

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

DİYABETİK NÖROPATİK AĞRIDA TRPM2 KATYON KANALLARININ
İNHİBİSYONUNDA N-ASETİL SİSTEİNİN ROLÜNÜN PATCH-CLAMP
TEKNIĞİYLE ARAŞTIRILMASI

Ercan SÖZBİR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Yönetim Birimi tarafından 3169-D2-12 Proje numarası ile desteklenmiştir

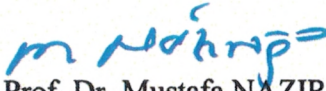
Tez. No:127
2015-İSPARTA

KABUL VE ONAY SAYFASI

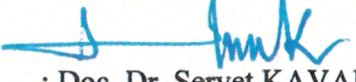
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

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

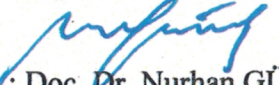
Tez Savunma Tarihi: 06/10/2015


Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

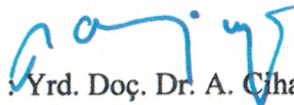
Süleyman Demirel Üniversitesi


Üye : Doç. Dr. Servet KAVAK

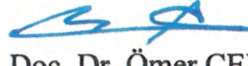
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi


Üye : Doç. Dr. Nurhan GÜMRAL

Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Çhangir UĞUZ

Süleyman Demirel Üniversitesi


Üye : Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK

Süleyman Demirel Üniversitesi

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


Doç. Dr. Mustafa KAYAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Ayrı şehirlerde yaşamamıza rağmen hiçbir zaman maddi manevi desteklerini esirgemeyen anneme, ağabeyime ve özellikle çok sevdiğim dedeme,

Yorucu doktora sürecine destek olan sevgili eşim Merve ve sıkıldığım her an sıkıntımı alan biricik kızım Elif'e,

Her başım sıkıştığında yardıma koşan Mehmet Emin KURTMEN başta olmak üzere "*kardeşten de yakın*" olan tüm akrabalarım,

Bilime harcadığı enerjisiyle bize örnek olan, bilgi birikimi çalışmaları ve fikirleriyle Kuzey Yıldızı gibi yol gösterici danışmanım Prof. Dr. Sayın Mustafa NAZIROĞLU hocama,

Doktora boyunca ne zaman bir konuda yardım istesem yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK hocalarım olmak üzere tüm kürsü arkadaşlarıma,

Akademik hayat sayesinde tanıştığım ve benimle aynı yollardan geçmiş/geçen, fikren destek/örnek olmuş diğer akademisyen arkadaşlarıma,

Bu tez çalışmama verdiği maddi destekten dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne,

Ve bana çocukluktan beridir adını unutmuş bile olsam yardımı dokunmuş ve hayatta tebessüm etmemi sağlayan herkese teşekkürler...

Saygılarımla...

Ercan SÖZBİR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Oksidatif Stres	4
2.2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri.....	7
2.2.4. N - Asetil Sistein (NAC)	7
2.3. TRP Kanalları	10
2.3.1. TRPM Katyon Kanalları.....	11
2.3.1.1. TRPM2 Katyon Kanalları.....	12
2.3.1.1.1. Basit yapısı	12
2.3.1.1.2. C-terminal ucun NUdT9 homoloji alanı.....	12
2.3.1.2. TRPM2 Kanallarının Aktivasyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	13
2.3.1.2.2. ADPR, NAD ve cADPR.....	13
2.4. Diyabet, Ca ⁺² ve Nöropatik Ağrı.....	16
2.5. Patch – Clamp Tekniği	20

2.5.1. Patch-Clamp Setini Oluşturan Temel Malzemeler	21
2.5.2. Hücre Üzerinde (On-cell, Cell-attached)	23
2.5.3. Tüm Hücre (Whole-cell)	23
2.5.4. İçi-Dışarıda (Inside-out)	24
2.5.5. Dışı-Dışarıda (Outside-out)	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Gereç	25
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	25
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1 Deney Hayvanları	27
3.2.2. Çalışma Grupları	27
3.2.3. Sıçan Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücreleri İzolasyonu	28
3.2.4. Patch - Clamp Analizleri	30
3.2.5. Beyin Elde Edilmesi ve Homejanat Hazırlanması	37
3.2.6. Antioksidan Analizleri	38
3.2.6.1. GSH ve GSH-Px Analizleri	38
3.2.6.2. Lipit Peroksidasyon (MDA) Analizi	39
3.2.6.2. Beyin B-Karoten A Vitamini, C Vitamini ve E Vitamini Analizleri	40
3.3. İstatistiksel Analizler	41
4. BULGULAR	42
4.1. Patch-Clamp Analiz Sonuçları	42
4.1.1. Kontrol Kaydı Sonucu	42
4.1.2 Kontrol Grubu Kaydı Sonucu	42

4.1.3. STZ Grubu Kaydı Sonucu	45
4.1.4. NAC Grubu Kaydı Sonucu	48
4.1.5. STZ+NAC Grubu Sonucu	49
4.2. Lipit Peroksidasyon ve Antioksidan Vitamin Sonuçları	52
4.3. AKG ve Beyin GSH-Px ve GSH Sonuçları.....	53
4.4. Antioksidan Vitamin Sonuçları	55
5. TARTIŞMA	57
6. KAYNAKLAR.....	63
ÖZET	75
ABSTRACT	76
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

·OH	: Hidroksil radikali
¹ O ₂	: singlet oksijen
ACA	: Antranilik asit
ADP	: Adenozin di-fosfat
ADPR	: Adenozin di-fosfat riboz
AKG	: Arka kök gangliyon
AMP	: Adenozin mono fosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPase	: Adenozin trifosfataz
cADPR	: Siklik adenozin di-fosfat riboz
cGMP	: Siklik guanin mono fosfat
CHPO	: Cumene hydroperoxide
-COOH	: Karboksilik asit
DM	: Diabetes Mellitus
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
HNA	: 4-hidroksinoneal
IP3	: inositol trifosfat
IP3Rs	: inositol trifosfat redüktaz
KAT	: Katalaz
LPO	: Lipit peroksidasyon

MDA	: Malondialdehid
NAC	: N-asetil sistein
NAD ⁺	: Nikotinamid adanin dinükleotid
NADH	: İndirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
NMDG ⁺	: <i>N-Methyl D-Glucamine</i>
NO·	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NUDT9	: Nudix Box 9
NUDT9-H	: TRPM üzerinde bulunan enzimatik bölge
O ₂ ⁻	: Süperoksit
OH ⁻	: Hidroksil radikali
ONOO ⁻ ·	: Peroksinitrit
PARG	: Poli-ADPR glikohidrolaz
PARP	: Poli-ADPR Polimeraz
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROO·	: Peroksil
ROT	: Reaktif oksijen türlerine
SERCA	: Sarco-endoplazmik retikulüm atpase
SOD	: Süperoksit dismutaz
STZ	: Streptozotosin

TBARS	: Tiyobarbitürük asit
TCA-1	: Trikarboksilik asit
TCA-2	: triklosetik asit
TNF	: Tümör nekrozu faktörü
TRP	: Transient receptor potential
TRPA	: Transient receptor potential ankyrin
TRPC	: Transient receptor potential conancial
TRPM	: Transient receptor potential melastatin
TRPML	: Transient receptor potential mucolipin
TRPN	: Transient receptor no-mechano-potential
TRPP	: Transient receptor potential polycystin
TRPV	: Transient receptor potential vanilloid

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Diyabette NAC'ın glutatyon ve antioksidan redoks sistemlerindeki rolü..... 9
- Şekil 2.** TRP üst ailesinin yedi alt aileden oluştuğunu gösteren şematik şekil..... 11
- Şekil 3.** TRPM2 kanallarının, oluşan oksidatif stresle ve bunun neticesi olan, NAD⁺ dan üç farklı yolla oluşan ADPR ile aktive olma mekanizmalarını gösteren şekil... 15
- Şekil 4A.** H₂O₂ ile uyarım yapılmamış sıçan AKG hücrelerinden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı..... 42
- Şekil 4B.** H₂O₂ ile uyarım yapılmış diyabetik olmayan AKG nöronlarından patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı 44
- Şekil 4B (I-V).** 4B aynı kaydın akım voltaj (I-V) değişikliğini gösteren grafik.. 45
- Şekil 4C.** STZ grubunun sonra H₂O₂ ile uyarım yapılarak AKG sinir hücrelerinde patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı..... 47
- Şekil 4C (I-V).** 4C patch-clamp kaydının akım-voltaj I-V değişikliğini gösteren grafik..... 48
- Şekil 4D.** NAC grubunun H₂O₂ ile uyarım yapılarak AKG hücrelerinden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (W.C. tüm hücre). 49
- Şekil 4E.** STZ+NAC grubunda AKG hücreleri H₂O₂ ile uyarım yapılarak hücrelerden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı 50
- Şekil 5.** AKG hücrelerinde TRPM2 kanal akımları üzerinde NAC, 2-APB, ACA ve H₂O₂ in etkisi. 51
- Şekil 6.** STZ ile oluşturulan diyabet modelinde sıçan AKG nöronlarında lipit peroksidasyon (LP) seviyeleri üzerine NAC'ın etkileri..... 53
- Şekil 7.** STZ ile oluşturulan diyabet modelinde sıçan AKG nöronlarında indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyeleri üzerine NAC'ın etkileri. 54
- Şekil 8.** STZ ile oluşturulan diyabet modelinde sıçan AKG nöronlarında GSH-Px enzim aktiviteleri üzerine NAC'ın etkileri..... 55

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. AKG hücrelerinin stereo mikroskop altındaki görüntüsü	29
Resim 2. A,B: Patch-clamp (Yama-menteşe) seti genel ve yakından görünümüleri (İnverted mikroskop, Motorize manipülatör ve kumandası, Isı kontrollü çember, Titreşimi önleyici masa, Faraday kafesi ve perfüzyon sistemi) C: Mikropipetin Mikroskop altında görünümü	33
Resim 3. Patch – Clamp pipetinin hazırlanışı ve mikroskop altındaki görünüşü.....	34
Resim 4. Patch-clamp pipetinin AKG hücresi ile teması	35
Resim 5. Patch- Clamp Pipetinin çembere girdiğini gösteren yazılımdaki osiloskop görüntüsü.....	36
Resim 6. Patch- Clamp Pipetinin çembere girip hücreye temas ettiğine dair yazılımdaki osiloskop görüntüsü.	36
Resim 7. Gigaseal oluşumunun patch-clamp yazılımındaki osiloskop görüntüsü. ..	37

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Hücre dışı eşdeğer solüsyon kimyasalları.....	31
Tablo 2. Hücre içi eşdeğer solüsyon kimyasalları.....	32
Tablo 3. N-methyl D-Glucamine'in (NMDG) hücre dışı eşdeğer solüsyon içerisinde hazırlanmasında kullanılan kimyasallar	32
Tablo 4. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar	39
Tablo 5. STZ ile oluşturulan diyabet modelinde sıçan beyinlerindeki lipit peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve antioksidan vitamin konsantrasyonları üzerinde NAC'ın etkileri	56

1. GİRİŞ

Beyin ve periferel sinir sistemi nöronları başta olmak üzere vücuttaki bütün canlı yapılar oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdırlar. Merkezi sinir sistemi vücuda alınan toplam oksijenin beşte bir kadarlık kısmını harcamaktadır. Böylesine yüksek oranda oksijen tüketimi ve sinir sisteminin metabolizma hızının yüksekliği serbest radikal üretimini arttırabilmektedir (1). Sinir sisteminin diğer organlara göre düşük miktarda vitamin ve antioksidan içermesiyle beraber, araşidonik asit ve dokozahekzaenoik asitler gibi çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşan fosfolipit içeren zarlardan oluşması (2), serbest oksijen radikallerine düşük savunma olmasına neden olmaktadır. Çünkü bu yağ asitleri zayıf çift bağlarla birbirine tutunan hidrojen iyonları bulundurmaktadırlar. Reaktif oksijen türleri (ROT) ise bu iyonları hedef olarak zarar vermektedir (3). Bu bağlamda, beyin ve arka kök gangliyon hücrelerinde bulunan fosfolipitlerin değişikliklerine neden olan oksidatif hasarın, nörolojik hastalıklarda rol alabileceği ortaya atılmıştır (4,5).

N-asetil sistein (NAC) glutatyon'un (GSH) yenilenmesine katkıda bulunmakla birlikte doğrudan serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek ortama sülfidril salar (6). Bu serbest oksijen radikallerinin elektrofilik grupları ile etkileşimli serbest tiyol grubudur ve oksidatif stresle indüklenen arka kök gangliyon (AKG) nöronlarındaki nöronal ölümler de dahil olmak üzere birçok hücre tipinde koruyucudur (7,8). NAC'ın antioksidan etkisi serbest oksijen radikallerine karşı GSH sentezini uyararak hücre içi GSH seviyesini optimum düzeyde tutmasıyla gerçekleşir (7).

“Transient receptor potential melastatin 2” (TRPM2) katyon kanalları oksidatif stresle aktive olan, seçici olmayan katyon kanallarıdır. Bu kanallar; N ucu, transmembran bölge ve C ucu olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır. C ucunda bulunan Nudix Hidrolaz enzimleri kanalın açılması için gerekli olan anahtar kilit vazifesini üstlenmektedir. Bu bölge adenosin di-fosfat (ADP) ve adenosin di-fosfat Ribozu (ADPR) bağlayabilen bir Nudix Hidrolaz türüdür (9). Son zamanlarda beyin ve diyabetik AKG gibi değişik nöron tiplerinde NAC'ın oksidatif stres üzerinde

inhibitör rolü olduğu bildirilmiştir. (10,11,12). Bu nedenle, aynı inhibitör etkiler TRPM2 kanalları ve diyabetik sıçanların beyin ve AKG'lerindeki oksidatif stres üzerinde de görülebilir.

Diyabete bağlı dokularda geri dönüşümsüz hasarlar, hücre ölümü ve buna bağlı olarak ortaya çıkan fonksiyonel kayıplara neden olur. Bu patolojik süreçlerin anlaşılması, etkin tedavi stratejilerin geliştirilmesine yol açabileceğinden önemlidir. Diyabette dejeneratif süreçleri açıklamada kabul gören bir patofizyolojik mekanizma da oksidatif stres hasarıdır. Bu mekanizmanın açıklayan bir bileşen TRPM2 katyon kanallarıdır. Bu kanallar, oksidatif stres ürünleriyle aktif hale gelerek hücre içine Ca^{+2} almaktadır. Hücresel hasarda başlatan olayın hücre içine aşırı miktarda Ca^{+2} girişi olduğu düşünüldüğünde, hücrede doğrudan hasar yapabilen oksidatif stresle aktive olan TRPM2 kanallarının potansiyel önemi ortaya çıkmaktadır.

Günümüzde diyabet dünya çapında yaygınlığı ve ilişkili birçok organ bozukluklarına neden olmasıyla ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Diyabette artan oksidatif stres ile ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri birçok organda dejenerasyona sebep olmaktadır. TRPM2 katyon kanalları serbest oksijen radikallerinin üretiminin artmasıyla aktive oldukları iyi bilinmektedir. Diyabetik olmayan sinir hücrelerinde oksidatif stresle aktive edilen TRPM2 kanallarının inhibisyonunda NAC'ın rolü iyi bilinmesine rağmen (11,12), diyabetik sıçan nöronlarında TRPM2 kanalları konusunda henüz bir bildirim mevcut değildir.

Nöronlar ve beyin diyabet kaynaklı, çoklu doymamış yağ asitlerinin oto-oksidasyonu ile devamlı olarak ortaya çıkan ROT'lara maruz kalarak oksidatif stresten etkilenebilir (13). Beyin diyabet kaynaklı oksidatif strese artan zaafiyet gösterir çünkü yüksek oranlarda oksijen tüketir, bol miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içerir ve enzimatik antioksidan savunma sistemince fakirdir. (14,15,16). Diabetes mellitus, insülin salgılanması ve kullanım bozukluğundan kaynaklanan yaygın bir metabolik hastalıktır. Diyabette hiperglisemiye glukozüri, polidipsi, poliüri ve eşlik eder (16). ROT üretimine hipoglisemik ve beyin nöron oksidatif hasarla ilişkili olduğunu ileri sürülmüştür ve bu ROT üretimi enzimatik olmayan, glikozilasyon ve aldoz redüktaz-poliol yolağı aktivasyonu ile uyarılır (13). Diyabetik

nöropati, Periferal olarak çok çeşitli hasar ile ortaya çıkabilir ve spontan ağrı, hiperaljezi ve allodini ile karakterize olan ilk hasar geçtikten sonra bile uzun sürebilir (17). Nöropati diyabet kaynaklı aşırı Ca^{+2} girişi sık görülen bir komplikasyondur ve süresi ve hiperglisemi süresi ve çeşitliliği ile ilişkilidir (15, 18). Diyabetik nöropati AKG nöronları da dahil olmak üzere tüm periferik sinirleri etkiler.

Bu tezin amacı TRPM2 hasarlanma süreçlerindeki rolünün ve NAC'ın bu olayda rolünün araştırılmasıdır. Tez temel olarak TRPM2 aktivitesinin uyarıldığı ve baskılandığı stres durumlarında çeşitli dokuların hayatta kalma ya da ölme süreçlerini aydınlatacaktır. Oksidatif stresle aktiflenen TRPM2 inhibisyonunda NAC'ın bloke edici etkisi araştırılacaktır. Projenin sonuçları, TRPM2'in diyabete bağımlı hücre ölümüyle ilişkilerini ortaya koyacak ve hücre hasarlarını sınırlamaya yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Beyin dokusu, antioksidan bakımından zayıf, oksijen tüketimi ve doymamış yağ asitleri bakımından zengin olmasından dolayı serbest oksijen radikallerinin en önemli hedeflerinden birisidir. Diyabette polidori ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz sistemleri aracılığı ile serbest oksijen radikalleri aşırı oluşmaktadır. NAC antioksidan özelliği ile, beyindeki bu antioksidanları düzenleyebilir. Bu tez çalışmasının diğer bir amacı beyin ve arka kök gangliyon (AKG) sinir hücreleri antioksidan değerleri üzerinde NAC'ın koruyucu etkisinin araştırılmasıdır.

Bu projede, diyabetik sıçan dokularında oksidatif stresle aktive edilen TRPM2 katyon kanallarında NAC'ın koruyucu rolünü araştırarak diyabetin meydana getirdiği olumsuzlukların etiyojine katkıda bulunmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres

Serbest radikaller daima tek elektron transferleri içeren biyolojik redoks tepkimelerinin sık görünen ürünlerindedir. Bazı ilaç türleri, çevre kirliliğine yol açan maddeler, ağır metaller, sıcaklık, ultraviyole ışınları veya görünür ışık ve diğer iyonize olabilen radyasyon çeşitleri gibi birçok dış faktörler bu serbest radikallerin biyolojik sistemlerde üretilmesine sebep olmaktadır (19,20). Kontrolsüz bir şekilde reaktif türlerin üretimi, DNA'ları, lipitleri, proteinleri, karbonhidratları veya hücrel hasar ve hastalıklarda çıkan zincir reaksiyonlarını içeren biyolojik moleküler mekanizmanın geniş yelpazesinde, önemli ölçüde geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hasara sebep olmaktadır (21). Bu işlemlerin çoğu, hedef moleküllerin birçoğunda yayılan tek bir başlatıcı radikal türleri ile zincir reaksiyonları yapmaktadır. Kanser de dâhil olmak üzere fizyolojik ve patolojik hastalıkların çeşitlerinde, hücre hasarını içeren bu tür reaksiyonlar ve bu reaksiyonların aralarındaki ilişkilere büyük ilgi duyulmaktadır (20).

Serbest radikallerin ROT ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olmak üzere iki ana türü mevcuttur. ROT 'un üç ana türü mevcuttur. Bunlar; Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) dir. Süperoksit bir serbest radikal olmasına rağmen, çokta zararlı tür değildir. Çoğunlukla doğada indirgeyici madde olarak bulunmasının yanı sıra H_2O_2 ve geçiş metal iyonlarına kaynak teşkil etmektedir.

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilebilen oldukça aktif atom veya moleküllerdir. Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Her kimyasal ve biyokimyasal tepkime her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin aktivitesini olağanüstü artırır, dolayısıyla

serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (22,23). İnsan vücudunda bütün hücelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan oksijen O₂ yapısı gereği radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir anlatımla ‘ROT’ ifade edilmektedir. ROT ve serbest radikaller organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile oluşurlar. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (24).

O₂ ve nitrojen molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır. O₂'nin kısmi indirgenmesinden, ROT olan hidroksil ($\cdot\text{OH}$) radikali ve O₂⁻ oluşmaktadır. Ayrıca singlet oksijen (¹O₂) ve H₂O₂ molekülleri, radikal olmayan ROT olarak ifade edilirler. Oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit (NO \cdot), peroksinitrit (ONOO \cdot) ve lipit peroksidasyon (LPO) sırasında oluşan peroksil (ROO \cdot) radikalidir (24,25).

Radikal olmayan türler, bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sırayla serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (26,27).

Serbest radikaller, hücelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Endojen kaynaklı etmenler organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşur. Oksijen, nitrik oksit, aktive nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma zarı, araşidonik asit metabolizması başlıca endojen kaynaklardır. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında; diyet faktörleri, stres, çevresel faktörler (hava kirliliği), ilaçlar, ksenobiyotikler, zararlı ışınlar (X-ışınları, ultraviyole ışınlar v.b.) yer alır (21,23,28).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, O₂'den oluşan radikallerdir (2) O₂, iki elektronu eşleşmemiş bir şekilde elektron dağılımına sahiptir. Bu yüzden bazen O₂ bir radikal olarak değerlendirilir (29). Bir radikal O₂, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde serbest radikallerle kolayca

reaksiyona girer. Bir radikal O_2 'nin elektronlarından birinin enerji olarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle tekli oksijen radikali oluşur. Tekli oksijen radikali, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Organizmada geçiş metallerini (Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla, moleküler oksijene tek elektronların transferi ile oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, radikal oluşunun bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri oluşturma eğilimindedir. ROT normal oksijen metabolizması sırasında oluşan $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , ve OH^- dir. Reaktif oksijen türlerinin oluşum basamaklarında öncelikle tek elektron transferi ile moleküler oksijen, $O_2^{\bullet-}$ ye dönüşür. $O_2^{\bullet-}$ 'ne iki elektron eklenmesi ile H_2O_2 oluşur. H_2O_2 , univalan redüksiyonu ile diğer bir protonun eklenmesi sonucu suya ve OH^- 'ne dönüşür. OH^- 'i de univalan redüksiyon ile suya dönüşür (30).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızındaki artış ya da ortadan kaldırılma hızında ki bir düşüş dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermektedir (31).

