

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

**ARKA KÖK GANGLİYON HÜCRELERİNDE OKSİDATİF
STRESLE AKTİVE EDİLEN TRPM2 KATYON KANALLARININ
İNHİBİSYONUNDA N-ASETİL SİSTEİNİN ETKİSİNİN
PATCH-CLAMP SİSTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Cemil ÖZGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 2680-YL-11 Proje numarası ile desteklenmiştir
Tez. No: 92**


2013-İSPARTA


KABUL VE ONAY SAYFASI


Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

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

Tez Savunma Tarihi: 02/01/2013


Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi


Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Cemal KAHYA
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi


Üye : Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi

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

Prof. Dr. Fehmi ÖZGÜNER
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Hayattaki varlık ve yaşama tutunma sebeplerim ve haklarını asla ödeyemeyeceğim muhterem anne ve babama,

Lisansüstü eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimleriyle daima bana yol gösteren, olaylara farklı açılardan bakabilme yetisini öğreten, geleceğe daima ümitle bakmamı sağlayan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU hocama,

Onlardan ayrı kaldığım zamanlarda bir yanımın hep eksik olduğunu hissettiğim değerli ağabeyime ve sevgili kardeşime,

Her ne zaman başım dara düşse, fikir ve tavsiyeleriyle beni ümitsizlikten kurtaran ve ailemden uzak olduğum bu senelerde bana ağabeylik yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK hocalarıma,

Zor zamanlarımda desteklerini hissettiren Biyofizik Anabilim Dalında görev yapan tüm arkadaşlarıma,

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

Ve bu günlere gelmemde üzerimde emeği olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla...

Cemil ÖZGÜL

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Oksidatif Stres	4
2.1.1. Bütiyonin Sülfoksimin (BSO)	9
2.2. Antioksidanlar	10
2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	10
2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	12
2.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	15
2.2.4. N - Asetil Sistein.....	16
2.3. TRP Kanalları.....	18
2.3.1. TRPM Katyon Kanalları.....	20
2.3.1.1. TRPM2 Katyon Kanalları	22
2.3.1.1.1. Basit Yapısı	22
2.3.1.1.2. C-Terminal Ucun NUDT9 Homoloji Alanı	22
2.3.1.2. TRPM2 Kanallarının Aktivasyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar.....	23
2.3.1.2.1. Oksidatif Stres	23
2.3.1.2.2. ADPR, NAD ve cADPR	24
2.4. Patch-Clamp (Yama-Menteşe) Tekniği.....	27
2.4.1. Hücre Üzerinde (On-cell, Cell-attached)	29
2.4.2. Tüm Hücre (Whole-cell).....	30
2.4.3. İçi-Dışarıda (Inside-out)	30
2.4.4. Dışı-Dışarıda (Outside-out)	31

2.4.5. Yama-Menteşe Setini Oluşturan Temel Malzemeler.....	32
2.4.6. Pipet Yapıcısı.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Gereç	36
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	36
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Sıçan Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücreleri İzolasyonu.....	37
3.2.2. Solüsyonların Hazırlanması	38
3.2.3. Yama-menteşe (Patch-clamp) Deneşleri	40
3.3. Etik Kurul İzni.....	44
3.4. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. Kontrol Kaydı Sonucu.....	45
4.2. Kontrol Grubu Kaydı Sonucu.....	45
4.3. BSO Grubu Kaydı Sonucu	47
4.4. NAC Grubu Kaydı Sonucu.....	49
4.5. BSO+NAC Grubu Sonucu	49
4.6. NAC +BSO Grubu Sonucu	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	56
ÖZET.....	57
ABSTRACT	58
KAYNAKLAR	59
EK-1.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACA	: Antranilik asit
ADP	: Adenozin di-fosfat
ADPR	: Adenozin di-fosfat Riboz
AKG	: Arka kök gangliyon
ATP	: Adenozin trifosfat
BSO	: Bütiyonin sülfoksimin
cADPR	: siklik ADPR
cAMP	: siklik Adenozin monofosfat
CCl₃	: Triklormetil
CCl₄	: Karbon tetraklorür
CHO	: <i>Chinese Hamster Ovary</i>
DHAA	: L-dihidroaskorbik asit
DHLA	: Dihidrolipoik asit
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	: Dimethyl sulphoxide
GR	: Glutasyon reduktaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
KAT	: Katalaz
LA	: Lipoik asit
LPO	: Lipit peroksidasyon
MDA	: Malondialdehid
NAC	: N-asetil sistein
NAD(P)H	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAD⁺	: Nikotinamid adanın dinükleotid
NADH	: İndirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotid
NMDG	: <i>N-Methyl D-Glucamine</i>

NO·	: Nitrik oksit
NUDT9-H	: TRPM üzerinde bulunan enzimatik bölge
O₂·⁻	: 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
SOD	: Süperoksit dismutaz
TRP	: <i>Transient receptor potential</i>
TRPA	: <i>Transient receptor potential ankyrin</i>
TRPC	: <i>Transient receptor potential conancial</i>
TRPM	: <i>Transient receptor potential melastatin</i>
TRPML	: <i>Transient receptor potential mucolipin</i>
TRPP	: <i>Transient receptor potential polycystin</i>
TRPV	: <i>Transient receptor potential vanilloid</i>
¹O₂	: singlet oksijen
2-APB	: <i>2-Aminoethyl diphenylborinate</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması	7
Şekil 2. OH radikalının biyolojik moleküllerle reaksiyonları.....	8
Şekil 3. Hücrede serbest radikallerin üretimi, radikallere etki eden antioksidan sistem ve oksidatif stres sonucunda, NAD ⁺ dan üç farklı yolla ADPR üretiminin şematik gösterimi..	15
Şekil 4. Tiyol redoks döngüleri antioksidan savunma ağı üzerinde en önemli yere sahiptir. Hem glutatyon hem de lipoate redoks döngüleri kendi indirgenmiş formları olan GSH ve DHLA ları oluşturmak için hücrel düşürücü eşdeğeri tarafından yürütüldüğünü gösteren, bir dizi sinerjik reaksiyonların şematik gösterimi.....	18
Şekil 5. TRP üst ailesinin altı alt aileden oluştuğunu gösteren şematik şekil.....	20
Şekil 6. TRPM kanalları dört alt grup olmak üzere toplamda sekiz alt üyeden oluşmaktadır.....	21
Şekil 7. TRPM2 kanallarının, oluşan oksidatif stresle ve bunun neticesi olan, NAD ⁺ dan üç farklı yolla oluşan ADPR ile aktive olma mekanizmalarını gösteren şekil.....	27
Şekil 8. Patch mikropipetinin hücre zarına teması ve hücre üzerinde bulunan iyon kanallarının gösterimi.....	29
Şekil 9. Patch clamp tekniğinde kullanılan dört farklı konfigürasyonunun şematik gösterimi.....	31
Şekil 10. H ₂ O ₂ ile uyarım yapılmamış sıçan AKG hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı	45
Şekil 11. H ₂ O ₂ ile uyarım yapılmış AKG hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik.	46
Şekil 12. 24 saat 0,5 mM BSO ile inkübe edildikten sonra H ₂ O ₂ ile uyarım yapılarak AKG hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik ..	48
Şekil 13. 3 saat 2 mM NAC ile inkübe edildikten sonra H ₂ O ₂ ile uyarım yapılarak AKG hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı.	49

Şekil 14. AKG hücreleri, 24 saat 0,5 mM BSO ile inkübe edildikten sonra 3 saatte 2 mM NAC ile inkübe edilmiş ve daha sonra H₂O₂ ile uyarım yapılarak hücrelerden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı..... 50

Şekil 15. AKG hücreleri, 3 saat 2 mM NAC ile inkübe edildikten sonra 24 saatte 0,5 mM BSO ile inkübe edilmiş ve daha sonra H₂O₂ ile uyarım yapılarak hücrelerden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı..... 50

Şekil 16. AKG hücrelerinde TRPM2 kanalları üzerine BSO, NAC, 2-APB ve H₂O₂'in etkisi..... 51

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. 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).	34
Resim 2. Mikro pipet yapıcısı genel görünümü (Cihaz programı ayar tuşları, pipet olukları, pipet kısıkaçları ve tungsten ısı rezistansı).	35
Resim 3. Yama-menteşe tekniği ile gigaseal (sıkı mühür) oluşturulmuş AKG hücrelerinin mikroskopik görünümü.	42
Resim 4. Yama-menteşe setinde, mikropipetin hücrelerin bulunduğu solusyona girdiği anda, <i>patch-master</i> programının gösterdiği osiloskop ekranı ve pipetin direnci.....	42
Resim 5. Mikropipetin AKG hücrelerine temasından sonraki, programın gösterdiği osiloskop ekranı	43
Resim 6. AKG hücresiyle ve mikropipet arasında oluşan mühür (gigaseal) gösteren ekran görüntüsü.	43

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Normal ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü	39
Tablo 2. NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü.....	39
Tablo 3. Hücre içi tampon çözelti hazırlama protokolü	39

1. GİRİŞ

Vücuttaki tüm organlar özellikle beyin ve periferal sinir ağı oksidatif strese karşı oldukça hassastırlar. Ayrıca çoklu doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonu (self-oksidasyon) yolu ile devamlı olarak üretilen reaktif oksijen türlerine de (ROT) maruz kalabilmektedirler. Merkezi sinir sisteminin yüksek oksijen tüketimi, kolayca okside olabilen zengin yağ asitlerini barındırması, diğer organlara göre düşük seviyede antioksidan enzim ve antioksidan vitamin içermesi onu ROT tarafından birincil hedef haline getirmektedir.

Merkezi sinir sistemi, diğer organlarla karşılaştırıldığında vücuda alınan oksijenin büyük bir kısmını (% 20) kullanır. Bu yüksek oksijen kullanımı ve metabolizmasının hızlı oluşu merkezi sinir sisteminde serbest radikal üretim miktarını arttırabilir (Butterfield 2003). Bu sistem, proteinlerden ve bol miktarda fosfolipitlerden oluşan zarlardan oluşmuştur. Bu fosfolipitler de araşidonik asit ve *docohexaenoic* asitler gibi okside çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşur (Halliwell 2006). Bu doymamış yağ asitleri serbest oksijen radikaline karşı savunmasız bir durumdadırlar. Çünkü zayıf çift bağlarla birbirine tutunan hidrojen iyonlarını içermektedir. ROT da - hasar vermek için - bu zayıf bağlı hidrojen iyonlarını bir hedef olarak görmektedir (Özmen et al., 2007). Beyin ve arka kök gangliyon hücreleri fosfolipitlerinin değişikliklerine neden olabilen oksidatif hasarın, nörolojik hastalıklarda rol oynuyor olabileceği ileri sürülmüştür (Nazıroğlu 2007a, 2007b).

Beyin ve başta arka kök gangliyon (AKG) hücreleri olmak üzere diğer nörolojik hücreler peroksidatif hasara karşı antioksidanlarca korunmaktadırlar (Halliwell 2006, Nazıroğlu 2007b). Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) hidrojen peroksiti (H_2O_2) indirgeyerek suya katalizler. GSH-Px de organik hidrojen peroksidi ortamdandan uzaklaştırabilirler.

Glutasyon (GSH) hücresel fonksiyonların geniş bir alanında bir hidroksil radikali (OH \cdot), bir singlet oksijen (O_2^1) tutucusudur (Rayman 2009). Vitamin-E (*α-tocopherol*) hücrenin lipit fazındaki en önemli antioksidanıdır. Vitamin E vücudun metabolik ürünler vasıtasıyla hücreye hasar veren serbest radikallerin etkilerine karşı hücreleri korumada rol oynar (Halliwell 2006, Nazıroğlu 2007 b). Vitamin C (askorbik asit) serbest radikal tutucusu olmasının yanı sıra E vitamininin aktif

formuna doğru dönüşebilmektedir (Nazıroğlu 2011). Askorbik asit konsantrasyonu vücut dokuları içinde karaciğer ve böbrekte olduğu gibi AKG hücrelerinde de çok düşüktür (Nazıroğlu 2010). Vitamin A (retinol) retinoitler için bir prohormon olarak hizmet vermekte iken sitoplâzma ve zar alanlarında da sinyal iletimi ile ilişkilidir (Tafti and Ghyselinck 2007).

“*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 (NUDT9-H) enzimleri kanalın açılması için gerekli olan anahtar kilit vazifesini üstlenmektedir. Bu bölge Adenozin di-fosfat (ADP) ve Adenozin di-fosfat Ribozu (ADPR) bağlayabilen bir Nudix Hidrolaz türüdür (Kühn et al., 2005).

