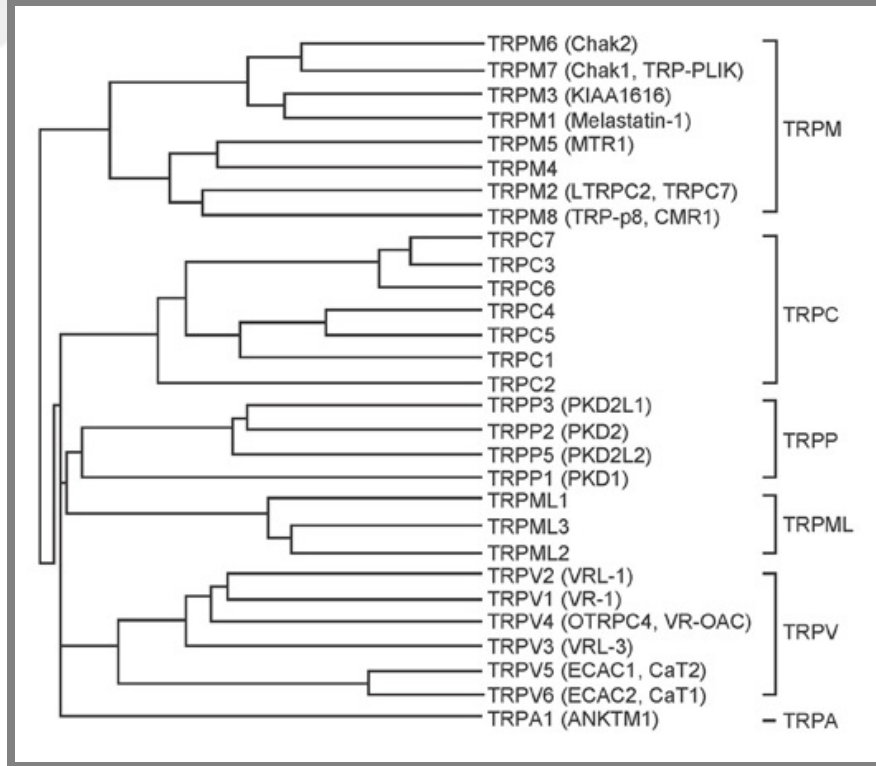
Curcumin hakkında yapılan araştırmalar başlangıçta curcuminin, anti-enflamatuvar, anti-tümör ve antioksidan özelliğini göstermekle birlikte sonraları E vitaminine kıyasla 8 kat daha güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (7, 25). Merkezi sinir sistemi, özellikle beyin dokusu, lipid bakımından zengin yapısı nedeniyle oksidatif hasara oldukça duyarlı dokulardır. Yağda çözünebilen kuvvetli bir antioksidan olması nedeniyle son yıllarda yapılan araştırmalar Alzheimer, Parkinson ve serebral iskemi gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarında curcuminin koruyucu etkisi üzerine yoğunlaşmaktadır. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda Alzheimer hastalığının belirteci olan amyloid beta proteininin birikimi ve toksik etkilerinin azaltılmasında curcuminin faydalı etkilerinden söz edilmiştir (26-28).

Ayrıca Curcuminin *in vitro* oksidatif stres modelinde nöronal hücreler üzerinde koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışma da Uğuz ve ark. tarafından

yapılmış ve bu güçlü antioksidan etkiler gösteren maddenin oksidatif hasarın önlenmesinde terapötik etkisi olabileceği vurgulanmıştır (29).

2.3. Transient Receptor Potential (TRP) Kanalları

TRP kanalları, ilk olarak *Drosophila* cinsi meyve sineklerinin fotoreseptör hücrelerinde varlığı tespit edilen, genel olarak Ca^{+2} geçirgen transmembran iyon kanallarıdır (30). Hücre dışı sıvı, hücre içine oranla yaklaşık 20.000 kat daha fazla oranda Ca^{+2} ihtiva ettiği göz önüne alınca, sitozoldeki Ca^{+2} konsantrasyonunun değişimine bağlı olarak açılıp kapanan bu kanallardan iyon geçişinin hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirmesinde büyük önem arz ettiği düşünülmektedir. TRP iyon kanal üst ailesi insanlarda, kendi içerisinde spesifik bağlanma bölgelerine göre toplamda 29 alt tip ihtiva eden, altı alt aileye ayrılır (31). Bunlar; Ankyrin (TRPA), Vanilloid (TRPV), Canonical (TRPC), Melastatin (TRPM), Polycystin (TRPP), Mucolipin (TRPML)'dir.



Şekil 2. TRP Kanal alt aileleri ve bunların alt tiplerinin moleküler filogenetik dikotomisi (31).

Her bir alt aile spesifik tanımlayıcı bölgelerine göre belirlenmiş alt birimlere ayrılır ve her alt birim kendi içinde değişik sayıda kanal alt tiplerine sahiptir ve bunlar aynı zamanda anılan alt ailelerin üyeleridirler. TRPA alt ailesinin bir, TRPV alt ailesinin altı, TRPC alt ailesinin yedi, TRPM alt ailesinin sekiz, TRPP alt ailesinin dört ve TRPML alt ailesinin şimdiye kadar keşfedilen üç alt birimi veya üyesi mevcuttur (30). Son yıllarda yapılan çalışmalarla TRP iyon kanallarının; apoptozis (32), kanser (33), diyabet (34) gibi hastalıkların yanı sıra; Alzheimer hastalığı (35) ve migren (36) gibi nörolojik rahatsızlıklarla bağlantısı olabileceği bildirilmiştir.

2.3.1. TRPM Katyon Kanal Alt Ailesi

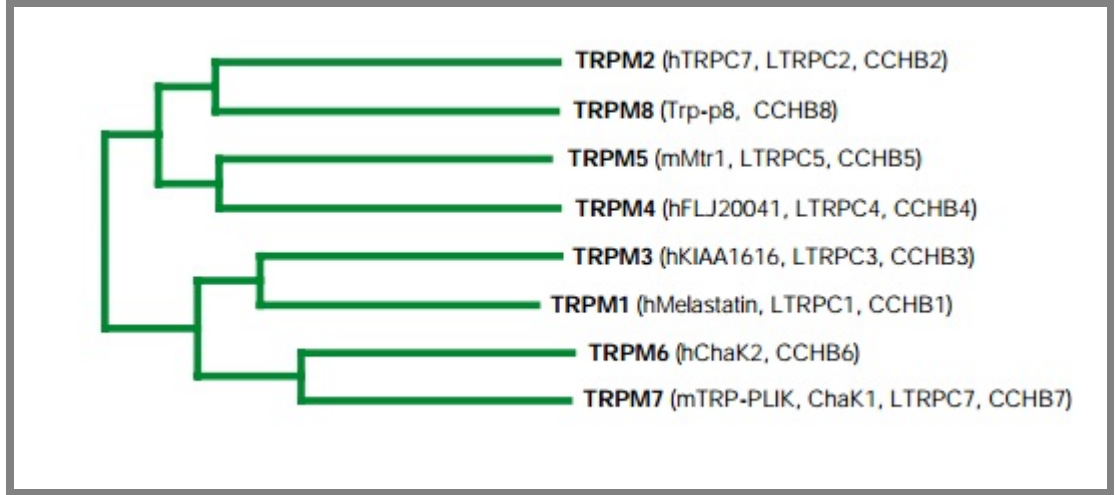
TRPM alt ailesi sekiz alt tip içerir ve dört gruba ayrılır. Bu gruplar, kanalları oluşturan aminoasit dizi benzerlikleri esasına dayanarak oluşturulmuştur (Şekil 3).

1. Grup; TRPM1 ve TRPM3'ten oluşur. TRPM1'i aktive eden bilinmemekle beraber, TRPM3'ün ise steroidlerden pregnenolon sülfat ve Ca^{+2} ile aktive olduğu bildirilmiştir (37).

2. Grup; TRPM6 ve TRPM7'den oluşur. TRPM6 ve TRPM7'nin karboksi terminalinde yerleşik kinaz aktivite bölgesindeki serin/treonin kalıntılarından ATP harcanarak aktive edildiği vurgulanmıştır (38).

3. Grup; TRPM4 ve TRPM5'ten oluşur. TRPM4 ve TRPM5'in Ca^{+2} geçirgen olmadığı fakat aktivasyonlarının $[Ca^{+2}]_i$ ile düzenlendiğinden söz edilmiştir (39).

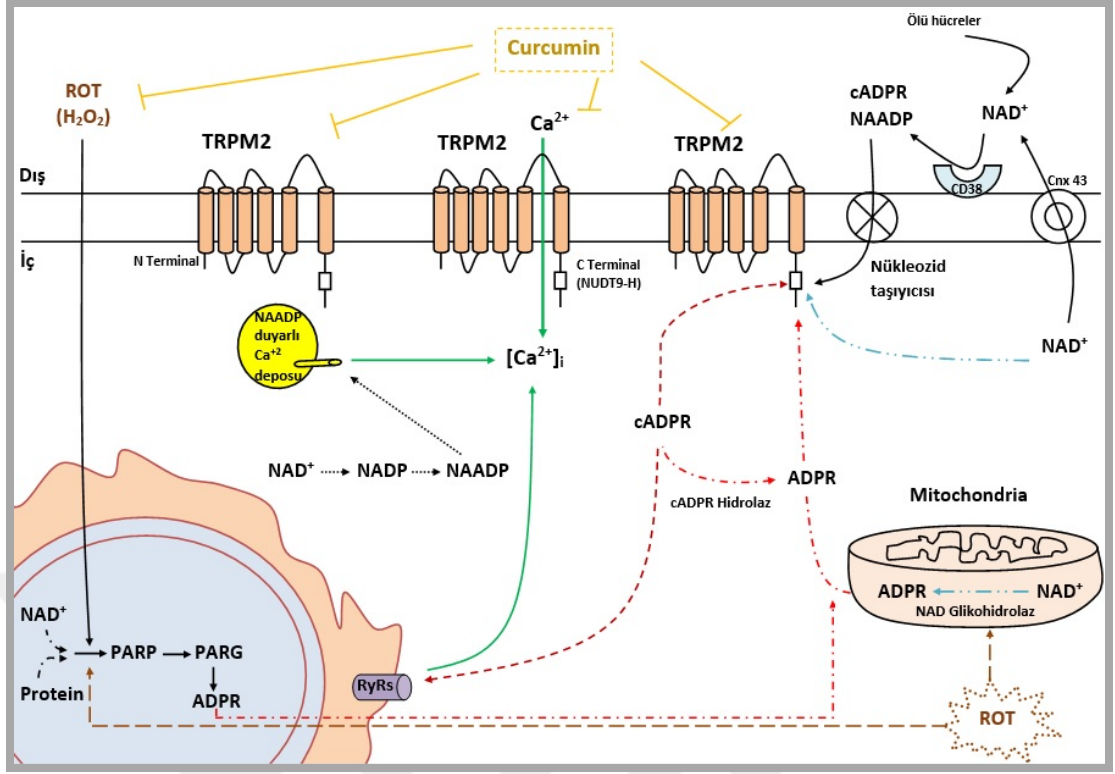
4. Grup; TRPM2 ve TRPM8'den oluşur. TRPM2'nin karboksi terminaline yerleşik NUDT9-H bölgesinin ADP-Riboz pirofosfataz aktivitesiyle ADP-Riboz ve ROT ile (H_2O_2) aktive olduğu; TRPM8'in ise mentol ve düşük sıcaklıklarda aktive olduğu kanıtlanmıştır (40, 41).



Şekil 3. TRPM alt ailesinin ihtiva ettiği dört grubu, filogenetik yakınlıkları ve geçmiş literatürdeki adları (30).

2.3.1.1. TRPM2 Katyon Kanalları

TRPM2, TRPM ailesinin ikinci üyesi olarak tanımlanmıştır (42, 43). TRPM2 katyon kanallarında tıpkı voltaja duyarlı sodyum kanallarında olduğu gibi 6 segment bulunmaktadır ve iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasındaki pordan gerçekleşmektedir (44). Kanalın amino ve karboksi uçları sitozole bakar. TRPM2'nin karboksi ucuna '**nudix domain**' (NUDT9-H bölgesi) denilmektedir. Bu uç ADP-Riboz pirofosfataz enzimi aktivitesine sahiptir. Bu sayede kanalın karboksi ucuyla ADP-Riboz'un etkileşimi esnasında, ADP-Riboz'dan AMP ve Riboz 5-fosfat oluşumu katalizlenir ve kanal aktivasyonu gerçekleşir (45). Bu reaksiyon sonucu biriken adenosin mono fosfat (AMP)'in negatif geribildirim mekanizmasıyla çalışarak kanalın inaktivasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (46).



Şekil 4. Curcuminin TRPM2 kanalları üzerinde muhtemel etki yolları. Eksojen ve endojen kaynaklı ROT'un teşvik ettiği ADP-Riboz/NAD⁺ metabolizması aracılı potansiyel TRPM2 kanal aktivasyon yolları ve kanalın 6 segmentten oluşan, hücre içine bakan N-terminal ve C-terminal uçlar ihtiva eden membrana yerleşik moleküler yapısı. (RyRs: Riyanodin reseptörleri, Cnx 43: Konneksin 43, CD38: Halkasal ADP-Riboz hidrolaz)

2.4. Patch-Clamp Tekniği

Dilimize Yama-Kenetleme, Yama-Menteşe veya Yama-Kıskacı şeklinde çevrilen Patch-Clamp tekniği; istenen düzeye kenetlenen (sabit tutulan) membran potansiyeline karşın iyon kanallarında değişen iyon hareketliliğine bağlı oluşan akımların kaydedilmesi prensibine dayanır. Prof. Dr. Erwin Neher ve Prof. Dr. Bert Sakman tarafından Voltage-Clamp Tekniğinden geliştirilen ve kullanılmaya başlanan bu teknik, zamanla değişik amaçlara uygun hale getirilen donanımlarla günümüzdeki halini almıştır (47).

Patch-Clamp temel olarak; hücre membranı üzerinde mevcut hedef kanallar açıkken kimyasal gradient yönündeki iyon akışının elektriksel hesabı ve bilgisayar yazılımıyla ifadesi şeklinde tanımlanabilir. İyon kanallarının geçirgenlik özellikleri,

kanalı aktive/inaktive eden mekanizmaların doğası ve çeşitli hastalıklarda kanalların işlevsel durumlarının araştırıldığı çalışmalarda en sık kullanılan yöntem Patch-Clamp tekniğidir. Voltage-Clamp tekniğinden türetilen Patch-Clamp tekniğinde; tek elektrot kullanılarak zar belli bir potansiyele kenetlenirken, aynı elektrotla iyon akımına bağlı elektriksel değişiklikler kaydedilebilir. Bu Patch-Clamp'in Voltage-Clamp'ten en önemli farkı ve üstünlüğüdür (48).

Patch-Clamp, dört değişik konfigürasyon üzerinden yürütülen bir tekniktir. Bunlar; On-cell veya Cell-attached, Whole-cell, Inside-out ve Outside-out konfigürasyonudur. Araştırmacı ilk olarak çemberdeki sıvıya temas eder. Pipet uç direncini osiloskop ekranından takip ederek 2-8 mega ohm ($M\Omega$) seviyelerinde olduğunu doğruladıktan sonra on-cell veya cell-attached (hücre üzerinde) konfigürasyonunda hücreye temas eder ve membran yaması ile patch pipeti arasında **giga seal (giga mühür/yapışma)** diye tabir edilen direnç seviyelerine (1-10 $G\Omega$) ulaşmayı bekler. Bu değerlere ulaşıncaya diğer konfigürasyonlara geçmek için işlemleri başlatır. Ancak çalışmalarda hücrelerin bulunduğu ortam ve pipet içi sıvıları kullanılacak konfigürasyona göre değiştiğinden araştırmacı çalışmada hangi konfigürasyonu kullanmayı amaçlıyorsa çembere ve pipet içerisine uygun solüsyonları en başından koymasına gerekmektedir.

2.4.1. Hücre Üzerinde Kayıt Konfigürasyonu (On-cell, Cell-attached)

Patch pipetinin ucu, mikromanipülatör vasıtasıyla hücreye temas edecek en yakın noktaya kadar ayarlanır (Resim 3). Membranın üzerine getirilir. Hücreye dokundurulur. Membrana pipet vasıtasıyla bir miktar negatif basınç (emme kuvveti) uygulanır. Membranın bir kısmı pipetin içine doğru girer. Yani pipet içine negatif basınçla membrandan bir bölüm (membran yaması) hapsedilmiş olur. Membranın pipetin içine hapsedilen kısmı pipetin iç cidarını, pipet içi sıvı ile hücrelerin bulunduğu sıvıdan (ekstraselüler sıvı) karşılıklı geçişini engelleyecek şekilde kapatır. Buna seal (mühür) oluşumu denir. Bu durumda bilgisayar yazılımının osiloskop ekranında gösterilen direnç $M\Omega$ seviyelerinde değişir. Şayet pipet içerisindeki membran parçası pipeti iki sıvı arası alışverişini tamamen kesecek şekilde kapatırsa buna giga seal oluşumu denir. Bu esnada pipet direncinin giga ohm (1-10 $G\Omega$)

seviyelerinde olduğu gözlenir. Pipetin içerisinde bulunan mikro elektrot ile pipet ucuna hapsedilen membran yaması üzerinde bulunan kanallardan geçen iyon akımları kaydedilir. Böylece hücre içi metabolizma süreçlerinin devam ettiği anda, membran yaması üzerindeki kanallarının davranışı tespit edilebilmektedir. Bu konfigürasyonda hücreler çember içerisinde ekstraselüler sıvıda bulunurlar. Pipetin içine hapsedilen parçanın normalde olması gereken yer de ekstraselüler ortam olduğundan, pipet içerisine de ekstraselüler sıvı koyulur.

2.4.2. Tüm Hücre Kayıt Konfigürasyonu (Whole-cell)

Hücre üzerinde konfigürasyonu oluşturulduktan sonra, pipet içine hapsedilen membran parçasını kopartacak kadar negatif basınç uygulanır. Pipet içerisindeki membrandan bir parça kopması ile hücre bütünlüğünü bozulmaz. Hücre membranının pipet iç cidarında yapıştığı yerlerden bütünlük sağlanır. Bu sırada pipet içi sıvı ile hücre içi sıvı membranın kopmuş boşluk bölgesinden birleşir. Hücrenin kopmadan önceki konumuna gelmesi ve canlılığının etkilenmediği bilgisayar programından izlenirken ve mikroskoptan da takip edilir. Kayıt almaya başlanır. Bu konfigürasyonda hücre içine verilen maddelerin kanalları nasıl etkilediği çalışılabileceği gibi hücrenin üzerindeki tüm kanallardan iyon geçişini nelerin etkilediğini araştırmak için hücrelerin bulunduğu ortama çeşitli maddeler vererek çalışılabilir.