Serbest radikaller, normal insan fizyolojisinde endojen kaynaklı olarak indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında bol miktarda üretilir.

Malignite, diabetes mellitus (DM), ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalık gibi birçok patolojik olayla ilişkili olan serbest radikallerin en zararlı biyolojik etkisi; hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması ve LPO olarak bilinen bir reaksiyon zincirini başlatarak, zar proteinlerine hasar verip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmasıdır (32).

2.2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Vücutumuzda serbest radikaller ve antioksidan savunma mekanizması normal şartlarda denge halindedir. Antioksidan savunma mekanizması ve serbest radikaller arasındaki denge oksidanlar lehine bozulduğunda serbest radikaller; zar lipitleri, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır (33, 34).

2.2.4. N - Asetil Sistein (NAC)

Günümüzde mukolitik ve genel tedavi amaçlı olarak akciğer rahatsızlıklarında üst solunum yolu enfeksiyonlarında kullanılan NAC yapısında L-sistein isimli aminoasitten türeyen sistein grubu bulunmaktadır. Bronşiyal sekresyonların atılımına ve solunumu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur. NAC'ın mukolitik etkisinden başka parasetamol zehirlenmesinde tedavi edici bir ajan olarak da kullanılır. Asetilsistein, parasetamol doz aşımına bağlı olarak oluşan hepatotoksisite üzerine etkisini karaciğer GSH seviyesini koruyarak veya arttırarak gösterir.

Solunum sistemi rahatsızlıklarında kullanılan NAC'ın nörolojik bozukluklara olumlu ya da olumsuz etkisi henüz ortaya konulamamıştır (35).

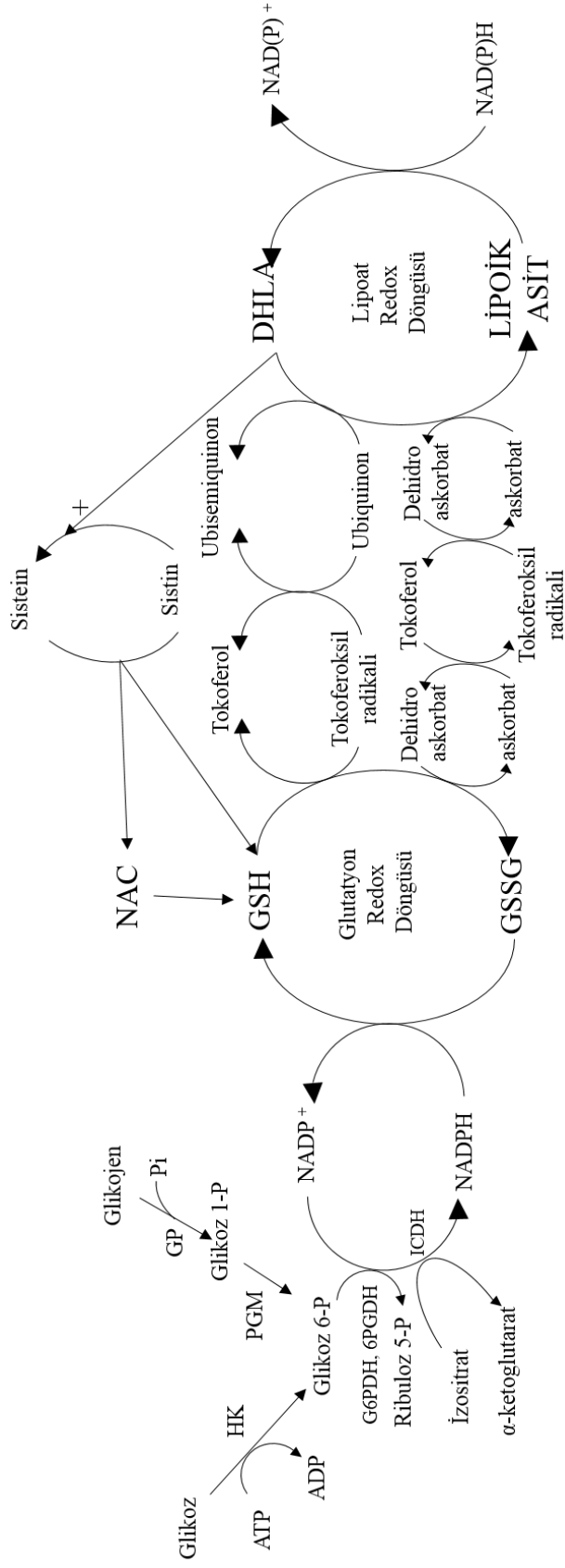
1960 lı yıllardan itibaren iv, inhalasyon ve oral yol ile NAC mukolitik bir ilaç olarak kullanılmaktadır. NAC, karbosistein ve erdosteine gibi klasik mukolitikler serbest sülfhidril (tiyol) grubu içerirler. Yapısında bulunan sülfhidril grubu ile mukustaki disülfid bağlarını kırarak, mukoproteinleri parçalar ve mukusun viskozitesini azaltırlar. Zamanla bu ilacın hücre içinde sistein miktarını arttırarak glutatyon üretimi yolu ile antioksidan özellik gösterdikleri keşfedilmiştir (36).

NAC ve GSH'ın hücre hasarını önleyerek koruyucu etkisi özellikle akciğerde, sigara dumanı ve diğer zararlı maddelerin solunmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerle birlikte enfeksiyonlar esnasında nötrofillerin oluşturduğu serbest radikalleri de bağlayarak gerçekleşir. Aynı zamanda, NAC, deneysel sepsis

modelinde, hücre içi genetik materyel olan DNA'nın oksidatif stresten dolayı hasar görmesiyle bir dizi reaksiyon sonucu oluşan malondialdehid (MDA) düzeylerini düşürmektedir (37).

NAC'ın antioksidan ve hücre koruyucu özellikleri bulunmaktadır. Antioksidan özelliğini GSH seviyelerini düzenleyerek, doğrudan radikalleri temizleyerek, nötrofil aktivitesi ve TNF üretimini baskılayarak göstermektedir. (38,44).

NAC'ın da yapısında bulunan tiyoller hücrede her zaman bulunur ve aerobik yaşamı devam ettirmede rol alırlar. Tek bir bileşenden oluşmayan tiyoller sistin ve sistein döngüsünden başlayarak, GSH ve Okside Gultatyon (GSSG), E vitamini, dihidrolipoik asit (DHLLA) ve lipoik asit (LA) gibi birçok sinerjik redoks tepkimelerinin oluşumuna öncülük ederek antioksidan mekanizmalarının önemli bir basamağını oluşturan antioksidanlardır. (7).

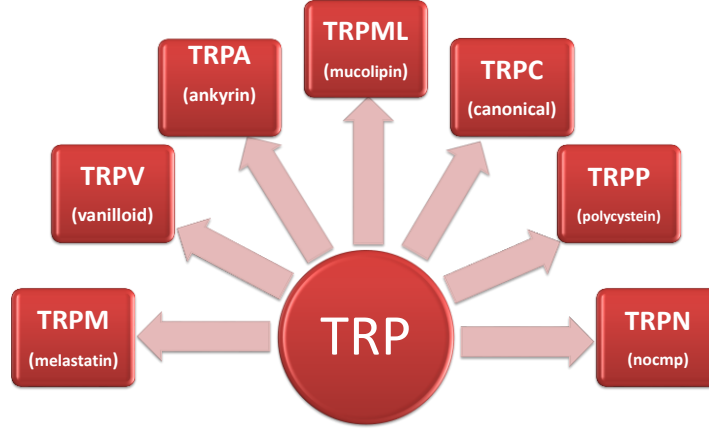


Şekil 1. Diyabette NAC'ın glutatyon ve antioksidan redoks sistemlerindeki rolü Sen and Packer(2000)'den modifiye edilmiştir .

2.3. TRP Kanalları

Transient Reseptor Potential (TRP) kanalları; nosiseptif duyuşal sinir sonlanmalarında konumlanan ve rahatsız edici potansiyeli olan termal, mekanik veya kimyasal uyarılarla aktive olan, seçici olmayan özel bir katyon kanalı ailesidir. TRP kanalları ilk defa *Drosophila* türü sirke sineklerinin gözlerinde bulunan fotoreseptörler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda 1989 yılında ışığa karşı, gelip geçici (kesik kesik) bir gerilim oluşturmasıyla karakterize iyon kanalı olarak varlığı gösterilmiştir (40). TRP kanalları katyonlara karşı seçici olmamakla birlikte kalsiyum iyonu (Ca^{+2})'a karşı duyarlılığı oldukça yüksektir. TRP kanalları ya direkt olarak plazma zarlarındaki Ca^{+2} giriş kanalları gibi davranmakta ya da Ca^{+2} giriş kanallarının modülasyonunu sağlayacak olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest Ca^{+2} kanalları üzerinde etkili olmaktadır. Diğer birçok kanalda olduğu gibi TRP kanallarında da 4 por ve her porda 6 segment bulunmaktadır. Ca^{+2} iyon girişleri 5. ve 6. segmentler arasından gerçekleşmektedir (41). Ca^{+2} ile birlikte az miktarda Na^{+} katyonu da girdiğinden, TRP kalsiyum kanalları yerine TRP katyon kanalları ismi kullanılmaktadır.

Yapısal benzeşime göre TRP kanalları 7 alt aileye ayrılmıştır (Şekil 2). Bunlar canonical (TRPC1-7), ankyrin (TRPA1-3), melastatin (TRPM1-8), mucolipin (TRPML1-3), vanilloid (TRPV1-6), polycystin (TRPP1-3), and no-mechano-potential (NOMCP or TRPN) dir. Yapısal olarak benzemelerine rağmen aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları birbirinden oldukça farklıdır. Örneğin TRPV1 katyon kanalları çevresel yüksek sıcaklık (≥ 43 °C), kapsaisin, oksidatif stress ve yangı yan ürünleri gibi faktörlerle aktive olurken TRPM8 ise 15°C'nin altındaki tehlikeli sıcaklıklarda ve mentol ile aktive olmaktadır. TRPA1 ise tarçın yağında bulunan cinnamaldehit, japon turpu, sarımsak ve çevresel araç egzost gazı gibi uyarılarla aktive olabilmektedir. TRP katyon kanalları vücudun değişik dokularında dağılım gösterirler. TRPV1 ve TRPM2 kanallarının ekspresyonu beyin ve sinir sistemi dokularında daha sık görülürken TRPC1 kanalları ise kalp – damar sistemi dokularında daha çok gözlenirler. Bundan dolayı TRP kanalları çevre etkenlere duyarlı farklı hücreşel polimodal bağlanıcıları bulunmaktadır. (42, 43,44,45).



Şekil 2. TRP üst ailesinin yedi alt aileden oluştuğunu gösteren şematik şekil.

2.3.1. TRPM Katyon Kanalları

TRPM alt ailesi 4 grup 8 üyeden oluşmaktadır Bunlar; TRPM2/TRPM8, TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5 ve TRPM6/TRPM7 dir (5).

TRPM2 ADPR pirofosfataz faaliyeti gösteren fonksiyonel NUDT9 homoloji alanı içerirken, TRPM6 hem de TRPM7 fonksiyonel karboksil (-COOH) terminal serin/treonin kinaz içerir. Ca^{+2} u geçirmeyenden (TRPM4 ve TRPM5), Ca^{+2} u çok geçirene, (TRPM6/TRPM7) Ca^{+2} geçirgenlikleri alt gruplara göre farklılıklar gösterir. TRPM2 ADPR, H_2O_2 ve sıcaklıkla aktif hale gelir. Hücre şişmesi gibi bazı mekaniksel uyarımların TRPM3 kanallarını aktive ettiğine dair raporlar olmasıyla beraber, TRPM3 kanalları TRPM6 ve TRPM7 kanallarına benzer şekilde hücre içi Mg^{+2} seviyesi vasıtasıyla düzenlenir. (40, 46, 47, 48). TRPM4 ve TRPM5 ısıya duyarlı Ca^{+2} aktif kanallarıdır (47). Yakın zamanlarda yapılan bir araştırmaya göre; düşük sıcaklıkla ve mentol ile aktive edilen TRPM8 kanallarının hem tekrar vücut sıcaklığına döndüğünde ve hem de ACA uygulandığında, önemli ölçüde kanalların inaktive olduğu rapor edilmiştir (49). Bu kadar geniş araştırmalara rağmen TRPM1 kanalı hariç tüm TRPM katyon kanalları bu güne kadar karakterize edilmemişlerdir.

2.3.1.1. TRPM2 Katyon Kanalları

2.3.1.1.1. Basit yapısı

TRPM kanalları, bilinen diğer TRP kanallarıyla büyük oranda benzerlik göstermektedir (9). Kanalın yapısında 4 por vardır. Kanalın orta kısmında altı adet transmembran açıklık olduğu bildirilmiştir. Her por da iyonlar kanala beş ile altıncı segment arasından giriş yapmaktadır. Belirtilen kanal yapısı, temel olarak az oranda sodyum iyonuna ve daha ziyade kalsiyuma iyonuna geçirgendir (50). TRPM alt ailelerine ait TRPM4, TRPM5, TRPM8 katyon kanallarının açılma mekanizması, klasik S4 gerilim sensörüne sahip olmamaları nedeniyle temel olarak benzedikleri bazı voltaj bağımlı kanalların açılma mekanizmalarından farklılık gösterir. (47, 51). Yaklaşık 700 amino asit kalıntılarının N-terminal bölgesinde bulunuyor olması TRPM alt familyalarının tüm üyelerine ait benzersiz bir özelliktir. TRPM2 kanalları; C, N ucu ve bu ikisi arasında bulunan transmembran bölge olmak üzere toplam üç ana bölgeden oluşmaktadır. TRPM2 kanallarının en önemli özelliği kanalın açılmasına olanak sağlayan ve bu kanallaewrın açılması için gerekli kilit yeri olan C ucunda bulunan ve Nudix bölgesi olarak adlandırılan alanın bulunmasıdır. TRPM2 N-terminal kısmının, kanal birimlerinin ve/veya zar yapısına uygun montajı için gerekli olduğu da ileri sürülmüştür (52).

2.3.1.1.2. C-terminal ucun NUDT9 homoloji alanı

Önemli benzeşimi ile (% 39 sekans kimliği ile (53) insan nükleozid difosfat bağlantılı X-tipi motif 9 (NUDT9) ADPR pirofosfataz yapısını taşıyan TRPM2 nin C-terminal alanına sahip olması onun önemli bir özelliğidir (46, 52, 54). NUDT9 enzimi substrat olarak kullandığı ADPR 'un hücre içi uygulanması TRPM2 katyon kanallarının açılmasına neden olmaktadır (60). Kristal yapı analizleri ve biyokimyasal çalışmalar; katalitik bir aktivite içeren C-terminal alanı ve bağlayıcı ADPR'u destekleyebilen N-terminal alanının içerisinde, insan NUDT9 enziminin

fonksiyonel olarak ayrılabilirliğini ortaya koymuştur (53). Bu etki alanlarının mimarisi de TRPM2 nin C-terminal NUDT9-homoloji (NUDT9-H) bölgesinde bulunmaktadır. NUDT9 ve NUDT9-H arasındaki katalitik sitenin uzlaşma dizininin karşılaştırılması, hem NUDT9'un enzimatik aktivitesi için hem de TRPM2 kanallarının açılması için kritik önem taşıyan hassas amino asit değişikliğini ortaya koymaktadır (52,56).

2.3.1.2. TRPM2 Kanallarının Aktivasyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

TRPM2 katyon kanallarının açılmasında; Oksidatif stres, tümör nekroz faktörü alfa, ADPR ve NAD⁺ metabolizması olmak üzere 4 aktivatör vardır (46). TRPM2 kanallarının sıcaklığa duyarlı olabileceği TRPM2 için vücut ısısı endojen bir ko-faktör gibi davranması sebebi nedeniyle tahmin edilmektedir (57).

2.3.1.2.2. ADPR, NAD ve cADPR

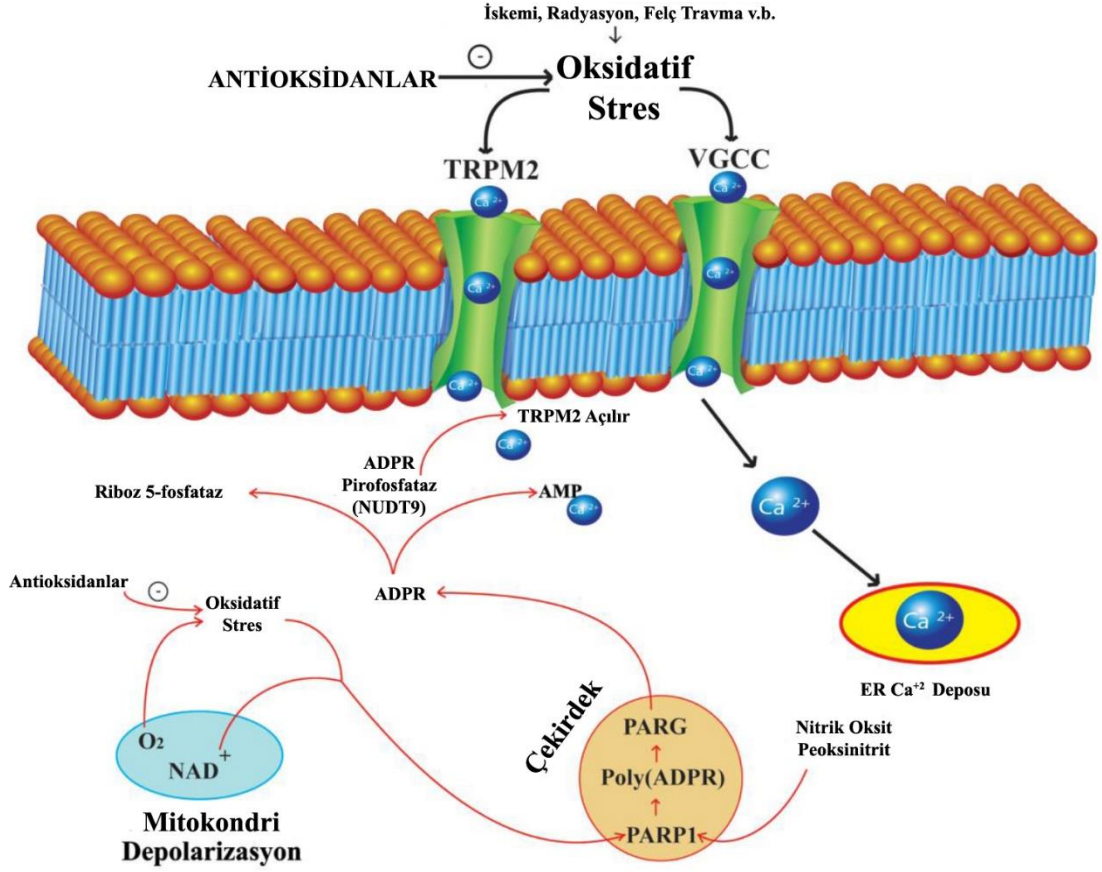
ADPR üretiminin gerçekleşmesiyle hücreye Ca⁺² girişi TRPM2 üzerinden olur. ADPR mitokondriyal oluşabileceği gibi poly-ADPR'un alternatif aktivasyonu sonucu oluşabilir (58).

ADPR üretimi G proteine bağlı reseptörlere ligand kanal aktivasyonu ile başlatılır. Reseptör aktivasyonu aynı zamanda intrasellüler Ca⁺² yoğunluğunun yükselmesi inositol trifosfat (IP3) tarafından hücre içi organellerden Ca⁺² serbest bırakılmasını sağlar. TRPM2 hücreye doğru güçlenen TRPM2 aktivasyonu ile bir pozitif feedback ile Ca⁺² girişi sağlar. Alternatif kaynaklar ADPR içeren mitokondri ve çekirdektir. ADPR polimerlerinin stimülasyon sonrası poli (ADPR) polimeraz-1 (PARP-1)'e ve sonrasında poly (ADPR) glikohidrolaz (PARG) tarafından ADPR'ye hidroliz edilir. Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyarabilir. Sitozolda Ca⁺² artışı mitokondride depolarizasyon ve porların açılması veya hücre dışından sitozole H₂O₂ 'lerin gelişi daha fazla nitrik oksit sentaz (NOS) ve ROT üretilir. ADPR ve

ROT, geri bildirim mekanizması ile TRPM2 kanallarının açılması yolu ile sitozole Ca^{+2} akışını artırır (4).

Oksidatif stres ve onun ürünleri olan ROT Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) den 3 yolla ADPR üretimine neden olmaktadır (5). TRPM2 kanallarının moleküler yapısına bakıldığı zaman kanalın diğer çoğu kanal gibi 6 segment'ten meydana geldiği ve katyon girişlerinin 5. ve 6. segment'ler arasından gerçekleştiği gözlenmektedir. Ayrıca kanalın bir C (Nudiks box) ve N uçları bulunmaktadır.

Patch-Clamp ile alınan tekli kanal kayıtlarında kanalın ikinci haberciler olmadan da aktive olabilmektedir. Nudiks boks kısmında ADPR pirofosfataz enzimi mevcut olup kanalın açılmasından bu enzimin aktivasyonu sorumludur. Yani anahtarı kanalın içerisindedir. ADPR pirofosfataz enzimi ise hem ADPR hem de oksidatif stresle aktive olabilmektedir. Bu oksidatif stres ve ADPR ile aktivasyon konuları kesinleşmiş olmasına rağmen bunların birlikte mi yoksa ayrı ayrı mı kanalı aktive ettikleri günümüzde dahi tartışma konusudur. Bir kısım araştırmacılar (59) kanalların hem ADPR ve oksidatif stresle ayrı ayrı aktive olduklarını rapor etmelerine rağmen, diğer bir kısım araştırmacılar (65) oksidatif stres ürünlerinin ADPR düzeyini artırdığını ve ADPR kanalı açtığını yani oksidatif stresin kanal aktivasyonunda dolaylı etkisinin olduğunu savunmuşlardır.