TRPM2'nin NUDT9-H'a ADPR'un bağlanması kanalı etkinleştirir ve elektrokimyasal gradyenti de katyonların geçişine izin verir. TRPM2 plazma zar kanalı olduğu için, TRPM2 açıldığında Ca^{+2} ve az miktarda Na^{+} iyonları hücre içine akmaktadır.

ADPR, TRPM2'nin en güçlü aktivatörü olmasının yanı sıra daha az güçlü aktivatörleri de mevcuttur (Hara et al., 2002, Heiner et al., 2006). H_2O_2 gibi oksidanlar nikotinamid adanin dinükleotid (NAD^{+}) ve siklik ADPR (cADPR) içerir. Önceleri NAD^{+} ve H_2O_2 ADPR'nin hücre içi düzeyini arttırarak kanalların açılmasına olanak sağladığı düşünülürken, daha sonraları yapılan tekli kanal araştırmalarında, oksidatif stresin (H_2O_2) doğrudan da TRPM2 kanallarını açtığı gözlemlenmiştir. Ve böylece oksidatif stresin, TRPM2 kanallarını, hem doğrudan hem de dolaylı olarak açabileceği gösterilmiştir (Perraud et al., 2005, Hara et al., 2002, Nazıroğlu and Lückhoff 2008a).

TRPM2 kanallarının bloke edilme mekanizmaları tam olarak aydınlatılmış olmamasına rağmen, son zamanlarda yapılan araştırmalarda *2-Aminoethyl diphenylborinate* (2-APB), antranilik asit (ACA) gibi bazı kimyasalların, bu kanalları, ikinci haberciler vasıtasıyla inaktive ettikleri rapor edilmiştir (Togashi et al., 2008, Kraft et al., 2006, Bari et al., 2009). Ayrıca yakın zamanda yaptığımız bir araştırmaya göre; hücrelerin bulunduğu ortama glutatyon verildiğinde (GSH), GSH'ın, TRPM2 kanal akımlarını pek değiştirmedeğini, ancak pipet içi verildiğinde

bu kanal akımlarını tamamen bloke olduğu gözlemlenmiştir (Nazıroğlu et al., 2011b). Bu neticeler, antioksidan mekanizmalarının TRPM2 kanal akımları üzerinde azaltıcı etkisi olabileceği görüşünü kuvvetlendirmektedir. L-sistein isimli aminoasitten türeyen N-asetil sisteinin (NAC), tiyol grupları içersinde memeli hücrelerinde, hücre içi en güçlü antioksidan olarak bilinen glutatyonun (GSH) prekürsörü olması ve NAC'ın, GSH'a göre hücre zarından çok daha rahat geçebilmesi (Mazor et al., 1996) gibi sebepler, bu antioksidan maddenin, TRPM2 kanal akımları üzerindeki etkisinin incelenmesi gerektiği fikrini uyandırmıştır. Bu tez çalışmasında; sıçan arka kök gangliyon (AKG) hücrelerinde Bütiyonin sülfoksimin (BSO) ile hücre içi GSH düzeyleri azaltıldıktan sonra N-asetil sisteinin (NAC) koruyucu etkisi, TRPM2 kanal akımları üzerinden incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres

Serbest radikaller daima tek elektron transferleri içeren biyolojik redoks tepkimelerinin sık görünen ürünlerindedirler. 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 (Cheeseman and Slater 1993, Halliwell and Gutteridge 1999). Kontrolsüz bir şekilde reaktif türlerin üretimi, DNA'ları, lipitleri, proteinleri, karbohidratları veya hücrel hasar ve hastalıklarda çıkan zincir reaksiyonlarını içeren biyolojik moleküller mekanizmanın geniş yelpazesinde, önemli ölçüde geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hasara sebep olmaktadır (Akyol et al., 2002). 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 (Halliwell and Gutteridge 1999).

Reaktif oksijen türleri (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.

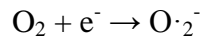
Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilebilen oldukça aktif atom veya moleküllerdir. Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Her tip 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 (Valko et al., 2007, Knight 2000). İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan 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 (Seifried et al., 2007).

Oksijen (O₂) ve nitrojen molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır. O₂in kısmi indirgenmesinden, ROT olan hidroksil ($\cdot\text{OH}$) radikali ve O₂⁻ \cdot oluşmaktadır. Ayrıca singlet oksijen (¹O₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) molekülleri, radikal olmayan ROT olarak ifade edilirler. Oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit (NO \cdot), peroksinitrit (ONOO⁻ \cdot), lipid peroksidasyon (LPO) sırasında oluşan peroksil (ROO \cdot) ve karaciğerdeki karbon tetraklorür (CCl₄) metabolizması sırasında oluşan triklorometil (CCl₃ \cdot) radikalidir (Seifried et al., Lam et al., 2008).

Organizmada oluşan serbest radikallerin en önemlileri ve büyük kısmı O₂ kaynaklı radikallerdir. O₂ in toksik etkisi yoktur, ancak aerobik hücre metabolizması sırasında serbest oksijen radikallerine dönüşür. O₂ in kısmi indirgenmesinden, ROT arasında yer alan $\cdot\text{OH}$ ve O₂⁻ \cdot oluşmaktadır. Ayrıca ¹O₂ ve H₂O₂ molekülleri radikal olmayan reaktif oksijen türevleridir (Russell et al., 1989, Van Wijk et al., 2008).

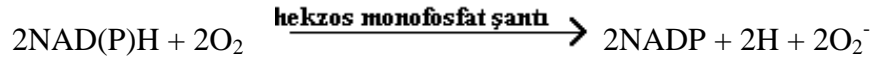
Süperoksit radikali (O₂⁻ \cdot), O₂in indirgenmesi ile oluşan ilk üründür. En önemli kaynağı, mitokondriyal elektron iletim zinciridir.



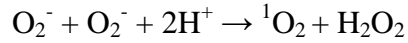
Yarılanma süresi uzun, ancak tepkisi düşük bir radikaldir. O₂⁻ \cdot , O₂in oksidatif fosforilasyon esnasında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD(P)H)-oksidaz veya ksantin-oksidaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde bir elektron indirgenmesi sonucunda meydana gelmektedir. O₂⁻ \cdot in yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz (SOD) enziminin varlığına bağımlıdır. Ayrıca, indirgeyici moleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken O₂⁻ \cdot oluşur.

Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler gibi yüzlerce molekül aerobik ortamda oksitlenirken O_2^- yapımına neden olurlar. Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında O_2^- bir ürün olarak oluşabilmektedir (Knight., 2000, Mruk et al., 2002).

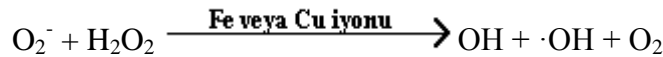
Dokularda O_2^- -in en önemli kaynağı, polimorfonükleer lökosit (PMNL) fonksiyonları sonucu üretilendir. Daha az miktarda olmakla birlikte eozinofil ve lenfositler de antibakteriyel bir ajan olarak O_2^- üretirler. PMNLlerde O_2^- üretimi membran bağlı azalmış NAD(P)H-oksidadaz şantı (veya heksoz monofosfat şantı) yolu ile gerçekleşir (Knight., 2000, Leusen et al., 1996).



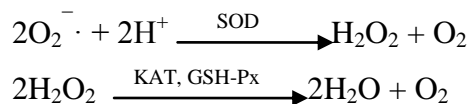
O_2^- , $\cdot\text{OH}$ radikaline göre zayıf reaktif özelliği olan bir moleküldür, yine de biyolojik dokulara zarar verebilir. Hücre hasarına neden olarak, sıvı ortamda spontan bir biçimde H_2O_2 ve $^1\text{O}_2$ radikaline dönüşebilir. O_2^- -in, osteoklastların kemiğe yakın yüzeylerinde de bulunduğu ve kemik matriks yıkımında da görev aldığı gösterilmiştir (Peskin., 1997, Raha et al., 2002).



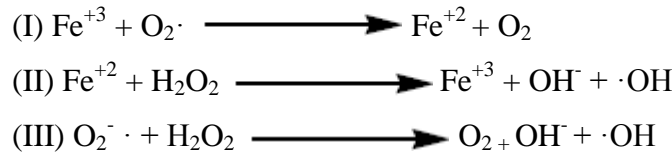
O_2^- , H_2O_2 radikali ile reaksiyona girerek daha etkili $\cdot\text{OH}$ radikaline de dönüşebilir. Bu reaksiyon için metal iyonlarına [demir (Fe^{+2}) ve bakır (Cu^{+2})] gereksinim vardır.



Dokulardan O_2^- -in uzaklaştırılması, H_2O_2 spontan dismutasyonu yolu ile olur. Bu reaksiyon SOD enzimi tarafından da katalizlenir. H_2O_2 , glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) enzimleri ile uzaklaştırılır (Knight 2000, Peskin 1997, Juranek and Bezek 2005).



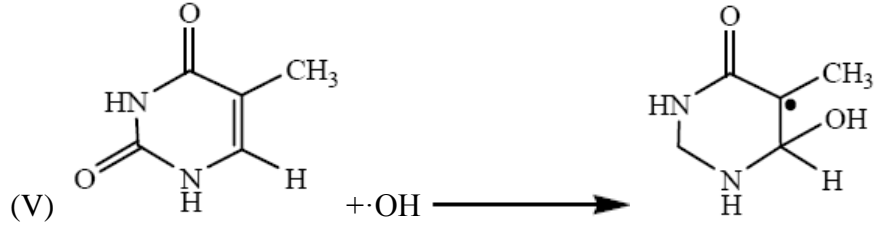
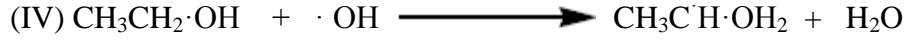
Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), bilinen en reaktif radikaldır ve radikallerin radikali olarak da adlandırılır. Bu radikal, DNA sarmallarında kırılmaya sebep olur, hidroksilasyon için temel oluşturur ve gen mutasyonlarına neden olarak malign transformasyonlara veya hücre ölümlerine yol açar. $\cdot\text{OH}$ aynı zamanda klasik serbest radikal reaksiyonunu (LPO) da stimüle etmek yoluyla doku yıkımında rol oynamaktadır. $\cdot\text{OH}$, membran fosfolipitlerine yakın bölgede oluşursa, lipit zincirlerini etkiler ve peroksil radikalleri, H_2O_2 ve lipit hidroperoksitleri gibi ara radikaller oluşur. Hidroksiperoksitlerin birikimi, membran fonksiyonlarını bozabilir veya hidroksiperoksitler ayrılarak sitotoksik aldehitlere dönüşebilir. $\cdot\text{OH}$, en aktif ve en toksik oksijen radikali olarak üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. $\cdot\text{OH}$, iyonlaştırıcı radyasyonun (x -ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi H_2O_2 molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir. Fe^{+2} , Cu^{+2} gibi metal iyonları tarafından katalizlenen bu indirgenme reaksiyonu Haber-Weiss tepkimesi olarak bilinmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması

IV ve V numaralı reaksiyonlar, III numaralı reaksiyonun ara basamaklarıdır (Şekil 2) (Sharpe et al., 2003, Liochev and Fridovich 2002).

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot\text{OH}$, su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler, $\cdot\text{OH}$ in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Liochev and Fridovich 2002, Kehrer 2000).



Şekil 2. OH radikalının biyolojik moleküllerle reaksiyonları

$\cdot\text{OH}$ radikalının sebep olduğu en önemli hasar, LPO olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. $\cdot\text{OH}$ radikalının başlıca hedefi, hücre zarı su içermediğinden dolayı yağ asididir. Zar lipitlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozabilmekte ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Sharpe et al., 2003, Liochev and Fridovich 2002).

Singlet oksijen radikali ($^1\text{O}_2$), eşleşmemiş elektron taşımadığı için gerçek bir radikal değildir. O_2 in yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında, dış yörüngesindeki bir elektronun enerjisinin değişmesi ve stabilitenin bozulmasıyla oluşur. O_2 in kinetik olarak uyarılan bu formu, membran lipitleri ile oldukça yüksek reaktivite gösterir ve hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle (PUFA) reaksiyona girmesiyle, lipid peroksitlerin oluşumuna yol açabilmektedir. $^1\text{O}_2$ in yarılanma ömrü 10^{-6} ile 10^{-5} saniye arasında olup karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir fakat doku hasarındaki rolü ile ilgili net bir bilgi yoktur (Khan and Kasha 1994).