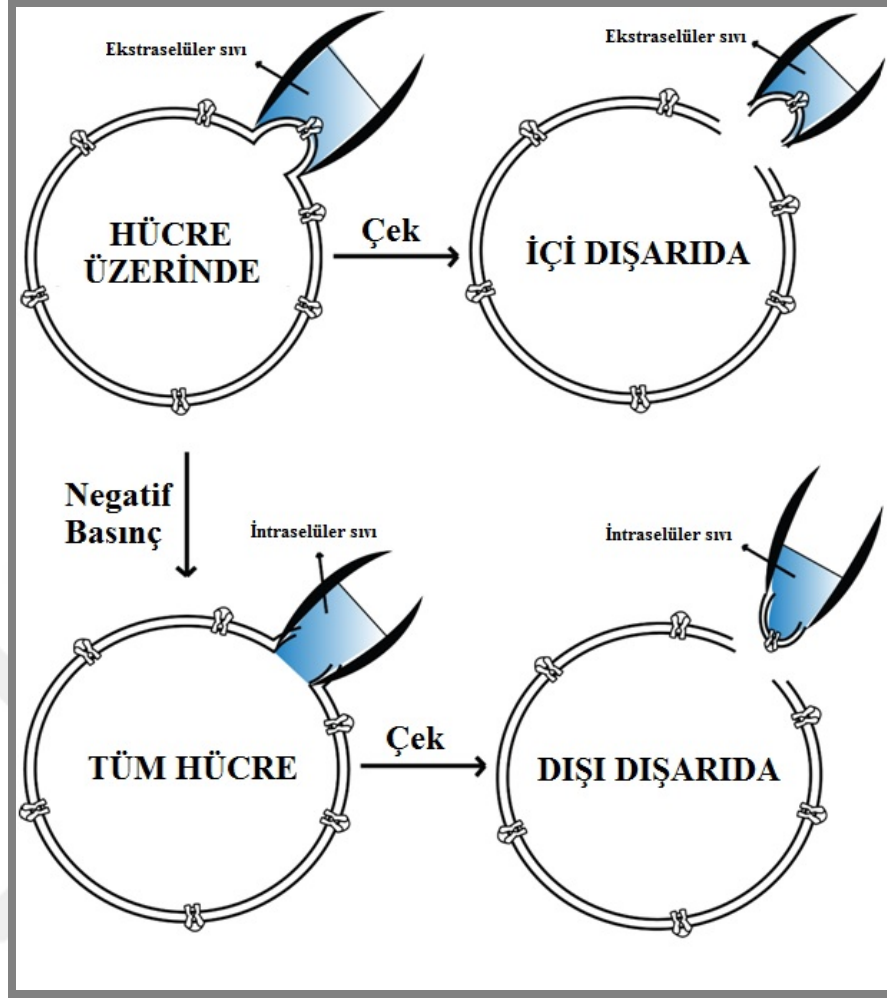
2.4.3. İçi Dışarıda Kayıt Konfigürasyonu (Inside-out)

Hücre üzerinde konfigürasyonundayken pipet içine hapsedilen membran parçasının pipetin geriye çekilerek kopartılmasıyla içi dışarıda konfigürasyonuna geçilmiş olur. Bu konfigürasyonda amaç; hücreden ayrılan membran yaması üzerinde mevcut iyon kanallarından hücre organellerinin etkilerinden bağımsız olarak kanal davranışının doğrudan araştırılmasıdır. Kanal aktivasyonu veya inhibisyonunun kanalın kendi üzerinde veya membran üzerindeki mekanizmalar vasıtasıyla olup olmadığını ve kanallar üzerinde intraselüler faktörlerin etkilerini araştırmakta kullanılır. Burada membran yamasının hücre içi alana bakan tarafı artık çembere baktığından içi dışarıda denilmektedir. Dolayısıyla çember içerisine

intraselüler solüsyon, pipet içerisine membranın dış tarafı baktığı için ekstraselüler solüsyon koyulur.

2.4.4. Dışı Dışarıda Kayıt Konfigürasyonu (Outside-out)

Tüm hücre kayıt konfigürasyonundayken pipetin geriye çekilerek membran iç çeperine yapışan kısımdan uzayıp kopartılmasıyla dışı dışarıda konfigürasyonuna geçilmiş olur. Pipet çeperine yapışmış membran parçalarının hücreden ayrılan parçaları bilinmeyen bir şekilde tekrar birleşerek membranın doğal halinde ekstraselüler alana bakan yüzü çembere baktığından dışı dışarıda diye adlandırılır. Kanal aktivasyonu veya inhibisyonunun kanalın kendi üzerinde veya membran üzerindeki mekanizmalar vasıtasıyla olup olmadığını ve kanallar üzerinde ekstraselüler faktörlerin etkilerini araştırmakta kullanılır. Burada membran yamasının hücre içi alana bakan tarafı artık çembere baktığından dışı dışarıda denilmektedir. Dolayısıyla çember içerisine ekstraselüler solüsyon, pipet içerisine membranın iç tarafı baktığı için intraselüler solüsyon koyulur. İçi dışarıda ve dışı dışarıda konfigürasyonları hücre membranının sadece pipet ucunda kalan kısmıyla ve o alandaki kadar iyon kanalıyla ilgilendiklerinden ikisine birden '*excised patch-clamp*' (*kesilmiş yama-kenetleme*) denilmektedir (48).



Şekil 5. Patch-Clamp çalışmalarında kullanılan dört konfigürasyona geçişin çizimi. Çek: Pipetin geri çekilmesi ve hücreden uzaklaştırılması. (Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK'in izni ile kullanılmıştır.)

2.4.5. Patch-Clamp Sisteminin Ana Elemanları

Patch-Clamp Tekniği için sistemin (veya setin) eksiksiz kurulmuş olması gerekmektedir. Çalışma amacına göre kullanılacak aletlerin niteliği değişmekle birlikte genel olarak tek hücre (single cell) kayıtlarının alınması için belirtilen alet ve donanımlar elzemdir.

a. Faraday Kafesi

Michael Faraday tarafından 1836 yılında keşfedildiğinden bu yana bilimsel çalışmalar için kullanılmaktadır. Patch-Clamp Tekniği ile bir hücreden veya bazen hücreden ayrılmış bir membran parçasından potansiyel veya akım kayıtları alındığından mili volt (mV) veya piko amper (pA) düzeylerindeki anlık verilerin oldukça hassas ve çevredeki elektrik alanlardan izole bir şekilde elde edilebilmesi için Faraday kafeslerine ihtiyaç duyulmaktadır. İyi topraklanmamış setlerden veya Faraday kafesi kullanılmadan alınan kayıtlar, dış etkilere açık hale geldiğinden ve bu da kayıtların güvenilirliğini olumsuz etkilemektedir. Özellikle tekli kanal kayıtlarının alınacağı çalışmalar için dış ortamdan gelen noise (gürültü) tabir edilen parazit akımların arındırılarak sağlıklı kayıtlar almak için kullanılmaktadır.

b. Titreşim Önleyici Masa

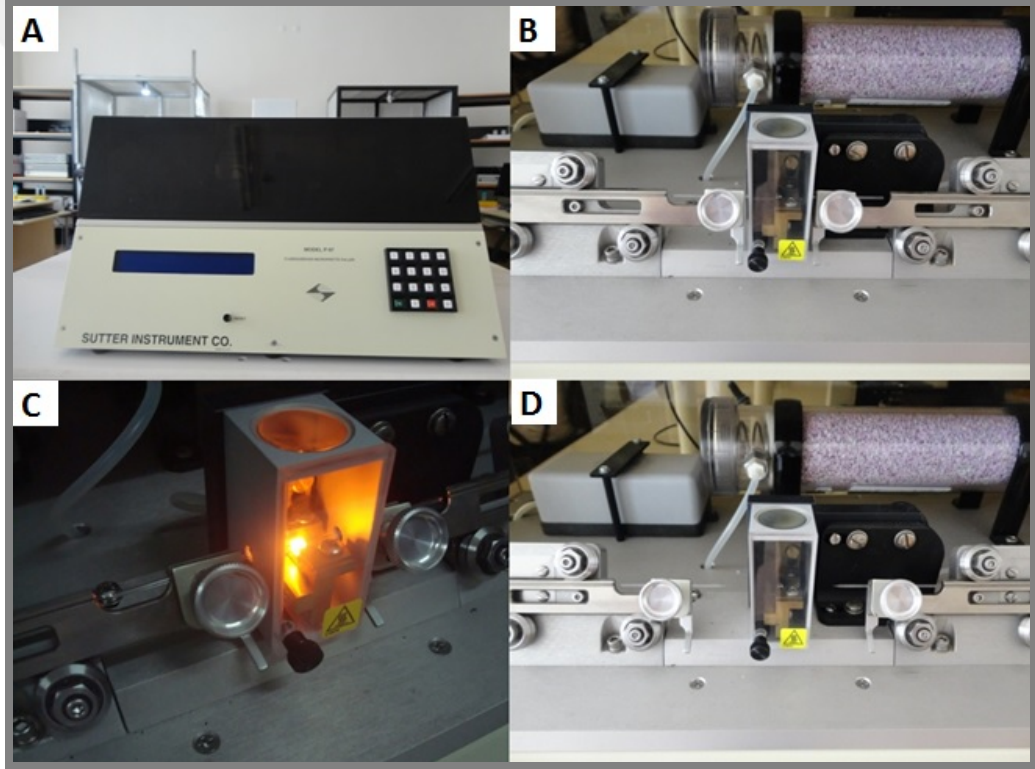
Hücrelere temas esnasında dış çevreden gelen fiziksel titreşimler patch pipetinin hücreyle temasını kesebilir veya pipetin kırılmasına sebep olabilir. Bunu önlemek için pipetin bağlı olduğu mikromanipülatör ile inverted mikroskopun mümkün oldukça sarsıntıdan uzak ve sabit tutulması gerekmektedir. Bu amaçla Patch-Clamp çalışmalarında kullanılmak üzere özel tasarlanmış, dış titreşimleri mümkün olduğunca engelleyen masalar kullanılmaktadır.

c. Inverted Mikroskop

Inverted mikroskopların temel çalışma prensibi objektifi numune tablasına üstten bakan (upright) mikroskoplara göre zıttır. Objektifleri altta bulunduğu için mikroskop tablasının üzerindeki numuneyi aslında en altından görürler. Çember (chamber, bath) içerisine koyulan hücrelere alttan bakarak hücrenin yeri tespit edilir. Tek hücreden Patch-Clamp kayıtları için en uygun mikroskoplardır. Doku kesitlerinden alınacak kayıtlar için objektifi üstten bakan ve suya temas etmeye uyumlu olan mikroskopların tercih edilmesi gerekmektedir.

d. Pipet yapıcısı (Puller)

Patch-Clamp çalışmalarında elektrofizyolojik kayıtlar alınabilmesi için patch pipeti denilen 1-2 μm uç açıklığında, borosilikat tüplerden yapılmış pipetler kullanılmaktadır. Pipet yapıcısı üzerinde bulunan kanala borosilikat tüp yerleştirilir. İstenilen pipet uç açıklığı ve direnci göz önüne alınarak cihaza uygun değerler girildikten sonra pipet yapımı başlatılır. Tüp tam ortadan ısıtılıp iki yandan gerdirilince işlem sonunda iki adet patch pipeti elde edilmiş olur. Patch-Clamp çalışmaları için mutlaka pipet yapıcısı kullanılması gerekmektedir. Yatay (horizontal) veya dikey (vertical) tipte gerdirme yapan pipet yapıcıları mevcuttur.



Resim 1. Horizontal gerdirme uygulayan pipet yapıcısı ile patch pipeti yapım aşamalarının görüntüleri. A: Cihazın genel görünüşü, B: Borosilikat tüpün cihaza yerleştirilmiş hali, C: Isı uygulaması ve zıt yönde gerdirme ile tüpün pipet haline getirilişi, D: İşlem sonrasında iki patch pipetin elde edilmiş hali.

e. Mikromanipülator

Patch pipetini X, Y ve Z düzlemlerinde (öne-arkaya, sağa-sola ve yukarı-aşağı) kumandası ile hareket ettirerek hücreye yaklaşımda ve temas etmede kullanılan motorize sistemdir. Bu sistem pipeti μm seviyelerinde çok hassas hareket ettirerek pipetin daha verimli kullanılmasını sağlar.

f. Perfüzyon Sistemi ve Peristaltik Pompa

Kayıtlar esnasında hücreye veya membran yamasına dışarıdan çeşitli kimyasallar verilmekte ve kanal davranışı anlık kaydedilmektedir. Bu kimyasalların sırasıyla çembere göndermeyi kolaylaştıran tüp ve borular sistemine perfüzyon sistemi denilmektedir. Çembere gönderilen sıvının çemberden uzaklaştırılması için tahliye amaçlı peristaltik pompa ile birlikte kullanılırlar.

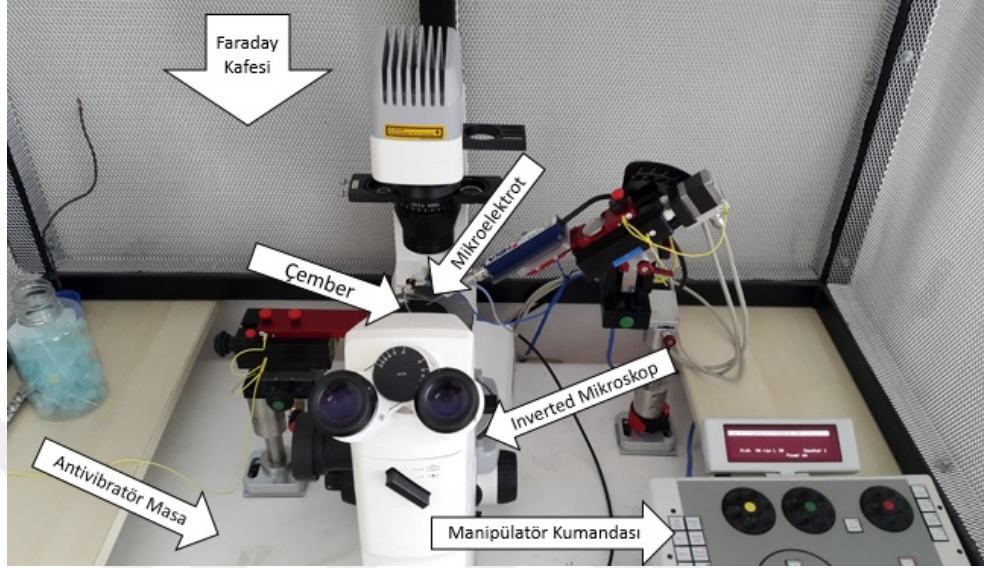
g. Yükselteç (Amplifikatör)

Güvenilir kayıtlar alabilmek için mümkün olduğunca izole ortamlar ve iyi tasarlanmış kayıt cihazlarına ihtiyaç vardır. Kenetleme değerlerinin ayarlanmasında ve kanal davranışında olan değişimlerin kaydedilmesinde yükselteçler kullanılmaktadır. Potansiyel kaydı yaparken etkin kayıt düzeni için mümkün olduğunca düşük dirençli elektrotlar ve giriş direnci yüksek yükselteçler kullanılmalıdır. Alınan biyopotansiyel kayıtları yükseltilecek bilgisayar yazılımından sayısal veriler halinde izlenir. Yükselteçler; Patch-Clamp tekli kanal (single channel) ve tek hücre kayıtlarında piko amper (pA) düzeyindeki akımları ve milivolt (mV) düzeyindeki potansiyelleri, çevreden gelen ve gürültü (noise) olarak adlandırılan parazitlerden arındırarak net kazanç elde eden sistemlerdir.

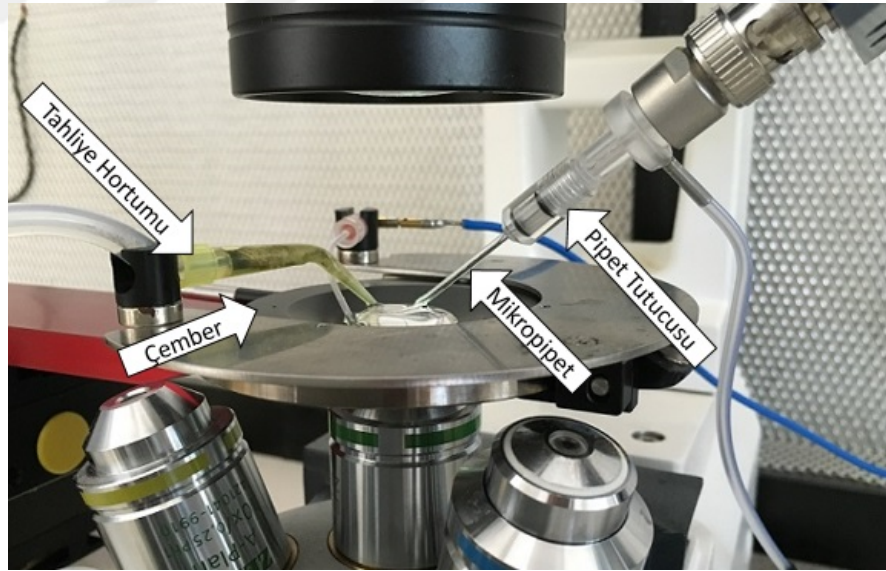
h. Bilgisayar Donanımı ve Yazılımı

Yükselteçlerin etkin kazançla aldığı veriler bağlı olduğu bilgisayara iletilir. Burada hazır bulunması gereken yükseltece uyumlu yazılım sayesinde görsel formata

uyarlanır ve anlık grafik ekranı, sinyal pulslarını gösteren osiloskop ekranı ve sayısal veriler ekranı gibi ekranlardan takip edilir ve bilgisayarda saklanır.



Resim 2. Patch-Clamp sisteminin oluşturulan temel donanımların görüntüsü.



Resim 3. Çember ve kayıt alanının yakından görüntüsü.