Şekil 3. TRPM2 kanallarının, oluşan oksidatif stresle ve bunun neticesi olan, NAD^+ dan üç farklı yolla oluşan ADPR ile aktive olma mekanizmalarını gösteren şekil. Hücrede lipid peroksidasyon sonucu NAD^+ dan üç farklı yolla ADPR üretilir. 1. NAD^+ poli-ADPR polimeraz (PARP) aktivasyonu yoluyla poli-ADPR oluşur. Bu poli ADPR ise poli-ADPR glikohidrolaz (PARG) enzimi vasıtasıyla ADPR dönüşür. 2. NAD^+ CD38 reseptöründe bulunan NADase enzimi yoluyla, 3. NAD^+ dan siklik ADPR (cADPR) oluşur ve cADPR hidrolaz enzim aktivasyonu ile de ADPR oluşur. TRPM2 katyon kanallarının C ucunun Nudix alanında (NUDT9) bulunan ADPR pirofosfataz enzimi yardımıyla, ADPR, riboz-5 fosfat ve AMP ye parçalanıp TRPM2 kanallarının açılmasına sebep olur (43).

2.4. Diyabet, Ca⁺² ve Nöropatik Ağrı

Diyabet (DM), 100 milyon insanı etkileyen, güçten düşürücü kronik bir rahatsızlıktır (61). Diyabetin bu yıkıcı komplikasyonları üzerine uygulanan tedaviler yetersizdir ki bu kısmen hastalığın patofizyolojik mekanizmasının iç yüzünü kavrama eksikliğine dayandırılabilir (62). Diyabetik periferel nöropatinin en önemli özelliklerinden biri ağrının gelişimidir. Tipik olarak ekstremiteleri kapsar ve ağrılı/acılı uyarılara (hyperalgesia: aşırı hassaslık, Hiperaleji) ya da orta düzeyli veya acısız uyarılara aşırı tepki (allodynia: normal uyarının ağrıya sebep oluşu, ailodini) şeklinde oluşur. Hiperaleji (hyperalgesia) ve ailodini (allodynia) nöropatik ağrının hassas hücrel mekanizması tam olarak anlaşılmalıdır. Fakat voltaj ve kimyasal (nörotransmitter) geçişli iyon kanallarının şeklinin değiştirilmesi/tadilat yapılması kritik bir rol oynayabilir ki bu duyusal nöronların uyarılabilirliğini artırır. (62, 63)

Beta hücresine glikoz girişi pirüvat üreterek glikolizi sağlar. Bu da mitokondriye gönderilerek orada trikarboksilik asit (TCA) döngüsünü besler. TCA döngüsü aktivasyonu NADH ve flavin adenin diniklotid hidrojen 2 aracılığıyla elektronların ara TCA döngüsünden solunum zinciri reaksiyonlarına aktarımına sebep olur ve sonra zincir reaksiyonları mitokondride ROT üretimini sağlar. Mitokondriyal elektron taşınışı zinciri hücrede ROT üretiminin önemli bir yeridir. Şeker, yağ asitleri ve aminoasit katabolizmasından gelen elektronlar solunum zinciri reaksiyonlarının elektron taşıyıcılarında toplanır. ROT oluşumu moleküler oksijenin tek elektron azaltımı içerisinde normal mitokondriyal solunumun sonucu olarak elektron taşınışına bağlanmıştır (64). Ek olarak mitokondri sadece pankreas odacıklarında ROT üretimine katkı sağlamaz. Aslında beta hücreleri, ikincil olarak ROT üretimini azaltarak tepkiyi olumsuz olarak modüle eden cAMP, NADPH oksidazları gibi fagositleri ifade ederler (65). Dahası NADPH oksidazlarının diyabetik obez faredeki T2D'de mitokondriyal düzensizlik başlangıcına yol açan beta hücrelerindeki sinyal yollarını uyarmadan da sorumlu oldukları bildirilmiştir (65).

Diyabette nöral Ca⁺² sinyali değişimleri distal simetrik duyusal-motor çoklu nöropati ve acının gelişimine katkı sağlayabilir (66). Diyabet çoklu voltaj-kontrollü

Ca^{+2} akımının mevcut genişliğini artırır ve Ca^{+2} akışı (67) nitrik oksit (NO), cGMP/protein kinaz G yollarını aktive eder ki bu yolların kapanması indüklenmiş acıları azaltır. Diyabetik sıçanlarda protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC) ve NO ikinci mesajlaşma sistemi Hiperaleziye (hyperalgesia) katkıda bulunur. Hâlbuki NMDA reseptörü aracılı durumların alakalı olduğu düşünülmemektedir (68). Ek olarak sitozolik Ca^{+2} in sürekli yükselişi nöral dejenerasyon (69) ve apoptozla (70) ilgilidir. Bu yüzden oksidatif stresin azaltılması ve anormal Ca^{+2} sinyalizasyonunun iyileştirilmesi sensorimotor polinöroterapide önemli teröpatik hedefler olarak ortaya çıkmıştır (71).

Bilimsel delillerin önemli bir kısmı farklı tip hücrelerdeki kalsiyum değişikliğine neden olan diyabetten elde edilmiştir. Diyabetik beta hücrelerindeki L tipi Ca^{+2} kanallarının mevcut yoğunluğunun arttığı aktarılmıştır (72). Diyabet hastalığı hem periferik hem de merkezi sinir sistemini etkileyebilmektedir. Depolarizasyon normalde küçük ölçekte geçici Ca^{+2} 'a neden olmakta fakat AKG nöronlarının STZ nedenli ve normal gelişimli diyabette esnasında büyük ölçüde depolarizasyon süreleri uzamaktadır (73) Yüksek eşikli, voltaj-kontrollü kalsiyum akımları diyabetik sıçanlardaki oldukça çözünük, kapsaisin duyarlı AKG nöronlarını diyabetik olmayan kontrol grubuyla kıyaslandığında arttığı görülmüştür (79). Diyabete bağlı nöral Ca^{+2} homeostazis değişimleri diyabetin fare hipokampusu, uzun dönemli depresyon ve potansiyalizasyonu üzerinde gözlemlenen etkilerini açıklayabilir.

Umeda ve arkadaşları (75), AKG'nin tüm alt birimlerindeki gen ve protein seviyelerini ve immunohistokimya ve gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu kullanılan STZ nedenli diyabetik farelerin omuriliğini inceledi. STZ nedenli diyabetik Hiperaleziye sıçanlardaki AKG nöronlarındaki, özellikle küçük ve orta C-liflerindeki voltaja duyarlı P/Q tipi Ca^{+2} kanallarındaki ekspresyonunun seçim değişikliğinin sebep olabileceğini buldular. P/Q tipi kanalların geliştirilmiş ekspresyonunun anormal şekilde acıya neden olabilecek birincil iletken nöronlarda çok miktarda taşıyıcının ortaya çıkmasıyla sonuçlanacağı konusunda karar kıldılar.

Benzimidazolil işlevli tetralin türevi olan mibefradil birçok farmakolojik özellikleriyle yeni bir Ca^{+2} kanal tıkayıcısıdır. Önceki araştırmalar göstermiştir ki Mibefradil nöropatik ağrıda periferik T tipi Ca^{+2} kanallarında ağrıyı engelleyici bir rol oynayabilir. Wen ve arkadaşlarının (76) aktardığına göre farelerin bel omuriliklerinde voltaja duyarlı T tipi Ca^{+2} kanalları (Cav3.2 ve Cav 3.3) vardır ve nöropatik ağrı şartlarında T tipi Ca^{+2} kanallarında mRNA ekspresyonu artış gösterdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak AKG nöron operasyonunun kronik kompresyonlarını izleyen nöropatik ağrının gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir.

Li ve Chen (77) PKCb hücreler arası Ca^{+2} tarafından aktive edilen ve belki, sırasıyla, Ca^{+2} sinyallerini düzenleyen bir serine/treonin kinazdır. Nöronlar gibi uyarılmaya eğimli hücreler içerisindeki Ca^{+2} homeostazı sıkı bir şekilde düzenlenmiştir. Çünkü hücreler arası Ca^{+2} pek çok sinyal diziliminde önemli bir parçadır ve nörotransmitter ortaya çıkışı, hücre yaşamı ve aksonal büyüme ve sürdürme gibi fizyolojik olgularla bağlantılıdır. Onun normal çalışma düzenindeki dengesizlik nörodejeneratif hastalıklarda kritik bir konudur. Benzer olarak AKG nöronlarındaki Ca^{+2} homeostazis anormalliği diyabetik nöropatinin erken bir moleküler belirleyicisi olduğunu göstermiştir. Artırılmış voltaj-kontrollü Ca^{+2} akımının bozulmuş/ hasar görmüş önleyici G proteini fonksiyonu ve Ca^{+2} tampon etkisiyle hücreler arası organellerin düzensizliğinin -endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi- diyabetik nöropatideki düzensiz kalsiyum sinyaline katkı sağladığı görülmüştür.

Diyabetik nöropati patogenezi polioliol yolu ilerlemiş glikasyon ürünü, oksidatif stres, PKC aktivasyonu sinir sistemi üzerindeki etki hipoksiye yol açar. Bu faktörler dejenerasyon ve sinir fonksiyonu bozukluğunun gelişmesine katkıda bulunur. (63, 72, 78). Bunların arasında PKC nin aktivitesi özellikle β izoformu öncü bir rol oynayabilir. Onun patojenik mekanizması temelinde PKCb selektif önleyicisi (inhibitörü) LY333531 şu sıralar klinik deneylerde inceleme altındadır. Tahara ve arkadaşları (79) AKG nöronları üzerinde PKC seçici inhibitör olan LY333531'in hücreler arası Ca^{+2} homeostaza muhtemel direkt etkisini araştırdı. Onlar PKCb selektif inhibitörü LY'nin zarar görmüş Ca^{+2} homeostazını diyabetik farelerin küçük

AKG nöronlarındaki azalmış mitokondriyal Ca^{+2} tamponu vasıtasıyla iyileştiğini göstermişlerdir.

Drel ve arkadaşlarının (80) çalışmasında db/db farelerinin (Tip 2 diyabet) 2-3 ay boyunca beslenmiş olabileceği görülmektedir. STZ- diyabetik 8-14 haftalık Wistar farelerindeki L4 L5 AKG den izole edilmiş hem geniş hem küçük AKG nöronlarındaki $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonu büyük ölçüde 2, 2.5 kat artış göstermiştir; $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonundaki artış hastalığın ilerleyişiyle ilişkilidir. Diğer taraftan omuriliğin daha yüksek seviyelerinde yer alan C3, C4 sinir düğümlerinde bulunan nöronlardaki $[Ca^{+2}]_i$ 8-14 haftalık deneysel diyabetten zarar görmemiştir.

STZ sebepli diyabetik nöropatideki orta büyüklükte AKG nöronlarındaki T tipi kanallar depolarizasyonu hem kısa hem de uzatılmış periyodları esnasındaki aktivasyonları için ulaşılabılır olmak maksadıyla kanalların daha büyük fonksiyonlarını müsaade ederek voltaj-kontrollü aktivasyonda göze çarpan değişimler gösterdiği bildirilmiştir (62).

Voitenko ve arkadaşları tarafından (67) STZ sebepli diyabetin nöronlar üzerindeki etkilerini araştırdı. Fura-2AM Ca^{+2} işaret metodu aracılığıyla omur dilimlerinden keskin bir şekilde ayrılan omurilik arka boynuzu nöronlarındaki Ca^{+2} konsantrasyonlarını ölçtüler. Ekip, plasmalemmalin voltaj geçişli Ca^{+2} kanallarının farklı alt tiplere ko-ekspresyonunu tavsiye ederek, K^+ -sebepli Ca^{+2} yükselimine nikel iyonlar, nifedipine ve x-conotoxin tarafından başka bir boyutta ket vurulduğunu buldular. Çalışmalarında Ca^{+2} ın işlevinin Ni^{+2} (50 pM) nin geçici dalgalarının durdurulması diyabetik nöronlar ve kontrol altındakilerle aynıydı. Diğer tarafta $[Ca^{+2}]_i$ nin geçici dalgalarının nifedipine (50 pM) ve x-conotoxin (1 pM) tarafından engellenmesi normal hayvanlarla kıyaslandığında diyabetik nöronlardakiler daha büyüktü.

Endoplazmik retikulum çoklu programlanmış hücrelerin ölüm yollarında önemli bir rol oynar. Endoplazmik retikulum temelli oksidatif stres tarafından sebep olunan programlanmış hücre ölümü (apoptoz) diyabetle de alakalı olabilir (81, 82) ve endoplazmik retikulümdaki bozulmuş Ca^{+2} dan kaynaklanan yayılmış proteinlerin toplanması sebep olabilir. Hem sarco-endoplazmik retikulum atpase (SERCA)'nın

güçlü ve spesifik inhibitörü olan Tapsigargin hem de SERCA'yı aşağı yönlü düzenleyen, iç kısımdan kaynaklanan (endojen) faktörler β hücrelerindeki apoptoz ve endoplazmik retikulum sebepli oksidatif stresi uyarır (83, 84).

SERCA'nın çoklu izoformlarına ek olarak β hücrelerinin endoplazmik retikulumu içinde inositol trifosfat alıcıları (IP3Rs) ve ryanodine alıcılarını barındıran sitozolik Ca^{+2} salan kanallarının pek çok türünü açıklar (85, 86). Oksidatif stres kaynaklı diyabetik durumunda bu alıcıların ekspresyonları pankreatik β hücreleri (87) de dahil olmak üzere bir çok hücre şeklinde modüle edildiği bilinir. Şu sıralar aktarıldığına göre ryanodine alıcılarının önlenmesi MIN6 hücrelerindeki ATP nin ADP'ye oranını azalttı. Ki bu durum endoplazmik retikulum oksidatif baskısını muhtemelen aktive eder (88). Dahası diğer hücreler üzerine olan çalışmalar göstermiştir ki endoplazmik retikulum oksidatif strese bağlı hasar, ryanodine alıcılarının ve IP3Rs nin inhibitörleri tarafından tesir edilebilir (89).

2.5. Patch – Clamp Tekniği

18. Yüzyılda Luigi Galvani'nin yaptığı bazı araştırmalar onun kurbağa bacaklarının belirli bazı metallere temas etmesi sonucu refleks olarak hızla harekete geçmesinin bu hayvandaki iç elektrik sonucunda ortaya çıktığı sonucuna varmasına yol açmıştır.

20. Yüzyılın ortalarında ise, Alan Lloyd ve Andrew Huxley uyarılabilir hücre zarlarının biyofiziksel özelliklerini açıklayan bir model olarak mürekkep balığı dev aksonunda yaptığı bir çalışma ortaya konulmuştur (90). Daha sonraları hücreye temas edebilen, hücrede meydana gelen akım değişimlerini ve voltaj deşarjlarını ölçebilecek pipetler geliştirmek ve üretmek mümkün hale gelmiştir. Hücre içindeki iyonların oluşturduğu potansiyel fark (voltaj) ve akım kuvvetleri geliştirilen ve içinde elektrot bulunan pipetler yardımıyla ölçülebilir hale gelmiştir.

Çapı yaklaşık olarak 1-5 μ m arasında olan bir mikropipet ucunun hücre zarı arasında "seal" olarak tabir edilen sıkı bir yapışma sağlanmasının ardından pipet ucu içerisinde kalan hücre zarı parçasında bulunması muhtemel olan iyon kanal

akımlarının ölçülmesine dayanmaktadır. Pipete uygulanan negatif basınç (emme) sayesinde bu direnç 1-10 G Ω 'a ulaşmaktadır. Oluşan bu sıkı yama 'gigaseal' olarak adlandırılmaktadır. Bu ise voltaj kenetleme olarak adlandırılır.

Voltaj kenetleme tekniğinde, zar boyunca oluşan elektrik akımı ölçülmesi için zar potansiyeli belirli bir değere kenetlenir. Patch-clamp (Patch-clamp) tekniği voltaj kenetleme tekniğinin geliştirilmiş halidir. Bu yöntem ilk defa Erwin Neher ve Berk Saakman tarafından asetil-kolin ile aktive edilebilen hücrelerden aldıkları tekli kanal kayıtları ile kullanıma sokulmuştur ve hücre zarı üzerinde bulunan belirli bir bölgeden veya tek bir iyon kanalından elektrik akım kaydı alabilmek mümkün hale gelmiştir.

2.5.1. Patch-Clamp Setini Oluşturan Temel Malzemeler

1. Titreşimi Önleyici Masa: Patch-clamp yöntemi, pipet ile hücrenin temasine dayanan, çalışma esnasında yüksek hassasiyet gerektiren bir yöntemdir. Çalışma esnasında hücre ve pipeti görmemizi sağlayan mikroskop ve pipetin hareketini sağlayan mikromanipülatör sistemi sarsıntı önleyici masa üzerine sabitlenmiş halde bulunmalıdır. Oluşabilecek en küçük sarsıntı bile hücre ile pipet arasında kurulan temasın kopmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle darbe emici özel sistemlerle donatılmış olmalıdır. (Resim 1).

2. Faraday Kafesi: İletken malzemeleri oluşturan atomların en dış yörüngelerindeki değerlik (valans) elektronları, atomlarından kolayca ayrılarak hareket etme yeteneğine sahiptirler. Dolayısıyla; kapalı bir yüzeye sahip olan iletken bir cisim, elektrik alanı içerisine yerleştirildiğinde bu elektronlar, iletkenin içerisindeki elektrik alanı sıfırlanıncaya kadar hareket eder ve bir 'yeniden dağılım'a uğramaktadırlar. Elektrik alanın sıfırlanmasıyla birlikte, hareket etmelerinin gerekçesi ortadan kalkmış olur. Faraday kafesi bu ilkeye göre çalışır ve içindeki nesnelere dış elektrik alanlara karşı korur. İletken teller ile ağ biçiminde kaplanmış ve topraklanmış her kafesle bu koruma gerçekleştirilebilir. Ağ gözü sıklığı ve topraklama kalitesi korumayı artırır. Faraday kafesi sayesinde dışarıdaki elektrik

alan kafesin içine etki edemez. Böylece patch-clamp deneyleri esnasında sağlıklı kayıtlar alınması sağlanır. Kafesin işlerliği için iletkenlerin iyi topraklanmış olması gerekmektedir. (Resim 1).

3. İverted Mikroskop: Bu tip mikroskoplarda objektifler mikroskop tablasının altına yerleştirilmiş durumdadır. Bu durum hem hücrelerin görüntülenmesi hem de pipetin hareket kabiliyeti ve alanının artırılması adına çok önemli avantajlar sağlamaktadır. (Resim 1).

Tek bir hücreden alınacak kayıtlarda inverted mikroskop kullanılırken doku kesit (slice) çalışmalarında üstten ışık veren mikroskoplar kullanılır.

4. Mikromanipülatör: Patch-clamp deneyleri esnasında inverted mikroskop ile hücreler tespit edildikten sonra mikro pipetin ucunu hücre zarına temas ettirebilmek için x-y-z ekseninde üç boyutlu hareket ettirilmesini sağlayan mikromanipülatörler kullanılmaktadır (Resim 1).

5. Perfüzyon sistemi: Patch-clamp deneyleri esnasında hücrelerin yerleştirildiği ve çember adı verilen, ortama sıvı alış-verişini sağlayan sistemdir. Deneyler esnasında kullanılacak çözeltilerin bulunduğu haznelere çember hizasından daha yüksek bir seviyeye konuşturulmuştur. Bu haznelere ince hortumlar vasıtasıyla çembere bağlanmış durumdadır. Sıvının akış hızı, haznelere hortumlara bağlandığı noktalara yerleştirilen musluklar sayesinde kolayca kontrol edilebilmektedir. Çembere gönderilen sıvı, yüksek basınç nedeniyle hücrelere ve taşma nedeniyle objektiflere zarar verebilir. Bu nedenle gönderilen sıvının diğer taraftan aynı hızla tahliye edilmesi gerekmektedir. Bu işlemi sıvının iki yönlü hareket etmesini sağlayan peristaltik pompa ile gerçekleştirmek mümkündür. Bazı sistemlerde; sıvının çembere gönderilmesinde ve tahliye edilmesinde sadece peristaltik pompalar kullanılabilir (Resim 1).

Patch-clamp tekniğinin; hücre üzerinde (on-cell, cell-attached), tüm hücre (whole-cell), içi-dışarda (inside-out) ve dışı-dışarda (outside-out) olmak üzere 4

farklı biçimde. Yapılacak çalışmanın niteliğine göre bunlardan biri ya da birkaçı seçilebilir.

2.5.2. Hücre Üzerinde (On-cell, Cell-attached)

Hücre üzerinde yöntemi tam bir patch-clamp tekniğidir ve en temel uygulamasıdır. Mikropipet yardımıyla hücre zarına temas edilir ve pipete emme uygulanarak bu konfigürasyon elde edilir. Mikropipet içerisine hücre dışı eşdeğeri tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Bu konfigürasyonda hücre dışı eşdeğeri olarak uygulanan hormon veya kimyasal maddelerin mikropipet ile yakalanan hücre zarı parçasında bulunan iyon kanal akımları üzerine etkisinin ölçülmesi mümkündür. Kayıt esnasında pipet halen hücre ile temas ettiğinden hücre içi organellerin kanal üzerine olan etkileri devam etmektedir.

2.5.3. Tüm Hücre (Whole-cell)

Mikropipet ile hücre üzerinde konfigürasyonu oluşturulduktan sonra pipete hafif bir emme uygulanır. Sonunda; mikropipetin, hücre zarını tuttuğu bölgeden plazma membranını yırtmasıyla oluşturulur. Mikropipet içerisine, intraselüler tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Bu konfigürasyon ile hücre dışı hormonların plazma zarı üzerinde bulunan tüm kanal akımları üzerine olan etkilerinin incelenmesi mümkündür. Yani alınan kayıt, bir hücrenin tüm kanallarıyla verdiği cevabın bir göstergesidir. Hücre üzerinde konfigürasyonunda olduğu gibi pipet hücreden tamamen ayrılmadığı için kayıt esnasında hücre içi organel ile kanal etkileşimi devam etmektedir. Özellikle, alyuvarlar gibi çapı 5-20 µm arasında olan küçük çaplı hücrelerden kayıt almak için kullanılan en uygun patch-clamp konfigürasyonudur.