Hidrojen peroksit radikali (H_2O_2), O_2 in enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da $\text{O}_2\cdot^-$ radikallerinin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Güçsüz bir oksidan olmasına rağmen hücre membranlarından kolayca diffüze olabildiği için ve ayrıca geçiş metalleriyle Fenton reaksiyonuna girdiği için hasar oluşturmada yüksek potansiyele sahiptir. Esasen H_2O_2 in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metal iyonlarının varlığında $\cdot\text{OH}$ radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 , özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan Fe^{+2} ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif formlarını oluşturur. Bu formdaki demir molekülleri çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre

zarlarında LPO gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Ayrıca bu radikal birtakım intraselüler olayları da tetikler, örneğin birçok pro-enflamatuvar sitokinin transkripsiyonundan sorumlu nükleer faktör kappa-B (NF-κB)' nin oksidasyonunda rol oynar. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂in derhal ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan KAT ve GSH-Px yerine getirir (Gutteridge et al., 1990, Imlay et al., 1988, Winterbourn., 1995).

Fizyolojik olarak serbest radikaller 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. Ayrıca bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, x ışınları gibi radyant enerjinin emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç kullanımı (parasetamol, nitrofurantoin gibi), solventler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler (Valko et al., 2007).

Patolojik olarak birçok malignite, diyabet, ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıkla ilişkili olan serbest radikallerin en zararlı biyolojik etkisi; hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması ve LPO olarak bilinen bir reaksiyon zincirini başlatarak, membran proteinlerine hasar verip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmasıdır (Gutteridge., 1995).

2.1.1. Bütiyonin Sülfoksimin (BSO)

BSO sentetik bir aminoasittir. BSO gama glutamilsistein sentetazı geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Böylece oksidatif stres hasarına karşı hücreleri koruma ile görevli GSH tüketerek hücrenin ölümüne yol açabilmektedir. Yüksek GSH seviyeleri alkilleyici ajanlar ve platin bileşikleri için tümör hücre direnci ile ilişkilidir. Glutatyona zarar veren BSO, ilaca dirençli tümörlerde çeşitli kemoterapi ajanlarının sitotoksititilerini arttırabilmektedir (Nazıroğlu 2011).

BSO geri dönüşümsüz inhibe gama glutamil sistein sentetaz ile birlikte GSH tüketen bir amino asittir. Bu enzimin inhibisyonu, glutatyon sentezi için önemli bir

adıdır. İnsan T- lenfositinde ve makrofaj aktivasyonunun inhibisyonunda proliferatif yanıtını inhibe ettiği gösterilmiştir (Nazıroğlu et al., 2011b).

BSO nun etkileri ile ilgili çalışmalar, şu görüşü desteklemektedir ki; BSO bazı hücre içi faktörlerin üretilmesinin kademeli olarak başlatılmasında rol oynamaktadır. Böylece hücrel oksidatif stres ve TRPM2 kanal aktivasyona neden olmaktadır. Bu sonuçlar, GSH inhibitörlerinin, intraselüler GSH'nin düzenlenmesinde önemli bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Bu etkisini, oksidatif stresle aktive edilmiş TRPM2 kanal aktivasyonu ve bu kanalların aktivasyonuna bağlı Ca^{+2} akımları ile sağlayabileceği düşünülmektedir (Özgül and Nazıroğlu 2012).

2.2. Antioksidanlar

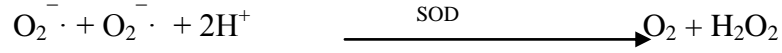
Fizyolojik koşullarda; antioksidanlar, ROT hasarını önlemek için üretilen süpürücü moleküllerdir. İnsan vücudunda, enzimatik antioksidan ve non-enzimatik antioksidan olmak üzere iki tip antioksidan savunma sistemi mevcuttur (Nazıroğlu 2007).

2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, nötralize ROT hasarını ve hücrel yapıya zarar vermesini önleyen doğal antioksidanlar olarak da bilinmektedirler. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), ve glutatyon reduktaz (GR) olmak üzere dört önemli antioksidan maddeleri ihtiva etmektedir (Nazıroğlu et al. 2004).

Antioksidan enzimlerin başlıcaları SOD, KAT ve GSH-Px'dır (Blokina et al., 2003).

Süperoksit Dismutaz (SOD): $O_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. Metalloprotein olan SOD, hücrelerdeki $O_2^{\cdot-}$ düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir $O_2^{\cdot-}$ radikalini yükseltirken, diğer $O_2^{\cdot-}$ radikalini H_2O_2 e indirger (Greenwald 1990).



Memelilerde üç tip SOD izoenzimi tanımlanmıştır:

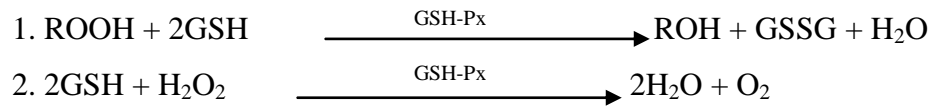
1. *Çinko-Bakır (Cu-Zn) SOD*: Genellikle sitozolde ve lizozomda lokalizedir. Bakır (Cu) ve çinko (Zn) atomları arasındaki köprü histaminle sağlanır. Cu atomları enzimatik aktiviteden sorumluyken, Zn atomları enzimin stabilitesinden sorumludur. Cu-Zn SOD'nin antioksidan savunmada ilk sırada yer aldığı düşünülmektedir (Peskin 1997).

2. *Manganez (Mn) SOD*: Mitokondriyal SOD olarak da ifade edilen Mn-SOD, bakterilerden yüksek yapılı organizmalara kadar birçok kaynaktan izole edilebilmiştir (Macmillan-Crow and Cruthirds 2001).

3. *Ekstraselüler SOD (EC-SOD)*: Ekstraselüler bölümlere salgılanan ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilen EC-SOD, Cu-Zn SOD gibi kofaktör olarak Zn ve Cu kullanır. EC-SOD'un $\text{ONOO}^{\cdot -}$ aktivitesini önlediği düşünülmektedir (Greenwald 1990).

SOD aktivitesi, yüksek O_2 kullanımı olan dokularda, özellikle eritrositlerde fazladır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de SOD fazla miktarda bulunmaktadır (Peskin 1997, Greenwald 1990).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Glutasyon yolunun ilk enzimi olan GSH-Px, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (Bhamre et al., 2000).



GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan H_2O_2 radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldırabilme özelliği gösterir (Zachara et al., 2006).

GSH-Pxın selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere, farklı substratlar kullanan iki tipi bulunur. Selenyumdan bağımsız formu organik H₂O₂ moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (Bhamre et al., 2000, Cheng et al., 1999).

Majör peroksit uzaklaştırıcı olarak görev gören GSH-Px ın fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Endoplazmik retikulumdan salınan H₂O₂in dekompozisyonunun primer sorumlusu olan GSH-Px aktivitesindeki azalma, H₂O₂in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır.

Ayrıca GSH-Px, araşidonik asit metabolizmasının iki temeli olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz yollarının aktivasyonunu arttırarak, tümör oluşumunda anahtar rol oynar.

Katalaz (KAT): Glikoprotein yapısında, içeriğinde Fe⁺³ bulunduran dört hem grubuna ayrılmış bir hemoproteindir. SOD ın oluşturduğu H₂O₂ in, peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalanmasında rol alır (Vaziri et al., 2003).



KAT, hemen hemen tüm memeli hücrelerinde, ağırlıklı olarak eritrosit, karaciğer ve böbrekte bulunur. Kansersiz dokularda, sağlıklı dokulara oranla daha yüksek miktarda bulunan KAT, özellikle H₂O₂in yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda etkilidir. Eritrositler, KAT aktivitesinin %98'inden fazlasını sağlamaktadır (Greenwald 1990).

2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon (GSH): Sistein içeren bir tripeptit olan GSH, in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve eksojen bir antioksidandır. Peroksidazlar

için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir .

Ökaryotik hücrelerde GSHun yaklaşık %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride ve çok az bir kısmı da endoplazmik retikulumda bulunur. GSH oksidasyonu, apoptozis sürecinin erken dönemdeki belirtisidir ve metabolik sinyal görevi görebilir (Hall 1999, Salinas and Wong 1999).

DNA sentezi ve hasarlı parçalarının onarılmasında etkin olan GSH; aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur ve eksikliği hücre ölümüne yol açar (Hall 1999, Matthews and Butler 2005).

C Vitamini (Askorbik Asit): Suda eriyebilen bir vitamin olan askorbik asit; O_2 , 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. O_2^- ve $\cdot OH$ radikalleriyle reaksiyona girip, onları temizlemesinin yanısıra tokoferol radikalinin tekrar tokoferole dönüşümünü sağlar. Kollajen sentezinde, tirozin yıkımında, epinefrin sentezinde ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda görev alır. Ayrıca düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve kolesterolün oksidasyonunu önleyerek ateroskleroza karşı korumaya katkıda bulunur (Birlouez-Aragon and Tessier 2003).

C vitamini yetersizliğinde hücredeki GSH miktarı da azalır. Plazma C vitamin düzeyleri özellikle 0,2 mmol/l düzeyinin altına indiğinde oksidan etki de gösterebilir, yine bu şartlarda O_2^- üretimine katkıda bulunabilir.

C vitamininin iki ana formu vardır:

1. L-askorbik asit: Güçlü indirgeyici ajandır.
2. L-dihidroaskorbik asit(DHAA): Okside formudur (Duarte and Lunec 2005).

E Vitamini: Alfa, beta, gama, delta gibi çeşitli formları olan E vitaminin α -tokoferol formu, en geniş doğal dağılıma ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanıdır. Yağda çözünebildiği için hem selüler hem de subselüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur.

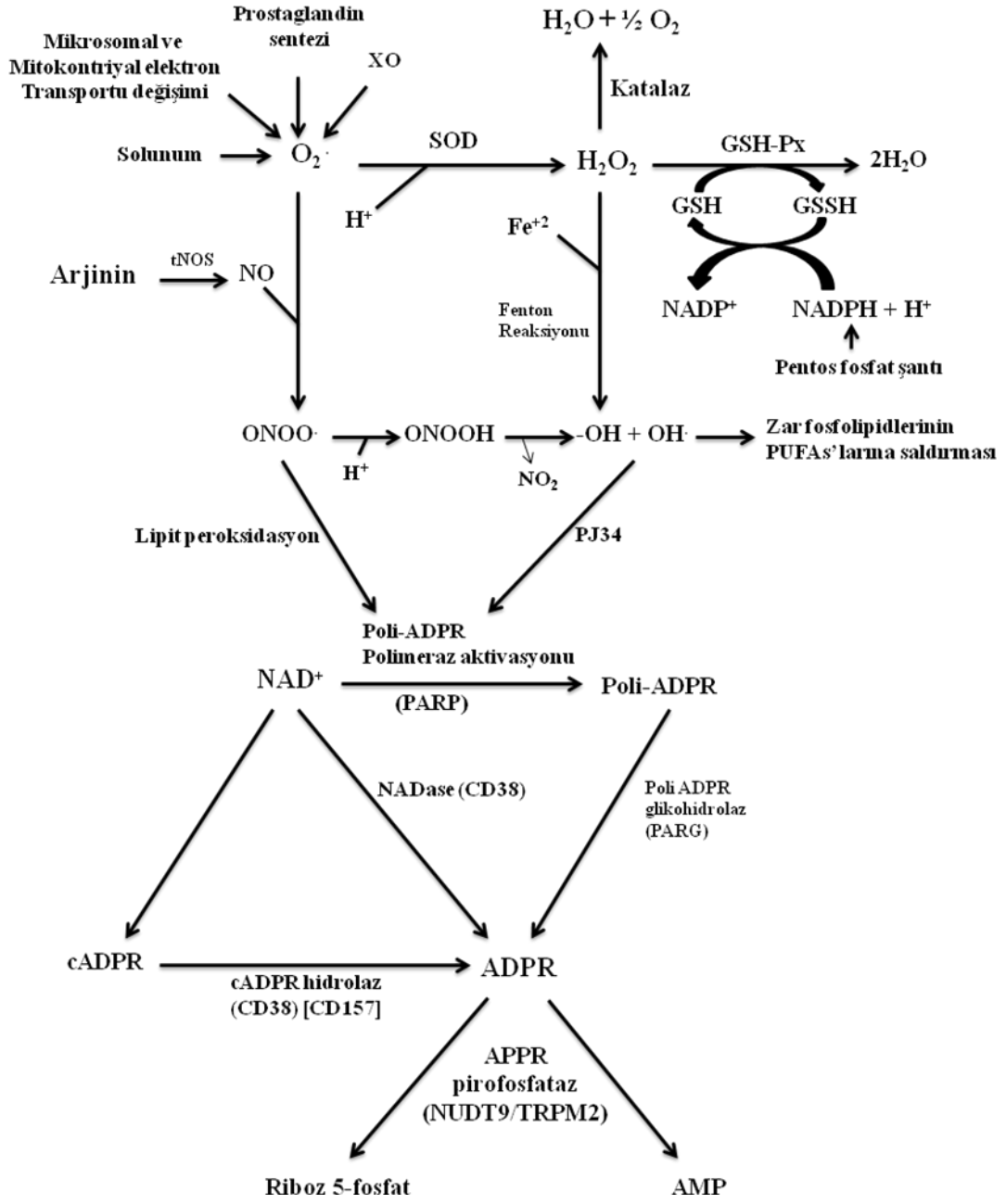
Membranlarda oksijen radikallerinin aktif temizleyici olan E vitamini; özellikle en aktif formu olan α -tokoferol, zincir kırıcı antioksidan olarak işlev görür.