2.4.6. Patch-Clamp Sistemine Ek Cihazlar

a. Polishing cihazı

Pipet yapıcısının ısınan parçası olan filamanı veya rezistansları zamanla deformasyona uğrayabilir ve istenilen uç açıklığına sahip pipetler elde edilemeyebilir. Bu da pipetin çember sıvısına ilk temasta gözlenmesi gereken 2-8 M Ω seviyelerinden sapmasıyla anlaşılabilir. Böyle durumlarda ışık mikroskobu tablasına yerleşik lehim benzeri ısıtma sistemine pipet ucu birkaç saniyeliğine yaklaştırılır ve ısı uygulamasıyla istenen düzeye getirmeye çalışılır (47).

b. Floresan ışık kaynağı eklentisi

Patch-Clamp araştırmaları sıklıkla normal olarak çalışılacak iyon kanalını ifadeleyen hücrelerle yapılır. Ancak çalışma amacına göre istenen kanal geni transfeksiyon ile normalde o geni ifadelemeyen hücre hatlarına geçici veya daimi olarak aktarılabilir. Bu aktarım için floresan ışık altında parlama yapabilen genellikle Green Fluorescent Protein (GFP) raportör geni kodlayan plazmidler kullanılır. İstenen kanalın aktarılan hücrede ifadelendiği doğrulanmış hücrelerden kayıt almak için mikroskoba floresan ışık kaynağı eklentisi ile transfekte hücreler tespit edilerek kayıtlar alınır (3, 4, 49).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Inverted mikroskop: Zeiss, Axiovert A1 ve Primo Vert (Almanya)

Yükselteç: HEKA, EPC-10 USB (Almanya)

Mikromanipilatör: Luigs and Neumann (Almanya)

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

Pipet yapıcısı (Puller): Sutter Instruments P90 (ABD)

Borosilikat tüpler: Sutter Instruments (ABD)

Peristaltik pompa: LongerPump (Çin)

Faraday kafesi: Süleyman Demirel Üniversitesi Metal Atölyesi (Türkiye)

Sarsıntı önleyici masa: Süleyman Demirel Üniversitesi Metal Atölyesi (Türkiye)

Laminar Flow Kabini: Jouan MSC 12 (ABD)

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

Şarjlı pipet: Witeg (Almanya)

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

Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)

Floresan spektrofotometre: Cary Eclipse, Varian, (Avustralya)

Plate reader: Infinite 200 Pro, Tecan (Avusturya)

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

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

Soğutmalı santrifüj: Kubota 2800 (Japonya)

Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

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

Çalkalamalı su banyosu: Termal Laboratuvar Aletleri (Türkiye)

Çalkalama cihazı: Biosan (Türkiye)

Kültür flaskları: Cell Star, Greiner Bio-One (Almanya)

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

Cryo tüpler: Greiner Bio-One (Almanya)

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

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Curcumin, Sigma Aldrich (ABD)

HAM'S F12 Medium, Biochrom (Almanya)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Sigma Aldrich (ABD)

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

Penicillin/Streptomycin, Biochrom (Almanya)

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

Trypsin-EDTA (%0,25), Sigma Aldrich (ABD)

Dimethyl sulphoxide (DMSO), Sigma Aldrich (ABD)

N-Methyl D-Glucamine (NMDG⁺), Sigma Aldrich (ABD)

Anthranilic acid (ACA), Sigma Aldrich (ABD)

Hydrogen peroxide (H₂O₂), Sigma Aldrich (ABD)

Cumene hydroperoxide, Sigma Aldrich (ABD)

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

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

HEPES, Sigma Aldrich (ABD)

Sodium chloride (NaCl), Merck (Almanya)

Potassium chloride (KCl), Merck (Almanya)

Calcium chloride (CaCl₂), Merck (Almanya)

L-glutamic acid, Merck (Almanya)

Cesium hydroxide monohydrate (CsOH.H₂O), Sigma Aldrich (ABD)

Hydrochloric acid (HCl), Merck (Almanya)

Potassium hydroxide (KOH), Merck (Almanya)

Fura-2 AM, Invitrogen (ABD)

TransFast Transfection Kit, Promega (ABD)

APOPercentage Apoptosis Kit, Biocolor (Kuzey İrlanda)

APOPercentage Release Solution, Biocolor (Kuzey İrlanda)

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

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

JC-1 Dye, Santa Cruz Biotechnology (ABD)

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

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



3.2. Yöntem

3.2.1. Hücrelerin Çoğaltımı ve Grupların Oluşturulması

Medyumların Hazırlanması

SH-SY5Y hücrelerinin ekim ve pasajlanmasında iki farklı medyumun (HAM'S F12, Biochrom, Almanya ve DMEM, Biochrom, Almanya) %50-%50 oranlarında karışımı kullanılmıştır. SH-SY5Y hücre hattı besi ortamı; %89 Medyum (%50 HAM'S F12 + %50 DMEM), %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom, Almanya) ve %1'i Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Almanya) antibiyotik kombinasyonu olacak şekilde modifiye edildi. Hazırlanan bu karışım bundan sonraki bölümlerde sadece 'medyum' olarak anılmıştır.

Laminar Akım Kabini ve Diğer Ekipmanların Hazırlanması:

SH-SY5Y hücrelerinin ekim, pasajlama ve transfeksiyon işlemleri steril Laminar Akım Kabini (Laminar Flow) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemlerin öncesinde laminar flowun (MSC 12, Jouan, ABD) kültür kaplarının yüzeyleri ile temas edecek çalışma alanı, 15 dakika boyunca Ultra Viyole (UV) ışığa maruz bırakılmak suretiyle sterilize edilmiştir. Hücrelerin ekim işlemine geçmeden önce laminar flowun çalışma yüzeyi, inverted mikroskopun (Zeiss, Primo Vert, Almanya) tablası ve diğer tek kullanımlık olmayan malzemeler %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. SH-SY5Y hücreleri -196 °C sıcaklıkta sıvı nitrojen tankı içerisinde bulunan 2 ml'lik cryo tüplerde (Greiner Bio-One GmbH, Almanya) muhafaza edilmiştir.

Hücrelerin Çözdürülmesi

Hazırlanan medyumdan tek kullanımlık steril pipetler yardımıyla 75 cm²'lik zemin alanına ve 250 ml'lik hacme sahip olan T75 flask (Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, Almanya) paketi laminar flow kabini içerisinde açılıp kapakları açılmadan

hazır bir şekilde bekletildiler. Bunun yanı sıra 15 ml'lik bir falkon tüp içerisine taze medyumdan 9 ml koyuldu. SH-SY5Y hücrelerini ihtiva eden cryo tüp sıvı nitrojen tankı içerisinden alınarak sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda (Termal Laboratuvar Aletleri, Türkiye) yarı sıvı yarı buz haline gelinceye kadar ısıtıldı. Cryo tüp iç çeperi eriyince ısıtma işlemi sonlandırılarak ve tüpün etrafı %70'lik etil alkol ile silinerek laminar flow kabini içerisine yerleştirildi. Henüz yarı buz-yarı sıvı haldeyken cryo tüp içerisindeki sıvının tamamı daha önceden hazırlanan içerisindedir 9 ml medyum bulunan 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüp 800 RPM (yaklaşık 125 g) devirde 5 dakika süreyle ve 20-23 °C sıcaklıkta santrifüj (Kubota 2800, Japonya) edildi. Süpernatant hassas bir şekilde uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücreler üzerine 10 ml taze medyum eklendi. 20-25 kez hassas bir şekilde resüspense edip hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Pipetaj işlemi bittikten sonra bu falkon tüp içerisindeki hücre-medyum süspansiyonu daha önceden hazırladığımız boş flasklara aktarıldı. Böylece hücrelerin çözme ve ekim işlemleri tamamlandı. Bu flasklar daha sonra steril inkübatöre alınarak burada 24 - 48 saat inkübe (37 °C ve %5 CO₂) edildi (HF 90, Heal Force, Smart Cell, ABD).

Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin, 25 cm² yüzey alanına sahip T25 flasklara (Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, Almanya) pasajlanması amaçlanmıştır. Laminar flow kabini içerisinde ambalajları açılan flasklar kapakları açılmadan hazır bir şekilde bekletildi. T75 flasklarda 24 - 48 saat inkübe edilen hücrelerin üreme yoğunlukları (konfluent) inverted mikroskop yardımıyla tespit edilerek en az %80 konfluent olan flasklar çalışmaya dâhil edildi. Ayrıca mikroskopta kontaminasyon olup olmadığı da değerlendirildikten sonra çalışmaya uygun flasklar laminar flowa alındı. SH-SY5Y hücreleri buldukları kültür kaplarının zeminine tutunma özelliği göstermektedir. Deneysel çalışmaların yapılabilmesi için flask zemininden kaldırılmaları gerekmektedir. Hücrelerin büyütme medyumunu atık toplama şişesine boşaltıldı. Her flaskın üzerine yaklaşık 2,5 ml 1X Phosphate Buffered Saline (PBS, Biochrom, Almanya) koyularak yavaş hareketlerle hücreler nazikçe yıkandı. Flask içerisindeki PBS pipet yardımıyla hücrelerin bulunduğu flasktan uzaklaştırıldı. Böylelikle ölü

hücre artıkları ve ekstraselüler ortamda bulunan toksik metabolitler ortamdaki uzaklaştırılmış oldu. Hücrelerin üzerine %0,25'lik Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, ABD) çözeltisinden flask zeminini kaplayacak miktarda (yaklaşık olarak 1-2 ml) koyuldu. Hücrelerin inverted mikroskop ile tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyden ayrıldıkları tespit edilince flasklar laminar flow kabinine alındı ve üzerlerine 8-9 ml taze medyum eklendi. Çok hassas bir şekilde 10-15 kez pipetaj işlemi uygulandı. Pipetaj işlemi bitince hücreler steril boş bir 15 ml'lik falkon tüpe alındı. 5 dakika boyunca 1200 RPM de santrifüj edildi. Süpernatant atık toplama şişesine döküldü. Böylece hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA'dan arındırıldı. Falkon tüpün dip kısmında biriken SH-SY5Y hücre topluluğu üzerine yaklaşık 5 ml medyum eklendi ve tek kullanımlık steril bir pipetle hassas bir şekilde pipetaj işlemi yapıldı. Daha önceden hazırladığımız ve içerisine 4'er ml medyum aktardığımız T25 flasklara falkon tüpünde bulunan SH-SY5Y hücre topluluğu-medyum karışımından 1'er ml alınarak eklendi. Flaskların kapağı kapatıldıktan sonra bulunduğu zemin üzerinde öne-arkaya ve sağa-sola doğru çok yavaş hareket ettirilerek hücrelerin flask içerisindeki medyuma homojen bir biçimde yayılması sağlandı. Böylece pasajlama işlemi tamamlanan hücreler beşe bölündükten sonra inverted mikroskopta son kez kontrol edilerek tekrar inkübatöre alındı ve 24 - 48 saat boyunca inkübe (37 °C ve %5 CO₂) edildi. Süre sonunda hücrelerin %80'den fazla konflüente ulaşması durumunda; 'Hücrelerin Pasajlanması' başlığı altındaki adımlar takip edilerek yeniden pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama işlemi yaklaşık her 24 - 48 saate bir tekrarlandı.

3.2.2. Hücre Canlılığı (MTT) Testi ile Curcuminin Doz Tayini

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Aldrich, ABD) gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Temel çalışma prensibi, proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak Plate Reader ya da spektrofotometre ile

ölçülmesine dayalıdır. Her konsantrasyon için 4 kuyucuk kullanıldı ve deney iki tekrarlı yapıldı.

%80 konfluente ulaşmış bir T25 flaskı %0,25'lik Tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra hücreler sayım cihazı (Casy TT, Roche, Almanya) ile sayıldı. Steril 96'lık plate'nin her bir kuyucuğuna yaklaşık 2000 hücre olacak şekilde 125 µl taze medyum içerisinde ekim yapıldı. 24 saat rutin inkübasyona alındı. Süre sonunda 125 µl taze medyumda 0 (Kontrol, yalnızca taze medyum), 1, 2, 5, 10, 15 µM curcumin solüsyonları kuyucuklara aktarıldı. Plate tekrar 24 saat inkübasyona alındı. Süre sonunda 20 µl MTT boyası (10 mg/ml) her kuyucuğa ilave edildi. Boyanın uygun koşullarda karışması için yine 3 saatlik inkübeden sonra 5-7 dk oda koşullarında çalkalama cihazında (Biosan, Türkiye) nazik çalkalama yapıldı. Ardından Plate Reader cihazında 570 nm ve 630 nm dalga boylarında okumaları yapıldı. Elde edilen değerler kontrole kıyasla hesaplandı (50).

3.2.3. Grupların Oluşturulması

Tez çalışmasında 4 farklı grup oluşturuldu. Hücrelere uygulanan işlemler ve yapılan analizler hakkında detaylı bilgiler aşağıdaki grup başlıkları altında belirtilmiştir. Bütün gruplara; Patch-Clamp, Kalsiyum Sinyali, Western-Blot, Reaktif Oksijen Türleri (ROT) üretim tayini, Mitokondriyal Membran Depolarizasyon tayini, Kaspaz 3, Kaspaz 9, Apoptozis tayini testleri uygulanmıştır.

1. Grup: Kontrol Grubu

Bu gruptaki hücreler, TRPM2 kanal transfeksiyon işlemi yapılmayan ve curcumin ile inkübe edilmeyen hücrelerdir. Kontrol grubu flaskları yeterli konfluente ulaşınca medyum değişimi yapıp diğer gruplarla aynı koşul ve sürede inkübasyona bırakıldı.

2. Grup: Curcumin Grubu

Bu gruptaki hücelere, TRPM2 kanal transfeksiyon işlemleri uygulanmadı. Yeterli konflüente ulaştıklarında flasklardaki medyumunu uzaklaştırılıp 5 µM curcumin içeren taze medyum ile 24 saat boyunca inkübe edildi.

3. Grup: Transfekte Grubu

Bu gruptaki hücelere TRPM2 kanal transfeksiyon işlemleri tamamlandıktan sonra medyum değişimi yapılarak 24 saat boyunca yalnızca taze medyum ile inkübe edildi.

4. Grup: Transfekte + Curcumin Grubu

Bu gruptaki hücelere TRPM2 kanal transfeksiyon işlemleri uygulandı ardından 24 saat boyunca taze medyum içerisinde 5 µM curcumin ile inkübe edildi.

3.2.4. TRPM2 pcDNA'sının SH-SY5Y Hücelerine Transfeksiyonu

Transfeksiyonun amacı normal olarak ifadelenemeyen bir geni dışarıdan çeşitli ajanlar/yöntemler ile nükleusa katıp geçici veya daimi ifadelenemesini sağlamaktır. SH-SY5Y nöroblastoma hüceleri doğal olarak TRPM2 kanal proteini ifadelememektedir. Nöronal bir model olarak TRPM2 pcDNA'sı içeren plazmidlerin aktarılması gerekmektedir. Aktarılacak TRPM2 kanal geninin ifadeleneip ifadelenemediğini anlamak adına raportör Green Fluorescent Protein (GFP) geni ile işaretlenmiş plazmidler kullanılmıştır. Aktarılan plazmidlerde TRPM2 gen ekspresyonu GFP gen ekspresyonuna bağlandığından transfekte hüceler floresan eklentili inverted mikroskop ile floresan ışığa maruz bırakıldıklarında floresan ışımaya yapmaktadır. Bu gözlemlerle transfeksiyonun tutarlılığı anlaşıldıktan sonra analizlere geçilmiştir. SH-SY5Y hüceleri *plasmid construct enhanced green fluorescent protein TRPM2/TRPM2 C-terminal splice variant* (pcDNA3-EGFP-TRPM2/TRPM2ΔC) plazmidleri ile TransFast Transfection Reagent (Promega, ABD) kiti içeriğinde bahsedildiği şekilde transfeksiyon işlemleri gerçekleştirildi.

Transfeksiyon işlemi kitin yaygın kullanılan (CHO, HEK293 vs.) hücre hatlarına optimize edilmiş prosedürüne uygun olarak yapıldı. Transfeksiyon işlemi yalnızca Transfekte ve Transfekte + Curcumin gruplarına yapıldı. Transfeksiyon işlemi aşağıdaki sıralamayla gerçekleştirildi.



Önceki Gün: Hücreler transfeksiyon gününde %80 konfluent olacak şekilde ekildi. TransFast Transfection Reagent Diluent'in 400 µl'si enjektör yardımıyla çekildi ve cam şişedeki toz Lipid Reagent'a eklendi. Vortekslendi. Bu şekilde TransFast Transfection Reagent stok solüsyonu elde edilmiş oldu.



Transfeksiyon Günü: T25 flask için aktarılacak miktardaki (5 µg) DNA 2 ml medyum içerisinde dilüe edildi.



DNA - medyum karışımına DNA miktarının hacimce 3 katı (15 µl) kadar TransFast Transfection Reagent eklendi. Hemen vortekslendi.



Oluşan bu karışım oda sıcaklığında 10-15 dk inkübe edildi.



Flasklar içindeki hücrelerin inkübasyonu süresince kullanılan medyum uzaklaştırıldı.



DNA - TransFast Transfection Reagent - medyum karışımı (2 ml) nazik bir şekilde hücreler kaldırılmadan flasklara aktarıldı.



37 °C'de 1 saatlik inkübasyona bırakıldı.



4'er ml taze medyum eklendi ve 37 °C'de 48 saatlik inkübasyona bırakıldılar.



Süre sonunda istenen analizleri yapmaya hazır olup olmadıkları floresan eklentili inverted mikroskop ile tayin edildi.

48 saat sonunda transfeksiyon işlemi tamamlandığı pilot deneylerle önceden tecrübe edildiğinden curcumin inkübasyonu bu süre sonunda kültür flasklarına taze medyum içerisinde yapılmıştır. Curcumin ile inkübe edilmeyen transfekte grubu ise yalnızca medyumunu tazelenerek 24 saat süreliğine tekrar inkübatöre alınmıştır. Transfekte ve Transfekte + Curcumin grupları 24 saatlik inkübasyon sonrasında gerekli analizler yapmak üzere %0,25'lik Tripsin-EDTA ile kaldırılmış, araştırılacak yöntem veya tekniğe uygun prosedürlerde çalışma takip edilmiştir.

3.2.5. Patch-Clamp Analizleri

Patch-Clamp deneylerinde kullandığımız tampon çözeltiler, aşağıdaki tablolarda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır (Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3). Çözücü olarak tüm çözeltilerde ultra distile su kullanıldı. Çözeltilerin osmaolaritesi 310 mosmol/l olacak şekilde ayarlandı (51).

Tablo 1. Ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü. pH KOH ile 7,4'e ayarlandı.

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

Tablo 2. NMDG⁺li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü. pH HCl ile 7,35'e ayarlandı.

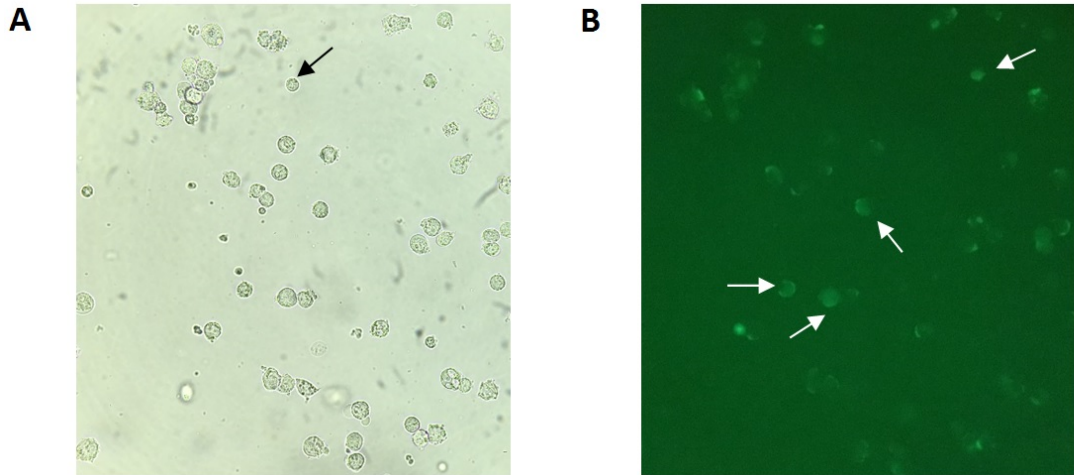
Kimyasal Madde	Konsantrasyon (mM)
NMDG ⁺	150
MgCl ₂ .6H ₂ O	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	1
HEPES	10
D-Glukoz.H ₂ O	10

Tablo 3. İntraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü. pH CsOH ile 7,2'ye ayarlandı.

Kimyasal Madde	Konsantrasyon (mM)
L-Glutamik Asit	145
NaCl	8
MgCl ₂ .6H ₂ O	2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,001
HEPES	10
EGTA	10

Elektrofizyoloji-İyon Kanal Akımlarının Ölçülmesi ve Kaydedilmesi

İnkübasyonu tamamlanan flasklardaki hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA ile kaldırılıp 15 ml'lik steril falkona alınıp santrifüjlendikten sonra süpernatantı atıldı. 1 ml taze medyum eklenerek çalışmaya hazır hale getirildi. Mikroskopla bakıldığında uygun yoğunlukta olacak şekilde önceden 1 ml normal ekstraselüler tampon çözeltisi (Tablo 1) koyulan çembere 10-20 µl aktarıldı. Transfeksiyon belirteci olan floresan ışık altında yeşil parlayan hücreler tespit edildi ve temas edilmesi planlandı.



Resim 4. Transfekte hücrelerin mikroskop altında tespiti. Inverted mikroskopla aydınlık alanda (A) ve floresan ışık altında (B) gözlenen hücreler (beyaz oklar en belirgin GFP parlaması olan hücreleri, siyah ok floresan alanda parlaması görünmeyen hücreyi göstermektedir).