2.5.4. İçi-Dışarıda (Inside-out)

Mikropipet ile hücre üzerinde (cell-attached) konfigürasyonu oluşturulduktan sonra pipete hafifçe geriye doğru çekilirse pipetin ucunda hücre zarına ait fakat zardan bağımsız bir yama kalır. Böylece hücre zarının hücreler arası boşluğa bakan yüzü, mikropipetin içerisinde bulunan sıvıya temas ederken intraselüler ortama bakan yüzü, banyo ortamına temas etmektedir. Bu nedenle, hücre üzerinde konfigürasyonunda olduğu gibi, mikropipet içerisine hücre dışı eşdeğeri tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Kalsiyum ve cAMP gibi intraselüler ikincil habercilerin, izole edilmiş zar parçasında bulunan kanallar üzerine etkilerinin araştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Hücre içi organeller olmaksızın iyon kanallarının çeşitli kimyasallara karşı verdiği cevapların anlaşılması için kullanılan önemli bir araştırma metodudur.

2.5.5. Dışı-Dışarıda (Outside-out)

Mikropipet ile tüm hücre (Whole-cell) konfigürasyonu oluşturulduktan sonra mikropipet hafifçe geriye doğru çekilirse pipetin ucunda, hücre zarına ait fakat zardan bağımsız bir yama kalır. İçi-dışarıda konfigürasyonunda olduğu gibi hücre içi organellerden bağımsız bir araştırma olanağı sağlamaktadır. Böylece hücre zarının hücreler arası boşluğa bakan yüzü, banyo ortamına temas ederken, intraselüler ortama bakan yüzü, mikropipetin içerisinde bulunan sıvıyla temas etmektedir. Bu nedenle tüm hücre konfigürasyonunda olduğu gibi mikropipet içerisine, intraselüler tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Hormonların ve bazı kimyasal maddelerin izole edilmiş zar parçası içerisinde bulunan iyon kanal akımları üzerine etkisinin araştırılması için kullanılan bir yöntemdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

Borosilikat tüpler: Sutter Instruments (ABD)

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

Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)

Faraday kafesi: SDÜ metal atölyesi (Türkiye)

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

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

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

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

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

Mikromanuplasyon: Luigs and Neumann (Almanya)

Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya),

Peristaltik pompa: Ismatec (İsviçre)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Pipet yapıcı (Puller): Sutter Instruments (ABD)

Şarjlı pipet: Hirschmann (Almanya)

Sarsıntı önleyici sehpa: SDÜ metal atölyesi (Türkiye)

Soğutmalı santrifüj: Kubota (Japonya)

Ultrasonik Homojenizatör: Sonopuls HD-2070 (Almanya)

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

Yükselteç: HEKA, EPC-10 (Almanya)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

Triklor asetik asit

2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB),

Kalsiyum klorür,

Cesium hidroksit monohidrat,

Cumene hydroperoxide (%80) (CHPO)

Dimethyl sulphoxide (DMSO) Hybri-Max,

5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoik acid (DTNB)

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM),

Dulbecco's phosphate buffer saline (10X), Biochrom

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)

Ethylene glikol tetraasetik (EGTA)

GSH

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

HEPES

H₂O₂

L-glutamic asit

N-asetil sistein

N-Hekzan

N-Metil D-Glucamine katyonu (NMDG⁺)

Potasyum klorür

Potasyum klorür

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

Tris-hidroksimetil-aminometan

Tripsin-EDTA solusyonu (% 0,25)

MDA

3.2. Yöntem

3.2.1 Deney Hayvanları

36 adet 180 - 200 gram ağırlıktaki wistar albino dişi sıçan Süleyman Demirel Üniversitesi (SD ) Deney Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Sıçanlara “*ad libitum*” olarak yem ve su verilmiş, hayvan refahı kuralları ve SD  Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Kılavuzu’na riayet edilmiştir. Çalışma SD  Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı (Protokol No: 2011-12-05) tarafından onaylanmıştır. Deneyler streptozotosin (STZ) enjeksiyonundan   gün sonra başlamak üzere 2 hafta süre boyunca gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Çalışma Grupları

Sıçanlar her grupta 9 tane (n=9) olacak şekilde 4 adet grupta toplanmıştır.

Kontrol grubu: Bu grup hayvanlarda herhangi bir STZ enjeksiyonu yapılmamıştır ve 14 gün boyunca oral yolla 1 ml plasebo (saf su) dışında tedavi uygulanmamıştır.

Diyabet Grubu: Sıçanlarda diyabet tek doz periton içi STZ (45 mg/kg) intraperitoneal ( P) enjeksiyonuyla oluşturulmuştur. (Sigma, St. Louis, MO, USA)

(91). STZ enjeksiyonundan 4-6 gün sonra kan glikoz değeri ölçüldü. Sıçan kan glikoz değeri enjeksiyon öncesi döneme göre en az 4 kat (≥ 320 mg/dl) olmalıdır. Bu grup 14 gün boyunca gavaj yoluyla (saf su) almıştır.

NAC Grubu: Sıçanlar 150 mg/kg/gün (12) hesabına göre günlük olarak NAC'dan saf suda çözülüp son konsantrasyonuna NAC (150 mg/kg) seyreltilmiştir ve 14 gün boyunca bu gruba gavaj yoluyla verilmiştir.

Diyabet (STZ)+NAC grubu: Sıçanlara STZ uygulanmasının 4-6 gün ardından NAC grubundaki gibi gavaj besleme yoluyla (150 mg/kg) uygulanmıştır.

Daha önceki çalışmalarda (44, 91) STZ uygulanmasını takip eden 4-6 gün içerisinde diyabet oluşumu gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bu nedenle, STZ uygulandıktan 4-6 günlerde glukometre ve test çubukları ve glukometre vasıtasıyla (eBsensor, Visgener Inc., Hsinchu City, Taiwan) kan glukoz değerleri ölçülmüş, diyabet gözlemlendikten sonra (STZ uygulandıktan 4-6 gün içerisinde) NAC ve STZ+NAC gruplarına NAC uygulanmıştır. Son NAC uygulanmasından 12 saat sonra bütün sıçanlar kurban edilmiş, AKG ve beyin örnekleri alınmıştır. Bu çalışma sırasında STZ ve STZ+NAC gruplarında 2'şer sıçan ölmüştür.

3.2.3. Sıçan Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücreleri İzolasyonu

AKG hücreleri 12–14 haftalık sıçanlarda, inhalasyon anestezisi işleminden sonra dekapitasyon işlemi takiben vakit kaybedilmeden sırt omurları bir bütün halinde çıkarıldı. Sırt omurları kas dokusundan olabildiğince ayrılarak silikonla kaplı özel yerine hareket etmeyecek şekilde yerleştirildi. Hücrelerin canlılığını kaybetmemesi için bir miktar DMEM medyumunu (% 89 Dulbecco's Modified Eagle Medium, % 10 FBS, % 1 Penisilin-Streptomisin antibiyotiği) konuldu. Bu işlemlerden sonra omurlar median hatlarının üzerinden olacak şekilde eşit iki parçaya ayrılmaya çalışıldı. Spinal kord ve üzerindeki zar stereo mikroskop altında yerleştirildiği alandan dış kısma alındı, bu sırada spinal kord ile sinir gruplarının bağlantısı koparılmamaya özen gösterildi. Her iki vertebra arasında bulunan hücre yumakları ince uçlu pensler vasıtasıyla yerlerinden alınarak içerisinde antibiyotikli

medyum bulunan petri kaplarına konuldu. Bütün hücre yumakları alındıktan sonra içerisinde antibiyotikli medyum bulunan petri kutusu stereo mikroskop altına alınarak hücre yumaklarının gangliyon uzantıları kesilerek ayrıldı. Ve bir saat süresince inkübatörde (37 °C ve %5 CO₂) kollejenazlı solüsyon (% 2,5) içerisinde bekletildi. Bir saat sonunda mekanik parçalama işlemine geçilerek; sırası ile 1 ml hacimli pipet uçları ile daha sonra 200 µL pipet uçları ile ve en sonunda da steril insülin iğnelerinden geçirilerek mekanik parçalama işlemi tamamlandı. Bu işlemlerin ardından hücreler elektrofizyolojik kayıtlar alınmak üzere patch çemberine konuldu.



Resim 1. AKG hücrelerinin stereo mikroskop altındaki görüntüsü

3.2.4. Patch - Clamp Analizleri

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

Kayıt alınan dört grup için pipet içerisine normal hücre içi eşdeğeri tampon ile dolduruldu (Tablo 2). Pipet içerisinde hava kalmaması için pipet ucu kırılmayacak şekilde pipet sarsıldı. Mikropipet kayıt elektrodu mikropipetin içerisine gelecek şekilde pipet tutucu takılıp sabitlendi. Kültür kabı içerisinde bulunan AKG hücreleri patch-clamp çemberi içerisinde bulunan hücre dışı eşdeğeri tampona eklendi (Tablo 1). Pipet tutucuda bulunan mikropipet çember içine daldırıldı. Bilgisayar yazılımı üzerinden pipetin direncinin 2-8 M Ω olup olmadığı bakıldı. Bu değerler dışında ise pipet değiştirildi. Pipet uygun değerlerde ise pipet invert mikroskop altında hücre ile temas ettirildi. Pipet mikromanipulator ile hücre üzerinde çember yönüne (z eksen) bastırılarak hücrenin çamberde tutunarak kayması engellendi. Hücre teması anlık direnç değişiklikleri gözlenerek teyit edildi. Pipete hafifi bir vakum uygulanarak pipetin ucundaki hücre zarı bölgesinin hücreden kopmadan pipet içine girmesi sağlandı ve “*gigaseal*” (1-10 G Ω) adı verilen pipetin hücreye mühürlenmesi olayı beklendi. Bu oluştuktan sonra hücre zar potansiyeli yazılım yardımıyla -60mV'a sabitlenip whole cell konfigürasyon ayarları seçildi. Daha sonra bir kez daha vakum yapılarak pipet içindeki mühürlü hücre zarı kısmının parçalanıp pipetle hücre için aynı ortamda olması sağlandı.

Perfüzyon sistemi ile çembere 10 mM H₂O₂ çamberde bulunan hücreler üzerine gönderilirken çamberde bulunan tampon peristaltik pompa yardımıyla uzaklaştırıldı. Çamberde bulunan 10 mM H₂O₂ ile TRPM2 katyon kanallarının aktive

edilmesi amaçlandı. TRPM2 kanallarının aktivasyonundan sonra kanal aktivitesi ve akım değışkenliği belirli bir platoya ulaşıncaya kadar beklenildi. Plato oluştuğundaise TRPM2 blokörü olarak bildirilen 0,1mM konsantrasyonundaki 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB), H₂O₂'nin gönderilmesine benzer şekilde çembere gönderildi (Nazıroğlu et al., 2011a). Daha sonra ise 2-APB gönderilmesine benzer şekilde 0,025 mM ACA ortama gönderildi. Son olarak hücrelerimizin canlılığından emin olmak üzere NMDG⁺li hücre diği eşdeğer tampon çözelti çembere gönderilerek kayda devam edildi. Canlılığı devam eden hücelere tekrar sırasıyla H₂O₂, 2-APB ve NMDG⁺ (Tablo 3) uygulamaları yapılarak kayıt sonlandırıldı.

Kimyasal	Konsantrasyon (mM)	Ağırlık / Hacim (1 L saf suda)
NaCl	140	8,474 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2	1 ml (1 M stoktan)
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,2	1 ml (1 M stoktan)
KCl	5	0,373 mg
HEPES	10	2,383 g
D-Glucose.H ₂ O	10	1,986 g

pH KOH ile 7,4'e ayarlanır

Tablo 1.Hücre dışı eşdeğer tampon solüsyon kimyasalları

Kimyasal	Konsantrasyon (mM)	Ağırlık / Hacim (1 L saf suda)
L-Glutamic Acid	145	2,13 g
NaCl	8	46,8 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	2	40,7 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	10 ⁻³	86,6 µl (1M stoktan)
HEPES	10	238 mg
EDTA	8	292 mg

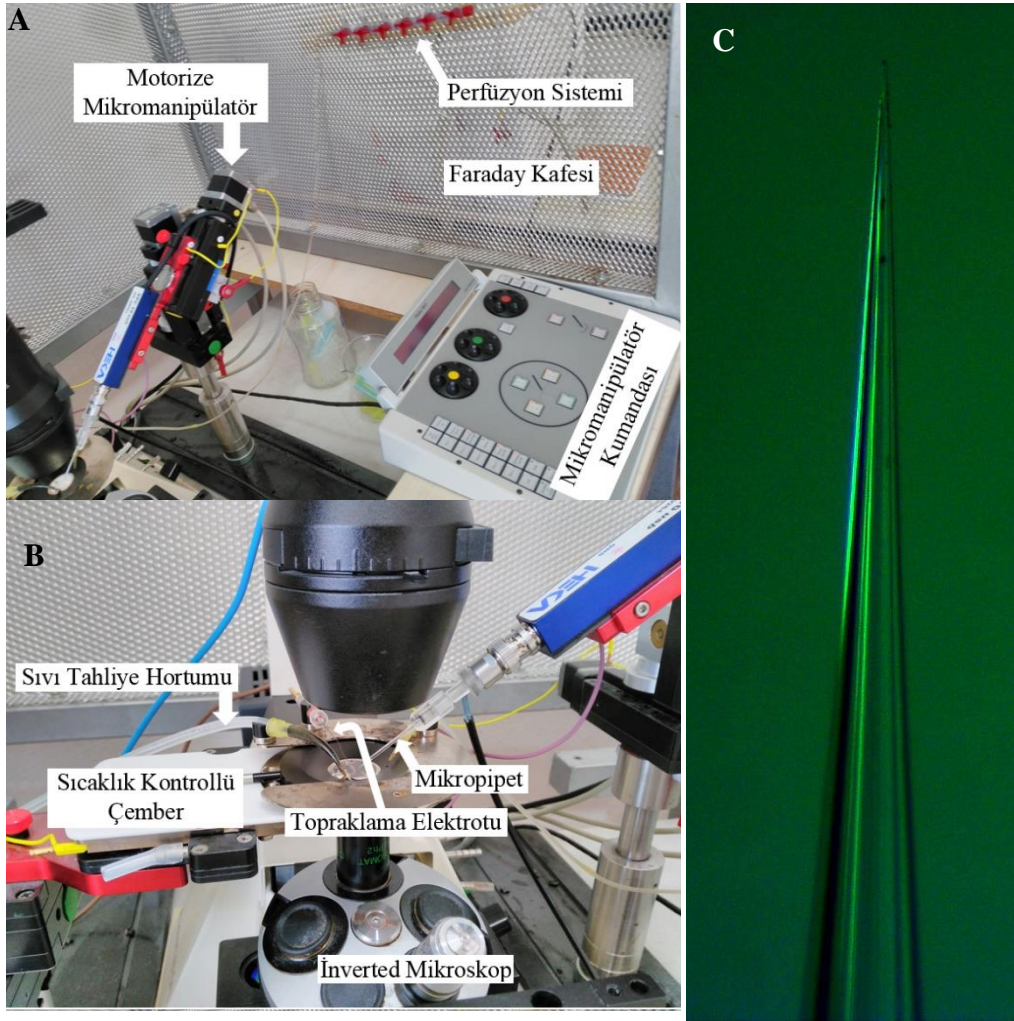
pH CsOH ile 7,2'ye ayarlanır.

Tablo 2. Hücre içi eşdeğer tampon solüsyon kimyasalları

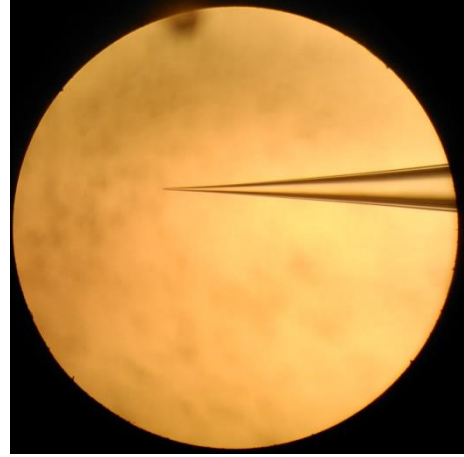
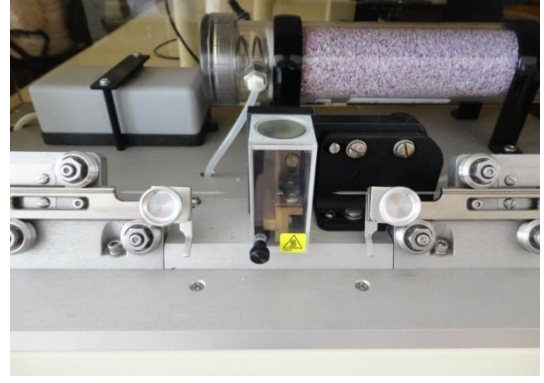
Kimyasal	Konsantrasyon (mM)	Ağırlık / Hacim (1 L saf suda)
NMDG ⁺	150	29,28 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1	1 ml (1M stoktan)
CaCl ₂ .2H ₂ O	1	1 ml (1M stoktan)
HEPES	10	2,383 g
D-Glucose.H ₂ O	10	1,986 g

pH HCl ile 7,35'e ayarlanır

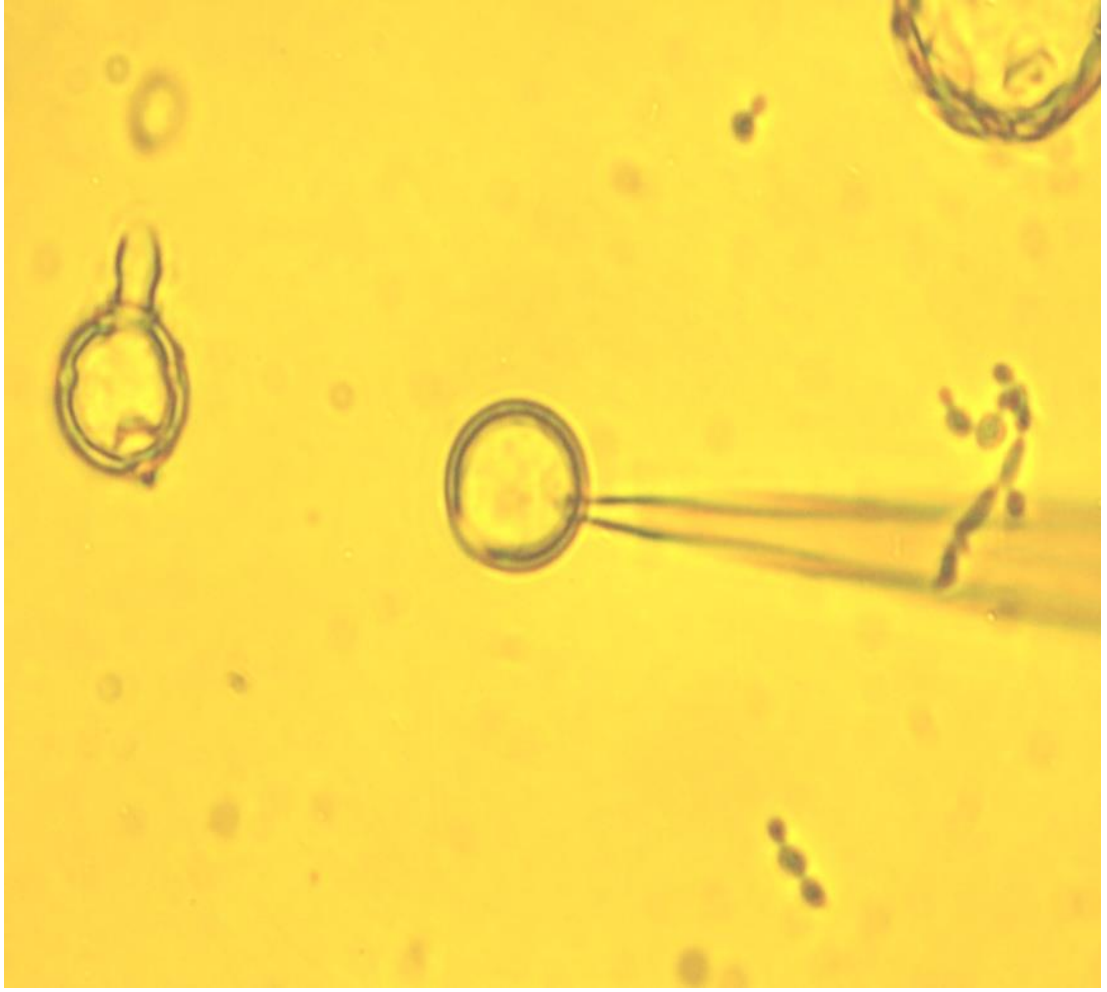
Tablo 3. N-methyl D-Glucamine'in (NMDG⁺) hücre dışı eşdeğer solüsyon içerisinde hazırlanmasında kullanılan kimyasallar