Tokoferoller $^1\text{O}_2$ ile reaksiyona girer ve membranı bu radikale karşı korur. Ayrıca A vitamini kullanımı ve saklanması, diğere bir antioksidan grup olan karotenoidlerin enzimatik oksidasyona karşı korunmasında da etkilidirler (Duarte and Lunec 2005).

A Vitamini: A grubu vitaminler görme, üreme, büyüme ve epitel doku sağlamlılığı için esastır. α -tokoferol ile karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır (Birlouez-Aragon and Tessier 2003).

Karotenoidler: Doğada 700'ün üzerinde yağda çözünebilen pigmente sahip bir aile olan karotenoidlerin yaklaşık 25 kadarı insanlar tarafından özellikle havuç, domates, greyfurt gibi gıdalarla alınmaktadır (Hinds et al., 1997).

Diyetin yağ miktarıyla ilişkili olarak % 5-50 kadarı ince bağırsakta pasif difüzyonla emilen karotenoidler, triplet molekülleri ve $^1\text{O}_2$ radikalini süpürerek antioksidan aktivite gösterir (Edge et al., 1997).



şekil 3. Hücrede serbest radikallerin üretimi, radikallere etki eden antioksidan sistem ve oksidatif stres sonucunda, NAD^+ dan üç farklı yolla ADPR üretiminin şematik gösterimi. (Nazıroğlu 2007b).

2.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidan bileşiklerin etki şekli ve etkinlik düzeyi oldukça farklıdır. Antioksidanlar; ROT ve nitrojen türlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle

hasarlanmış dokuların tamiri, diğ er antioksidanların onarımı/yenilenmesi ve metal şelasyonu gibi farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar. İdeal bir antioksidan bilinen bu etki şekillerinden çoğunu yerine getirebilir. Biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir (Krinsky 1992).

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Süpürücü etki (Temizleme Etkisi) (Scavenging): ROTni etkileyerek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterir.

2. Bastırıcı etki (Baskılama Etkisi) (Quencher): Vitaminler, flavonoidler ve trimetazidin, radikallere bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya onları inaktif forma dönüştüren bir etkiye sahiptir.

3. Onarıcı etki (Onarma Etkisi) (Repair): Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.

4. Zincir kırıcı etki (Zincir Koparma Etkisi) (Chain breaking): Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller bu tip etki göstermektedir (Pinchuk and Lichtenberg 2002, Klouche et al., 2004).

2.2.4. N - Asetil Sistein

N- asetilsistein (NAC), L-sistein isimli aminoasitten türemektedir ve yapısında sistein bulunmaktadır (Arakawa and Ito 2007). Günümüzde akciğ er hastalıkların tedavisinde yaygın olmasına rağmen, nörolojik hastalıklardaki rolü kesin olarak henüz bilinmemektedir (Welin et al., 2009). Ayrıca hücre koruyucu ve antioksidan özellikleri de vardır. Antioksidan özelliğini, GSH seviyelerini düzenleyerek, doğrudan radikalleri temizleyerek, nötrofil aktivitesi ve TNF üretimini baskılayarak gerçekleştirmektedir (Saricaoglu et al., 2005, Koçkar et al., 2010).

Asetilsistein ve GSH özellikle akciğ erde, enfeksiyonlar esnasında nötrofillerin oluşturduğu serbest radikallerin yanı sıra sigara dumanı ve diğ er zararlı maddelerin solunmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerini de bağlar.

Böylece hücre hasarını önleyerek koruyucu etki gösterir. Aynı zamanda, NAC, deneysel sepsis modelinde, hücre içi genetik metaryel olan DNA'nın oksidatif stresten dolayı hasar görmesiyle bir dizi reaksiyon sonucu oluşan malondialdehid (MDA) düzeylerini düşürmektedir (Van Surell et al., 1992).

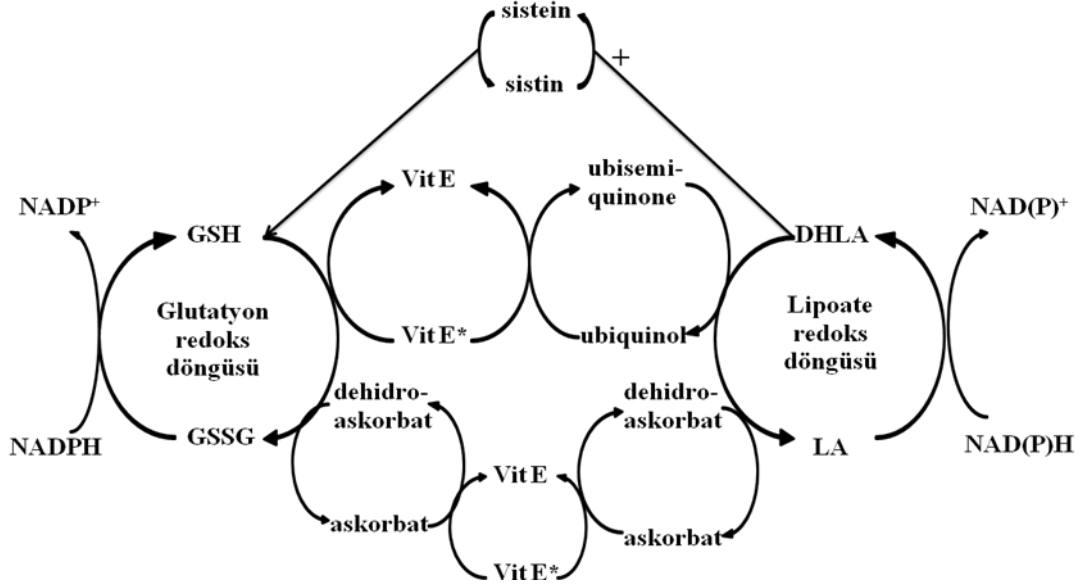
NAC mukolitik bir ilaç olarak 1960 lardan itibaren kullanılmaktadır. Klasik mukolitikler serbest sülfhidril (tiol) grubu içerirler. Mukustaki disülfid bağlarını kırarak, mukoproteinleri parçalar ve mukusun vizkozitesini azaltırlar. Bunların başlıcaları NAC, karbosistein ve erdosteindir. NAC iv, inhalasyon ve oral yol ile alınabilmektedir. Zamanla bu ilacın hücre içinde sistein miktarını arttırarak glutatyon üretimi yolu ile antioksidan özellik gösterdikleri keşfedilmiştir (Jones et al., 1997).

NAC L-cystein ve redükte glutatyonun asetillenmiş öncülüdür. Hücre içi sülfhidrid birikimine sebep olup GSH öncü maddesi olarak rol oynamaktadır (Özgül and Nazıroğlu 2012). Düşük moleküler ağırlıklı olan bileşik, glutatyon prekürsörüdür. Glutatyon stoklarını yeniden doldurmakta, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini arttırmakta, hidroksil radikallerini azaltmakta ve otokatalitik lipid peroksidasyonunu engellemektedir (Yogesh 1994)

Asetilsistein doğal bir aminoasit olan L-Sistein'in N-Asetillenmiş türevi olup mukolitik olarak kullanılan ajandır. Yapısında bulunan sülfidril grubu ile glikoprotein içerisindeki disülfid bağlarını koparma özelliğinden dolayı mukoid ve mukopürülan sekresyonlar üzerine mukolitik etki göstermektedir. Solunum yollarında biriken balgam yoğunluğunu, yapışkanlığını azaltır ve bu özelliği sayesinde balgamı su gibi akıcı kıvama getirir. Balgamın çözülmesinde yardımcı olur. Bronşiyal sekresyonların atılımına ve solunumu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur. Mukolitik etkisinden başka asetaminofen zehirlenmesinde tedavi edici bir ajan olarak da kullanılır. Asetilsistein, asetaminofenin doz aşımına bağlı olarak oluşan hepatotoksisite üzerine etkisini karaciğer GSH seviyesini koruyarak veya arttırarak gösterir (www.wikipedia.org, 09.07.2012).

Tiyoller hücre içersinde her zaman hazır bulunmasıyla ve aerobik yaşam koşullarını sağlama yoluyla, antioksidan savunma mekanizmasında çok önemli ve çok yönlü roller üstlenmektedirler. Tiyoller sadece tek bir bileşenden oluşan antioksidanlar değildir. Sistin ve sistein döngüsünden başlayarak, GSH ve GSSG, E

vitamini, dihidrolipoik asit (DHLA) ve lipoik asit (LA) gibi birçok sinerjik redoks tepkimelerinin oluşumuna öncülük ederek antioksidan mekanizmalarının önemli bir basamağını oluşturmaktadırlar (Sen and Packer 2000) (Şekil 4).



Şekil 4. Tiyol redoks döngüleri antioksidan savunma ağı üzerinde en önemli yere sahiptir. Hem glutatyon hem de lipoate redoks döngüleri kendi indirgenmiş formları olan GSH ve DHLA ları oluşturmak için hücrel indirgeyici eşdeğeri tarafından yürütüldüğünü gösteren, bir dizi sinerjik reaksiyonların şematik gösterimi (Sen and Packer 2000).

2.3. TRP Kanalları

Transient receptor potential (TRP) kanalları ilk defa *drosophila* türü sirke sineklerinin gözlerinde bulunan fotoreseptörler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda 1989 yılında keşfedilmiştir. Mutasyona uğramış bu kanalların sürekli bir ışığa karşı, gelip geçici (kesik kesik) bir gerilim oluşturmasıyla karakterize olduğu saptanmıştır (Clapham 2003). TRP kanalları, memelilerden omurgasızlara kadar, canlıların organizmalarının farklı dokularında proteinlerin çeşitli bir grubunu oluşturmaktadır (Miller 2006). Kalsiyum sinyalinde TRP kanalları, iyon kanallarının yeni bir sınıfının prototip üyeleridir. İlk olarak fotoreseptör hücrelerinde bulunan bu TRP kanallarının, omurgalılarda yaygın olarak bulunan voltaj kapılı kalsiyum

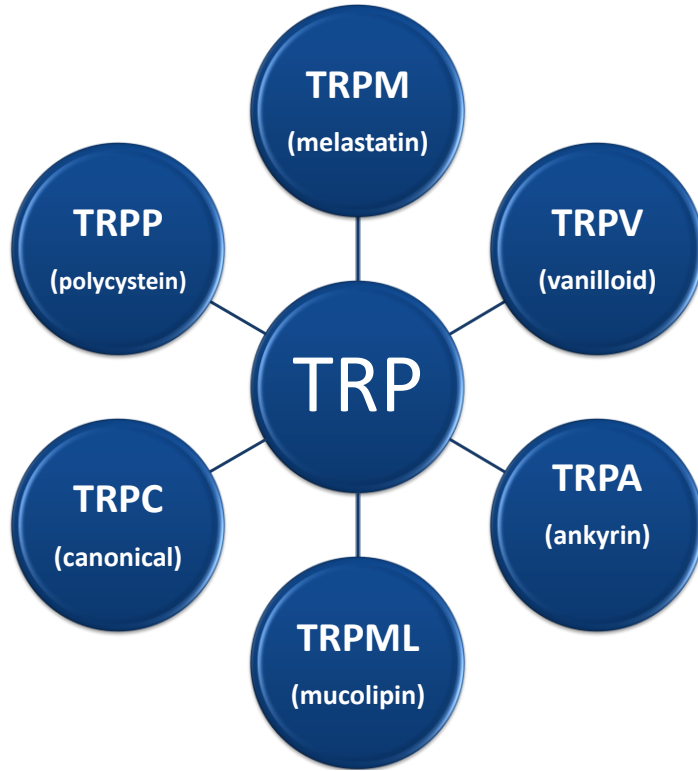
kanalları ile yapısal olarak benzerlikleri bulunduğu anlaşılmıştır. Altı olası transmembran alanları dâhil, S5 ve S6 segmentler arasında gözenek bölgenin bulunması gösterilen benzerliklerden örnek olarak verilebilir (Hardie and Minke 1992).