Tüm gruplarda mikropipetin içerisine normal intraselüler tampon çözeltisi (Tablo 3) dolduruldu. Pipet içerisinde hava kabarcığı kalmaması için; parmak ile duvarlarına çok hafifçe vurularak kabarcığın uzaklaşması sağlandı. Mikropipet, kayıt elektrotunun üzerine kılıf gibi giydirilerek sıkıştırıldı (52). Kısa bir süre bekledikten sonra elektrofizyolojik kayıtlara başlandı.

Tüm hücrelerden EPC 10 USB (HEKA, Lamprecht, Almanya) yükseltecinin bağlı olduğu PatchMaster USB (HEKA, Lamprecht, Almanya) yazılımına sahip bir bilgisayar yardımıyla Patch-Clamp tekniğinin whole-cell (tüm hücre) konfigürasyonu kullanılarak kayıtlar elde edildi. Tüm kayıtlar oda sıcaklığında (24-26 °C) alındı. Kayıt esnasında hücrelere temas etmede; dış çapı 1,5 mm, iç çapı 0,86 mm ve uzunluğu 10 cm olan borosilikattan (Sutter Instrument, Novato, ABD) yapılmış tüpler kullanıldı. İstenen çap ve dirençteki (~ 2-8 MΩ) uca sahip mikropipetler elde etmek için pipet yapıcı (puller) (Sutter Instrument, Novato, ABD) kullanıldı (4).

Sıvıya temas eden Patch pipetinin direnci kaydedildi. Hücre zarına temas edene kadar mikropipet mikromanipülatör vasıtasıyla yönlendirildi (53). Hücre zarı ile temasın sağlandığı hem mikroskop altında gözle görülerek hem de bilgisayar yazılımının osiloskop ekranındaki anlık direnç değişiminden kontrol edilerek kesinleştirildikten sonra sırasıyla on-cell ve whole-cell kayıt konfigürasyonlarına geçildi. Perfüzyon sistemi ile pipete hafif bir negatif basınç (vakum, emme kuvveti) uygulanarak pipet ile hücre zarı arasında 'gigaseal' (1-10 GΩ) diye anılan sıkı mühür oluşumu sağlandı (54). Hücre zarı potansiyeli bilgisayar yazılımı kullanılarak -60 mV'a ayarlandı (kenetlendi). Bu aşamadan sonra pipete bir miktar daha vakum uygulanarak tutulan zar parçasının yırtılması sağlandı ve böylece tüm hücre konfigürasyonuna geçildi. Peristaltik pompa (LongerPump, Çin) ile çemberdeki sıvı bir yandan tahliye edilirken aynı hızda diğer taraftan da perfüzyon sistemi ile 10 mM H₂O₂ çemberde bulunan hücreler üzerine gönderildi. Bu şekilde oksidatif stres ürünlerine karşı duyarlılığı bilinen TRPM2 kanallarının aktivasyonu sağlanmaya çalışıldı. Meydana gelen kanal aktivitesine ait akımlar belirli bir platoya ulaşıncaya kadar beklendi. Beklenen plato oluştuğunda; H₂O₂ perfüzyonu durdurularak kanalları inaktive ettiğine dair bildirimler olan 25 µM konsantrasyonundaki Anthranilic acid (ACA), H₂O₂'nin gönderilmesine benzer şekilde çembere gönderildi. Son olarak kayıt alınan hücrenin canlılığından emin olmak üzere NMDG⁺li ekstraselüler

tampon çözelti (Tablo 2) çembere gönderilerek kayda devam edildi. Canlılığı devam eden hücrelere tekrar sırasıyla H₂O₂, ACA ve NMDG⁺ uygulamaları yapılarak kayıt sonlandırıldı (55). Akım-voltaj ilişkisi 400 milisaniyeden fazla sürede -90 mV'tan +60 mV'a kadar uygulanan voltaj rampalarından elde edildi. Analiz için, bir nöroblastoma hücresindeki maksimum akım genliği o hücreye ait yüzey alanıyla doğru orantılı olan kapasitans değerine oranlanarak bulundu. Deney sonuçları orijinal kayıtların çizgi grafikleri ve akım yoğunluğu (pA/pF) grafiği şeklinde sunuldu.

3.2.6. Kalsiyum Sinyali Analizleri

Her gruba ait flasklardaki hücreler rutin olarak kaldırıldı, 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 400 g'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, 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 yedi dakika boyunca kayıt alındı. Stimülasyon için kümen hidroperoksid (CHPx) kullanıldı ve TRPM2 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 (56).

3.2.7. Western Blot Analizleri

Tüm Western Blot analizleri standart protokol izlenerek gerçekleştirildi. Her gruba ait flasklar rutin olarak kaldırılıp santrifüjden sonra süpernatant atıldı. Hücreler lizis tamponu içerisinde çözdürüldü. 1600 g'de 20 dakika boyunca santrifüj edilen SH-SY5Y hücrelerinin üzerinden süpernatant uzaklaştırıldı. Total protein miktarı Bradford yöntemine göre belirlendi. Immunoblottlama için %6 ile %13 arasında

değişen konsantrasyonlarda Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel (SDS-Page) hazırlandı ve jellere eşdeğer protein (her örnekten 30 µg) yüklemesi yapıldı. Elektroforez işlemi ardından jeller nitroselüloz membranlara transfer edildi. Oda sıcaklığında 1 saat boyunca %5 yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye) ve %1 Tween 20 içeren Tris Buffered Saline (TBS) ile bekletildi ve 3 defa 5 dk süreyle TBST buffer ile yıkandı. Daha sonra membran primer (TRPM2 Antibody PA1-46466, Thermo Scientific Fischer, ABD; Caspase 9/p35/p10 Polyclonal Antibody; Caspase 3, p17-specific Polyclonal Antibody; beta Actin Polyclonal Antibody; PARP1 Polyclonal Antibody Proteintech, ABD) ve sekonder antikor (Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab, İngiltere) ile inkübe edildi. İşlem sonunda β-actin, PARP1, prokaspaz 3, prokaspaz 9 ve TRPM2 kanal proteinlerine ait bantlar hassas jel görüntüleme cihazı (Syngene G:Box, İngiltere) kullanılarak görüntülendi (57).

3.2.8. Hücre İçi ROT Üretimi Tayini

İnkübasyon sonrasında kaldırılan her bir flasttaki hücreler 1 ml 1X PBS ile dilüe edildi. Bundan 150 µl'si ROS üretim tayini analizi için ayrıldı. 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 µl taze medyum eklendi ve 15-20 kez pipetaj yapıldı. Üzerine 1µl Dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Sigma Aldrich, ABD) ROT boyasından koyulup tekrar 15-20 kez pipetaj yapıldı. Eppendorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 3500 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 değer olarak belirlendi (58).

3.2.9. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analizi

1 ml 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 3'e 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 membran depolarizasyon boyasından koyuldu ve tekrar 15-20 kez pipetaj yapıldı. Eppendorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 3500 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'da 488 nm eksitasyon, 590 nm (JC-1 kümeleşmeleri) ve 525 nm (JC-1 monomerleri) emisyon dalga boylarında okunup 590/525 emisyon oranıyla sonuçlar hesaplandı. Veriler kontrol grubuna kıyasla nispi artış şeklinde grafiklendirildi (59).

3.2.10. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Analizleri

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarının hazırlanması için 2,5 ml kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponu ham solüsyonlarından ayrı ayrı 15 ml'lik falkon tüplerine koyuldu. Her 2 tüpe de 2,5µl NP-40 kimyasalından ilave edildi. Sonrasında vortekslenip floresan kaspaz DTT boyasından 12,5µl koyulup tekrar vortekste karıştırıldı. 1 ml 1X PBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 µl'si kaspaz 9, 150 µl'si kaspaz 3 analizi için ayrıldı. Her iki analiz için de 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 15 µl olacak şekilde 10 kuyucuğa eşit bir şekilde koyuldu. Üzerlerine öncesinde hazırlamış olduğumuz kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarından 50'şer µl eklendi. Sonrasında açığa çıkan enzimler Plate Reader cihazında 360 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında okunarak kaspaz 3 ve 9 enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi (60).

3.2.11. 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 3'e bölündü. Daha sonra üzerine 950 µl 1X PBS koyuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 3-5µl apoptozis boyasından (APOPercentage, Biocolor, İngiltere) ilave edildi ve 30 dk süreyle çalkalama cihazına bırakıldı. Çalkalama sonrası 3500 RPM de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 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 (60).

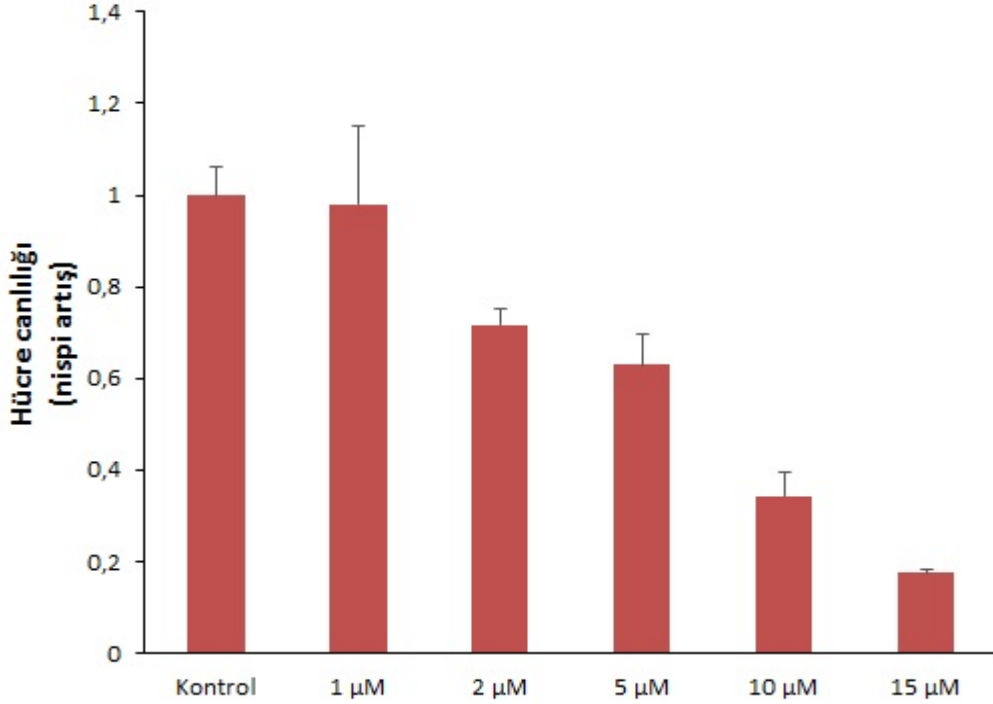
3.3. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 17.0 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı Mann-Whitney *U* testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Curcuminin Doz Tayini Bulguları

Curcuminin sırasıyla 0, 1, 2, 5, 10, 15 μM konsantrasyonlarında 24 saat süreyle inkübasyonu neticesinde kuyucuklardan alınan absorbans değerleri kontrole kıyaslandığında 5 μM curcumin inkübasyonunun SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri için optimal doz olduğuna, bu dozdan sonra hücre canlılığının keskin bir düşüşle azaldığı gözlenerek karar verilmiştir (Grafik 1). Bu sonuç literatürle de bağdaşmaktadır (61).

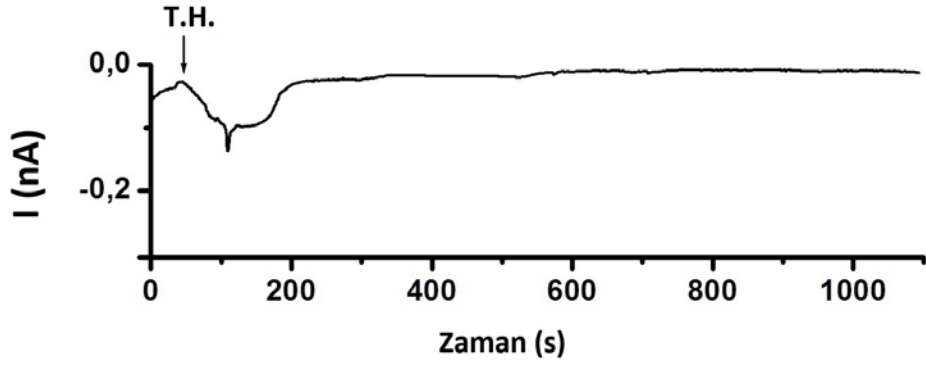


Grafik 1. 96'lık plakaya ekilmiş SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine 5 farklı dozda curcumin inkübasyonunun hücre canlılığının MTT testi ile belirlenmesi. (Ortalama \pm SD; n=8)

4.2. Patch-Clamp Sonuçları

a. Kontrol Kaydı

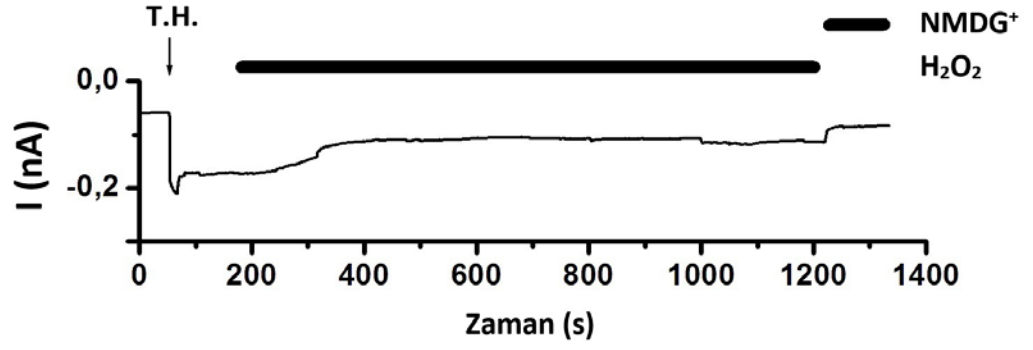
Transfekte edilmemiş ve hiçbir inkübasyon uygulanmamış SH-SY5Y nöroblastoma hücresinden 10 mM H₂O₂ ile uyarım yapılmadan alınan tüm hücre kaydıdır. Şekil 6'da görüleceği gibi herhangi bir uyarım yapılmayan hücrelerde tüm hücre kaydı boyunca kanallar vasıtasıyla akım değişikliğine sebep olacak kadar iyonik değişim olmadığından düz bir hat şeklinde gözlenmiştir.



Şekil 6. H₂O₂ ile uyarım yapılmamış SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinden alınan kontrol kaydı.
(T.H. : tüm hücre, whole-cell konfigürasyonuna geçişi temsil eder)

b. Kontrol Grubu Kaydı

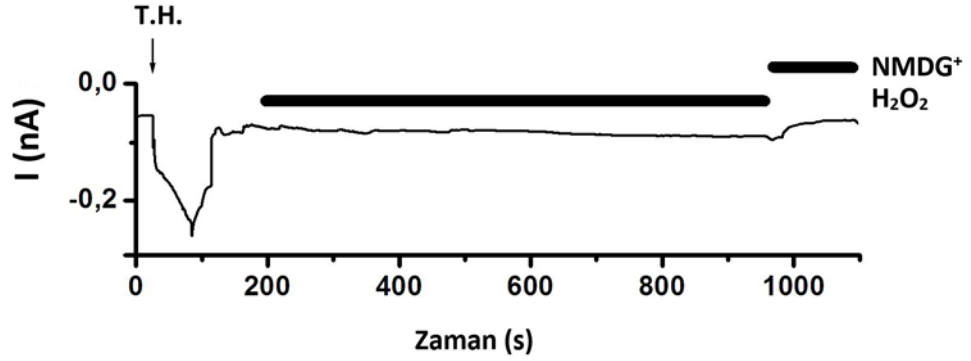
Transfekte edilmemiş ancak tüm hücre kaydı alınırken H₂O₂ ile uyarım yapılmış kontrol grubuna ait SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinden alınan kayıttır. TRPM2 kanallarını doğal olarak ifade etmeyen bu hücre hattından alınan kayıtlarda da H₂O₂ iyon değişimine sebep olmadığından akımda bir değişiklik gözlenmeyip kayıt süresince düz bir hat şeklinde seyretmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Kayıt esnasında H_2O_2 ile uyarım yapılan kontrol grubuna ait SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinden alınan kontrol grubu kaydı. (T.H. : tüm hücre)

c. Curcumin Grubu Kaydı

Transfekte edilmemiş ancak Patch-Clamp kayıtları öncesinde 24 saat boyunca $5 \mu M$ curcumin antioksidanı ile inkübe edilmiş, tüm hücre kaydı alınırken H_2O_2 ile uyarım yapılmış curcumin grubuna ait SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinden kayıt alınmıştır (Şekil 8).

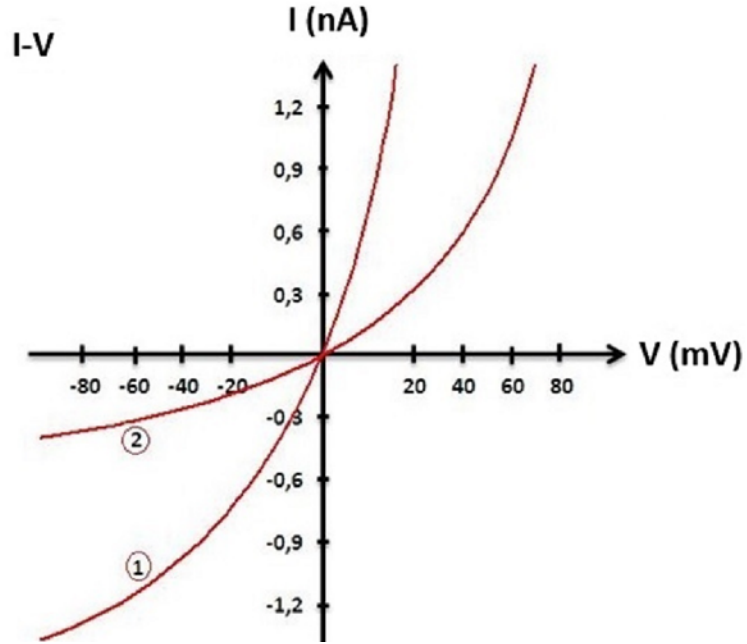
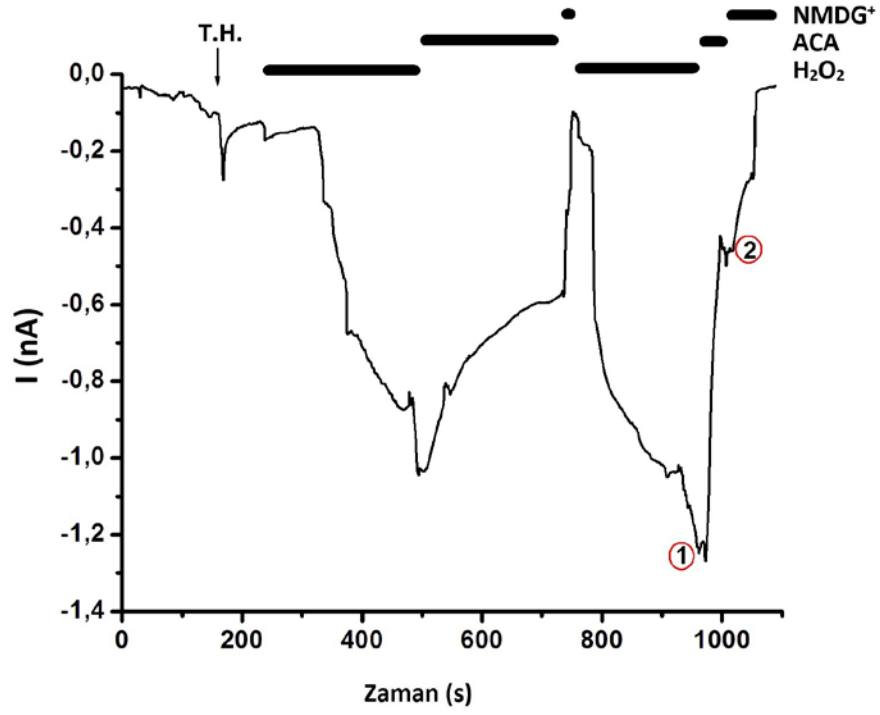


Şekil 8. Kayıt esnasında H_2O_2 ile uyarım yapılan $5 \mu M$ curcumin ile inkübe edilen SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine ait curcumin grubu kaydı. (T.H. : tüm hücre)

d. Transfekte Grubu Kaydı

TRPM2 kanallarını doğal olarak ifadelemeyen SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri bu kanal genini içeren plazmid vasıtasıyla transfekte edildikten sonra floresan ışık altında GFP parlaması yapan hücreler H_2O_2 ile uyarım yapılarak bu kanallardan hücreye iyonik akış ile hücrenin elektriksel akım değişimi beklenmiştir.