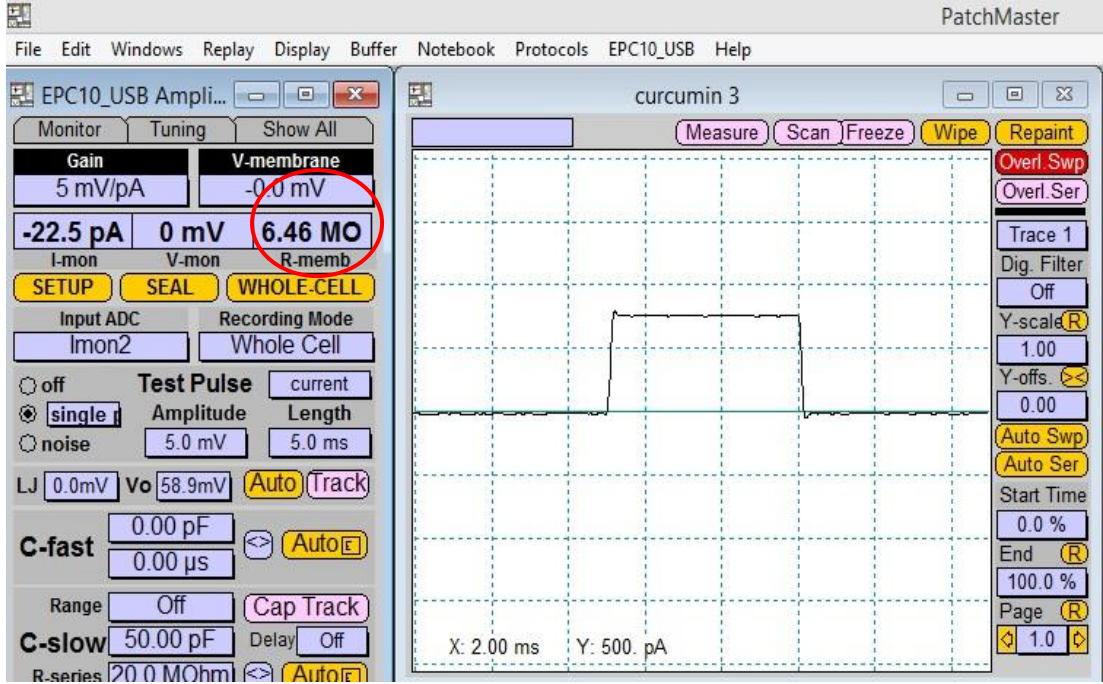
Resim 2. A,B: Patch-clamp (Yama-menteşe) seti genel ve yakından görünümü (İverted mikroskop, Motorize manipülatör ve kumandası, Isı kontrollü çember, Titreşimi önleyici masa, Faraday kafesi ve perfüzyon sistemi) C: Mikropipetin Mikroskop altında görünümü



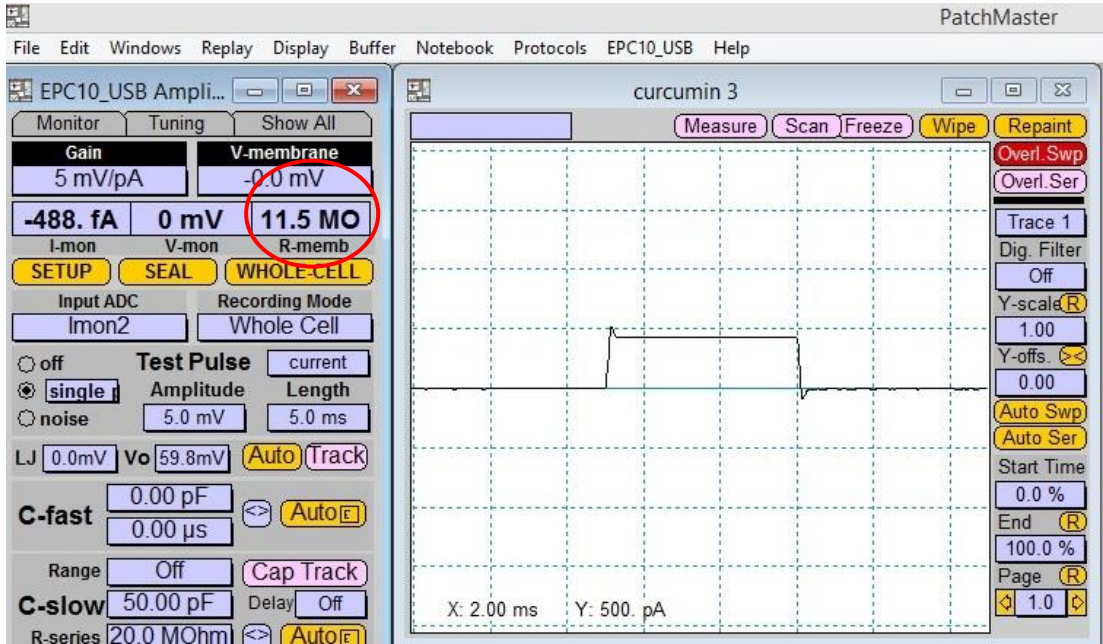
Resim 3. Patch – Clamp pipetinin hazırlanışı ve mikroskop altındaki görünüşü



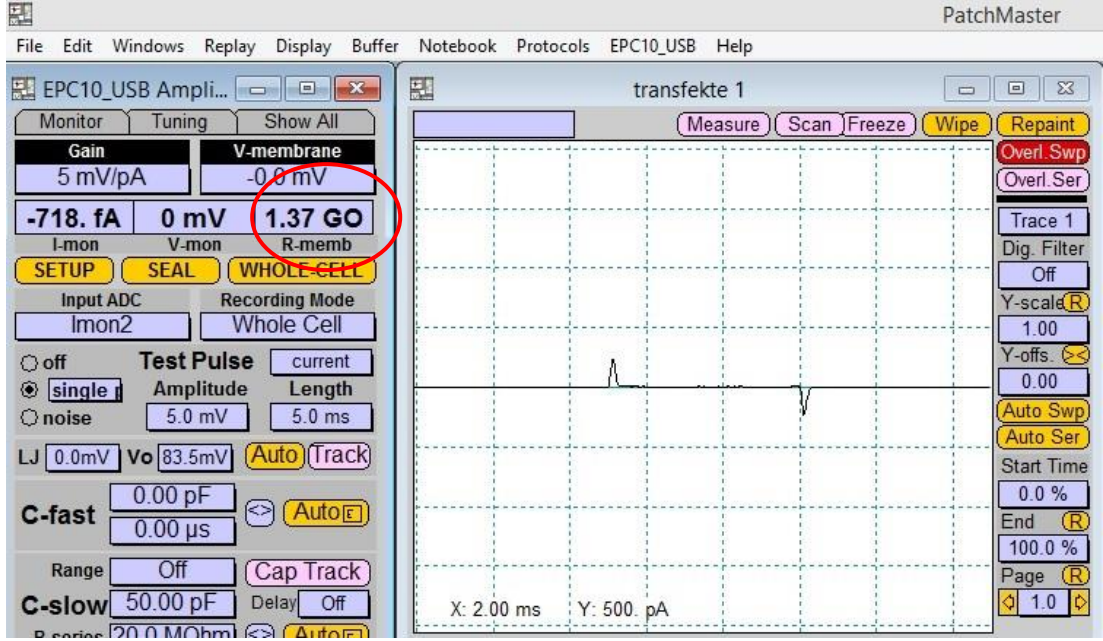
Resim 4. Patch-clamp pipetinin AKG hücresi ile teması



Resim 5. Patch- Clamp Pipetinin çembere girdiğini gösteren yazılımdaki osiloskop görüntüsü.



Resim 6. Patch- Clamp Pipetinin çembere girip hücreye temas ettiğine dair yazılımdaki osiloskop görüntüsü.



Resim 7. Gigaseal oluşumunun patch-clamp yazılımındaki osiloskop görüntüsü.

3.2.5. Beyin Elde Edilmesi ve Homejanat Hazırlanması

Beyin orta sagittal düzlükten bölündükten sonra korteks dışarıya çıkarıldı. Beynin çıkarılmasına müteakiben beyin korteksi diseke edildi. (91). Beyin korteksi soğuk Serum fizyolojik ile iki kez yıkandıktan sonra cam şişelere alındı ve etiketlenerek derin dondurucuda (-33°C) en fazla 10 saat olacak şekilde saklandı. Tartımdan sonra beynin yarısı buzun üzerine konarak makas yardımıyla küçük parçalara ayrılarak 1/5 oranında donma sıcaklığına yakın Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) ile seyreltilip ultrasonik homojenizatör kullanılarak homojenize edildi (2 dakika 5000 d/d). Bütün işlemler buz altında yapıp antioksidan analizlerinde kullanıldı.

3.2.6. Antioksidan Analizleri

3.2.6.1. GSH ve GSH-Px Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in bildirdikleri yönteme göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi (92). GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

%10 triklorikasetik asit (TCA) solüsyonu

Tris tamponu (0,4 M pH:8,9): 48.46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH 8.9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlandı.

Deneyin yapılışı: 0,1 ml kan homejenatı 0,4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi, 0.1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu ve 0,1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (93) tarafından bildirilen yönteme göre spektrofotometrede belirlendi. Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Doku homejanatı	0,5 ml	0,5 ml
Tris HCl tamponu eklendi	0,3 ml	0,3 ml
CHPO ilave edildi	-	0,1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu)	0,1 ml	0,1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1,0 ml	1,0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı		
Üzerine Tris Tampon eklendi	2,0 ml	2,0 ml
DTNB eklendi	0,1 ml	0,1 ml

Tablo 4. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar

3.2.6.2. Lipit Peroksidasyon (MDA) Analizi

AKG ve beyin lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve ark. (94) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: AKG ve beyin homejanatı 1/9 (2,25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0,25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C' lik su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1 cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda

hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi.

3.2.6.2. Beyin B-Karoten A Vitamini, C Vitamini ve E Vitamini Analizleri

A vitamini (retinol) analizleri Suzuki and Katoh (95) tarafından tarif edilen metodun modifikasyonu ile yapılırken ve E vitamini (α -tokoferol) analizleri Desai (96) tarafından belirtilen metodun modifikasyonu ile yapılmıştır. Bu amaçla, 250 μ l civarında beyin homojenatı alınarak su banyosunda 2-3 dakika ısıtılmıştır. Daha sonra üzerlerine 0,3 ml doymuş (% 60) KOH ilavesi ile kırmızı renk oluşmuştur. Daha sonra üzerine oksidasyon önlemek amacıyla etanolda hazırlanmış 2 ml askorbik asit eklenip, 70°C'de 30 dakika ısıtılarak sabunlaştırıldı. Örnekler buz üzerinde soğutulduktan sonra üzerlerine 2 ml su ve 1 ml n-hekzan eklenip fazların ayrılması için 10 dakika beklendi. A vitamini için, üstte oluşan n-hekzan ekstratından 0,5 ml'lik bir kısmı alınarak spektrofotometrede 325 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Daha sonra reaktantlar eklenip 535 nm dalga boyuyla spektrofotometrede E vitamini değerleri saf hekzana karşı okunmuştur. Standart olarak hekzanda çözülmüş retinol ve α -tokoferol çözeltileri kullanılmıştır.

Beyin homojenatındaki β -karoten düzeyleri daha önce açıklandığı yöntemdeki gibi yapıldı (95). Beyin örnekleri dondurucudan çıkartılarak erimesi sağlandı. 2 ml n-hekzan ve 0,25 gr beyin örneği karıştırıldı. Üstteki hekzan fazı temiz bir tüpe alınarak köre (saf hekzana) karşı spektrofotometrede 453 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü.

Beyin örneklerinde C vitamini (askorbik asit) analizi Jagota ve Dani (97) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Numunelerin absorbansı 760 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.3. İstatistiksel Analizler

Tüm sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir. Üç grubun önemi öncelikle ANOVA- Kruskal Wallis testi ile kontrol edilmiştir. Ardından, üç grupta önemli değerler çiftleşmemiş Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Veriler SPSS istatistik programı kullanılarak analiz edildi. 0,05'den küçük P-değerleri anlamlı olarak kabul edildi (98).

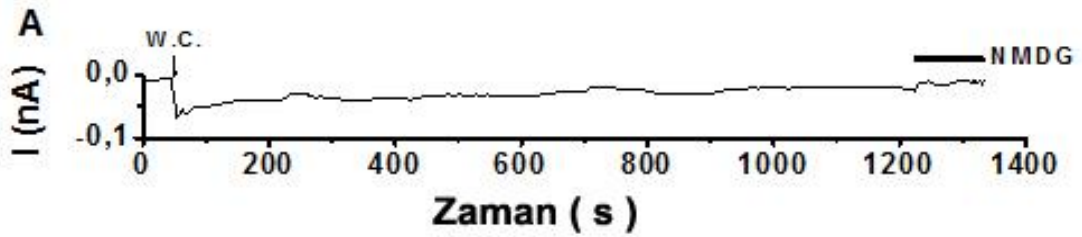
4. BULGULAR

4.1. Patch-Clamp Analiz Sonuçları

4.1.1. Kontrol Kaydı Sonucu

İlk kayıta, kontrol grubundan alınan hücrelere uyarım yapmaksızın alınan patch-clamp kaydıdır ki, çalışmanın kontrol kaydını oluşturmaktadır.

Şekil 4A da da görüldüğü gibi hiçbir uyarı yapılmaksızın AKG hücresinden alınan kayıtlarda, akım oluşmayıp, düz bir kayıt alınmıştır. Kontrol kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 4,64 pA/pF (n=18) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4A).



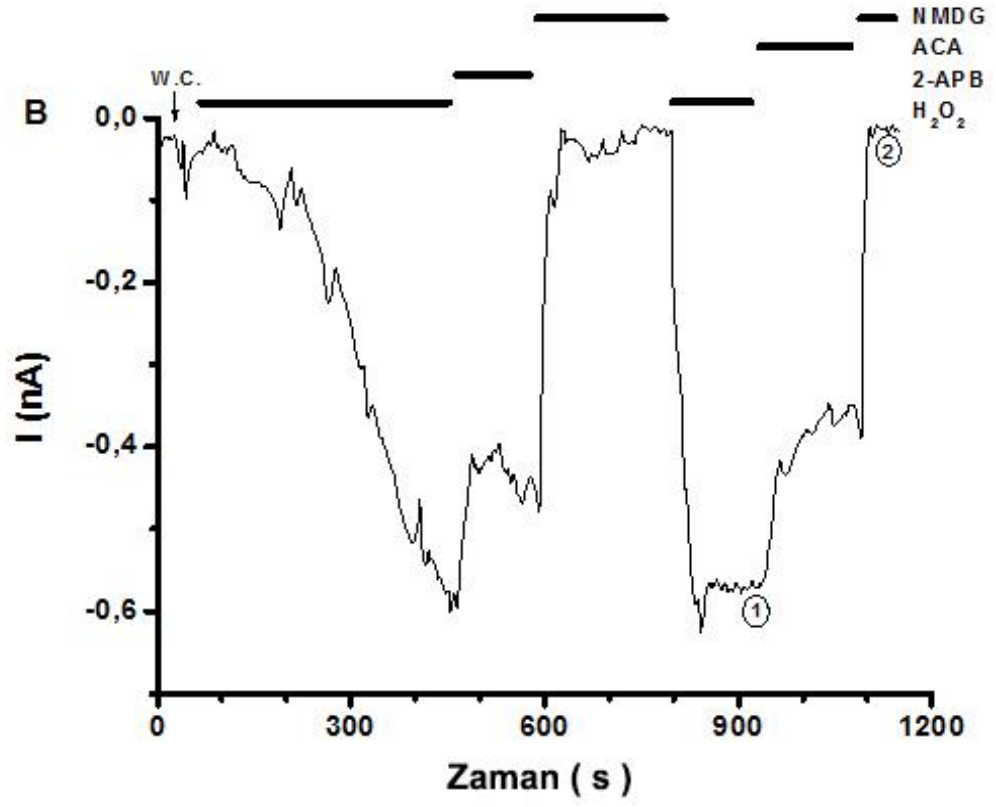
Şekil 4A. H₂O₂ ile uyarım yapılmamış sıçan AKG hücrelerinden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (W.C. tüm hücre).

4.1.2 Kontrol Grubu Kaydı Sonucu

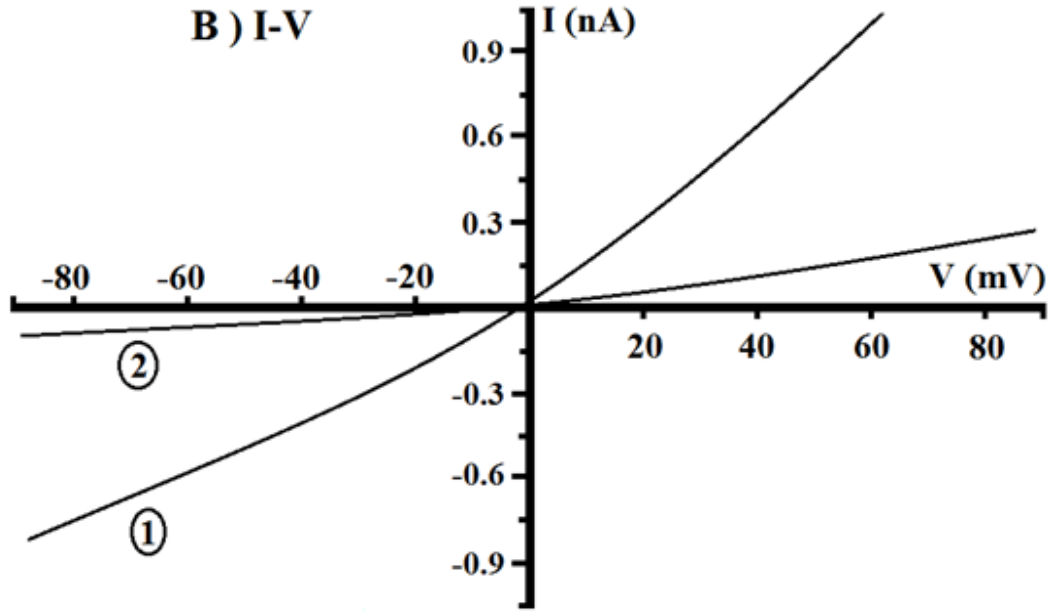
Şekil 4B de gösterilen kontrol grubu kaydında sadece H₂O₂ ile uyarım sonucunda yaklaşık 100-150. Saniyeler arasında negatif yönde akımın arttığı gözlemlenerek TRPM2 katyon kanallarının 0,63 nA seviyelerinde açıldığı gözlemlenmiştir. Kanallar açıldıktan sonra biraz daha kanal açılmak suretiyle iyon geçişi olup olmayacağı 30 saniye kadar beklenilip, grafiğin düzleşmesi (plato oluşumu) gözlemlendikten sonra (300-400 saniyeler arası), kanalları inhibe etmek

için antranilik asit (ACA) verilmiştir. Daha patch çemberindeki ACA (0,025 mM) peristaltik pompa yardımı ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan, tekrar H₂O₂ verilerek kanal tekrar açılmıştır. Bu ikinci açılışı inhibe etmek için diğer bir TRPM2 kanal blokeri olan sonra 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) (0,04 mM) kimyasalı verildiğinde kanal akımlarının azalttığı gözlemlenmiştir. ACA, 2-APB ve H₂O₂ uygulamaları tekrar edilerek ilave bir kayıt daha alınmıştır. ACA ve 2-APB kanaları %100 oranında kapatmadığı için, bu uygulamaların en sonunda kanalların tamamen kapatılması için hücre çembere Na⁺ yerine kullanılan ve kanalı fiziksel kapatıcı olarak bilinen n-metil d-glucamine katyonu (NMDG⁺)içeren hücre dışı çözelti verilmiştir.

Akım önceki seviyelere yakın geldiğinde kapandığı varsayılmış, sonrasında yukarıda anlatılan basamaklar tekrar uygulanıp birbirine paralel grafik elde edildiği gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak sabit voltaja göre akımın değişimi grafiği Şekil 4B'de I-V grafiği olarak da gösterilmiştir. Yani Şekil 4B ile I-V grafiği aynı kaydın farklı iki gösterimidir. H₂O₂ grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 80,58 pA/pF (n=8) olarak hesaplanmıştır (Şekil 5).



Şekil 4B. H₂O₂ ile uyarım yapılmış diyabetik olmayan AKG nöronlarından patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. (W.C. tüm hücre).



Şekil 4B (I-V). Yukarıdaki (4B) aynı kaydın akım voltaj (I-V) değişikliğini gösteren grafik. Her iki grafik için, (1) H_2O_2 ile TRPM2 kanallarının açılışını, (2) $NMDG^+$ ile kanalların kapanışının gösterimi.