Transient Reseptor Potential (TRP) katyon kanalları üst ailesi voltaja duyarlı Ca^{+2} 'a geçirgen katyon kanallarının geniş bir yelpazesini içine almaktadır. Memelilere ait toplam yirmisekiz çeşit TRP kanalları altı alt familyaya gruplandırılmıştır (Şekil 5). Bunlar;

TRP *conancial* (TRPC) yedi alt aileden, TRP *vanilloid* (TRPV) altı alt aileden, TRP *melastatin* (TRPM) sekiz alt aileden, TRP *polycystein* (TRPP) üç alt aileden, TRP *mucolipin* (TRPML) üç alt aileden ve TRP *ankyrin* (TRPA) bir alt aileden oluşmaktadır. Tüm bu TRP katyon kanalları henüz tam olarak karakterize edilememesine rağmen, birçok insan hastalığı bu kanalların aktivasyonu ve inaktivasyonu ile alakalı olduğundan bunlara olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Kanal gözeneğinin 5. ve 6. segmentleri arasında bulunan bir iletken iyon etrafında homo veya heterotetromerik düzenlemelerle TRP kanalları voltaj-kapılı K^{+} kanallarına benzer olarak basit bir yapıya sahiptir (Clapham 2003). Dördüncü transmembran segmenti ise pozitif yüklü değildir. TRPV N ucu ve TRPV tekrarlı bağlayıcı, çoklu *ankyrin* içerir. TRPC ve TRPM kanallarına ait 6. segmentin C terminal kısmı Nudix alanı olarak tabir edilen TRP alanı içerir. TRPM2 kanallarında iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasında gerçekleşmektedir. Ayrıca, TRPM2 ve TRPC kanallarının Nudix alanları ADPR pirofosfataz (ADP-ribozu, riboz 5- fosfat ve adozin monosfosfata parçalar ve kanal açılır) enzim aktivasyonu içermektedir. ADPR pirofosfataz aktivasyonu TRPV kanallarında yoktur. Buna ilaveten bütün TRP kanalları çok yönlü düzenleyici protein etkileşim alanlarına sahiptir. Çok yönlü Protein Kinaz A (PKA) ve Protein Kinaz C (PKC) varsayılan fosforilasyon alan fonksiyonları tanımlanmış ve kısmen test edilmiştir. Bir de birkaç TRP kanallarında *Phosphatidylinositide* 3-kinase SH2- tanıma alanları varlığı ispatlanmıştır (Watanabe et al., 2008).

TRP kanalları ya direkt olarak plazma zarlarındaki Ca^{+2} giriş kanalları gibi davranmakta ya da Ca^{+2} giriş kanallarının modülasyonu için itici güç olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarında değişime yardımcı

olmaktadırlar (Özgül ve Nazıroğlu 2011). Karakterize edilmiş tüm işlevsel TRP kanalları - bir istisna olarak TRPM4 ve TRPM5 dışında - Ca^{+2} için geçirgendirler. Bu durum sadece monovalent (tek değerliğe sahip) katyonlar için geçerli değil, aynı zamanda Ca^{+2} ve Mg^{+2} içinde geçerli olacaktır. İki memeli TRPleri, TRPV5 ve TRPV6, Ca^{+2} 'a çok geçirgendir. TRPM6 ve TRPM7 Mg^{+2} 'a çok geçirgen, TRPV1,TRPML1 ve TRPP3 kanalları da H^{+} iyonlarına ise çok geçirgendirler (Nilius, 2007).



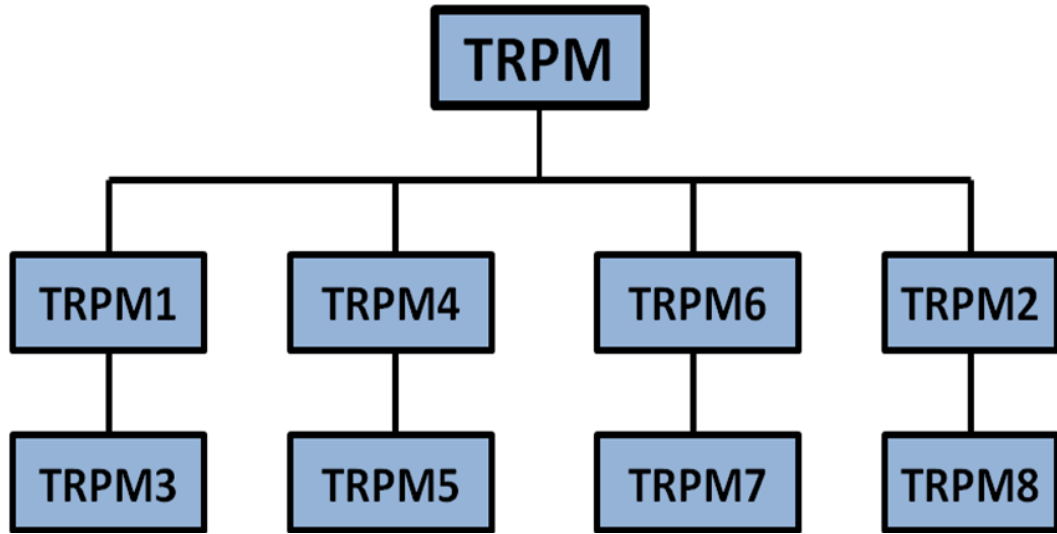
Şekil 5. TRP üst ailesinin altı alt aileden oluştuğunu gösteren şematik şekil.

2.3.1. TRPM Katyon Kanalları

TRPM alt ailesinin sekiz üyesi vardır ve bunlar 4 grup içerisinde yer alırlar. Bunlar; TRPM2/TRPM8, TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5 ve TRPM6/TRPM7 dir (Nazıroğlu 2007b) (Şekil 6).

Hem TRPM6 hem de TRPM7 fonksiyonel karboksil ($-COOH$) terminal *serin/treonin* kinaz içerirken, TRPM2 ADPR pirofosfataz faaliyeti gösteren

fonksiyonel NUDT9 homoloji alanı içerir. Ca^{+2} u çok geçirenden, (TRPM6/TRPM7) Ca^{+2} 'u geçirmeyene kadar (TRPM4 ve TRPM5) Ca^{+2} geçirgenliği farklılıklar gösterir. Buna rağmen TRPM1 kanalı hariç tüm TRPM katyon kanalları bu güne kadar karakterize edilmemişlerdir. TRPM4 ve TRPM5 ısıya duyarlı Ca^{+2} aktif kanallarıdır (Nilius ve arkadaşları, 2007). TRPM2 ADPR, H_2O_2 ve sıcaklıkla aktif hale gelir. TRPM3 kanalları TRPM6 ve TRPM7 kanallarına benzer şekilde hücre içi Mg^{+2} seviyesi vasıtasıyla düzenlenir. Hücre şişmesi gibi bazı mekaniksel uyarımların TRPM3 kanallarını aktive ettiğine dair raporlar mevcuttur. (Hara et al., 2002, Clapham 2007, Nilius et al., 2007, Nazıroğlu et al., 2007, Yamamoto et al., 2008). Yakın zamanlarda yapılan bir araştırmaya göre; düşük sıcaklıkla ve mentol ile aktive edilen TRPM8 kanallarının hem tekrar vücut sıcaklığına dönüldüğünde ve hem de ACA uygulandığında, önemli ölçüde kanalların inaktive olduğu rapor edilmiştir (Nazıroğlu and Özgül 2011)



Şekil 6. TRPM kanalları dört alt grup olmak üzere toplamda sekiz alt üyeden oluşmaktadır.

2.3.1.1. TRPM2 Katyon Kanalları

2.3.1.1.1. Basit Yapısı

TRPM kanalları, TRP ailelerinin diğer üyeleriyle sınırlı miktarda benzerlik göstermektedir (Kühn et al., 2005). Beş ve altıncı segmentler arasında bulunan açıklık ile birlikte toplam altı olası transmembran açıklık içeren kanalın orta kesimiyle sınırlıdır. Bu temel kanal yapısı, voltaj kapılı kanalların en önemli temsilcileri olan kalsiyuma, potasyuma ve sodyuma geçirgen voltaja duyarlı kanallar başta olmak üzere birçok iyon kanallarında ortak özelliktir (Hofmann et al., 2003). Her nasılsa, TRPM alt ailelerine ait diğer kanallar (TRPM4, TRPM5, TRPM8) bazı voltaj bağımlı kanalların açılma mekanizmalarına benzemesine rağmen, klasik S4 gerilim sensörüne sahip değildir (Nilius et al., 2003, Voets et al., 2004). TRPM alt familyalarının tüm üyelerine ait benzersiz bir özellik; yaklaşık 700 amino asit kalıntılarının N-terminal bölgesinde bulunuyor olmasıdır. TRPM2 kanalları; C, N ucu ve bu ikisi arasında bulunan transmembran bölge olmak üzere toplam üç ana bölgeden oluşmaktadır. TRPM2 kanallarının en önemli özelliği bu C ucunda bulunan ve Nudix bölgesi olarak adlandırılan alanın bulunmasıdır ki bu kanalların açılması için gerekli kilit yeridir ve kanalın açılmasına olanak sağlamaktadır. Kanal birimlerinin ve/veya zar yapısına uygun montajı için TRPM2 N-terminal kısmının zaruri olduğu da ileri sürülmüştür (Perraud et al., 2003).

2.3.1.1.2. C-Terminal Ucu NUDT9 Homoloji Alanı

Önemli benzeşimi ile (% 39 sekans kimliği ile (Shen et al., 2003)) insan nükleozid difosfat bağlantılı X-tipi motif 9 (NUDT9) ADPR pirofosfataz yapısını taşıyan TRPM2 nin C-terminal alana sahip olması onun önemli bir özelliğidir (Hara et al., 2002, Perraud et al., 2003, Inamura et al., 2003). NUDT9 enzimi substrat olarak kullandığı ADPR 'un hücre içi uygulanması TRPM2 katyon kanallarının açılmasına neden olmaktadır (Perraud et al., 2001). Kristal yapı analizleri ve

biyokimyasal çalışmalar; katalitik bir aktivite içeren C-terminal alanı ve bağlayıcı ADPR'ü destekleyebilen N-terminal alanın içerisinde, insan NUDT9 enziminin fonksiyonel olarak ayrılabilceğini ortaya koymuştur (Shen et al., 2003). 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 (Kühn and Lückhoff 2004, Perraud et al., 2003).

2.3.1.2. TRPM2 Kanallarının Aktivasyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

Aktif TRPM2 katyon kanallarının açılması üzerinde üç hücre dışı etken (aktivatör) bilinmektedir. Bunlar; Oksidatif stres, ADPR/NAD⁺ metabolizması ve tümör nekroz faktörü alfa' dır (Hara et al., 2002). TRPM2 için vücut ısısı endojen bir ko-faktör gibi davranması sebebi ile TRPM2 kanallarının sıcaklığa duyarlı olabileceği de tahmin edilmektedir (Togashi et al., 2006).

2.3.1.2.1. Oksidatif Stres

Süperoksit, H₂O₂ ve singlet oksijen içeren ROT aşırı üretildiğinde veya enzimatik ve non-enzimatik savunma işlemleri engellendiğinde, mitojenik sinyal iletimi gibi karmaşık süreçlerde hücre habercisi olarak hücrenin düzenlenmesinde rol alırlar (Nazıroğlu 2007a, 2007b). Birçok hücre içi ve dışı molekülleri nöronal doku hasarına ve apoptozuna katılabilirken, oksidatif stres ürünlerinin birikimi, ROT' un aşırı üretimi, hücre hasarı ve ölümü için potansiyel bir faktör olarak görünmektedir (Özgül and Nazıroğlu 2012).