Hücre içerisine katyon akışı negatif akım oluşumuna sebep olduğundan bu kayıtlarda akım çizgisinin aşağı yönlü görüntüsü TRPM2 kanallarının aktivasyonuna, yukarı yönlü görüntüsü inhibisyonuna delalet etmektedir. Hücre içi oksidatif stres parametrelerinden ve TRPM2 kanal agonistlerinden olan H_2O_2 ekstraselüler solüsyonla hücrelere uygulandığında oluşan negatif akımlara karşı TRPM2'ye özgü antagonist ACA (25 μM) uygulandığında akım yönünün pozitif yaklaşması ile ACA etkisiyle kanalların kapanıp akımın önemli derecede azaldığı ancak tamamen başlangıç seviyesine kadar gerilemediği gözlenmiştir. Ekstraselüler NMDG⁺ uygulamasıyla akımın sıfır seviyelerine oldukça yaklaştığı gösterilmiştir. Transfekte grubuna ait kayıtlarda ekstraselüler sıvı içerisinde hücrelerin bulunduğu çembere sırasıyla H_2O_2 , ACA, NMDG⁺ uygulanarak transfeksiyon neticesinde kanal ifadeleyen hücrelerden akım kayıtları alınmıştır. Membran potansiyelinin kenetlendiği voltaj değerine karşın akımın değişimini ifadeleyen akım-voltaj (I-V) eğrisi çizilmiştir. I-V eğrisinde H_2O_2 ile kanalın aktive olduğu seviye ile NMDG⁺ ile inaktive olduğu seviye sırasıyla 1 ve 2 rakamlarıyla gösterilmiştir (Şekil 9).

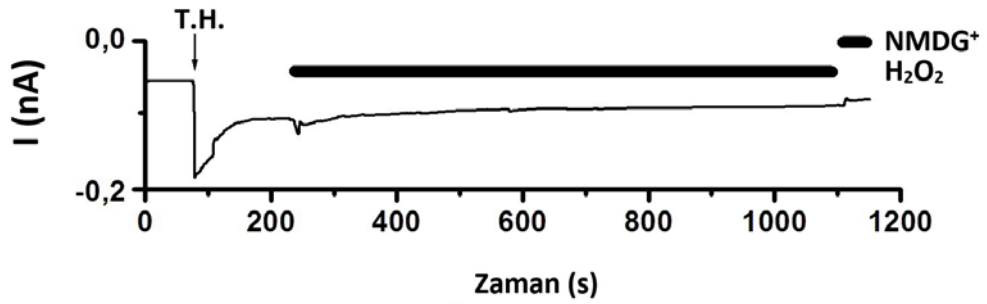


Şekil 9. TRPM2 kanalı transfekte edilen ve H_2O_2 ile uyarım yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine ait transfekte grubu kaydı ile akım-voltaj ilişkisini gösteren I-V eğrisi grafiği. Her iki grafik için de 1: H_2O_2 ile kanalların açılışını, 2: $NMDG^+$ ile kanalların kapanışını temsil etmektedir.

(T.H. : tüm hücre)

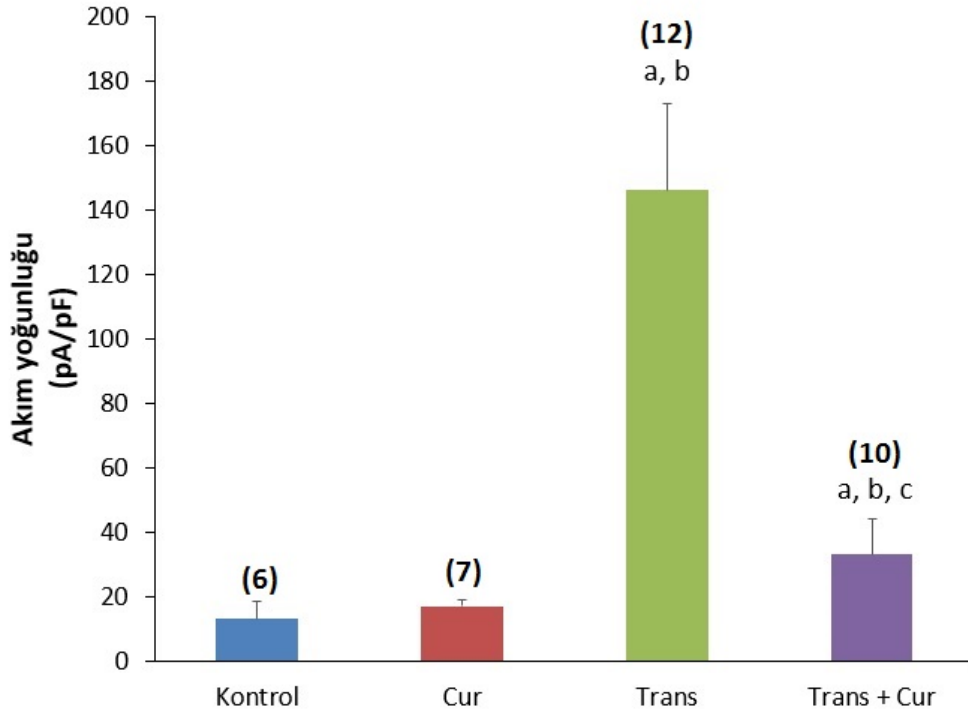
e. Transfekte + Curcumin Grubu Kaydı

Transfekte + Curcumin grubundan alınan kayıtlarda 24 saat boyunca 5 μM curcumin ile inkübe edilen hücrelerde H_2O_2 ile uyarım yapıldıktan sonra kayıtların tıpkı kontrol grubunda olduğu gibi düz bir çizgi halinde olması (Şekil 10), curcumin inkübasyonunun TRPM2 kanal akımları üzerine neredeyse tamamen baskılayıcı bir etkisi olduğu gözlenmiştir.



Şekil 10. TRPM2 transfeksiyonunu takiben 24 saat boyunca 5 μM curcumin ile inkübe edildikten sonra H_2O_2 ile uyarım yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine ait Transfekte + Curcumin grubu kaydı. (T.H. : tüm hücre)

Grupların TRPM2 kanalları aracılı katyon girişine bağlı oluşan elektriksel akım değerlerinin, hücrelerin büyüklüğüne bağlı olarak değişen kapasitans değerine oranıyla elde edilen akım yoğunluğu Grafik 2’de gösterilmiştir.

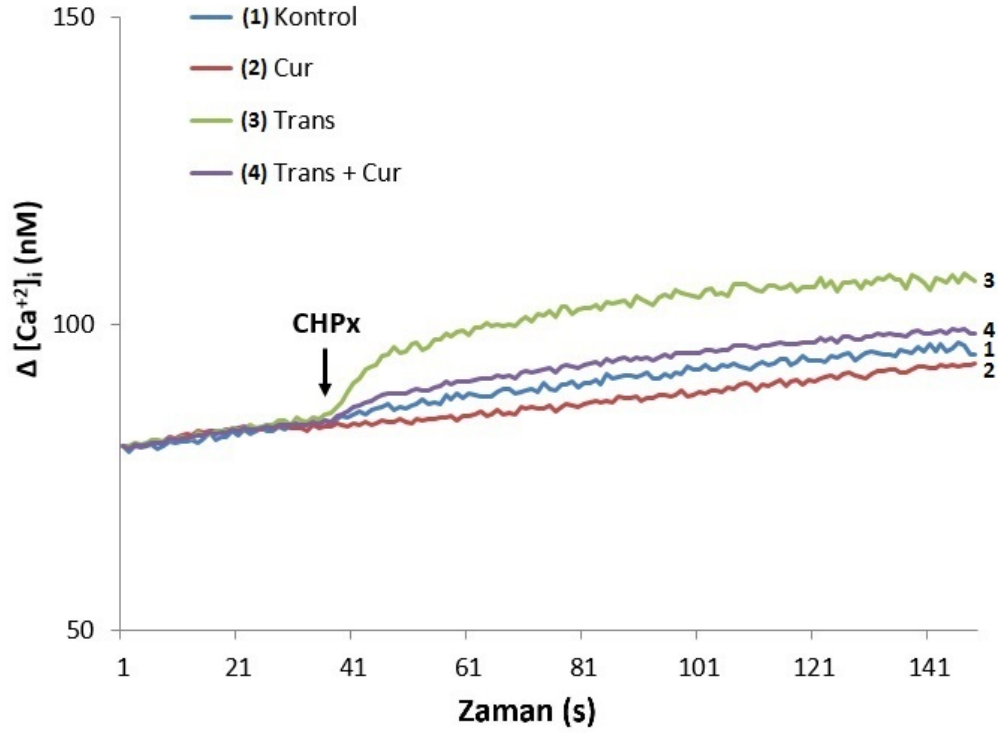


Grafik 2. Grupların akım yoğunluğu grafiği. TRPM2 aracılı en yüksek akım değeri ile kapasitans değerinin oranıyla belirlenmiştir. Parantez içerisindeki sayılar her gruba ait alınan kayıt sayısını göstermektedir. İstatistiksel olarak anlamlı akımların uyarım ve inhibisyonları, parantezlerin üstlerinde yer alan harflendirmelerle (a; $p < 0.001$ Kontrol ile kıyaslandığında, b; $p < 0.001$ Curcumin ile kıyaslandığında, c; $p < 0.001$ Transfekte ile kıyaslandığında) gösterilmiştir. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu, Ortalama \pm SD).

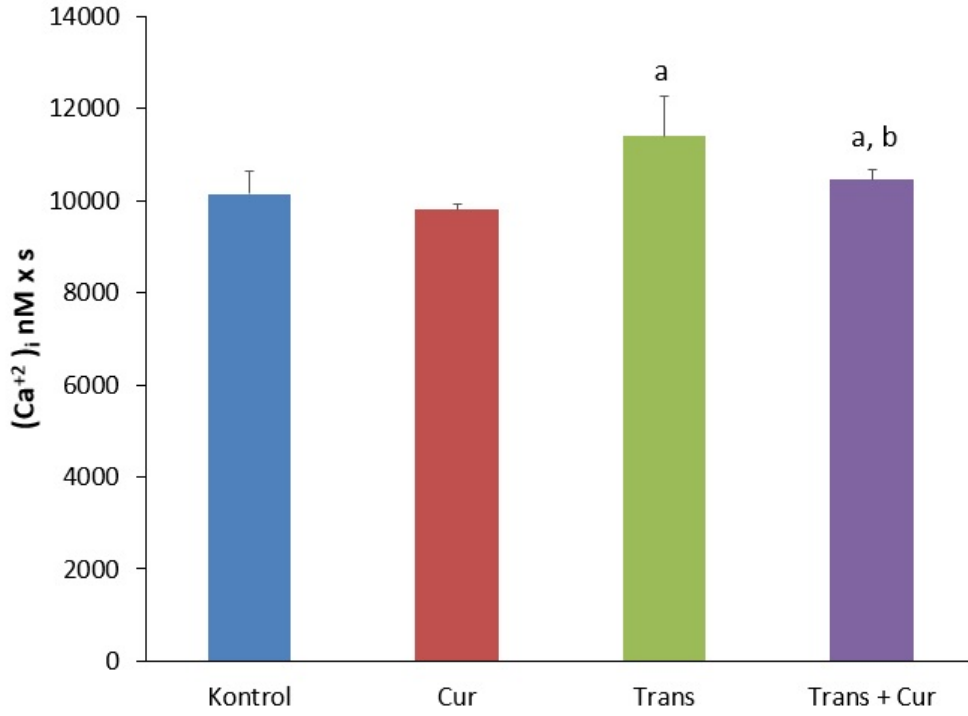
4.3. Kalsiyum Sinyali Analiz Sonuçları

Tüm gruplara ait hücreler bölüm 3.2.3'te belirtilen şekilde inkübasyonları tamamlandıktan sonra tripsinize edilerek kaldırılmış, 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 H_2O_2 kullanılmıştır. Tüm gruplara ait serbest Ca^{+2} salınımı Grafik 3'te gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde transfekte grubunda TRPM2 kanal ifadesine bağlı olarak, hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyleri kontrol grubuna kıyasla artmıştır ($p < 0.05$). Yalnızca curcumin ile inkübe edilen grupta hücre içi serbest Ca^{+2} miktarı kontrole kıyasla azalmıştır. Transfekte + Curcumin grubunda ise transfekte grubuna kıyasla hücre içi serbest Ca^{+2} seviyeleri

curcumin inkübasyonunun etkisiyle azaldığı ve kontrol grubuna oldukça yaklaştığı gözlenmiştir (Grafik 4).



Grafik 3. Kümen hidroperoksid (CHPx) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine curcumin inkübasyonunun etkilerinin zamanla değişimi. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu)



Grafik 4. CHPx stimülasyonu ile indüklenen hücre içi Ca²⁺ miktarı üzerine curcumin inkübasyonunun etkilerinin sütun grafiği ile gösterimi. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri harflendirmelerle (a; p<0.05 Kontrol ile kıyaslandığında, b; p<0.05 Transfekte ile kıyaslandığında) gösterilmiştir. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu, Ortalama ± SD; n=3)

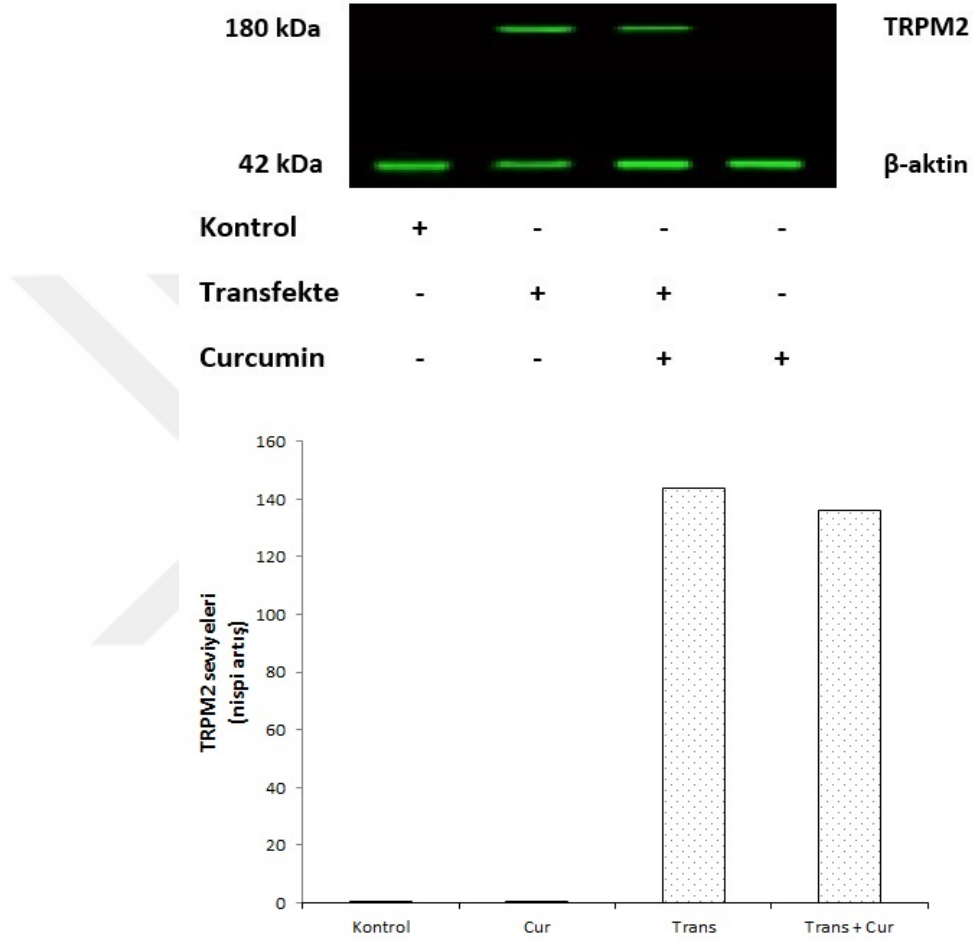
4.4. Western Blot Analiz Sonuçları

Tüm gruplara ait hücreler bölüm 3.2.3'te belirtilen şekilde inkübasyonları tamamlanıp tripsinize edilerek kaldırıldıktan sonra sırasıyla lizis, jele yükleme, membrana transfer, primer ve sekonder antikor muameleleri ardından görüntülenen grupların TRPM2, PARP1, prokaspaz 3 ve prokaspaz 9 ekspresyon düzeyleri hesaplanmıştır. Aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

a. Grupların TRPM2 kanal proteini ifade düzeyleri

Transfeksiyon uygulamasının kantitatif belirteci olan TRPM2 ifadesinin tüm gruplarda Western Blot yöntemi ile araştırılması sonucunda doğal olarak SH-SY5Y hücrelerinin TRPM2 kanallarını ifadelemediği, transfeksiyon yoluyla bunun

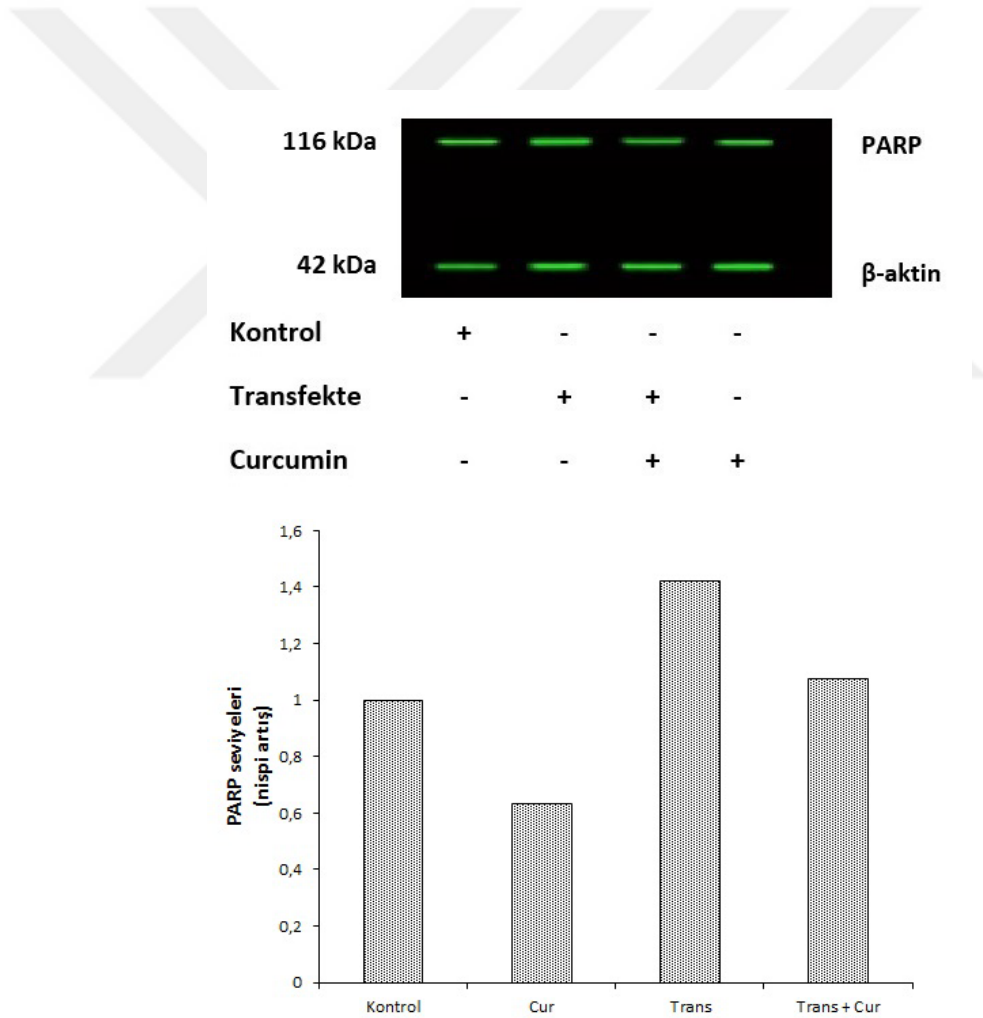
sağlanabileceği gösterilmiştir. Bu sonuçlar literatürle de örtüşmektedir (62). Transfekte + Curcumin grubunda ise istatistiki olarak anlamlı olmayan bir şekilde kanal ifadesinin transfekte grubuna nispetle azaldığı görülmüştür (Şekil 11).