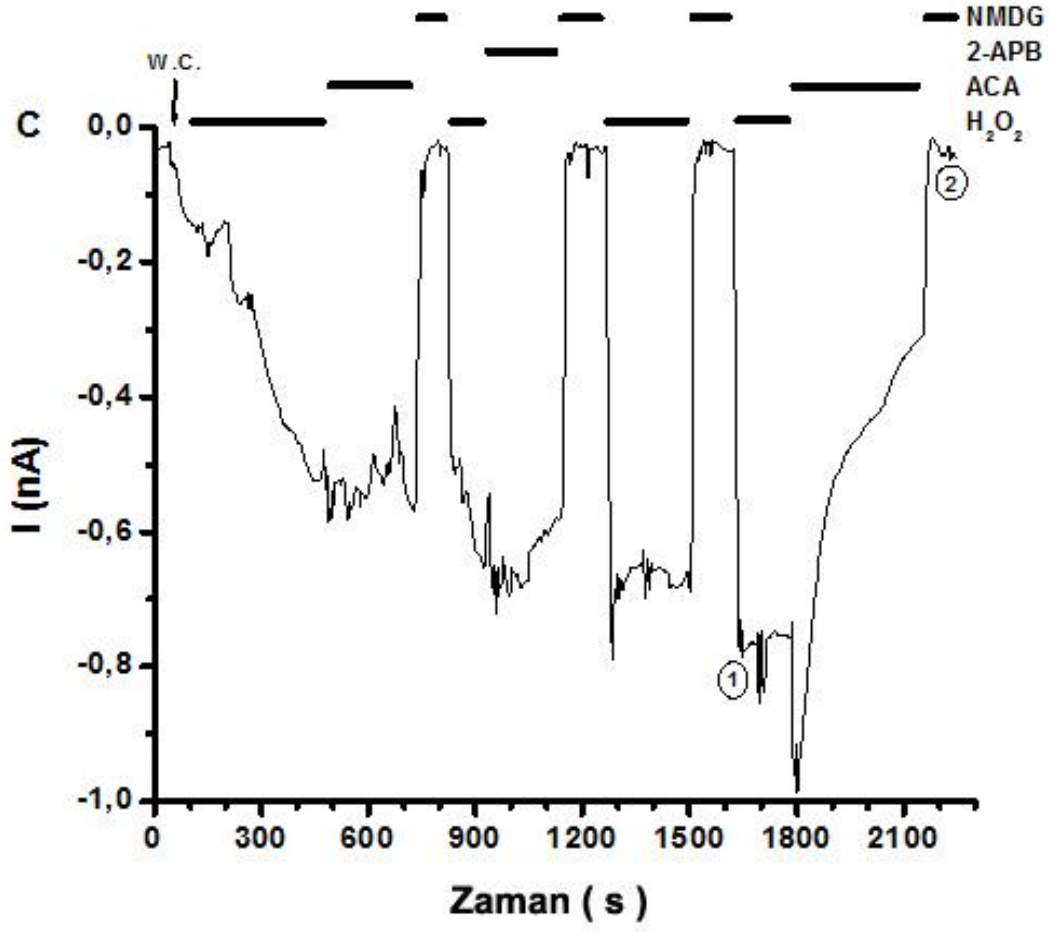
4.1.3. STZ Grubu Kaydı Sonucu

STZ ile diyabet oluşturulmuş grubun AKG hücreleri yine patch-clamp deneyleri sırasında H_2O_2 ile uyarımı neticesinde, TRPM2 katyon kanallarının, kontrol kayıtlarına (Şekil 4B) kıyasla çok daha fazla aktive olduğu gözlemlenmiş ve akım zaman grafiğinde de görüldüğü üzere biyopotansiyel akım değişiminin 1 nA seviyelerinde seyrettiği gözlenmiştir (Şekil 4C). STZ+ H_2O_2 grubundaki bu açılmanın kapasitans değerlerinin 146,4 pA/pF olduğu gözlemlenmiştir ve bu değer kontrol grubuna (80,58 pA/pF) kıyasla istatistiksel olarak önemli ($p < 0,001$) düzeyde yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebi olarak ise diyabetin neden olduğu oksidatif stresin hücre içi serbest radikallerin çoğalmasına bağlı olarak, TRPM2 kanalının çok daha fazla açılmasına sebep olduğu görülmektedir. Kayıt alma esnasında akımın artık değişmediği yani bir platoya ulaştığı dakikada kapatıcılar olarak ACA (0,025) ve 2-APB (0,04 mM) verilmiş ve katyon kanallarını kısmen kapattığı gözlemlenmiştir. Tam kapatma ise $NMDG^+$ li tampon ile sağlanmıştır. Yine

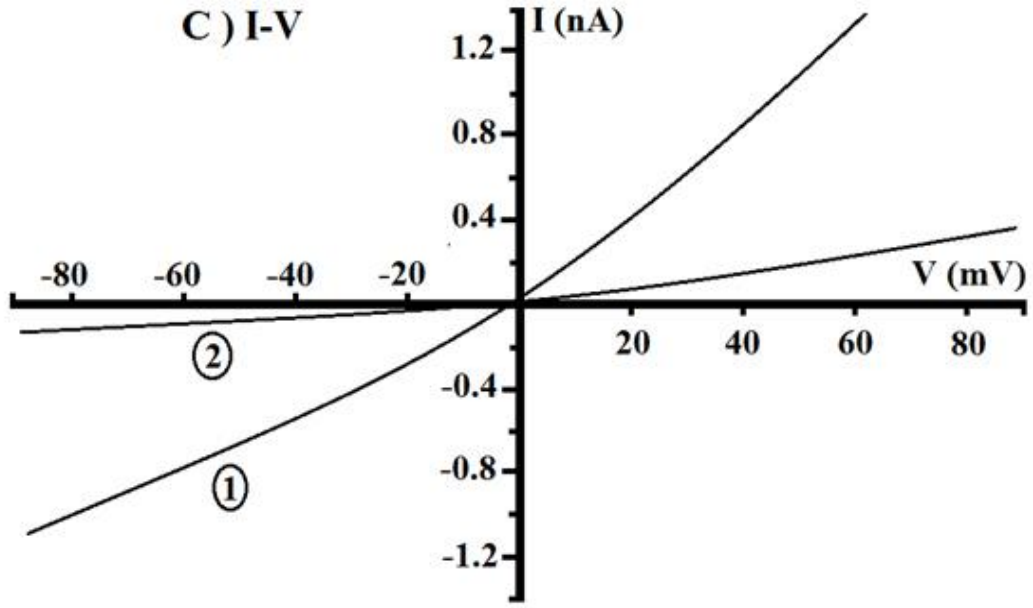
akım zaman grafiği ile birlikte aynı ölçümün akım voltaj grafiğide verilmiştir (şekil 4C I-V). Bu I-V grafiğinde verilen 1 ve 2 numaralı hiperbol eğrileri ise sırasıyla H₂O₂ nun açtığı ve NMDG⁺ nın kapattığı seviyeleri göstermektedir ve akımın voltaja göre değişimini göstermektedir. STZ grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 80,58 pA/pF (n=8) olarak hesaplanmıştır (şekil 5).

STZ grubu kapasitans ortalama değerine (146,4 pA/pF) kıyasla, STZ+ACA+H₂O₂ (62,56 pA/pF) ve STZ+2-APB+H₂O₂ (103,92 pA/pF) gruplarının kapasitans değerlerinin önemli düzeyde (p<0,001) azaldığı gözlemlendi. Fakat bu STZ+ACA+H₂O₂ ve STZ+2-APB+H₂O₂ değerlerinin kontrol düzeylerine kadar azalmadığı gözlemlenmiştir.

STZ+ACA+H₂O₂ ile STZ+2-APB+ H₂O₂ grupları aralarında kıyaslandığında, kapasitans değerlerinin STZ+ACA+H₂O₂ grubunda, STZ+2-APB+H₂O₂ grubuna kıyasla daha az (p<0,001) olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlara göre ACA kimyasalı 2-APB ye göre TRPM2 kanal inhibisyonunda daha etki gözükmemektedir.



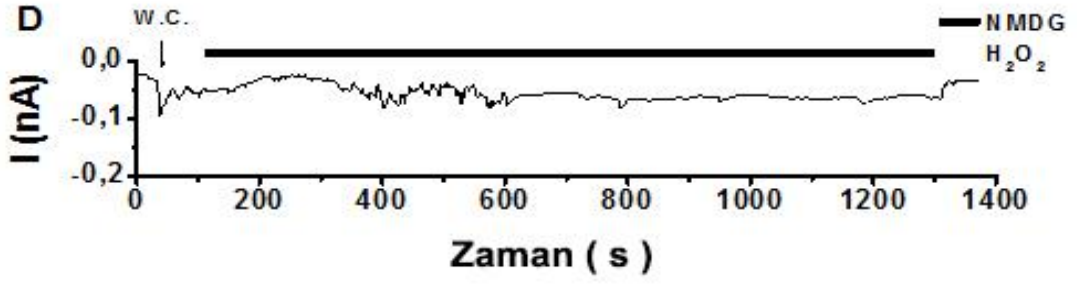
Şekil 4C. STZ grubunun sonra H_2O_2 ile uyarım yapılarak AKG sinir hücrelerinde patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. (W.C. tüm hücre).



Şekil 4C (I-V). Yukarıdaki (4C) patch-clamp kaydının akım-voltaj I-V değişikliğini gösteren grafik. Her iki grafikte için, (1) H_2O_2 ile TRPM2 kanallarının açılışını, (2) $NMDG^+$ ile kanalların kapanışının gösterimi (W.C. tüm hücre).

4.1.4. NAC Grubu Kaydı Sonucu

NAC grubundan (Şekil 4D) alınan kayıtlarda, AKG nöronları patch-clamp tekniği yardımıyla yine H_2O_2 ile uyarım yapılmış, uzun süre bekletilmesine rağmen, kontrol kaydına benzer şekilde akımda herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu durum NAC ın antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülebilir. NAC grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması $14,64 \text{ pA/pF}$ ($n=11$) olarak hesaplanmıştır (Şekil 5).

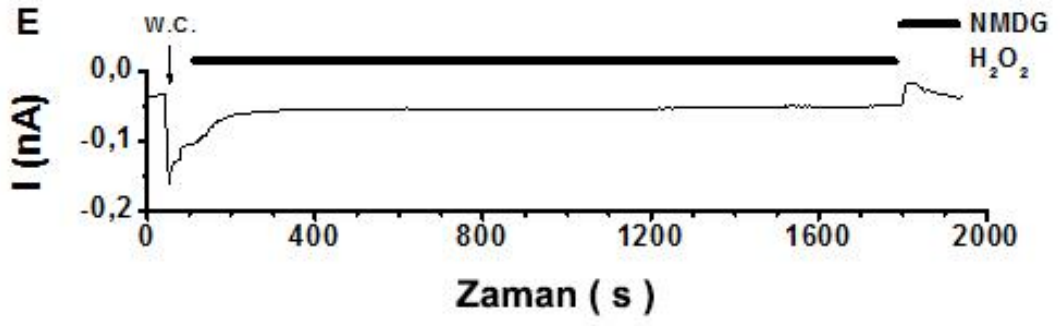


Şekil 4D. NAC grubunun H_2O_2 ile uyarım yapılarak AKG hücrelerinden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (W.C. tüm hücre).

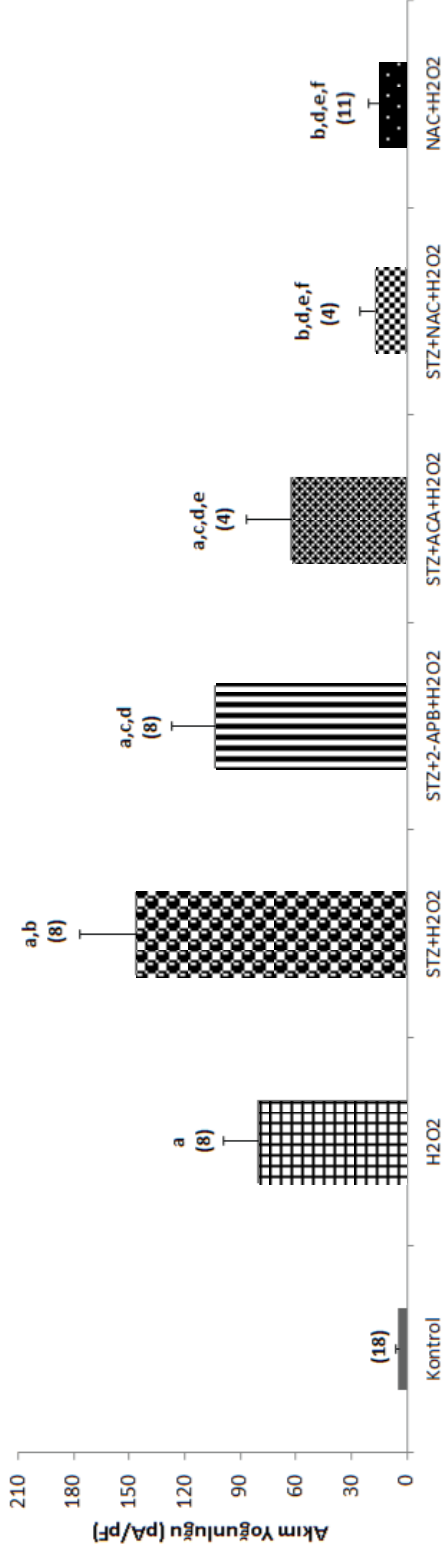
4.1.5. STZ+NAC Grubu Sonucu

STZ+NAC grubunda AKG hücrelerinden alınan kayıtlarda patch-clamp tekniği yardımıyla 10 mM H_2O_2 ile uyarım yapılmış ve katyon kanallarının açılmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4E). Buradan STZ ile diyabet yapılmış sıçanlarda NAC'ın serbest radikalleri azaltması yoluyla TRPM2 katyon kanalları açmayacak ölçüde koruyucu etkisi olduğu gözlemlenmektedir. STZ+NAC grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 17,35 pA/pF (n=4) olarak hesaplanmıştır (Şekil 5).

STZ+NAC+ H_2O_2 grubunun kapasitans ortalama değerinin (17,35 pA/pF) hem STZ+ H_2O_2 (p<0,001) hem de STZ+ACA+ H_2O_2 (p<0,001) ile STZ+2-APB+ H_2O_2 (p<0,001) gruplarına kıyasla önemli düzeyde düşük olduğu gözlemlendi. Bu sonuçların NAC'ın diyabetin neden olduğu aşırı ROT ürünlerini temizleyici özelliği ile kanal inhibisyonuna neden olduğunu gösterdi.



Şekil 4E. STZ+NAC grubunda AKG hücreleri H₂O₂ ile uyarım yapılarak hücrelerden patch-clamp yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (W.C. tüm hücre).

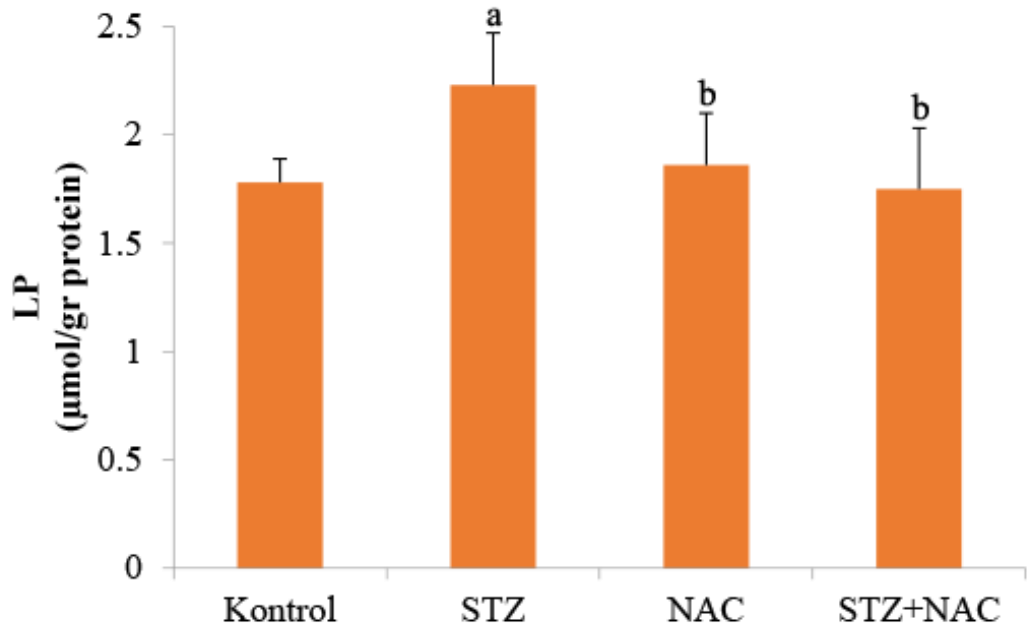


Şekil 5. AKG hücrelerinde TRPM2 kanal akımları üzerinde NAC, 2-APB, ACA ve H₂O₂ in etkisi. AKG hücreleri için, her dört grupta incelenen akım yoğunluğu; H₂O₂ ile açılmış TRPM2 katyon kanallarının maksimum akım değerlerinin, mikropipetin hücreye temas etmeden hemen önceki direncine bölümüyle hesaplanmıştır. Parantez içindeki sayılar her bir gruptan alınan kayıt sayısını belirtmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı (^ap<0,001 kontrol ve NAC+ H₂O₂ gruplarına göre. ^bp<0,001, H₂O₂ ve STZ+ H₂O₂ gruplarına göre. ^cp<0,001, STZ+NAC+ H₂O₂ ve NAC+H₂O₂ gruplarına göre, ^dp<0,001, STZ+2-APB+H₂O₂ grubuna göre ve ^ep<0,001, H₂O₂ ve STZ+H₂O₂ gruplarına göre, ^fp<0,001 versus STZ+ACA+ H₂O₂ groupakımların uyarım ve inhibisyonları, parantezlerin üstlerinde yer alan harflendirmelerle gösterilmiştir (Ortalama ± SD).

4.2. Lipit Peroksidasyon ve Antioksidan Vitamin Sonuçları

Malondialdehyde (MDA) lipit peroksidasyon seviyesi oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılmaktadır (94). Bu çalışmada da lipit peroxidation göstergesi olarak MDA analizleri yapıldı.

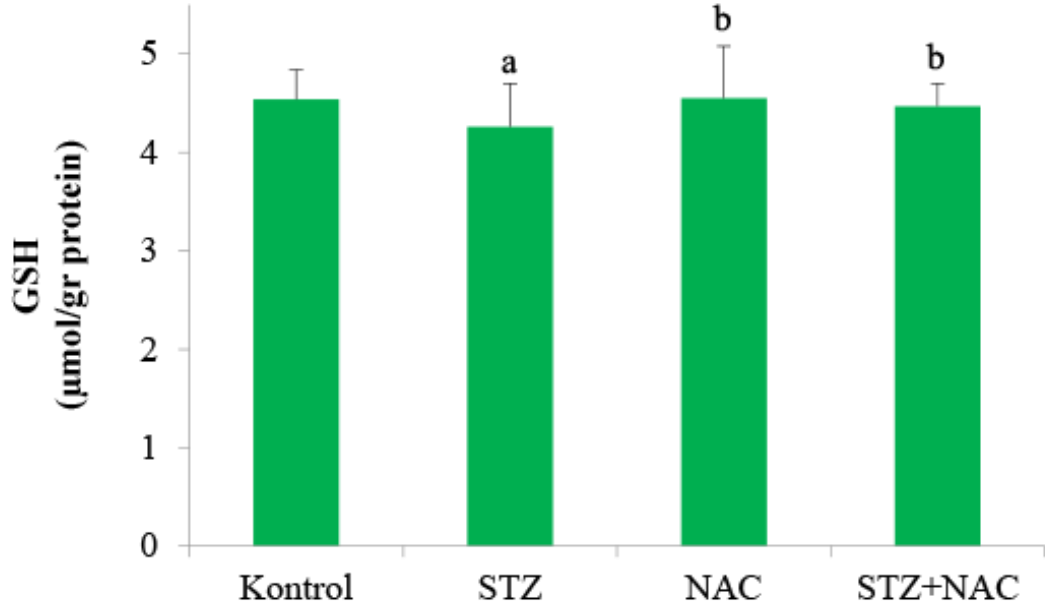
AKG ve beyin lipit peroksidasyon sonuçları sırası ile Şekil 6 ve Tablo 5 de gösterilmiştir. AKG sinir hücrelerinde Kontrol, STZ, NAC, STZ+NAC grubu lipit peroksidasyon ortalama değerleri $\mu\text{mol/gr}$ protein olarak sırası ile 1,78, 2,23, 1,86 ve 1,75 olarak bulunmuştur. Sonuçlar AKG ($p < 0,001$) ve beyin ($p < 0,05$) lipit peroksidasyon seviyelerinin kontrole göre STZ grubunda önemli oranda yüksek olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla AKG ve beyin oksidatif stres seviyeleri diyabet indüklemesine bağlı olarak yükselmiştir. Bununla beraber, NAC uygulanması sıçan AKG ve Beyin lipit peroksidasyon seviyelerinin azalmasına neden olmuştur. NAC ($p < 0,001$) ve STZ+NAC ($p < 0,05$ ve $p < 0,001$) grubunda AKG ve beyin lipit peroksidasyon düzeyleri STZ grubuna göre önemli olarak düşük bulunmuştur.



Şekil 6. STZ ile oluşturulan diyabet modelinde sıçan AKG nöronlarında lipit peroksidasyon (LP) seviyeleri üzerine NAC'ın etkileri ^ap<0.001 Kontrol ve NAC grubuna, ^bp<0.001 STZ grubuna karşı. (n=9 ve Ort. ± SD).

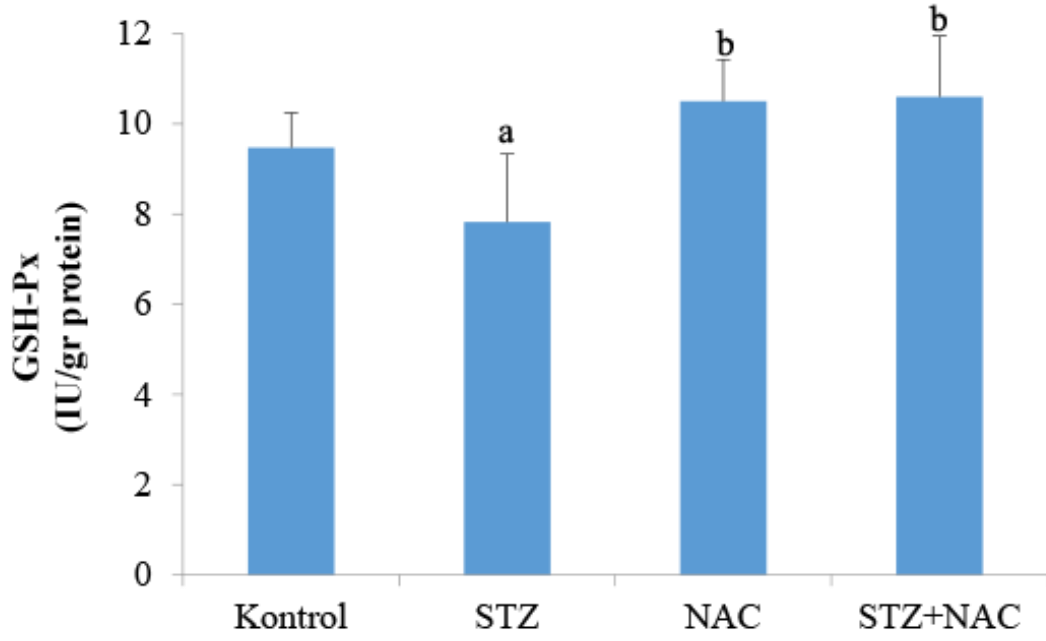
4.3. AKG ve Beyin GSH-Px ve GSH Sonuçları

NAC'ın AKG ve beyindeki GSH-Px ve GSH seviyeleri Şekil 7, Şekil 8 ve Tablo 5'de gösterilmiştir. GSH gibi tiyoller hücreleri ROT zararlarına karşı korumada önemli rol oynamaktadırlar. GSH ve GSH-Px azalması da diyabette oluşan oksidatif stres hakkında önemli ipuçları vermektedir. STZ grubunda AKG (p<0,001) ve beyindeki (p<0,05 and p<0.01) GSH-Px aktivitesi ve GSH düzeyi kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşük gözlemlenmiştir.