Oksidatif stres, H₂O₂ uygulaması bir deneysel oksidatif stres modeli olarak, TRPM2 akımları ve çeşitli hücre tipleri TRPM2 ile hücre transfeksiyonu sonrası serbest hücre içi Ca⁺² artışını hem pankreas β hücrelere, hem nötrofil granülosit ve

hem de U937 monositlerine indükler (Nazıroğlu and Lückhoff 2008b, Inamura et al., 2003, Heiner et al., 2003, Perraud et al., 2001, Yamamoto et al., 2008). Ancak, H₂O₂ kaynaklı TRPM2 kanal aktivasyonu için kesin aracı molekülleri tespit edilmemiştir. TRPM2'nin ROT duyarlılığı NAD⁺ veya mitokondri ve protein oksidasyonu üzerinden salınan ADPR tarafından belirlenmektedir (Hara et al., 2002, Wehage et al., 2002, Guse et al., 2005). H₂O₂ ve cADPR düşük konsantrasyonları ADPR 'un etkisini potansiyalize etmek için ve daha yüksek konsantrasyonlarda doğrudan TRPM2 kanalını açmak için etkileri oldukları ileri sürülmüştür (Massullo et al., 2006).

2.3.1.2.2. ADPR, NAD ve cADPR

TRPM2 üzerinden Ca⁺² girişi ADPR üretiminin gerçekleşmesiyle meydana gelir. ADPR bir mitokondriyal kaynaktan veya poly-ADPR'un alternatif aktivasyonu üzerinden ortaya çıkabilir (Guse et al., 2005).

NAD⁺ 'ın TRPM2 kanalını uyardığı bildirilmiştir (Hara et al., 2002). Nudix alanı indirgenmiş nükleozid difosforazın bir sınıfında olduğu bilinen pirofosforazların bir uzlaşma bölgesidir (Nazıroğlu 2007b) (Şekil 3, 7). Aslında, NAD⁺ ürününü ve cADPR, kalsiyum serbest ryanodin reseptörleri aracılığı ile uyarılan hücre içi ikincil haberciyi temsil eden ADPR, TRPM2 nudix alanına yapışır (Nazıroğlu 2009). TRPM2 tarafından ADPR hidrolize edilirken, aynı zamanda o da TRPM2 yi etkinleştirir. ADPR infüzyonu, patch pipeti yardımıyla TRPM2 akımlarını indükler (Perraud et al., 2001, Hara et al., 2002). NAD⁺ 'ın da TRPM2 kanalını uyardığı bildirilmiştir (Hara et al., 2002, Kühn and Lückhoff 2004, Kühn et al., 2005). Yukarıda bahsedilen NAD⁺ 'ın TRPM2 kanalını doğrudan etkilediğini son daha yakın zamanda yapılan bir çalışma ile de desteklenmiştir. Dolayısıyla, her iki çalışmanın sonuçları; NAD⁺ 'ın TRPM2 kanalını uyardığı fikrini desteklemektedir (Nazıroğlu and Lückhoff 2008a, 2008b).

Daha önce yayınlanmış verilere göre; H₂O₂ tarafından TRPM2 kanallarının açılacağı ve bağımsız ADPR, TRPM2 kanallarını açmak için H₂O₂'i kullanmasının mümkün olduğunu öne sürülmüştür (Hara et al., 2003, Wehage et al.,

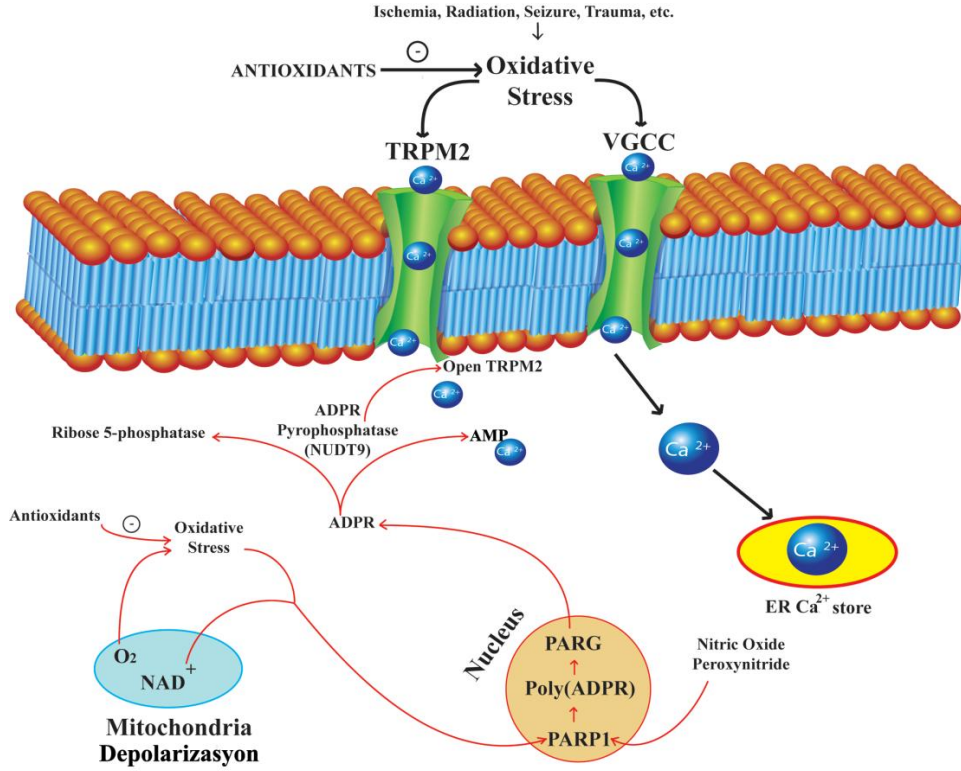
2002). Çünkü mitokondri içinde büyük ölçüde TRPM2 aktivasyonu H₂O₂ aracılığıyla ADPR konsantrasyonunun artırıldığı, H₂O₂'nin kanal açma mekanizmasının mitokondride ADPR'i sentezlemek için oksidatif strese ihtiyaç duyduğu kanıtlanmıştır. Fakat, son zamanlarda yapılan çalışmalar göstermektedir ki; H₂O₂ mitokondride ve aynı zamanda ADPR' nin potansiyalize ko-faktörünün bir fonksiyonu olarak ADPR' nin serbest bırakılmasını başlatırken, H₂O₂ TRPM2 kanalını harekete geçirmek için kendi kendine yeterli uyarıcılar oluşturabilmektedir (Kolisek et al., 2005, Özgül and Nazıroğlu 2012). Yine son zamanlarda yapılan bir çalışmaya göre, *Whole Cell* (tüm hücre) yöntemiyle alınan kayıtlarda TRPM2 aktivasyonu H₂O₂ tarafından görece hızlı olduğundan ve alınmış zar yamalarındaki karışım tek kanallı faaliyetleri tetiklediğinden ve H₂O₂ aracılı TRPM2 aktivasyonu doğrudan bir kanal açma mekanizması olarak görüldüğü rapor edilmiştir (Nazıroğlu and Lückhoff 2008a). Hücrelerin bulunduğu *patch* çemberine H₂O₂ eklendikten sonra hücre *inside-out* (içi dışarıda) kayıtları alınıp, hücre içi tampon ile yıkandıktan sonra, H₂O₂ tekrar verildiğinde, kanalın hücre içi bileşeni olmamasına rağmen H₂O₂'nin ikinci bir yönetimiyle tekrar kanalın etkinleştiği gözlemlenmiştir. Bu deneyimden yola çıkarak alınmış zar yamasında gözlenen tek kanal aktivitesi büyük olasılıkla doğrudan kanal açma mekanizma kaynaklı olduğu sonucu çıkmaktadır (Nazıroğlu and Lückhoff 2008a).

TRPM2 aktivasyonu üzerinde metodolojik problemler NAD⁺, ADPR ve H₂O₂ sebebiyle farklı raporların verilmesine neden olmuştur. Örneğin; daha önce yapılan bir çalışmadaki (Wehage et al., 2002) bir ifadede "*human embryonic kidney 293 (HEK293)*" hücreleri kullanılarak, H₂O₂ tarafından indüklenen TRPM-C nin varyant ek yeri karakteristik akımlar yoluyla gösterildi. Daha sonraki deneylerde, yeterli bir tutarlılık ile TRPM2 vahşi bir tipinin kullanıldığı "*Chinese hamster ovary (CHO)*" hücrelerinde, H₂O₂ ile kanalların uyarımı çoğu araştırmacılarca mümkün olmasına rağmen NAD⁺ ile uyurabilen çalışmalarda mevcuttur (Kolisek et al., 2005).

H₂O₂, ADPR ve metabolitleri ile TRPM kanallarının aktivasyonu çalışılmasında farklı hücre tiplerinin kullanılması ikinci bir farklı sorunu ortaya çıkarmaktadır. Öte yandan TRPM2'nin endojen ifadesiyle birlikte hücrede, H₂O₂ tarafından kanal aktivasyonu görünür. Örneğin, HEK293 hücrelerinde (Hara et al., 2002, Wehage et al., 2002), CHO hücrelerinde (Nazıroğlu et al., 2007), GRI-GI rat

insülinoma hücrelerinde (Fonfria et al., 2005) ve AKG hücrelerinde TRPM2 kanalları H₂O₂ tarafından aktive edilebilmektedir (Özgül and Nazıroğlu 2012). Fakat insan nötrofil granülosit hücrelerinde H₂O₂ TRPM2 kanalını aktive edememektedir (Heiner et al., 2003). Kolisek ve ark. (2005) HEK293 hücrelerini kullanıp, cADPR tarafından açılan TRPM2 kanalının, bu bileşik tarafından uyarıldığını gözlemlediler. Sonra, bu rapor sonuçları Gasser ve ark. (2006) tarafından desteklenmiş ve Jurkat hücrelerinde TRPM2 kanalları cADPR tarafından açılmıştır. Fakat, daha yeni bir çalışma nötrofil granülositlerinin sonuçlarını desteklemediğini ve cADPR'nin uyarımıyla TRPM2 kanallarının açılmadığını rapor etmişlerdir (Heiner et al., 2006).

ADPR bağımlı kanal açılımına bağlı olarak; hem doğal hem yapay olmak üzere çeşitli grupların TRPM üzerindeki çalışmalarda uyumlu sonuçlar vermiştir. Çünkü, ADPR'un düşük konsantrasyonlarının hücre içi uygulanmasından sonra tam uzunlukta TRPM2 kanalları sıfır gecikme ile açılmıştır (Nazıroğlu et al., 2011a). Dahası, kanalın maksimum açılma seviyesinin yarısı için gerekli olan ADPR konsantrasyon miktarı, TRPM2 nin hem NUDT9 ADPRase hem de NUDT9-H yapısı ile benzerlik göstermektedir. Bu bulgular ADPR un kanalı doğrudan açtığını ortaya koymaktadır. ADPR ve TRPM2 arasındaki bu etkileşime sebep olan şeyin NUDT9-H alanı olduğu kanıtlanmıştır (Şekil 7).



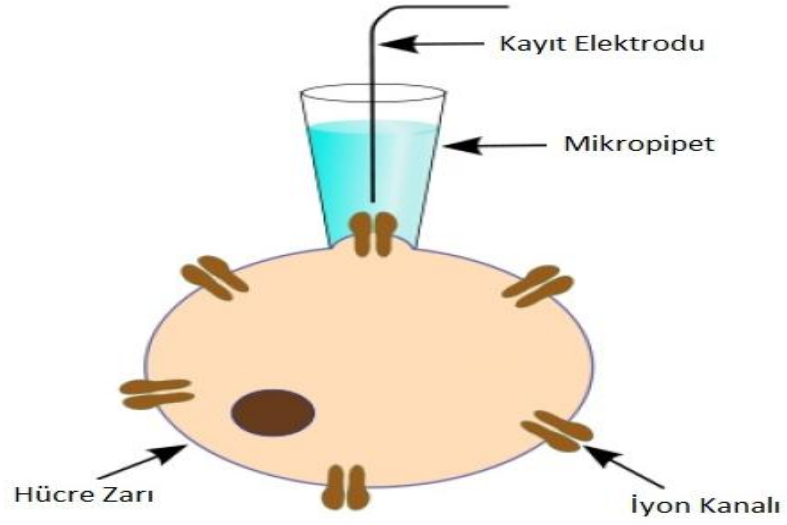
Şekil 7. TRPM2 kanallarının, oluşan oksidatif stresle ve bunun neticesi olan, NAD^+ dan üç farklı yolla oluşan ADPR ile aktive olma mekanizmalarını gösteren şekil. Hücrede lipit peroksidasyon sonucu NAD^+ dan üç farklı yolla ADPR üretilir. 1. NAD^+ poli-ADPR polimeraz (PARP) aktivasyonu yoluyla poli-ADPR 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 bundan da cADPR hidrolaz enzim aktivasyonu ile da 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 (Nazıroğlu 2011).