Şekil 11. Grupların TRPM2 kanal ekspresyon düzeylerinin Western Blot sonrası bant görüntüleri ve grafikte gösterimi. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu)

b. Grupların poli-(ADP-Riboz) polimeraz 1 (PARP1) ifade düzeyleri

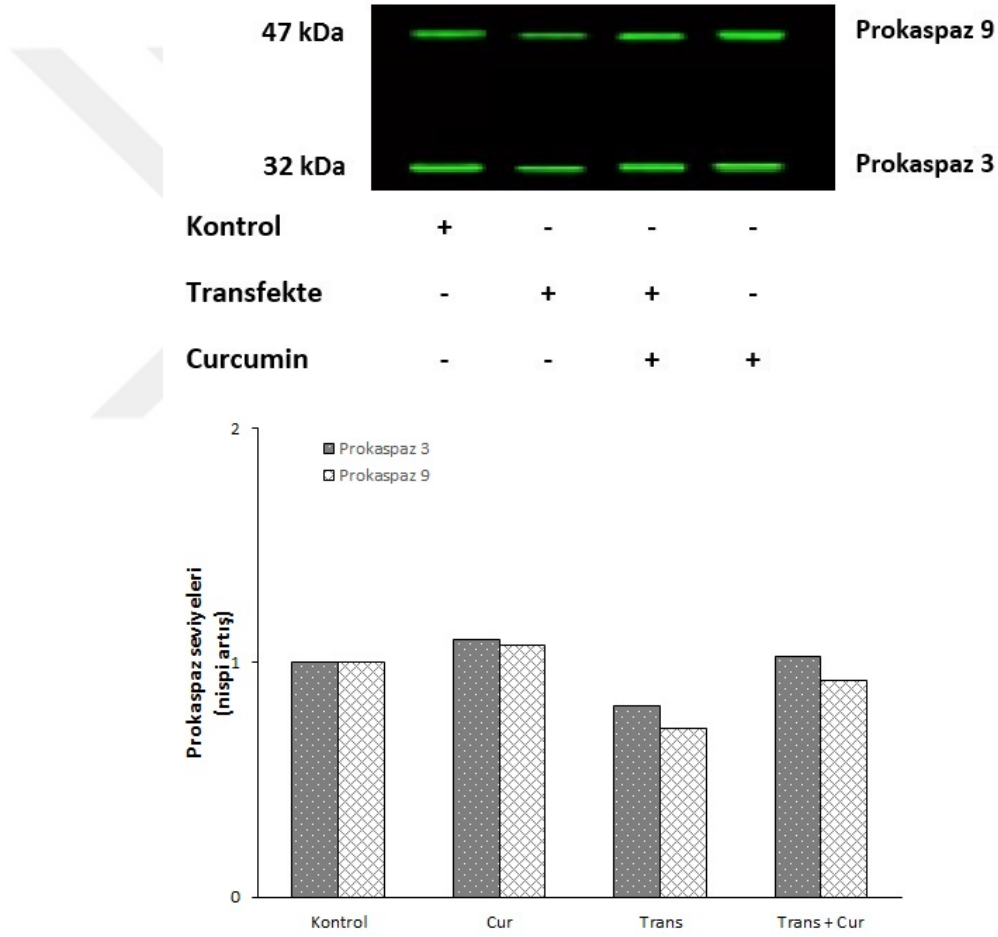
Çalışmamızda TRPM2 kanallarının hücre içi aktivatörlerinden ADP-Riboz'un polimerizasyonu ile nükleus DNA'sının tek zincir kırıklarını tamirde önemli görev yapan PARP1 enzimi ifade düzeyleri de araştırılmıştır. PARP1 enzimi DNA'nın kırık bölgesine ulaşır ADP-Riboz polimerleştirmeyle kırığın tamirinden sorumlu DNA ligaz ve benzeri enzimlere öncülük ederek tamir edilecek DNA'nın işaretlenmesinden sorumludur. Hücrede PARP1 enzimi ifadesinin artışı tamir edilecek DNA miktarının da artmış olduğu anlamına gelmektedir. Transfeksiyon işlemi yapılan gruplarda kontrol ve yalnız curcumin inkübe edilmiş gruplara kıyasla PARP1 aktivitesinin yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 12).



Şekil 12. Grupların PARP1 enzimi ekspresyon düzeylerinin Western Blot sonrası bant görüntüleri ve grafikte gösterimi. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu)

c. Grupların prokaspaz 3 ve prokaspaz 9 ekspresyon düzeyleri

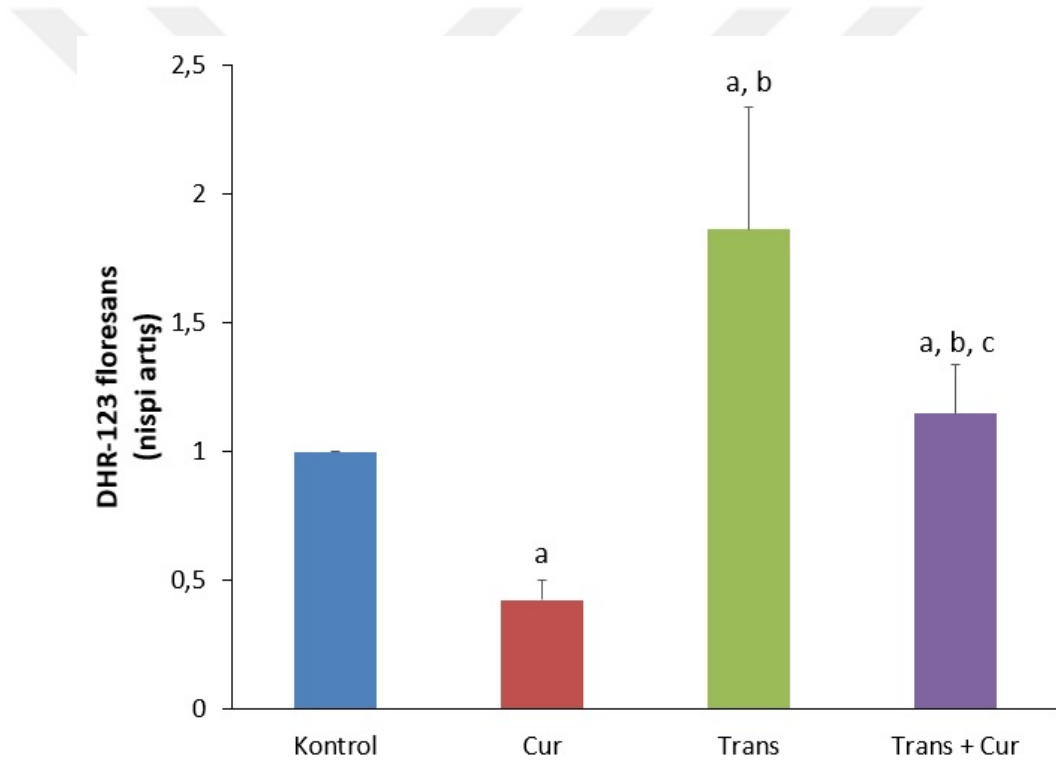
Prokaspaz 3 ve 9 enzim ifadesinin fazlalığı hücrenin apoptozise olan uzaklığıyla doğru orantılıdır. Elde edilen sonuçlara göre Curcumin grubunun her iki proenzim ifadesinde de kontrole kıyasla istatistiki açıdan anlamlı bir artış söz konusudur. Enzim düzeyleri Transfekte grubunda en alt seviyede iken, Transfekte + Curcumin grubunda curcumin inkübasyonu neticesinde bu enzimlerin ifade düzeylerinin anlamlı bir artış gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. Grupların prokaspaz 3 ve prokaspaz 9 ekspresyon düzeylerinin Western Blot sonrası bant görüntüleri ve grafikte gösterimi. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu)

4.5. Hücre İçi ROT Üretim Tayini Sonuçları

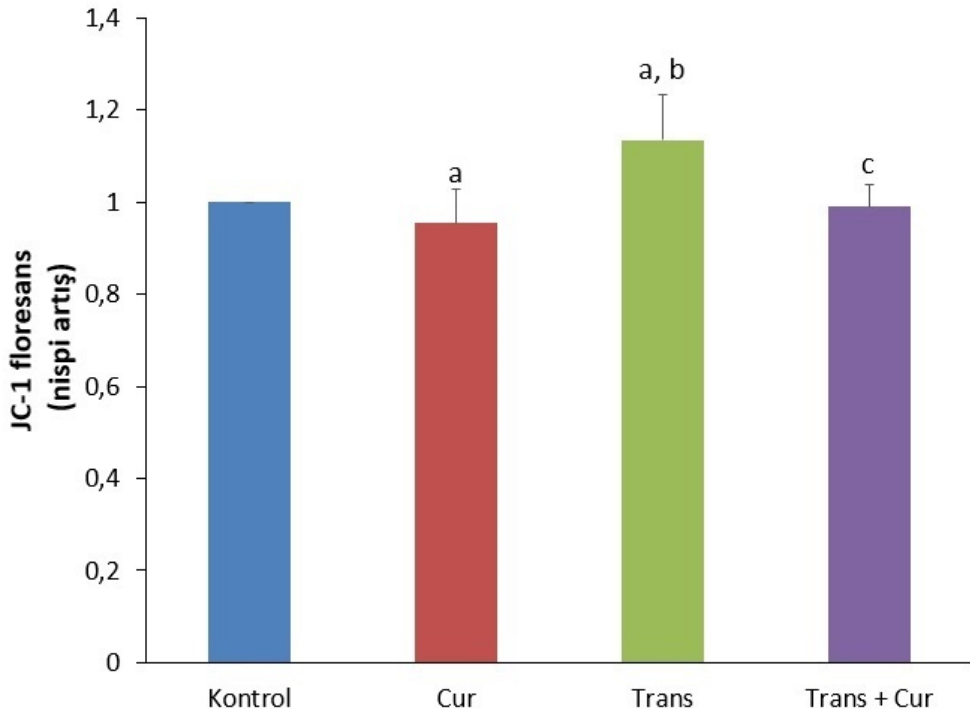
Transfeksiyon işleminin ve curcumin inkübasyonunun hücre içi ROT üretimine etkisi de araştırılmıştır. Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) hücre içine alındıktan sonra oksidatif ajanlarla oksitlenerek floresans rodamin 123'e dönüşür. Bu yöntem hücre içi ROT'un araştırılmasında kullanılan problemlardan biridir. Transfekte grubunda hücre içi ROT üretimi Kontrol grubuna kıyasla neredeyse iki kat arttığı gözlenmiştir. Curcumin grubunda bu seviyenin en düşük olduğu ve transfeksiyon sonrası curcumin inkübasyonunun hücre içi ROT düzeylerini önemli ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır (Grafik 5).



Grafik 5. Curcumin inkübasyonunun grupların ROT üretimi üzerine etkileri. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri harflendirmelerle (a; $p < 0.001$ Kontrol ile kıyaslandığında, b; $p < 0.001$ Curcumin ile kıyaslandığında, c; $p < 0.001$ Transfekte ile kıyaslandığında) gösterilmiştir. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu, Ort. \pm SD; n=6)

4.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Analiz Sonuçları

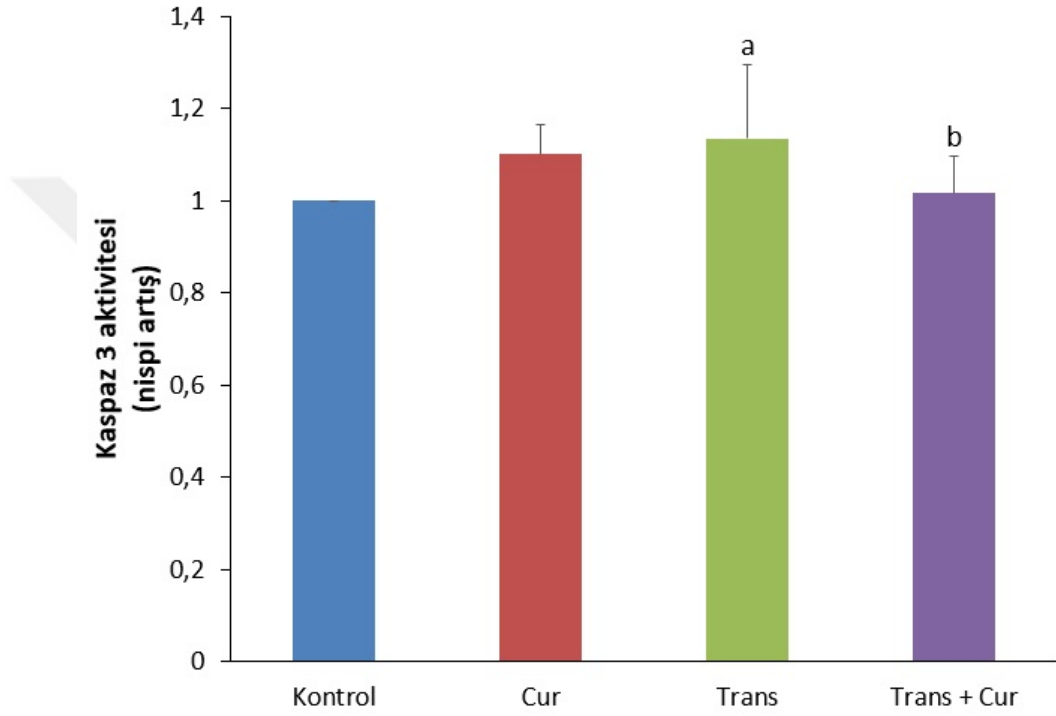
İyon kanalları vasıtasıyla hücreye düzensiz Ca^{+2} girişi mitokondrinin membran potansiyelini artırmakta ve depolarize olmasını sağlamaktadır. Mitokondriyal depolarizasyonun artışı ise hücre içi ROT üretimini netice vermektedir. Bu nedenle bu iki parametre genellikle bütüncül olarak değerlendirilmektedir. Ancak çalışmamızda olduğu gibi iki parametre birbiriyle korele çıkmayabilmektedir. Her ne kadar Transfekte grubunda Kontrol grubuna kıyasla mitokondriyal membran depolarizasyonu seviyelerinde artış olmuş, Curcumin inkübasyonu neticesinde Transfekte + Curcumin grubunda olumlu sonuçlar alınmış gibi gözükse de bu veriler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 6).



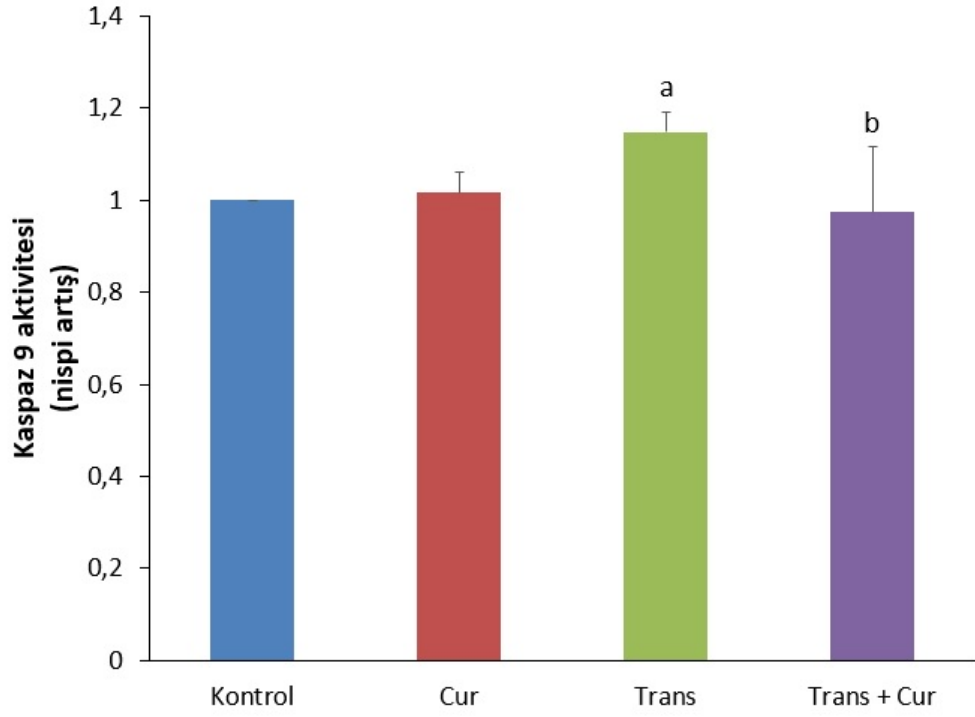
Grafik 6. Curcumin inkübasyonunun grupların mitokondriyal membran depolarizasyonu üzerine etkileri. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri harflendirmelerle (a; $p < 0.05$ Kontrol ile kıyaslandığında, b; $p < 0.05$ Curcumin ile kıyaslandığında, c; $p < 0.05$ Transfekte ile kıyaslandığında) gösterilmiştir. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu, Ortalama \pm SD; $n=6$)

4.7. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Analiz Sonuçları

Apoptozisin indikatörlerinden kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak çalışılmıştır. Transfekte grubunda her iki enzim aktivite değerlerinin yüksek olduğu ancak curcumin ile muamele sonrasında Transfekte + Curcumin grubunda bu değerlerin azaldığı gözlenmiştir (Grafik 7, 8).