Şekil 7. STZ ile oluşturulan diyabet modelinde sıçan AKG nöronlarında indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyeleri üzerine NAC'ın etkileri ^ap<0.001 Kontrol ve NAC grubuna karşı, ^bp<0.001 STZ grubuna karşı (n=9 and Ort. ± SD).

Tiyol içeren bir antioksidan olan NAC diyabet gibi değişik hastalıklarda GSH ve GSH-Px değerleri üzerine iyileştirici etkisi bulunmaktadır. (15, 99). NAC uygulaması sonucundaki verilerimiz ise bu bilgiyle tutarlılık göstermektedir. AKG (p<0,001) ve beyin (p<0,05 ve p<0,001) dokularındaki GSH-Px aktivitesi ve GSH seviyesi NAC ve STZ+NAC gruplarında STZ grubuna göre önemli düzeyde yükseklik göstermektedir. Bu veriler ışığında NAC'ın AKG ve beyinde oksidatif stresi azalttığını söyleyebiliriz. Yakın zamanda yapılan birçok çalışma sonucu göstermiştir ki, NAC AKG ve beyinde oluşan STZ kaynaklı oksidatif toksitenin azaltılmasında teröpatik etkili olabilmektedir (11, 100). İlk olarak, NAC STZ kaynaklı GSH-Px aktivitesinin azalmasını azaltmaktadır. Sinirsel oksidatif hasardan NAC kaynaklı AKG ve beyin sinirsel korumaya ek olarak, bu çalışma sadece STZ kaynaklı GSH-Px aktivitesi ve GSH seviyesinin azalmasının NAC tarafından düşürülmesinin yanı sıra STZ kaynaklı lipid peroksidasyon seviyesi düşüklüğünün zayıflatılmasını ortaya koymuştur. (Şekil 6; Şekil 7; Şekil 8; Tablo 5)



Şekil 8. STZ ile oluşturulan diyabet modelinde sıçan AKG nöronlarında GSH-Px enzim aktiviteleri üzerine NAC'ın etkileri ^ap<0.001 Kontrol ve NAC gruplarına, ^bp<0.001 STZ grubuna karşı. (n=9 ve Ort. ± SD).

4.4. Antioksidan Vitamin Sonuçları

Başta beyin olmak üzere tüm sinir hücrelerinde yağ fazında en önemli antioksidan E vitamindir. Yine lipit fazda antioksidan özellik göstererek başta tekli oksijen olmak üzere radikallerin inhibisyonunda rol oynayan, β -karoten ve A vitamindir. Hücrenin sıvı fazında (örneğin sitozolde) antioksidan özelliğe sahip olan ve E vitaminin radikallerden temizlenmesinde rol oynayan C vitamindir. Bu nedenle, deneysel diyabette oluşan oksidatif stresin önlenmesinde antioksidan vitaminlerdeki değişiklikleri belirlemek amacıyla, dört grubun beyin β -karoten A vitamini, C vitamini ve E vitaminin düzeyleri belirlendi. Beyin, β -karoten, A vitamini, C vitamini ve E vitaminin konsantrasyonlarının ortalamaları Tablo 5'de 4 grup halinde gösterilmiştir. Beyin C (p< 0,05) ve E vitamin konsantrasyonları STZ grubunda kontrol grubuna nazaran önemli derecede düşük bulunmuştur. C ve E vitamin

konsantrasyonlarındaki bu düşüş NAC uygulanmasıyla nispeten artış olarak gözükmemektedir.

Parametreler	Kontrol	STZ	NAC	STZ+NAC
LP ($\mu\text{mol/gr protein}$)	27,92 \pm 3,20	32,78 \pm 2,07 ^b	27,78 \pm 1,91 ^e	29,91 \pm 2,04 ^e
GSH ($\mu\text{mol/gr protein}$)	14,50 \pm 1,13	10,90 \pm 0,56 ^b	15,00 \pm 0,77 ^e	14,40 \pm 0,90 ^e
GSH-Px (IU/gr protein)	26,59 \pm 2,12	22,27 \pm 3,21 ^a	26,26 \pm 2,14 ^c	25,10 \pm 0,94 ^a
Vitamin A ($\mu\text{mol/gr beyin}$)	2,35 \pm 0,26	2,26 \pm 0,20	2,33 \pm 0,24	2,33 \pm 0,20
β-karoten ($\mu\text{mol/gr beyin}$)	2,32 \pm 0,31	2,21 \pm 0,28	2,27 \pm 0,36	2,26 \pm 0,27
C vitamini ($\mu\text{mol/gr beyin}$)	88,00 \pm 13,23	68,13 \pm 16,93 ^a	84,35 \pm 14,45	83,27 \pm 17,03
E vitamini ($\mu\text{mol/gr beyin}$)	11,47 \pm 1,02	10,03 \pm 0,62 ^b	10,70 \pm 0,76	10,86 \pm 0,85

^a p<0,05 ve ^b p<0.01 kontrole karşı. ^c p<0,05, ^d p<0.01 ve ^e p<0,001 STZ grubuna karşı.

Tablo 5. STZ ile oluşturulan diyabet modelinde sıçan beyinlerindeki lipid peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve antioksidan vitamin konsantrasyonları üzerinde NAC'ın etkileri (n=9 ve mean \pm SD).

5. TARTIŞMA

TRP kanalları ilk olarak 1998 yılında *Drosophila* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde ışığa karşı, kesik kesik bir gerilim oluşturmasıyla karakterize iyon kanalı olarak bulunmuştur. (40). Günümüze kadar ise 7 alt ailenin varlığı ispatlanmıştır. Bu kanal ailelerinden biri olan TRPM alt ailesi TRPM2/TRPM8, TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5 ve TRPM6/TRPM7 olmak üzere 8 üyeden oluşmaktadır (5).

TRPM2 ağırlıklı olarak beyin ve nöronal hücrelerde yerleşmiş olmasına rağmen, kemik iliği, dalak, kalp, lökosit, karaciğer ve akciğeri de kapsayan diğer birçok farklı dokuda olduğu tanımlanmıştır. (40). ADPR oksidatif stres ve onun ürünleri olan ROT'dan ve bunun neticesi olan NAD⁺ dan 3 yolla üretilmektedir (4). TRPM2 kanalları 6 segmentten oluşmaktadır ve katyon girişleri 5. ve 6. segmentler arasından gerçekleşmektedir.(46). Ayrıca kanalın bir C (Nudix homoloji alanı) ve N uçları bulunmaktadır. Bu nudix homoloji alanında, ADPR pirofosfataz enzimi bulunur ve kanalın açılmasından bu enzimin aktivasyonu sorumludur. ADPR pirofosfataz enzimi ADPR'nin yanı sıra oksidatif stresle de aktive olabilmektedir.

TRPM2 kanallarının ADPR tarafından aktive olabildikleri ilk defa Perraud ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (55). Japonya'dan Hara ve arkadaşları Aachen Tıp Fakültesi Fizyoloji Enstitüsü'nden Wehage ve arkadaşları TRPM2 kanallarının oksidatif stresle aktive olabileceğini ispatlamışlardır. (46, 101). Daha sonraları yapılan çalışmalarda aktivasyon, doğrudan ve dolaylı yolları konusunda iki gruba ayrılmışlardır. Oksidatif stresin mitokondriden ADPR üretimini arttırmak kaydıyla TRPM2 kanallarını aktive edildiği ve hem oksidatif stresin hem de ADPR'nin birbirinden bağımsız olarak kanalları aktive edebildiği ayrı ayrı ortaya konmuştur. (46, 52, 55, 59, 60, 101).

NAC, yapısında sistein bulunan L-sistein isimli aminoasitten türemektedir (102). Modern tıpta yaygın olarak mukolitik olarak kullanılmasına rağmen, nörolojik hastalıkların tedavisindeki rolü kesin olarak yeni yeni ortaya konmaya başlanmıştır (35). NAC'ın hücre koruyucu ve antioksidan özellikleri de vardır. Antioksidan

özelliğini, GSH seviyelerini düzenleyerek, doğrudan radikalleri temizleyerek, nötrofil aktivitesi ve TNF üretimini baskılayarak gerçekleştirmektedir (35, 39). NAC'ın sentezinde GSH'nin rolü ve NAC'ın GSH dan daha kolay hücre içerisine geçişinin olduğu iyi bilinmektedir (103).

Bu tez çalışmasında, kontrol grubuna kıyasla, STZ ile diyabet oluşturulan grupta AKG hücrelerinin TRPM2 kanallarının daha fazla açıldığını gözlemledik. Ayrıca, AKG ve beyin örneklerinde STZ grubunun LP düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu gözlemlendi. Bu nedenle de, araştırma sonuçlarına göre diyabet sonucu oluşan oksidatif stres ürünlerinin, TRPM2 kanalının C ucundaki ADP-riboz pirofosfataz enzimi ile etkileşerek kanalı daha fazla açtığı fikrini doğrulamıştır. Ayrıca tez çalışma sonuçlarının, TRPM2 kanallarını aktive ettiğini bildiren araştırma sonuçlarıyla uyum göstermektedir (46, 59, 60, 101).

GSH ve ürünleri (örneğin GSH-Px enzimi) eksikliğinde oksidatif stresi artırarak duyuşal sinirlerde TRPM2 kanalları üzerinden Ca^{+2} akışını arttırdığı iyi bilinmektedir. Duyusal nöronların hastalıkları içerisinde sistin ile sistein dönüşümleri arasındaki herhangi bir bozukluk GSH ın eksikliğine sebep olacağı bilinmektedir (7, 104, 105). Bu duruma benzer şekilde, GSH ın sentezlenmesinde, onun spesifik üretim destekleyicisi olarak bilinen NAC, sıçanlara verildiğinde GSH eksikliğini gidererek ve diğer antioksidan sistemleri destekleyerek TRPM2 kanal inhibisyonuna neden olduğu yakın zamanda yapılan çalışmalarda gözlenilmiştir (10, 11). Yapılan bu tez çalışmasında, STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların AKG hücrelerindeki TRPM2 katyon kanalları üzerinden Ca^{+2} girişinin fazlaştığı gözlemlenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, NAC'ın, STZ ile uyarılmış AKG nöronlarında TRPM2 kanal akımlarının değişiklikleri ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada hem ACA ile 2-APB hem de NAC tarafından, STZ ile uyarılmış TRPM2 kanallarından Ca^{+2} akışının engellendiğı gözlemlenmiştir. Ayrıca, hem AKG hem de beyin örneklerinde STZ grubunda kontrole kıyasla GSH düzeyinin azaldığı gözlenirken, NAC verilen STZ grubunda ise GSH düzeylerinin ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Hem TRPM2 kanal sonuçları, hem de GSH sonuçları birlikte dikkate alındığında tiyol gruplarının Ca^{+2} iyonları geçişi ile ilgili etkisi olabileceğı düşünölmektedir. NAC ve 2-APB kullanımı hücre içinde GSH

düzyini azaltarak TRPM2 kanalları üzerinden Ca^{+2} akışını azalttığı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı, AKG ve duyusal nöron hastalıklarında sitozolik tiyol düzeylerinin bir TRPM2 kanal düzenleyicisi olarak rol oynadığı anlaşılmaktadır.

ACA, TRPM2 kanal blokürü olmasının yanı sıra fosfolipaz A2 (PLA) enzimini bloke etmektedir. Bu sayede hücre içinde IP3 yolu ile Ca^{+2} salınışını azaltmaktadır. ACA ve ACA benzeri kimyasal yapıların pankreas beta hücreleri ile kalp-damar sistemi hücrelerinde araşidonik asit ve ikincil habercileri bloke ettikleri gözlemlenmiştir. ACA 'nın TRPM2 kanalının yanı sıra çeşitli TRP kanallarını (örneğin TRPC6 ve TRPM8) da bloke ettiklerini bildirilmiştir (106). Bununla beraber sınırlı sayıda TRP kanalını bloke etmesi nedeni ile en spesifik TRPM2 kanal antagonistidir. In vitro ortamlarda en fazla tercih edilen TRPM2 kanal brokeridir (44, 107). 2-APB, TRPM2 kanalları keşfedilmeden önce, inositol trifosfat (InsP3) inhibisyonu ile Ca^{+2} girişini bloke ettiği bildirilmesine rağmen kesin etkisi belli değildi (108). Çünkü bir kısım araştırmacılar 2-APB nin hücre sitozolüne hücre içi organellerden ve dışından Ca^{+2} girişini plazma zarı Ca^{+2} -ATPaz enzimini bloke ederek gerçekleştirdiğini öne sürmüşlerdir. Dolaylı TRPM2 kanal blokeri etkisinin varlığı rapor edilmiştir (48, 109). TRPM2 kanalı bloke etmesine rağmen TRPV1 kanalını açmaktadır. Bu tez çalışmasında, hem STZ+2-APB ve hem de STZ+ACA gruplarının kapasitans değerlerinin STZ grubuna göre önemli düzeyde düşük olduğu ve bu iki kanal antagonistinin de iyi bir TRPM2 kanal blokeri oldukları gözlemlendi. Fakat, STZ+2-APB grubuna kıyasla, STZ+ACA grubunun kapasitans değerlerinin önemli düzeyde düşük olduğunu gözlemledik. Bu sonucumuz da ACA'nın 2-APB'ye kıyasla daha iyi TRPM2 kanal inhibisyonu yaptığı literatür bildirimleri ile uyumludur (106, 110).

Bu tezde, daha önceki çalışmalarda (111) pankreatik β -hücrelerinde ortaya konulduğu gibi diyabetik AKG nöronlarında TRPM2 kanal ilişkili ROT üretimi ve hücre içine Ca^{+2} akışının olduğu gözlemlendi. (Uchida and Tominaga, 2014). Duyusal sinirlerde TRPM2 agonisti (H_2O_2)-aracılı hücre içine yine TRPM2 kanalları üzerinden Ca^{+2} akışı hücre içindeki ROT miktarını ve mitokondriyal geçirgenliği arttırmakta, mitokondriyal bozukluklara sebep olmaktadır (110, 112, 113). TRPM2 kanallarının aktivasyonu hücre içi Ca^{+2} miktarının artması Ca^{+2} bağımlı

mitokondriyal oksijen tüketimine bağlı ROT üretimi NAC ve GSH gibi antioksidanlar tarafından azaltılmaz ise TRPM2 kanal ve Ca^{+2} girişi arttırmaktadır (114). Bu güne kadar diyabetik olmayan AKG nöronları, TRPM2 ve NAC arasındaki ilişki ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen (10, 11), diyabetik AKG nöronlarında TRPM2 kanalları etkileşimi konusunda bir çalışma bulunmamaktadır. Bu teze benzer şekilde, kültüre edilmiş nöronlarda TRPM2 aktivasyonu ROT üretiminin NAC ve GSH tedavisiyle engellenmesi sebebiyle durdurulmasına rağmen, AKG ve hipokampal nöronlarda TRPM2 kanalları hücre içi glutatyon tükenmesi kaynaklı ROT üretimi sebebiyle aktive olur (11, 100, 115).

GSH ve GSH-Px gibi tiyol grubu içeren antioksidanlar aşırı ROT artışından hücreleri korumada önemli rol oynar (99). GSH-Px enzimi GSH oluşumu sırasında lipid hidroperoksitleri H_2O_2 'yi ortadan kaldıran ve ko-faktör olarak selenyum ihtiva eden bir antioksidandır (44, 99). GSH bir elektron vericisi olarak hizmet vererek sisteme sitoplazmik proteinler içinde oluşan disülfid bağlarını azaltır. GSH ayrıca bir antioksidan rolüne sahip ve ROT kaynaklı hücresel bileşenlerin zarar görmesini engeller (104). Doğrudan ROT temizleyici etkisine ek olarak, NAC tiol içeren antioksidan olarak hücre içi GSH'ın tekrar üretimini sağlar. (11). Bu tezdeki sonuçlar NAC uygulanan diyabetik nöropatik sıçanların AKG hücrelerinde ve beyinde sadece GSH ve GSH-Px artmış olmasıyla LP seviyelerinin azalması tutarlılık göstermektedir. (Şekil 6, Tablo 5). Diyabete bağlı oksidatif toksite üzerine NAC'ın ileri sürülen mekanizması GSH-Px ve aktivitesinin ve GSH redüktazın artması sonucunda hücre içi GSH seviyesinin artmasıyla gerçekleşir (10, 11).

Suda eriyebilen bir vitamin olan askorbik asit; süperoksit radikali, nitrat, sitokrom a ve c bileşiklerinin indirgenmesinde rol oynayabildiği gibi, sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptir. Oksidan ajanlara karşı plazmada ilk antioksidan savunma hattını oluşturur. Süperoksit radikali ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip, onları temizlemesinin yanısıra tokoferol radikalının tekrar tokoferole dönüşümünü sağlar. Kollajen sentezinde, tirozin yıkımında, epinefrin sentezinde ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda görev alır. Ayrıca düşük dansiteli lipoprotein ve kolesterolün oksidasyonunu

önleyerek ateroskleroza karşı korumaya katkıda bulunur (14). Plazma ve beyin C vitamini yetersizliğinde hücredeki GSH miktarı da azalır. Yapılan bu tez çalışmasında, AKG ve beyin GSH düzeylerinin azalmasına paralel, beyin dokusu C vitamini düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. Yine, NAC verilen gruplarda aynı örneklerde GSH düzeylerinin artışına paralel, C vitamini düzeylerinin de arttığı gözlemlendi. Bu tez çalışması içerisindeki, GSH sonuçlarının C vitamini sonuçlarını desteklediği gözlemlendi.

Saio ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (116), gruplara ayırdığı diyabetik sıçanları ayrı gruplarda halk arasında beşparmakotu olarak bilinen *Potentilla fulgens* ekstraktı ve C vitamini uygulamasının diyabetik sıçanlarda GSH, GSH-Px LP düzeylerinin C vitamini ve *Potentilla fulgens* ekstraktı uygulanmayan diyabetik sıçanlara göre düzenlediğini gözlemiştir. Yine Nazıroğlu ve arkadaşlarının (117) yaptığı bir çalışmada yaşlı diyabetik sıçanlara günlük C ve E vitamini uygulanmasının uygulanmayan gruplara göre beyin, kan, karaciğer ve testis dokularında oksidan hasarı azalttığını gözlemlenmiştir. Yukarıdaki çalışmaların sonuçları tez çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

E vitamini ROT ile reaksiyona girip onu baskılayıp lipid peroksidasyonun yayılım döngüsü engelleyen hücre zarındaki başlıca yağda çözünen antioksidandır. Ayrıca C vitamini de nöronların sulu fazında ROT'u detoksifiye eder (113). Okside E vitamini, C vitamini ve GSH tarafından sinerjik olarak tekrar üretilirler (7). A vitamini ve β -karotenin singlet oksijen radikal temizleyici olarak ve hücresel farklılaşma rolleri de dahil olmak üzere çeşitli işlevleri olduğu gösterilmiştir (7). NAC, GSH-Px, C ve E vitaminleri gibi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar oluşturma kapasitesine sahiptir. (7, 99). Aşırı ROT üretimi enzimatik olmayan glikozilasyon ve aldoz redüktaz-poliol yolunun aktivasyonu yoluyla hiperglisemiye bağlı oksidatif beyin hasarında önemli bir role sahiptir (13). NAC uygulanması ile C ve E vitamin seviyeleri beyinde biraz artmış olmasına rağmen STZ gruplarında azalmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada benzer şekilde beyin E vitamin ve C vitamini düzeylerinin azaldığı gözlemlenmiştir (91). Bir çalışmada STZ grubuna NAC uygulanmasının sonuçları, beyinde ROT ömrünü etkileyen sonuçlar ile desteklenmektedir (112). Beyin A vitamini ve β -karoten

konsantrasyonları 4 grupta da değişiklik göstermemiştir. Benzer şekilde A vitamini ve β -karoten antioksidan sonuçları, C vitamini E vitamini GSH ve GSH-Px konsantrasyonları ile uyumluluk göstermektedir. Dolayısıyla tez çalışmasındaki antioksidan vitamin sonuçları GSH ve GSH-Px sonuçlarıyla uyumluluk göstermiştir.