2.4. Patch-Clamp (Yama-Menteşe) Tekniği

19. Yüzyılda bazı bilim insanları, canlı hücrelerinin hayatsal faaliyetlerini gerçekleştirebilmeleri için, azda olsa iç dinamiklerinde küçük voltaj değişimlerin olabileceğini ve bunun düşük seviyelerde elektrik akımlarına yol açabileceklerini düşünüp, özellikle kurbağalar üzerinde, bu değişimleri gözleyebilmek adına teknikler geliştirip, deneyler yapmışlardır. Bu deneyler sonucunda elektriksel uyarıya maruz bırakılan kurbağa iskelet kaslarında kasılmalar gözlemlenmiştir (Molleman 2003). Alan Lloyd ve Andrew Huxley'in mürekkep balığı dev aksonunda yaptığı bir çalışma

sonucunda, uyarılabilir hücre zarlarının biyofiziksel özelliklerini açıklayan bir model ortaya konulmuştur (Hodgkin and Huxley 1952). Daha sonraları gelişen teknoloji ile beraber hücreye temas edebilen, hücrede meydana gelen akım değişimlerini ve voltaj deşarjlarını ölçebilecek pipetler geliştirmek ve üretmek mümkün hale gelmiştir. Bu mikropipet adı verilen cihazın sistemleştirilerek üç boyutta hareketi sağlayan cihazlarla, hücrelere rahatlıkla temas etmesini sağlayan cihazlar bütününe yama-menteşe sistemi denilmektedir. Bu sistem sayesinde hücre zarında bulunan iyon kanallarından geçen iyonların, gerek hücre içi gerek hücre dışında meydana gelen biyopotansiyel değişimlerini, oluşan elektriksel akımları ölçmek ve gözlemlemek mümkün hale gelmiştir (Neher and Sakmann 1992, Sakmann and Neher 1984, 2009).

Yama-menteşe yönteminin temel prensibi; çapı yaklaşık olarak 1-5 μm çapında olan bir mikropipet ucu ile hücre zarı arasında mühür olarak tabir edilen sıkı bir yapışma sağlanmasının ardından pipet ucu içerisinde kalan hücre zarı parçasında bulunması muhtemel olan iyon kanal akımlarının ölçülmesine dayanmaktadır. Pipet ucu ile hücre zarı parçası arasında oluşan mühür (seal) boyunca ilk etapta 50 $\text{M}\Omega$ 'luk bir direnç meydana gelmektedir. Pipete uygulanan negatif basınç (emme) sayesinde bu direnç 1-10 $\text{G}\Omega$ 'a ulaşmaktadır. Oluşan bu sıkı yama 'gigaseal' olarak adlandırılmaktadır. Bu sistem genel olarak 'voltaj kenetleme' olarak tanımlanmaktadır. Voltaj kenetleme tekniğinde, zar potansiyeli belirli bir değere kenetlenerek zar boyunca oluşan elektrik akımı ölçülmektedir (Şekil 8). Yama-menteşe (Patch-clamp) tekniği voltaj kenetleme tekniğinin geliştirilmiş halidir. Zaman içerisinde geliştirilen bu yöntem sayesinde hücre zarı üzerinde bulunan belirli bir bölgeden veya tek bir iyon kanalından elektrik akım kaydı alabilmek mümkün hale gelmiştir. Bu yöntem ilk defa Erwin Neher ve Berk Saakman tarafından asetil-kolin ile aktive edilebilen hücrelerden aldıkları tekli kanal kayıtları ile kullanıma sokulmuştur.



Şekil 8. Patch mikropipetinin hücre zarına teması ve hücre üzerinde bulunan iyon kanallarının gösterimi.

Yama-menteşe tekniğinin; hücre üzerinde (on-cell, cell-attached), tüm hücre (whole-cell), içi-dışarda (inside-out) ve dışı-dışarıda (outside-out) olmak üzere 4 farklı konfigürasyonda uygulanması mümkündür (Şekil 9). Yapılacak çalışmanın niteliğine göre bunlardan birinin seçilmesi mümkündür. Aşağıda bu konfigürasyonlara kısaca değinilmiştir.

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

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

2.4.2. Tüm Hücre (Whole-cell)

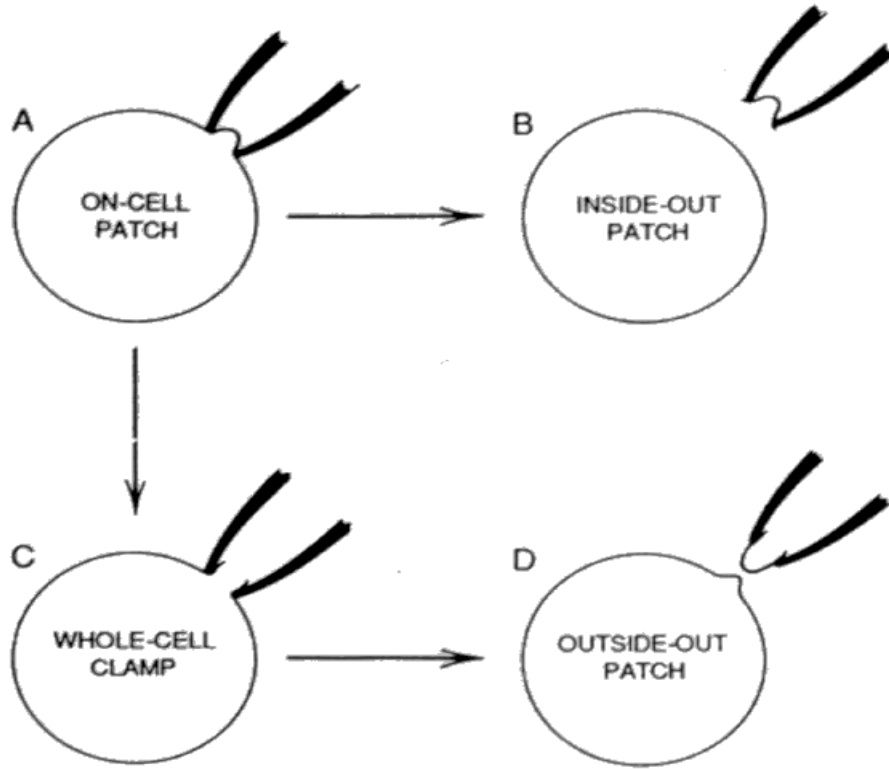
Mikropipet ile hücre üzerinde konfigürasyonu oluşturulduktan sonra pipete hafif bir emme uygulanır. Sonunda; mikropipetin, hücre zarını tuttuğu bölgeden plazma membranını yırtmasıyla oluşturulur. Mikropipet içerisine, intraselüler tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Bu konfigürasyon ile hücre dışı hormonların 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 yama-menteşe konfigürasyonudur.

2.4.3. 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 ekstraselüler tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Kalsiyum ve cAMP gibi intraselüler ikincil habercilerin, izole edilmiş zar parçasında bulunan kanallar üzerine etkilerinin araştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Hücre içi organeller olmaksızın iyon kanallarının çeşitli kimyasallara karşı verdiği cevapların anlaşılması için kullanılan önemli bir araştırma metodudur.

2.4.4. 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.



Şekil 9. Patch clamp tekniğinde kullanılan dört farklı konfigürasyonunun şematik gösterimi.

2.4.5. Yama-Menteşe Setini Oluşturan Temel Malzemeler

1. *Inverted Mikroskop (Floresans)*: Bu tip mikroskoplarda; normal ışık mikroskobunun aksine objektifler mikroskop tablasının altına yerleştirilmiş durumdadır. Bu durum hem hücrelerin görüntülenmesi hem de pipetin hareket kabiliyeti ve alanının artırılması adına çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Üzerinde bulunan floresans ekleme ile floresan ışık yayan hücrelerin görüntülenmesi mümkündür (Resim 1).

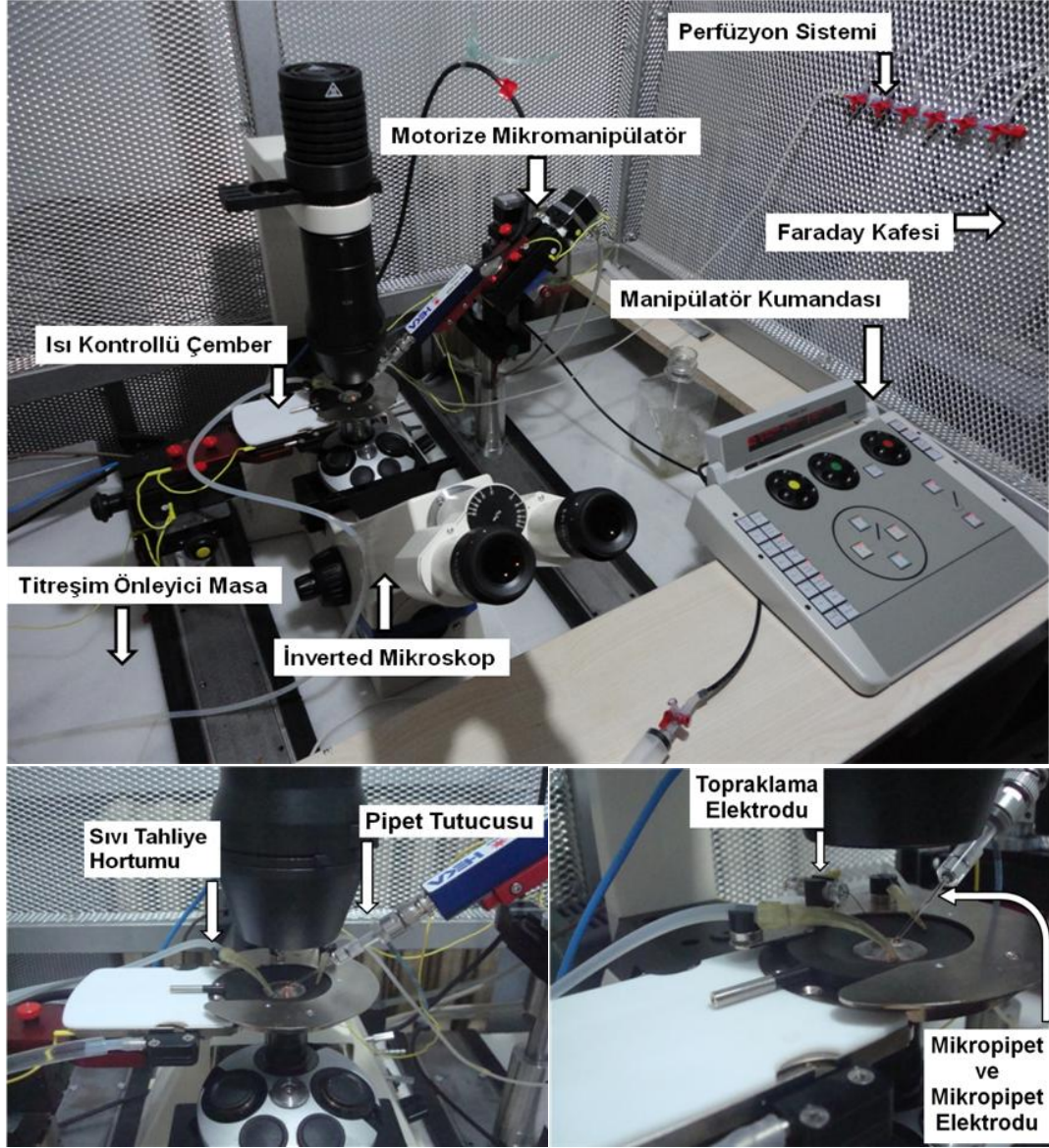
2. *Mikromanipülatör*: Yama-menteşe deneyleri esnasında inverted mikroskop ile hücreler tespit edildikten sonra mikroskobun makro ve mikro vidaları ile bir daha oynanmamalıdır. Mikropipetin ucunu hücre zarına temas ettirebilmek için üç boyutlu (öne-arkaya, sağa-sola ve yukarı-aşağı) hareket ettirilmesini sağlayan mikromanipülatörler kullanılmaktadır (Resim 1).