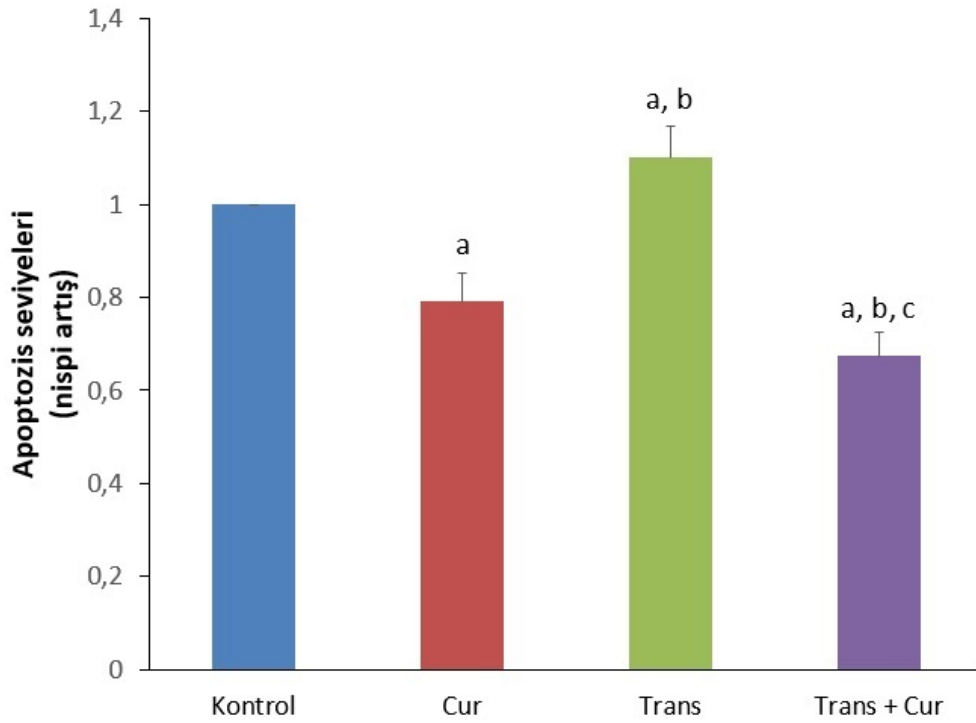
Grafik 7. Curcumin inkübasyonunun grupların kaspaz 3 enzimi aktivitesi üzerine etkileri. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri harflendirmelerle (a; $p < 0.05$ Kontrol ile kıyaslandığında, b; $p < 0.05$ Transfekte ile kıyaslandığında) gösterilmiştir. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu, Ortalama \pm SD; n=6)



Grafik 8. Curcumin inkübasyonunun grupların kaspaz 9 enzimi aktivitesi üzerine etkileri. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri harflendirmelerle (a; $p < 0.05$ Kontrol ile kıyaslandığında, b; $p < 0.05$ Transfekte ile kıyaslandığında) gösterilmiştir. (Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu, Ortalama \pm SD; n=6)

4.8. Apoptozis Testi Sonuçları

Grupların apoptozis seviyeleri Grafik 9'da gösterilmiştir. Buna göre Curcumin grubunun apoptozis seviyeleri Kontrol grubuna kıyasla oldukça düşük bulunmuştur. Ancak Transfekte grubunda ise Kontrol grubuna kıyasla apoptozis düzeylerinde artış söz konusudur. Transfekte + Curcumin grubunda curcumin inkübasyonunun apoptozis seviyeleri üzerindeki olumlu etkisi gözlemlenmiştir (Grafik 9).



Grafik 9. Curcumin inkübasyonunun grupların apoptozis seviyeleri üzerine etkileri. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri harflendirmelerle (a; $p < 0.05$ Kontrol ile kıyaslandığında, b; $p < 0.05$ Curcumin ile kıyaslandığında, c; $p < 0.001$ Transfekte ile kıyaslandığında) gösterilmiştir.

(Cur: Curcumin grubu, Trans: Transfekte grubu, Trans + Cur: Transfekte + Curcumin grubu, Ortalama \pm SD; n=6)

5. TARTIŞMA

Hücre metabolizması, kas kasılması, salgılama, hücre farklılaşması ve apoptosis gibi geniş yelpazede hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde $[Ca^{+2}]$ i en büyük düzenleyici faktör olduğundan, Ca^{+2} hücre canlılığı açısından kilit öneme sahiptir. Buna rağmen, kalsiyumun yüksek konsantrasyonda hücre içinde devamlı bulunması hücre ölümünde rol oynamaktadır (63). Kalsiyum iyonunun proapoptotik etkileri, endoplazmik retikulum ve mitokondriyi de kapsayan değişik hücre içi organellere yerleşik, kalsiyuma duyarlı faktörlerce düzenlenir (64). Mitokondriye aşırı kalsiyum iyonu birikmesi, hem mitokondrinin işlevini yitirmesine hem de zarlararası alanda bulunan apoptozu tetikleyici faktörlerin sitozole salıverilmesine öncülük eder (65).

Apoptozis, hücre ölümünün genlerle düzenlendiği, organizmada normal bir gelişim ve doku homeostazisi için kritik öneme sahip olgudur. Apoptotik mekanizmanın en büyük bileşenini, kaspazlar olarak adlandırılan ve birden fazla protein substratlarını yıkımlama kabiliyetine sahip bir grup protein ailesidir. Kaspaz aktivitesi ile hücre yapısı ve fonksiyonu bozulur, neticede hücre ölümü gerçekleşir (66). Apoptozis sürecinde kaspaz ailesi üyelerinden, kaspaz 8, 9 ve 10 indükleyici rol alırken, kaspaz 3, 6 ve 7 ise sürecin devam ettirilmesinde görev alan enzimlerdir (67). Kaspaz 3, hücrenin bazı yapı proteinlerinin yıkımına ve DNA zincirinde kırıkların oluşmasına böylece hücrenin yapısal bütünlüğünün bozulmasına sebep olmaktadır (68). Apoptozisin intrinsik yolağında kaspaz 9'un birçok düzenleyici ve sitokrom *c* gibi dönüştürücü ile etkileşime girdiği bildirilmiştir (69). Benzer şekilde, bu tez çalışmasında da curcumin uygulaması yapılan gruplarda hücrenin canlılığının devam ettirilmesinde önemli rolü olan prokaspaz 3 ve 9 ekspresyonunun arttığı aynı zamanda programlı hücre ölümünün belirteci olan kaspaz 3 ve 9 aktivitelerinin ise azaldığı tespit edilmiştir. PARP1 aktivitesinin DNA hasarına neden olduğu ve TRPM2 kanal aktivatörlerinden ADP-Riboz oluşumuna aracılık ettiği iyi bilinmektedir (70). PARP1 enzim ekspresyonunun transfekte grubunda arttığı, curcumin inkübasyonu ile Transfekte + Curcumin grubunda anlamlı düzeyde azaldığı

göz önüne alınınca, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde apoptozisi önlemede curcumin inkübasyonunun faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır.

TRPM2 katyon kanallarının açılması ve iyonik akımların başlaması üzerinde etkili üç etken bilinmektedir. Bunlar; ADP-Riboz/NAD⁺ metabolizması, oksidatif stres ve normal fizyolojik şartlarda immün hücrelerden TRPM2 aktivasyonu ile salındığı bilinen tümör nekroz faktör alfa (TNF- α)'dır (71).

TRPM2 katyon kanalları ağırlıklı olarak beyinde bulunur, aynı zamanda kemik iliği, dalak, kalp, lökosit, karaciğer ve akciğeri de kapsayan diğer birçok dokuda da bulunmaktadır. Milenyumun başlarında Perraud ve arkadaşları tarafından TRPM2 katyon kanallarının ADP-Riboz tarafından aktive olabildikleri ilk defa gösterilmiştir (42). 2002 yılında Hara ve arkadaşları ile Nazıroğlu ve Lückhoff yaptıkları çalışmalarda TRPM2 kanallarının oksidatif stresle de bağımsız olarak aktive olabileceğini göstermişlerdir (49, 71).

ROT'un aşırı üretimi nedeniyle oksidatif stres artışı iyon kanalları vasıtasıyla hücreye yüksek miktarda Ca⁺² girişine sebep olmaktadır. [Ca⁺²]i'nin fizyolojik sınırların üzerine çıkması ise mitokondrileri depolarize ederek daha fazla ROT üretimine neden olmaktadır. Hücrede sürekli artan ROT daha fazla oksidatif hasara ve TRPM2 katyon kanalları gibi ROT ile aktive edilebilen kanallardan daha fazla katyon girişini tetiklemektedir. Bu nedenle oksidatif stres artışı ile indüklenen katyonik akımlar nöronal hücre hasarı ve ölümü için potansiyel bir faktör olarak görülmektedir (3, 58, 60, 72). Curcumin inkübasyonunun SH-SY5Y hücrelerinde TRPM2 kanal aracılığıyla hücre içi Ca⁺² girişini ve dolayısıyla mitokondriyal depolarizasyon seviyelerini azalttığı tarafımızca yapılan analizlerle gösterilmiştir.

H₂O₂ kaynaklı TRPM2 kanal aktivasyonu için kesin aracı moleküller önceki çalışmalarla tespit edilmiştir (73). TRPM2'nin ROT duyarlılığına; NAD⁺ veya mitokondri ve protein oksidasyonu üzerinden salınan ADP-Riboz aracılığıyla etmektedir (74, 75). H₂O₂ ve cADP-Riboz'un düşük konsantrasyonları, ADP-Riboz'un etkisini artırmak için veya daha yüksek konsantrasyonlarında doğrudan TRPM2 kanalını açmak için etkili oldukları ileri sürülmüştür (51).

NAD⁺'ın TRPM2 kanalını bizzat uyardığı bildirilmiştir (2). TRPM2, C-terminal sitozolik ucundaki nudix alanı olarak bilinen karakteristik yapısal bir

özelliğe sahiptir. Nudix alanı indirgenmiş nükleozid difosforazın sınıfı olduğu bilinen bir pirofosforaz bölgesidir (76). TRPM2 kanalının nudix alanı tarafından ADP-Riboz katalizlenirken, kanal katyon geçişine aktifleşir. ADP-Riboz infüzyonu sırasında patch pipeti yardımıyla TRPM2 katyonik akımları başlatılır. İntraselüler ADP-Riboz, Ca^{+2} akışını uyararak TRPM2'yi aktive eder. ADP-Riboz, TRPM2'nin karboksil terminaline, NUDT9-H bölgesine bağlanarak etkisini gösterir. ADP-Riboz hidrolizi ile ortaya çıkan adenosin mono fosfat (AMP) konsantrasyonundaki artış ise kanalın inaktivasyonunu teşvik eder (77). Yani ADP-Riboz, TRPM2 agonisti olarak görev yaparken aynı zamanda kanal açılma süresi/ADP-Riboz pirofosforaz aktivitesinin uzaması ile biriken AMP metaboliti ile aslında antagonist etkiyi de sağlamaktadır. Kanal aktivasyonu ile sitozolik Ca^{+2} seviyelerindeki artma ile teşvik edilen pozitif geri bildirim mekanizmasına tam ters olarak vücutta sık rastlanan enzimsel kinetikle belirlenen negatif geri bildirim mekanizmasının bu kanal için söz konusu olduğu dikkat çekmektedir.

TRP katyon kanal üst ailesi üyelerinden oksidatif stresle ilişkisi en çok araştırılmış ve en iyi anlaşılmuş olanı TRPM2 katyon kanal alt tipidir. TRPM2'nin oksidatif stresle aktivasyonu neticesinde hücre içine Ca^{+2} girişi olduğu elektrofizyoloji (Patch-Clamp) çalışmalarıyla gösterilmiştir (51, 77, 78). Hücre içine Ca^{+2} girişi, hücre içi faaliyetlerin yerine getirilmesi için büyük önem arz ederken, girişi sağlayan kanal fonksiyonlarında gelişen düzensizlikler de çeşitli anomalilere sebep olabilmektedir. TRPM2'nin aktivasyonu, hem H_2O_2 'nin hücredeki NAD^+ türevi ikincil habercilerden ADP-Riboz üretimini teşvik etmesi ile hem de kanalın C-terminal kısmındaki ADP-Riboz pirofosforaz enzimini doğrudan uyarması sonucu gerçekleştiği bildirilmiştir (79).

TRPM2 katyon kanallarının aktivatörleri hakkında yeterli sayılabilecek düzeyde bilgi varken inaktivasyonunda rolü bilinen kimyasal madde sayısı oldukça sınırlıdır. Bu da potansiyel TRPM2 ile ilişkilendirilen anomalilerin düzeltilmesinde güçlüğüne sebep olmaktadır. Özellikle bazı nörodejeneratif hastalıklarda ve omurilik hasarı gibi travmatik olgularda TRPM2 kanal ekspresyonunda ve aktivasyonunda artış olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur (80). TRPM2 kanallarının fizyolojik sınırların üzerinde aktive olması, hücre içine Ca^{+2} girişini tetikleyerek hücre içindeki çok sayıda enzimin aktivasyonu sonucu hücre yapısına zarar vermektedir. TRPM2

kasyon kanallarını ikincil haberciler vasıtasıyla inaktive ettiği iyi bilinen 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) ve anthranilic acid (ACA) olmak üzere iki kimyasal bulunmaktadır. Bunlardan 2-APB'nin TRPM2 kasyon kanalına spesifik olmadığı da düşünülünce günümüzde araştırmacılar TRPM2 kasyon kanal aktivasyonunu düzenleyici yeni kimyasallar keşfetmek için uğraş vermektedirler (81-83).

TRPM2'nin H_2O_2 ile aktivasyonu sonucu sitozole Ca^{+2} girişinin düzenlenmesinde bazı antioksidanların görev üstlendiği bazılarının ise herhangi bir etkisi olmadığı yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla bulunmuştur. İndirgenmiş glutasyon (GSH), E ve C vitaminlerinin transfekte edilmiş Chinese Hamster Ovary (CHO) hücrelerinde TRPM2 kasyon kanalları üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, tüm hücre Patch-Clamp kayıtlarıyla katyonik akımlar veya sitozole Ca^{+2} akışı üzerinde bu üç antioksidanın herhangi bir inhibitör etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (49). Selenyumun, enzimatik antioksidanlardan GSH-Px'in kofaktörü olarak görev yapmasından dolayı, hücre içi ROT'u baskılayarak TRPM2 kasyon kanal davranışı üzerinde potansiyel rolünün araştırıldığı bir başka çalışmada; transfekte CHO hücrelerine ekstraselüler H_2O_2 uygulamasıyla katyonik akımlar tetiklenmiş, ancak selenyum uygulanan gruplarda bu akımların azaldığı whole-cell kayıtlarıyla gösterilmiştir. Ayrıca kalsiyum sinyali analizleriyle de selenyumun TRPM2 aracılı Ca^{+2} girişini azalttığı bildirilmiştir (3). Melatoninin transfekte CHO hücrelerinde intraselüler ve ekstraselüler uygulamasının TRPM2 aracılı katyonik akımları baskılamada rolü araştırılmış, intraselüler uygulamanın akımları baskıladığı ve melatonin uygulamasının tüm gruplarda apoptozisi önlemede etkili olduğu vurgulanmıştır (4). E vitamini ve NAC gibi tiyol grubundan zengin antioksidanların da antioksidan özellikleri sayesinde H_2O_2 aracılı TRPM2 aktivasyonu hücreye Ca^{+2} girişini düzenlediği ve hücre içi antioksidan sistem bileşenlerini güçlendirerek arka kök gangliyon (AKG) hücrelerini oksidan hasardan koruduğu bildirilmiştir (5, 55). Fakat literatür taramalarımız neticesinde nöronal hücrelerde curcumin antioksidanının TRPM2 kasyon kanal davranışı üzerine herhangi bir etkisi olup olmadığına dair bir kayda rastlanmamıştır. Curcuminin Ca^{+2} geçirgen kanallar dışında, bazı potasyum kanalları üzerinde inhibitör ve kistik fibrozis ile ilişkili klor kanalları üzerinde aktivatör etkili olabileceği bildirilmiştir (84, 85). NMDA reseptörü

aracılı Ca^{+2} girişine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada whole-cell Patch-Clamp kayıtları alınmış ve curcumin uygulanan grupta katyonik akımların azaldığı gözlenmiştir (86). Curcuminin TRP katyon kanal ailesi üyelerine etkisinin araştırıldığı yayın sayısı oldukça sınırlıdır. Curcumin uygulamasının gastrointestinal ağrıyı önlemede TRPV1 antagonisti gibi davrandığı ve potansiyel analjezik etkilerinin de bu yolla olabileceği Zhi ve ark. yaptığı bir çalışmada gösterilmiştir (87). Benzer şekilde Yeon ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada trigeminal nöronlarda curcuminin TRPV1 aracılı akımları inhibe ettiği vurgulanmıştır (88). TRPA1 kanalları üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise curcumin uygulamasının TRPA1 aracılı katyonik akıma sebep olduğu ancak bu etkinin devamlı olmadığı vurgulanmıştır (89).

Bu tezin hazırlandığı esnadaki bilgilerimize göre curcumin ve TRPM2 katyon kanal davranışı üzerine etkisinin araştırıldığı yalnız bir çalışma mevcuttur. Rat hepatositleri üzerinde yapılan bu çalışmada curcuminin TRPM2 aracılı katyonik akımları baskıladığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada HEK293 hücrelerine TRPM2 transfeksiyonu da yapılmış ve benzer sonuçlara ulaşıldığı söylenmiştir. Curcuminin Ca^{+2} girişini de azalttığı vurgulanan bu çalışmada hepatoprotektif özelliklere de sahip olduğuna dikkat çekilmiştir (90). Nöronal hücrelerde curcumin antioksidanının TRPM2 kanal akımları ve buna bağlı hücre sağkalım mekanizmaları üzerine etkisini araştıran bir çalışma mevcut bilgilerimize göre rapor edilmemiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, nörolojik hastalıklara *in vitro* model olarak sıklıkla kullanılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde transfeksiyon sonrasında curcumin inkübasyonunun TRPM2 kanalları üzerine etkisi Patch-Clamp sistemi ve başka yöntemlerle araştırılmıştır. Yapılan analizler neticesinde curcumin inkübasyonunun TRPM2 aracılı katyonik akımları baskıladığı gösterilmiştir. Ca^{+2} sinyali bulguları da TRPM2 aracılı kalsiyum girişinin curcumin inkübasyonu neticesinde azaldığını göstermiştir. Nörolojik hücrelerde oksidatif stresle TRPM2 kanallarının aktive olması hücreye Ca^{+2} girişini artırmaktadır. Sitolitik Ca^{+2} seviyelerinin artışı mitokondriyal membran potansiyelini artırdığı ve mitokondriyal depolarizasyon neticesinde hücrel apoptozis süreçlerinin aktiflenmesine sebep olduğu bilinmektedir (91). Bu çalışmayla curcuminin, apoptozis göstergesi olarak kabul edilen kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzimlerinin aktif formlarını azalttığı ve inaktif formları olan prokaspaz 3 ve prokaspaz 9 ekspresyonunu artırdığı tespit edilmiştir. Hücre içi ROT üretimini baskılamada etkili olduğu ve mitokondriyal depolarizasyon seviyelerini azaltması da nöronal hücre ölümünü engellemede etkili sonuçlar sunduğunu düşündürmüştür.

Günümüzde kullanılan kalsiyum kanal blokörlerinin TRP kanalları üzerinde tamamen etkili olamaması bu kanallara özgü blokörlerin keşfini gerekli kılmıştır. Elde edilen veriler, başta nöronal hücre ölümü olmak üzere, TRPM2 kaynaklı nörolojik hastalıkların patogenezi ve tedavisine yönelik *in vitro* çalışmalara ve TRPM2'nin değişik hastalık modellerinde ne derece etkisinin olduğunu araştırmada potansiyel kaynak olarak geleceğe ışık tutacak niteliktedir.