Ulaş ve Çay'ın (118) yılında yaptıkları çalışmada diyabetik ovarioktomize ratlara 17 beta-estradiol ve E vitamini uygulamasının beyin korteksindeki lipit peroksidasyon ve antioksidan düzeylerinin 17 beta-estradiol ve E vitamini uygulanmayanlara göre düzenlediği gözlemlenmiştir. Ayrıca bu sonuçlar ve Nazıroğlu ve arkadaşlarının 2011 (117) yılında yaptığı çalışmada yaşlı diyabetik sıçanlara günlük C ve E vitamini uygulanmasının uygulanmayan gruplara göre beyin, kan, karaciğer ve testis dokularında oksidan hasarı azalttığı yönündeki sonuçları tezin sonuçlarını destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, bu tezin bulguları benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında diyabet bağlantılı aşırı ROT üretiminin AKG hücrelerinde TRPM2 aktivasyonu yoluyla diyabetik ağrıya neden olduğu söylenebilir. (10, 11), Ek olarak, diyabet bağlantılı AKG TRPM2 akımları ve beyin oksidatif toksisite üzerine NAC'ın koruyucu etkisi vardır. Oksidatif stres ve aşırı Ca^{+2} girişi aşırı nöropatik ağrının ortak nedenleri olduğu iyi bilinmektedir. Diyabet kaynaklı beyin hasarı ve nöropatik ağrının nedeni olan beyin oksidatif toksisite ve AKG TRPM2 kanal aktivitelerinin NAC tedavisiyle azaltılabileceğini önermekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Butterfield DA, Castegna A. Proteomics for the identification of specifically oxidized proteins in brain:technology and application to the study of neurodegenerative disorders. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):419-425.
2. Halliwell B. Proteasomal dysfunction:a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(11-12):2007-2019.
3. Özmen B, Ozmen D, Parildar Z, Mutaf I, Bayindir O. Serum N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) levels in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr Res*. 2007;32(1-2):1-8.
4. Nazıroğlu, M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem. Res.*, 2007, 32(11), 1990-2001.
5. Nazıroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res* 2007;32:1990-2001.
6. Han D, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Tritschler HJ, Packer L. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *Am J Physiol* 1997;84:1173-1183.
7. Sen CK, Packer L. Role of glutathione on antioxidant redox systems *Am J Clin Nutr* 2000;72(suppl):653S–69S.
8. Naik AK, Tandan SK, Dudhgaonkar SP, Jadhav SH, Kataria M, Prakash VR, Kumar D. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur J Pain* 2006;10:573-579.
9. 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):212-219.
10. Belrose JC, Xie YF, Gierszewski LJ, MacDonald JF, Jackson MF. Loss of glutathione homeostasis associated with neuronal senescence facilitates TRPM2

- channel activation in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Mol Brain*. 2012;5:11.
11. Özgül 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):122-128.
 12. Senol N, Nazıroğlu M, Yürüker V. N-acetylcysteine and selenium modulate oxidative stress, antioxidant vitamin and cytokine values in traumatic brain injury-induced rats. *Neurochem Res*. 2014 Apr;39(4):685-92.
 13. Amador-Alvarado L, Montiel T, Massieu L. Differential production of reactive oxygen species in distinct brain regions of hypoglycemic mice. *Metab Brain Dis*. 2014;29(3):711-9.
 14. Özkaya D, Nazıroğlu M, Armağan A, Demirel A, Köroğlu BK, Çolakoğlu N, Kükner A, Sönmez TT. Dietary vitamin C and E modulates oxidative stress induced-kidney and lens injury in diabetic aged male rats through modulating glucose homeostasis and antioxidant systems. *Cell Biochem Funct*. 2011 Jun;29(4):287-93.
 15. Nazıroğlu, M. Molecular role of catalase on oxidative stress induced Ca²⁺ signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 2012a, 32(3), 134-141.
 16. Butterfield DA, Di Domenico F, Swomley AM, Head E, Perluigi M. Redox proteomics analysis to decipher the neurobiology of Alzheimer-like neurodegeneration: overlaps in Down's syndrome and Alzheimer's disease brain. *Biochem J*. 2014 Oct 15;463(2):177-89
 17. Zochodne DW. Diabetic neuropathies: features and mechanisms. *Brain Pathol*. 1999 Apr;9(2):369-91.
 18. Duzhy DE, Viatchenko-Karpinski VY, Khomula EV, Voitenko NV, Belan PV. Upregulation of T-type Ca²⁺ channels in long-term diabetes determines increased excitability of a specific type of capsaicin-insensitive DRG neurons. *Mol Pain*. 2015 May 20;11:29.
 19. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993;49 (3):481-493.

20. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals, other reactive species and disease. In:Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, New York, pp. 639–645, 1999.
21. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioğlu E, Unal S, Söğüt S, Ozyurt H, Savaş HA. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2002;26(5):995-1005.
22. Knight JA. Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30(2):145-158.
23. 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.
24. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007;18(9):567-79.
25. Lam MA, Pattison DI, Bottle SE, Keddie DJ, Davies MJ. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. *Chem Res Toxicol* 2008;21(11):2111-2119.
26. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 2000 Feb;21(1):55-89.
27. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals:the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr* 2004;134(11):3143S-3163S.
28. Cete Y, Dora B, Ertan C, Ozdemir C, Oktay C. A randomized prospective placebo-controlled study of intravenous magnesium sulphate vs. metoclopramide in the management of acute migraine attacks in the Emergency Department. *Cephalalgia*. 2005;25(3):199-204.
29. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005 Aug;15(4):316-28

30. Hoffer A, Osmond H, Smythies J. Schizophrenia: a new approach. *J Ment Sci* 1954;100:29-35.
31. Derin D, Yazıcı A, Erkoç Ş. Şizofrenik Bozukluğu Olan Hastalarda Serbest Radikal Metabolizması ve Nonenzimatik Antioksidan Savunma Sistemi Elemanlarının incelenmesi. *BCP* 2001;11:174-82.
32. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41(12 Pt 2):1819-1828.
33. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992;59(5):1609-23.
34. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:136-47. Review.
35. Welin D, Novikova LN, Wiberg M, Kellerth JO, Novikov LN. Effects of N-acetyl-cysteine on the survival and regeneration of sural sensory neurons in adult rats. *Brain Res*. 2009;1287:58-66.
36. Jones AL, Jarvie DR, Simpson D. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine are altered in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1997;11:787-791.
37. Van Surell C, Boczkowski J, Pasquier C, Du Y, Franzini E, Aubier M. Effects of N-acetylcysteine on diaphragmatic function and malondialdehyde content in *Escherichia coli* endotoxemic rats. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(3):730-734.
38. Sarıcaoglu F, Dal D, Salman AE, et al., Effect of low-dose N-acetyl-cysteine infusion on tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury in arthroscopic knee surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005;49:847-851.
39. Koçkar MC, Nazıroğlu M, Celik O, Tola HT, Bayram D, Koyu A. N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and antioxidant vitamin concentrations in liver of rats. *Cell Biochem Funct*. 2010;28(8):673-677.
40. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007;14;131(6):1047-1058.
41. Hardie RC, Minke B. The TRP gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*. 1992;8(4):643-651.
42. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003;4;426(6966):517 – 524.

43. Nazıroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases:where are we now? *Neurochem Res.* 2011;36(3):355-366.
44. Nazıroğlu, M., Dikici, D.M., Dursun, S. Role of oxidative stress and Ca²⁺ signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes:focus on TRP channels. *Neurochem. Res.*, 2012b, 37(10), 2065-2075.
45. Takahashi, N., Kozai, D., Mori, Y. TRP channels:sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front Physiol.*, 2012, 3, 324.
46. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell.* 2002;9(1):163-173.
47. Nilius B. TRP channels in disease. *Biochem Biophys Acta* 2007;1772:805-812.
48. Xu SZ, Zeng F, Boulay G, Grimm C, Harteneck C, Beech DJ. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate:a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol.* 2005;145(4):405-414.
49. Nazıroğlu M, Özgöl 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):314-320.
50. Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol.* 2003;13(13):1153-1158.
51. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature.* 2004;430(7001):748-754.
52. Perraud AL, Shen B, Dunn CA, Rippe K, Smith MK, Bessman MJ, Stoddard BL, Scharenberg AM. NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem.* 2003;278(3):1794-1801.
53. Shen BW, Perraud AL, Scharenberg A, Stoddard BL. The crystal structure and mutational analysis of human NUDT9. *J Mol Biol.* 2003;332(2):385-398.

54. Inamura K, Sano Y, Mochizuki S, Yokoi H, Miyake A, Nozawa K, Kitada C, Matsushime H, Furuichi K. Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line. *J Membr Biol.* 2003;191(3):201-207.
55. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* 2001;411(6837):595-599.
56. Kühn FJ, Lückhoff A. Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2. *J Biol Chem.* 2004;279(45):46431-46437.
57. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.* 2006;25(9):1804-1815.
58. Guse AH, Gu X, Zhang L, Weber K, Krämer E, Yang Z, Jin H, Li Q, Carrier L, Zhang L. A minimal structural analogue of cyclic ADP-ribose:synthesis and calcium release activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2005;280(16):15952-15959.
59. Nazıroğlu M, Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels:single channel events. *Neurochem Res.* 2008b;33(7):1256-1262.
60. Nazıroğlu M, Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J Neurol Sci.* 2008a;270(1-2):152-158.
61. Negi G, Kumar A, Sharma SS. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy:effects on NF- κ B and Nrf2 cascades. *J Pineal Res* 2011;50:124–131.
62. Obrosova IG. Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1543–1552
63. Obrosova IG, Kador PF. Aldose reductase/polyol inhibitors for diabetic retinopathy. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12:373–385.

64. Supale S, Li N, Brun T, Maechler P Mitochondrial dysfunction in pancreatic b cells. *Trends Endocrinol Metab* 2012 Sep;23(9):477-87.
65. Youn JY, Gao L, Cai H. The P47(phox)-and NADPH oxidase organiser 1 (NOXO1)-dependent activation of NADPH oxidase 1 (NOX1) mediates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling and endothelial dysfunction in a streptozotocin-induced murine model of diabetes. *Diabetologia* 2012;55:2069–2079.
66. Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN, Plurad SB, Parvin CA, Ohara S. Effect of IGF-I and neurotrophin-3 on gracile neuroaxonal dystrophy in diabetic and aging rats. *Brain Res* 2000;876:88–94.
67. Voitenko NV, Kruglikov IA, Kostyuk EP, Kostyuk PG. Effect of streptozotocin-induced diabetes on the activity of calcium channels in rat dorsal horn neurons. *Neuroscience* 2000;95:519–524.
68. Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience* 2002;111:389–397.
69. Orreniu S, Nicotera P. The calcium ion and cell death. *J Neural Transm* 1994;43:1-11.
70. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 1999;375:217–223.
71. Li F, Obrosova IG, Abatan O, Tian D, Larkin D, Stuenkel EL, Stevens MJ Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signaling in sensory neurons of STZ-D rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:29–36.
72. Fernyhough P, Calcutt NA. Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell Calcium*, 2010;47(2):130–139.
73. Verkhatsky A, Fernyhough P Mitochondrial malfunction and Ca²⁺ dyshomeostasis drive neuronal pathology in diabetes. *Cell Calcium* 2008;44:112–122.
74. Whyte KA, Greenfield SA. Expression of voltage-dependent calcium channels in the embryonic rat midbrain. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002;139:189–197.

75. Umeda M, Ohkubo T, Ono J, Fukuizumi T, Kitamura K. Molecular and immunohistochemical studies in expression of voltage-dependent Ca²⁺ channels in dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci*, 2006;79:1995–2000.
76. Wen XJ, Xu SY, Chen ZX, Yang CX, Liang H, Li H et al. The roles of T type calcium channel in the development of neuropathic pain following chronic compression of rat dorsal root ganglia. *Pharmacology*, 2010;85:295–300.
77. Li XY, Chen XG. Role of PKC β in the malignant tumors and enzastaurin, a PKC β inhibitor. *Yao Xue Xue Bao*, 2009;44:449–455.
78. Naziroglu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res*, 2009;34:2181–2191.
79. Tahara M, Omatsu-Kanbe M, Sanada M, Maeda K, Koya D, Matsuura H, Kashiwagi A, Yasuda H Effect of protein kinase C β inhibitor on Ca²⁺ homeostasis in diabetic sensory neurons. *Neuroreport*, 2006;17:683–688.
80. Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov VV, Obrosova IG The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*, 2006;55:3335–334.
81. Srinivasan K, Sharma SS. Augmentation of endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia/reperfusion injury associated with comorbid type, 2 diabetes. *Neurol Res*, 2011;33:858–865.
82. Syed I, Kyathanahalli CN, Jayaram B, Govind S, Rhodes CJ, Kowluru RA, Kowluru A. Increased phagocyte-like NADPH oxidase and ROS generation in type, 2 diabetic ZDF rat and human islets: role of Rac1-JNK1/2 signaling pathway in mitochondrial dysregulation in the diabetic islet. *Diabetes*, 2011;60:2843–2852.
83. Adachi T, Modulation of vascular sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in cardiovascular pathophysiology. *Adv Pharmacol*. 2010;59:165-195.
84. Kobayashi T, Taguchi K, Takenouchi Y, Matsumoto T, Kamata K Insulin-induced impairment via peroxynitrite production of endothelium-dependent relaxation and sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function in aortas from diabetic rats. *Free Radic Biol Med*, 2010;43:431–443.

85. Turan B, Vassort G. Ryanodine receptor: a new therapeutic target to control diabetic cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal*, 2011;15:1847–1861.
86. Tian C, Shao CH, Moore CJ, Kutty S, Walseth T, DeSouza C, Bidasee KR. Gain of function of cardiac ryanodine receptor in a rat model of type 1 diabetes. *Cardiovasc Res*, 2011;91:300–309.
87. Yaras N, Tuncay E, Purali N, Sahinoglu B, Vassort G, Turan B. Sex-related effects on diabetes-induced alterations in calcium release in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007;293:H3584–H3592.
88. Dror V, Kalynyak TB, Bychkivska Y, Frey MH, Tee M, Jeffrey KD, Nguyen V, Luciani DS, Johnson JD. Glucose and endoplasmic reticulum calcium channels regulate HIF-1beta via presenilin in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 2008;283:9909–9916.
89. Luciani DS, Gwiazda KS, Yang TL, Kalynyak TB, Bychkivska Y, Frey MH, Jeffrey KD, Sampaio AV, Underhill TM, Johnson JD. Roles of IP3R and RyR Ca²⁺ channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death. *Diabetes*, 2009;58:422–432.
90. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 1952;117(4):500-544.
91. Kahya MC, Naziroğlu M, Çiğ B. Melatonin and selenium reduce plasma cytokine and brain oxidative stress levels in diabetic rats. *Brain Inj*. 2015 Aug 12:1-7. [Epub ahead of print]
92. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Anal. Biochem* 1968;25:192-205 .
93. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71(4):952-8.
94. Placer ZA, Cushman L, Johnson BC Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. *Anal. Biochem* 1966;16:359-364.
95. Suzuki J, Katoh N. Cysteine protease in bovine milk capable of hydrolyzing casein as the substrate and elevation of the activity during the course of mastitis. *Nihon Juigaku Zasshi*. 1990;52(5):947-54

96. Desai ID. Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Methods Enzymol.* 1984;105:138-47.
97. Jagota SK, Dani HM. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Anal Biochem.* 1982 Nov 15;127(1):178-82.
98. SPSS yazılımı sürüm 17.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois, ABD
99. Dringen R, Hamprecht B. N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. *Neurosci Lett.* 1999;259:79-82.
100. Övey IS, Naziroğlu M. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience.* 2015 Jan 22;284:225-33.
101. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23150-23156.
102. Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: Basic and clinical pharmacology. *Cerebellum* 2007;19:1-7.
103. Mazor D, Golan E, Philip V, Katz M, Jafe A, Ben-Zvi Z. Red blood cell permeability to thiol compounds following oxidative stress. *Eur J Haematol* 1996;57:241–246.
104. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interac.* 1998;111-112, 1-14.
105. Cabungcal JH, Preissmann D, Delseth C, Cuénod M, Do KQ, Schenk F. Transitory glutathione deficit during brain development induces cognitive impairment in juvenile and adult rats: relevance to schizophrenia. *Neurobiol Dis.* 2007;26(3):634-645.
106. Harteneck C, Frenzel H, Kraft R. N-(p-amylicinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase A(2) inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovasc Drug Rev.* 2007;25(1):61-75.

107. Chung KK, Freestone PS, Lipski J. Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol.* 2011;106(6):2865-2875.
108. Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem.* 1997;122(3):498-505.
109. Togashi K, von Schimmelmann MJ, Nishiyama M, Lim CS, Yoshida N, Yun B, Molday RS, Goshima Y, Hong K. Cyclic GMP-gated CNG channels function in Sema3A-induced growth cone repulsion. *Neuron.* 2008 Jun 12;58(5):694-707.
110. Özdemir ÜS, Nazıroğlu M, Şenol N, Ghazizadeh V. Hypericum perforatum Attenuates Spinal Cord Injury-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in the Dorsal Root Ganglion of Rats: Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. *Mol Neurobiol.* 2015 Jun 23.
111. Uchida K, Tominaga M. The role of TRPM2 in pancreatic β -cells and the development of diabetes. *Cell Calcium.* 2014;Nov;56(5):332-9.
112. Kamboj SS, Sandhir R. Protective effect of N-acetylcysteine supplementation on mitochondrial oxidative stress and mitochondrial enzymes in cerebral cortex of streptozotocin-treated diabetic rats. *Mitochondrion.* 2011 Jan;11(1):214-22.
113. Nesuashvili L, Hadley SH, Bahia PK, Taylor-Clark TE. Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction activates airway sensory nerves via transient receptor potential (TRP) channels. *Mol Pharmacol.* 2013 May;83(5):1007-19.
114. Nazıroğlu M. Editorial: Role of Antioxidants Treatments on Oxidative Stress and Calcium Entry in Neurological Disease: Focus on TRP Channels. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(2):233.
115. 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 Jul;24(7):2533-45.
116. Saio V, Syiem D, Sharma R. Effect of *Potentilla fulgens* on lipid peroxidation and antioxidant status in alloxan-induced diabetic mice. *J Basic Clin Pharm.* 2012 Mar;3(2):249-54

117. Naziroğlu M, Butterworth PJ, Sonmez TT. Dietary vitamin C and E modulates antioxidant levels in blood, brain, liver, muscle, and testes in diabetic aged rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 2011 Nov;81(6):347-57.
118. Ulas M, Cay M. The effects of 17beta-estradiol and vitamin E treatments on oxidative stress and antioxidant levels in brain cortex of diabetic ovariectomized rats. *Acta Physiol Hung.* 2010 Jun;97(2):208-15.

ÖZET

N-Asetil sistein (NAC) ortama sülfidril salan, Glutasyon'un (GSH) yenilenmesine katkıda bulunmakla birlikte doğrudan serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek onları temizleyen bir antioksidandır. Son zamanlarda, sıçan GSH seviyesi azalmış dorsal kök gangliyon (DRG) üzerine NAC modülatör rolü araştırılmıştı. NAC diyabetik nöronlarda TRPM2 kanalının düzenlenmesi yoluyla oksidatif stres ve kalsiyum akını üzerinde koruyucu bir role sahip olabilir. Bu nedenle bu tez çalışmasında NAC'ın STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların AKG nöronlarının TRPM2 kanal akımları ve beyin oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri araştırıldı.

Otuz altı sıçan Kontrol, STZ, NAC ve STZ+NAC olarak dört gruba ayrıldı. Periton içi STZ (45 mg/kg) verilerek STZ ve STZ+NAC grupları diyabet yapıldı. Diyabet oluştuktan sonra NAC ve STZ+NAC grubundaki sıçanlara iki hafta boyunca gavaj yoluyla NAC (150mg/kg) verildi. İki hafta sonunda sıçanların AKG nöronları ve beyin korteksleri izole edildi. Patch-clamp tüm hücre konfigürasyonu ile yapılan deneylerde STZ ile diyabet oluşturulan gruplarda AKG hücrelerindeki TRPM2 katyon kanal akımları H₂O₂ ile açıldı. AKG hücrelerinde TRPM2 kanal akım yoğunlukları ve beyin lipit peroksidasyon düzeyleri STZ gurubunda Kontrol gurubuna göre daha yüksek bulunmakla beraber, Beyin GSH, C ve E vitamini düzeyleri ve GSH-Px aktivitesi ile AKG hücrelerinde GSH-Px aktivitesinin diyabette azaldığı gözlemlenmiştir. STZ+H₂O₂ ile oluşturulmuş TRPM2 akımları NAC tarafından bütünüyle, N-(p-amylcinnamoyl) antranilik asit(ACA) and 2-aminoetil difenilborinat (2-APB) ile kısmen azalmıştır. GSH-Px, Lipit Peroksidasyon, C ve E vitamin düzeyleri NAC uygulanmasıyla artmıştır.

Sonuç olarak, diyabetik DRG ve beyinde oksidatif stres ve TRPM2 kanalından Ca⁺² girişinde NAC'ın düzenleyici rolü görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diyabetik Nöropatik Ağrı;N-asetil sistein;Oksidatif beyin hasarı;TRPM2 kanalı.

ABSTRACT

N-acetylcysteine (NAC) is a sulfhydryl donor antioxidant that contributes to the regeneration of glutathione (GSH) and also scavengers via a direct reaction with free oxygen radicals. Recently, we observed a modulatory role of NAC on GSH-depleted dorsal root ganglion (DRG) cells in rats. NAC may have a protective role on oxidative stress and calcium influx through regulation of the TRPM2 channel in diabetic neurons. Therefore, we investigated the effects of NAC on DRG TRPM2 channel currents and brain oxidative stress in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.

Thirty-six rats divided into four groups: control, STZ, NAC and STZ+NAC. Diabetes was induced in the STZ and STZ+NAC groups by intraperitoneal STZ (65 mg/kg) administration. After the induction of diabetes, rats in the NAC and STZ+NAC groups received intraperitoneal NAC (150 mg/kg). After 2 weeks, DRG neurons and the brain cortex were freshly isolated from rats. In whole-cell patch clamp experiments, TRPM2 currents in the DRG following diabetes induction with STZ were gated by H₂O₂. TRPM2 channel current densities in the DRG and lipid peroxidation levels in the DRG and brain were higher in the STZ groups than in controls; however, brain GSH, GSH peroxidase (GSH-Px), vitamin C and vitamin E concentrations and DRG GSH-Px activity were decreased by diabetes. STZ+H₂O₂-induced TRPM2 gating was totally inhibited by NAC and partially inhibited by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid (ACA) and 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB). GSH-Px activity and lipid peroxidation levels were also attenuated by NAC treatment.

In conclusion, we observed a modulatory role of NAC on oxidative stress and Ca²⁺ entry through the TRPM2 channel in the diabetic DRG and brain. Since excessive oxidative stress and overload Ca²⁺ entry are common features of neuropathic pain, our findings are relevant to the etiology and treatment of pain neuropathology in DRG neurons.

Key words: Diabetic neuropathic pain; N-acetyl cysteine; Oxidative brain injury; TRPM2 channel.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı:	Ercan	Soyadı:	SÖZBİR
Doğum Yeri:	İzmir	Doğ. Tarihi:	25.01.1985
Uyruğu:	T.C.	Tel:	0 505 479 3785
Email:	esozbir@yahoo.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora	Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik A.D.	2015
Yüksek Lisans	-	-
Lisans	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2008
Lise	Ödemiş Hulusi Uçaçelik Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Veteriner Hekim	T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Kars Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü	2011-2014
Veteriner Hekim	T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Afyonkarahisar İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü	2014-2015(devam ediyor)

Yabancı Dilleri	KPDS/ÜDS Puanı	Diğer Puanı
İngilizce	ÜDS 2008 Sonbahar Sağlık Bilimleri	65.00

Yayınlar

1. Nazıroğlu M, Güler M, Özgül C, Saydam G, Küçükayaz M, Sözbir E. Apple cider vinegar modulates serum lipid profile, erythrocyte, kidney, and liver membrane oxidative stress in ovariectomized mice fed high cholesterol. J Membr Biol. 2014;247(8):667-73.
2. Nazıroğlu M, Özgül C, Çelik Ö, Çiğ B, Sözbir E. Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca²⁺ influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. J Membr Biol. 2011;241(2):69-75.