7. ÖZET

SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Curcuminin TRPM2 Katyon Kanalları Üzerine Etkisinin Patch-Clamp Sistemi ile Araştırılması

Nöronal hücrelerde Ca^{+2} iyonlarının hücre içine fizyolojik sınırların üzerinde girmesi ve buna bağlı olarak hücre içi oksidatif stres seviyesinin yükselmesi nöronal hasar oluşumunu tetikleyen başlıca faktörlerden biridir. Oksidatif stres aracılı TRPM2 katyon kanallarının aktivasyonu, nöronal hücre ölümüyle ilişkilendirilmektedir. Curcumin, hücre içi reaktif oksijen türlerini güçlü bir şekilde ortadan kaldırma potansiyeline sahip bir antioksidan molekül olarak değerlendirildiğinden nörolojik hastalıkların tedavisinde etkili bir rolü olabileceği düşünülmüştür. Curcuminin, oksidatif stresle indüklenen nöronal hasara etkilerini daha iyi karakterize etmek için TRPM2 kanal akımları ile oksidatif stres ve apoptoz üzerine olan etkisi SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde araştırıldı.

Hücreler deneyler için toplamda dört gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak kullanıldı. İkinci grup curcumin uygulanan gruptu. Üçüncü ve dördüncü gruplar TRPM2 pc DNA'sı ile transfekte edildi ve dördüncü grup transfeksiyondan sonra curcumin ile inkübe edildi. Tüm gruplardan Patch-Clamp ve Kalsiyum Sinyali kayıtları alındı. TRPM2 katyon kanal akımları ile hücre içi oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere; hücre içi ROT üretimi, mitokondriyal membran depolarizasyonu analizi, apoptosis, kaspaz 3 ve 9 aktivite tayinleri yapıldı. PARP1 ve apoptosis yolaklarındaki iki öncül enzim olan prokaspaz 3 ve 9 ekspresyon seviyeleri ise Western Blot ile tayin edildi. Analizler sonucunda curcuminin hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunu ve TRPM2 kanal akım yoğunluklarını, apoptosis, kaspaz 3 ve kaspaz 9, mitokondriyal membran depolarizasyonu, hücre içi ROT üretimini düzenlediği gözlemlendi. 5 μ M curcumin inkübasyonunun; PARP1, prokaspaz 3 ve prokaspaz 9 enzim ekspresyonlarını azalttığı diğer analizlere ek olarak gösterildi.

Sonuç olarak, curcumin uygulamasının TRPM2 katyon kanal akımlarını güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterildi. Bu çalışma, nöronal hücreye oksidatif stresle

başlatılan TRPM2 kanalları aracılı katyon akışı ve Ca^{+2} girişinde curcuminin düzenleyici rolü olabileceğini gösteren yeni bir bildirimdir. Nöronal hücre ölümü ve TRPM2 kanal aktivitesinin curcumin uygulaması ile düzenlenmesi, Ca^{+2} girişi ve apoptozise karşı potansiyel nöroprotektif etkisi olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Curcumin, TRPM2 katyon kanalları, Patch-Clamp, Ca^{+2} sinyali, SH-SY5Y hücreleri, Apoptoz



ABSTRACT

Investigation of the effect of Curcumin on TRPM2 cation channels in SH-SY5Y neuroblastoma cells by Patch-Clamp System

Neuronal injury can arise from overload of oxidative stress-induced calcium ion (Ca^{2+}) entry and oxidative stress. Activation of TRPM2 during oxidative stress have been linked to neuronal cell death. Curcumin has been considered as a potent antioxidant that detoxifies a variety of reactive oxygen species (ROS) in neurological diseases. In order to characterize the actions of curcumin better in oxidative stress-induced neuronal injury through modulation of TRPM2 channel currents, we tested the effects of curcumin on apoptosis and oxidative stress in the oxidative stress-induced SH-SY5Y neuroblastoma cell line.

SH-SY5Y neuroblastoma cells were divided into four groups for the experiments. The first group was used as control. The second group was used as the curcumin administrated group. The third and fourth groups were transfected with TRPM2 pcDNA, and the last group incubated with curcumin after transfection. Whole-cell Patch-Clamp and calcium signaling recordings were acquired from SH-SY5Y neuroblastoma cells in all groups. Moreover, intracellular ROS production, mitochondrial membrane depolarization, apoptosis, caspase 3 and 9 activity analyses were performed to investigate the relationship between cellular oxidative stress and TRPM2 cation channel currents. PARP1 and two precursor enzymes of apoptotic pathway, procaspase 9 and procaspase 3 expression levels were determined by Western Blotting. We observed that modulator role of curcumin on intracellular free Ca^{2+} concentrations, current densities of TRPM2 channel, apoptosis, caspase 3 and caspase 9, mitochondrial membrane depolarization, intracellular ROS production levels in the SH-SY5Y neuroblastoma cells. In addition, it was proved that extracellular 5 μM curcumin administration can decrease procaspase 3 and 9 activities and PARP1 expression levels.

In conclusion, in our study, TRPM2 channel currents can inhibited strongly by curcumin treatment. It is a novel report which shows the modulator role of

curcumin on oxidative stress induced cationic currents and Ca^{2+} influx through TRPM2 channels. Neuronal cell death and modulation of TRPM2 channel activity by curcumin treatment has neuroprotective activity against apoptosis and Ca^{2+} entry.

Keywords: Curcumin, TRPM2 cation channels, Patch-Clamp, Ca^{2+} signaling, SH-SY5Y cells, Apoptosis



8. KAYNAKLAR

1. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003;426(6966):517-24.
2. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflugers Arch*. 2005;451(1):212-9.
3. Nazıroğlu M, Özgöl C, Küçükayaz M, Çiğ B, Hebeisen S, Bal R. Selenium Modulates Oxidative Stress-Induced TRPM2 Cation Channel Currents in Transfected Chinese Hamster Ovary Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;112(2):96-102.
4. Çelik Ö, Nazıroğlu M. Melatonin modulates apoptosis and TRPM2 channels in transfected cells activated by oxidative stress. *Physiol Behav*. 2012;107(3):458-65.
5. Özgöl C, Nazıroğlu M. TRPM2 channel protective properties of N-acetylcysteine on cytosolic glutathione depletion dependent oxidative stress and Ca²⁺ influx in rat dorsal root ganglion. *Physiol Behav*. 2012;106(2):122-8.
6. Lee M, Cho T, Jantarantotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J*. 2010;24(7):2533-45.
7. Amani A, Somchit M, Konting M, Kok L. Vitamin E and curcumin intervention on lipidperoxidation and antioxidant defense system. *J Am Sci*. 2010;6:52-62.
8. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991;91(3):S31-S8.
9. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-5.
10. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA; 2015.
11. Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995;41(12):1819-28.
12. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30(2):145-58.
13. Quinlan GJ, Gutteridge JM. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Biol Med*. 1988;5(5-6):341-8.
14. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.

15. Winterbourn CC. Australasian society of clinical and experimental pharmacologists and toxicologists, 1994: Free radical toxicology and antioxidant defence. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22(11):877-80.
16. Lam MA, Pattison DI, Bottle SE, Keddle DJ, Davies MJ. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(11):2111-9.
17. Delibaş N, Özçankaya R. Serbest radikaller. *Med J SDU/SDÜ Tıp Fak Derg.* 1995;2(3).
18. Özelçi Kavas G. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.* 1989;9(1):1-8.
19. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları; 1995.
20. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
21. Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radic Res.* 1998;28(6):601-9.
22. NI K. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992;200(2):248-54.
23. Devasagayam T, Tilak J, Boloor K, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele R. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004;52(794804):4.
24. Sharma R, Gescher A, Steward W. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 2005;41(13):1955-68.
25. Ak T, Gülçin İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* 2008;174(1):27-37.
26. Wang Q, Sun AY, Simonyi A, Jensen MD, Shelat PB, Rottinghaus GE, et al. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *J Neurosci Res.* 2005;82(1):138-48.
27. Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5892-901.
28. Wang J, Du X-X, Jiang H, Xie J-X. Curcumin attenuates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by anti-oxidation and nuclear factor-kappaB modulation in MES23.5 cells. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(2):178-83.
29. Uğuz AC, Öz A, Nazıroğlu M. Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2016;36(4):395-401.

30. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(6):387-96.
31. Liedtke WB. TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades: CRC Press; 2006.
32. Sun L, Yau H-Y, Wong W-Y, Li RA, Huang Y, Yao X. Role of TRPM2 in H₂O₂-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7(8):e43186.
33. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):937-46.
34. Nazıroğlu M, Dikici DM, Dursun Ş. Role of oxidative stress and Ca²⁺ signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. *Neurochem Res.* 2012;37(10):2065-75.
35. Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):958-67.
36. Öz A, Cihangir A. Migren patogenezinde oksidatif strese duyarlı TRP kanallarının rolleri. *Med J SDU/SDÜ Tıp Fak Derg.* 2015;22(4):144-50.
37. Wagner TF, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, et al. Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic β cells. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1421-30.
38. W Runnels L. TRPM6 and TRPM7: A Mul-TRP-PLIK-cation of channel functions. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12(1):42-53.
39. Guinamard R, Sallé L, Simard C. The non-selective monovalent cationic channels TRPM4 and TRPM5. *Transient Receptor Potential Channels: Springer; 2011.* p. 147-71.
40. Clapham DE. Mammalian TRP channels. *Cell.* 2007;129(1):220.
41. Nazıroğlu M, Özgül C. Effects of antagonists and heat on TRPM8 channel currents in dorsal root ganglion neuron activated by nociceptive cold stress and menthol. *Neurochem Res.* 2012;37(2):314-20.
42. Perraud A-L, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* 2001;411(6837):595-9.
43. Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H, et al. Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science.* 2001;293(5533):1327-30.
44. Nilius B. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 2006;162(3-4):244-53.

45. Fliegert R, Gasser A, Guse A. Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(1):109-14.
46. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Molecular cell.* 2005;18(1):61-9.
47. Saygın M, Nazıroğlu M, Çalışkan S. Patch-Clamp'ın Elektrofizyolojik Uygulamalarında Son Gelişmeler. *J Exp Clin Med.* 2009;26(4).
48. Puralı N. Hücre Elektrofizyolojisi ve Görüntülemenin Temelleri. Ankara: Veri Medikal Yayıncılık; 2008.
49. Nazıroğlu M, Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J Neurol Sci.* 2008;270(1):152-8.
50. Mahalingaiah PKS, Singh KP. Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *PloS One.* 2014;9(1):e87371.
51. Nazıroğlu M, Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res.* 2008;33(7):1256-62.
52. Sakmann B. Single-channel recording. London, UK: Springer Science & Business Media; 2013.
53. Hille B. Ion channels of excitable membranes. USA: Sinauer Sunderland, MA; 2001.
54. Molleman A. Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology. England: John Wiley & Sons; 2003.
55. Naziroglu M, Ozgul C. Vitamin E modulates oxidative stress and protein kinase C activator (PMA)-induced TRPM2 channel gate in dorsal root ganglion of rats. *J Bioenerg Biomembr.* 2013;45(6):541-9.
56. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260(6):3440-50.
57. 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.
58. Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress. *Neurochem Res.* 2012;37(8):1631-8.
59. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(5):612-6.
60. Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez 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. *J Memb Biol.* 2009;232(1-3):15-23.

61. Qualls Z, Brown D, Ramlochansingh C, Hurley LL, Tizabi Y. Protective effects of curcumin against rotenone and salsolinol-induced toxicity: implications for Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2014;25(1):81-9.
62. Chen S-j, Hoffman NE, Shanmughapriya S, Bao L, Keefer K, Conrad K, et al. A splice variant of the human ion channel TRPM2 modulates neuroblastoma tumor growth through hypoxia-inducible factor (HIF)-1/2 α . *J Biol Chem.* 2014;289(52):36284-302.
63. Demaurex N, Distelhorst C. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. *Science.* 2003;300(5616):65-7.
64. Hajnoczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304(3):445-54.
65. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001;15(22):2922-33.
66. Stennicke HR, Salvesen GS. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem.* 1997;272(41):25719-23.
67. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424.
68. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391(6662):43-50.
69. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* 2002;9(3):459-70.
70. Siegel CS, McCullough LD. NAD⁺ and nicotinamide: sex differences in cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2013;237:223-31.
71. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, et al. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular cell.* 2002;9(1):163-73.
72. Naziroglu M, Sahin M, Cig B, Aykur M, Erturan I, Ugan Y. Hypericum perforatum modulates apoptosis and calcium mobilization through voltage-gated and TRPM2 calcium channels in neutrophil of patients with Behcet's disease. *J Membr Biol.* 2014;247(3):253-62.
73. Clapham DE. SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell.* 2007;129(1):220.
74. Massullo P, Sumoza-Toledo A, Bhagat H, Partida-Sánchez S, editors. TRPM channels, calcium and redox sensors during innate immune responses. *Semin Cell Dev Biol*; 2006: Elsevier.
75. Heiner I, Eisfeld J, Lückhoff A. Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium.* 2003;33(5):533-40.

76. Gasser A, Guse AH. Determination of intracellular concentrations of the TRPM2 agonist ADP-ribose by reversed-phase HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;821(2):181-7.
77. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell.* 2005;18(1):61-9.
78. Beck A, Kolisek M, Bagley LA, Fleig A, Penner R. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose regulate TRPM2 channels in T lymphocytes. *FASEB J.* 2006;20(7):962-4.
79. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23150-6.
80. Cook NL, Vink R, Helps SC, Manavis J, van den Heuvel C. Transient receptor potential melastatin 2 expression is increased following experimental traumatic brain injury in rats. *J Mol Neurosci.* 2010;42(2):192-9.
81. 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.
82. Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid. *Br J Pharmacol.* 2006;148(3):264-73.
83. Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kühn FJ, Gustafsson AJ, Lückhoff A, et al. H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the β -cells: involvement of TRPM2 channels. *J Cell Mol Med.* 2009;13(9b):3260-7.
84. Liu H, Danthi SJ, Enyeart JJ. Curcumin potently blocks Kv1.4 potassium channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(4):1161-5.
85. Berger AL, Randak CO, Ostedgaard LS, Karp PH, Vermeer DW, Welsh MJ. Curcumin stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activity. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5221-6.
86. Matteucci A, Cammarota R, Paradisi S, Varano M, Balduzzi M, Leo L, et al. Curcumin protects against NMDA-induced toxicity: a possible role for NR2A subunit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(2):1070-7.
87. Zhi L, Dong L, Kong D, Sun B, Sun Q, Grundy D, et al. Curcumin acts via transient receptor potential vanilloid-1 receptors to inhibit gut nociception and reverses visceral hyperalgesia. *Neurogastroenterol Motil.* 2013;25(6):e429-e40.
88. Yeon K, Kim S, Kim Y, Lee M, Ahn D, Kim H, et al. Curcumin produces an antihyperalgesic effect via antagonism of TRPV1. *J Dent Res.* 2010;89(2):170-4.

89. Leamy AW, Shukla P, McAlexander MA, Carr MJ, Ghatta S. Curcumin ((E, E)-1, 7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione) activates and desensitizes the nociceptor ion channel TRPA1. *Neurosci Lett.* 2011;503(3):157-62.
90. Kheradpezhoh E, Barritt GJ, Rychkov GY. Curcumin inhibits activation of TRPM2 channels in rat hepatocytes. *Redox Biol.* 2016;7:1-7.
91. Nazıroğlu M, iğ B, zđul C. Modulation of oxidative stress and Ca²⁺ mobilization through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neuron by *Hypericum perforatum*. *Neuroscience.* 2014;263:27-35.



**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

Ahmi ÖZ

İmza



Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK

İmza



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ahmi	Soyadı	ÖZ
Doğum Yeri	Isparta	Doğum Tarihi	14.01.1990
Uyruğu	T.C.	Telefon	0 246 211 36 55
E-mail	ahmioz@sdu.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora		
Yüksek Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik A.D.	2016
Lisans	Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği	2013
Lise	Isparta Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Arş. Gör.	Süleyman Demirel Üniversitesi	Ocak 2014 - Devam

Yabancı Dilleri	YDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce (İyi)	70	IELTS Academic: 5.5
Almanca (Zayıf)	-	-

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

Yayımları/Tebliğleri-Setifikaları/Ödülleri

A) SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1. Uğuz AC, **Öz A**, Yılmaz B, Altunbaş S, Çelik Ö. Melatonin attenuates apoptosis and mitochondrial depolarization levels in hypoxic conditions of SH-SY5Y neuronal cells induced by cobalt chloride (CoCl₂), Turk J Biol, 2015; 39: 896-903.
2. Uğuz AC, **Öz A**, Nazıroğlu M. Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells. J Recept Signal Transduct Res. 2016 Aug; 36(4):395-401.

B) SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özetler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1. **Öz A**, Uğuz AC. Migren patogenezinde oksidatif strese duyarlı TRP kanallarının rolleri, Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Derg, 2016, 22(4):144-150.

C) Uluslararası toplantıda poster, sözlü sunum ve gösterim

1. Uğuz AC, **Oz A**, Nazıroğlu M. Regulatory role of selenium on apoptosis, GSH, GSH-Px, caspase-3 and -9 levels in CoCl₂ induced hypoxia model in neuroblastoma cells. Neurizons 2015 – ‘Notes of an orchestrated brain’, 26-29 May 2015, Göttingen, Germany.
2. Çelik O, **Oz A**, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Role of TRPC1 in CoCl₂ induced neuronal cell death. Neurizons 2015 – ‘Notes of an orchestrated brain’, 26-29 May 2015, Göttingen, Germany.
3. **Öz A**, Çınar R, Çelik Ö, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of N-acetylcysteine treatment on CoCl₂-induced apoptosis and oxidative stress levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, 24-27 May 2016, Isparta, Turkey.

D) Ulusal toplantıda poster, sözlü sunum ve gösterim

1. Uğuz AC, **Öz A**, Yılmaz B, Altunbaş S, Çelik Ö. SH-SY5Y Hücrelerinde Kobalt Klorür ile İndüklenmiş Hipoksi Modelinde Melatoninin Koruyucu Rolü, 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 30 Nisan-3 Mayıs 2015, Selçuk Üniversitesi, Konya.
2. **Öz A**, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Rutin Kullanılan Hücre Hatlarında Doğal İfadelenen TRP Kanalları, 8. Hücrel Sinir Bilim Günleri, 29-30 Kasım 2014, Sakarya Üniversitesi, Sakarya.

E) Ulusal toplantıda sunularak özet metin olarak yayımlanan bildiri

1. Yiğit M, Güneş A, Uğuz AC, **Öz A**, Nazıroğlu M, Tök L, Tök Ö. Astaksantin'in, Retina Pigment Epitel Hücrelerinde (ARPE-19) Hydroquinone'un Tetiklediği Oksidatif Stresin Hücre İçi Ca²⁺ Sinyali, Mitokondriyal Depolarizasyon Düzeyleri ve Apoptosis Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması, Türk Oftalmoloji Derneği 49. Ulusal Kongresi, 4-8 Kasım 2015, İstanbul.
2. **Öz A**, Uğuz AC. Arka Kök Gangliyon Nöronlarında Patch-Clamp (Elektrofizyoloji) Kayıtları Alınması, 2. Ulusal Sağlık Bilimleri Lisansüstü Öğrenci Kongresi ve Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, 17-20 Nisan 2014, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.