3. *Perfüzyon sistemi*: Yama-menteşe 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. Haznelerin çember seviyesinden daha yüksekte olması nedeniyle yer çekimi etkisiyle çembere doğru doğal bir sıvı akışı sağlanmaktadır. 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).

4. *Faraday Kafesi*: İletken malzemeleri oluşturan atomların en dış yörüngelerindeki değerlik (valans) elektronları, atomlarından kolayca ayrılarak hareket etme yeteneğine sahiptirler. Dolayısıyla; kapalı bir yüzeye sahip olan iletken bir cisim, elektrik alanı içerisine yerleştirildiğinde bu elektronlar, iletkenin içerisindeki elektrik alanı sıfırlanmaya kadar hareket eder ve bir 'yeniden dağılım'a

uğramaktadırlar. Elektrik alanın sıfırlanmasıyla birlikte, hareket etmelerinin gerekçesi ortadan kalkmış olur. Faraday kafesi bu ilkeye göre çalışır ve içindeki nesnelere dış elektrik alanlara karşı korur. İletken teller ile ađ biçiminde kaplanmış ve topraklanmış her kafesle bu koruma gerçekleştirilebilir. Ađ gözü sıklığı ve topraklama kalitesi korumayı artırır. Faraday kafesi sayesinde dışarıdaki elektrik alan kafesin içine etki edemez. Böylece yama-menteşe deneyleri esnasında sağlıklı kayıtlar alınması sağlanır. Kafesin işlerliği için iletkenlerin iyi topraklanmış olması gerekmektedir (Resim 1).

5. *Sarsıntı nleyici Masa*: Yama-menteşe deneyleri hücre ile pipetin temasine dayanan, çalışma esnasında yüksek hassasiyet gerektiren bir yöntemdir. Çalışma esnasında hücre ve pipeti görmemizi sağlayan mikroskop ve pipetin hareketini sağlayan mikromaniplatr sistemi sarsıntı önleyici masa üzerine sabitlenmiş halde bulunmaktadır. Çalışma esnasında oluşabilecek en küçük sarsıntı bile hücre ile pipet arasında kurulan temasın kopmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle darbe emici özel sistemlerle donatılmış, sarsıntı önleyici bir masanın kullanılması bu sistemin olmazsa olmazlarındandır (Resim 1).

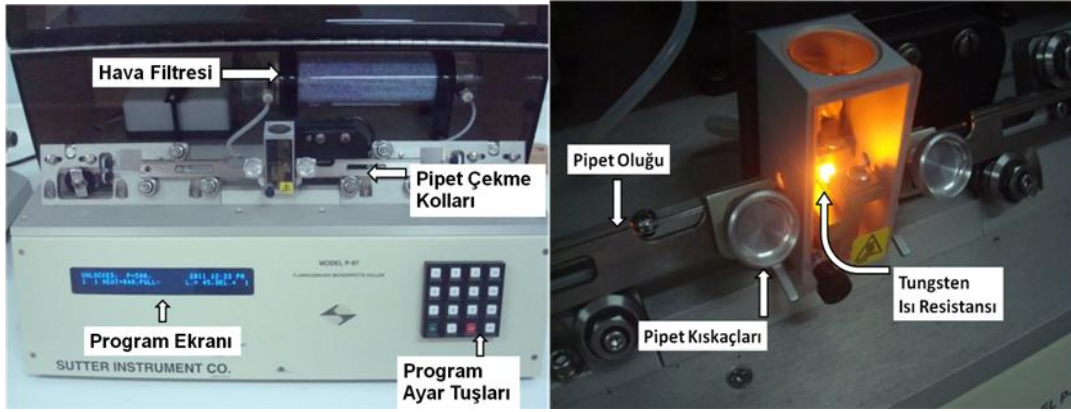


Resim 1. Patch-clamp (Yama-menteşe) seti genel ve yakından görünümü (İverted mikroskop, Motorize manipülator ve kumandası, Isı kontrollü çember, Titreşimi önleyici masa, Faraday kafesi ve perfüzyon sistemi).

2.4.6. Pipet Yapıcısı

Yama menteşe setinde kullanılan mikro pipetler, üretici firma tarafından içi boş silindirik tüp şeklinde gelmektedir. Bu tüpleri sivrilterek hücre zarına temas edebilecek duruma getiren alet ise pipet yapıcısı (pipet puller) cihazıdır. Resim 2 de de görüldüğü gibi pipet yapıcısının içinde bulunan pipet oluklarına, pipet yerleştirilip,

aygıtın ortasında bulunan, ısıtma işlemi uygulamasına yarayan içi boş kare şeklinde olan tungsten rezistansın içinden geçirilecek şekilde ileriye doğru sürülerek, oluk kollarında bulunan kısıkaçlar sıkılıp, sabitlenir. Daha sonra, önceden ramp testi yapılan cihazın ısı ayarları kullanılarak pipet yapımı işlemi başlatılır. Pipet yapımı esnasında, pipetin ortası ısıtılırken, aynı anda oluklarda sıkıştırılmış pipetin her iki tarafına, aynı doğrultuda fakat zıt yönlerde de çekme kuvveti uygulanır ve pipet ısı, kuvvet etkisiyle yavaş yavaş ortasından incelmeye başlayıp, hücreye temas edebilecek ölçülerde sivrilir. Cihazda bulunan hava soğutma sistemi yardımıyla pipet içi boşluğu, pipetin en sivri yerinde bile kapanmaz, boşluk olarak kalır. Bu da hücreden kayıt alabilmek için elzemdir (Nazıroğlu et al., 2011a).



Resim 2. Mikro pipet yapıcısı genel görünümü (Cihaz programı ayar tuşları, pipet olukları, pipet kısıkaçları ve tungsten ısı rezistansı).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

İnverted floresan mikroskop: Zeiss, Axiovert 40 CFL (Almanya)
Yükselteç: HEKA, EPC-10 (Almanya)
Mikromanuplasyon: Luigs and Neumann (Almanya)
Isı kontrollü çember ve çember tablası: Luigs and Neumann (Almanya)
Pipet yapıcı (Puller): Sutter Instruments (ABD)
Borosilikat tüpler: Sutter Instruments (ABD)
Peristaltik pompa: Ismatec (İsviçre)
Faraday kafesi: SDÜ metal atölyesi (Türkiye)
Sarsıntı önleyici sehpa: SDÜ metal atölyesi (Türkiye)
Soğutmalı santrifüj: Kubota (Japonya)
Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)
Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Select BioProducts (ABD)
Şarjlı pipet: Hirschmann (Almanya)
pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
CO₂ inkübatör: (Heal Force, Smart Cell (Japonya)
Kültür flaskı: Cell Star, Greiner bio-one (Almanya)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

N-asetil sistein, Hüsnü Arsan İlaçları A.Ş. (Türkiye)
N-Methyl D-Glucamine (NMDG), Sigma (Almanya)

2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB), Sigma (Almanya)
Hidrojen Peroksit (H₂O₂), Sigma (Almanya)
HAM'S F12 Medium (1X), Biochrom KG (Almanya)
Trypsin-EDTA Solüsyonu (% 0,25), Sigma (Almanya)
Cesium hydroxide monohydrate, Sigma (Almanya)
EDTA, Merck (Almanya)
EGTA, Merck (Almanya)
DMSO (Dimethyl sulphoxide) Hybri-Max, Sigma (Almanya)
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (10X), Biochrom (Almanya)
Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma (Almanya)
Sodyum hidroksit (NaOH), Riedel-de H en (Almanya)
HEPES, Sigma (Almanya)
Sodium Chloride, Merck (Almanya)
Potassium Chloride, Merck (Almanya)
Calcium Chloride, Merck (Almanya)
L-glutamic Acid, Merck (Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Sıçan Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücreleri İzolasyonu

AKG hücreleri 12–14 haftalık sıçanlarda, inhalasyon anestezisi işleminden sonra dekapitasyon işlemini 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 medyumu (% 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 kısıma alındı, bu sırada spinal kord ile sinir gruplarının bağlantısı koparılmamaya  zen 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 sterio 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 gerekli inkübasyonlar yapıldıktan sonra hücreler elektrofizyolojik kayıtlar alınmak üzere patch çemberine konuldu.

Birinci Grup (Kontrol Grubu): Önceden Hazırlanmış DMEM medyumunu ile AKG hücreleri inkübe edildi ve medyuma hiçbir şey ilave edilmedi. Daha sonra ise H₂O₂ ile uyarım yapılarak elektrofizyolojik kayıtlar alındı.

İkinci Grup (BSO Grubu): AKG hücreleri 0,5 mM BSO ile 24 saat inkübe edildi. Daha sonrasında, H₂O₂ ile uyarım yapılarak elektrofizyolojik kayıtlar alındı.

Üçüncü Grup (NAC Grubu): AKG hücreleri 2 mM NAC ile 3 saat inkübe edilerek, H₂O₂ ile TRPM2 kanallarının aktive olmasına çalışıldı ve elektrofizyolojik kayıtlar alındı.

Dördüncü Grup (NAC+BSO Grubu): Bu gruptaki AKG hücreleri 0,5 mM BSO ile 24 saat inkübe edildikten sonra 3 saat daha 2 mM NAC ile inkübe edilip, yine H₂O₂ ile uyarım yapılarak elektrofizyolojik kayıtlar alındı.

Beşinci Grup (BSO+NAC Grubu): AKG hücreleri 3 saat 2mM NAC ile inkübe edildikten sonra 24 saat 0,5 mM BSO ile inkübe edildi. Ve sonunda da H₂O₂ ile uyarım yapılarak elektrofizyolojik kayıtlar alındı.

3.2.2. Solüsyonların Hazırlanması

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

Tablo 1. Normal ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü

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

pH KOH ile 7,4 e ayarlandı.

Tablo 2. NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü

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

pH HCl ile 7,4 e ayarlandı.

Tablo 3. Hücre içi tampon çözelti hazırlama protokolü

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

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

İlk olarak, Bütiyonin sülfoksimin (BSO), dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldürüldükten sonra, normal ekstraselüler tamponla sulandırılarak depo solüsyon elde edildi. Yukarıda bahsedildiği gibi, elde edilen stok solüsyondan alınarak hücrelerin içinde bulunduğu medyuma BSO nun son konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde yama-menteşe deneyler başlamadan 24 saat öncesinden ilave edildi.

Elimizde bulunan N-asetil sistein (NAC) zaten solusyon şeklinde olduğundan doğrudan hücrelerin içinde bulunduğu medyuma, son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde yama-menteşe deneyleri başlamadan 3 saat öncesinden ilave edildi.

2-APB'nin çözünebilir formunun hazırlanması ve uygulanışı:

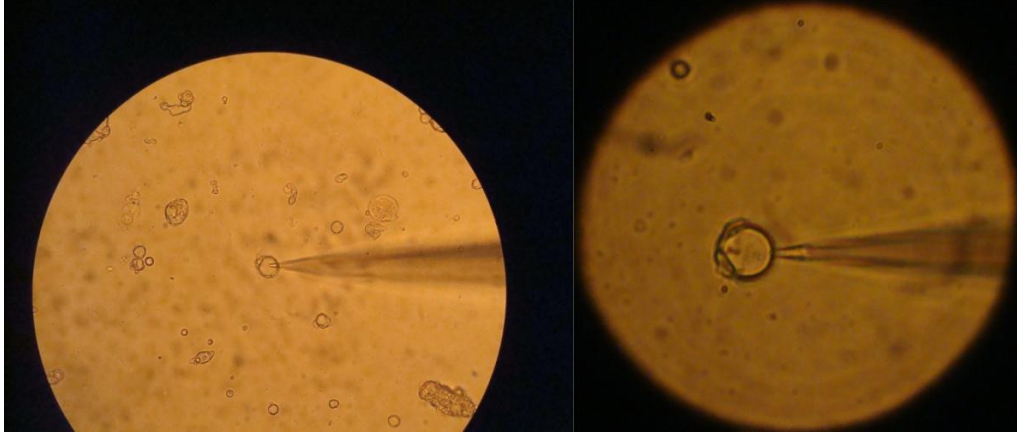
Öncelikle DMSO içerisinde çözdürülen 2-APB'nin stok solüsyonu (100 mM) hazırlandı. -33 °C' de dondurucuda saklandı. Yama-menteşe deneyleri öncesinde stok solüsyon son konsantrasyon 0,1 mM olacak şekilde normal ekstraselüler tampon içerisinde taze olarak çözdürüldü.

3.2.3. Yama-menteşe (Patch-clamp) Deneyleri

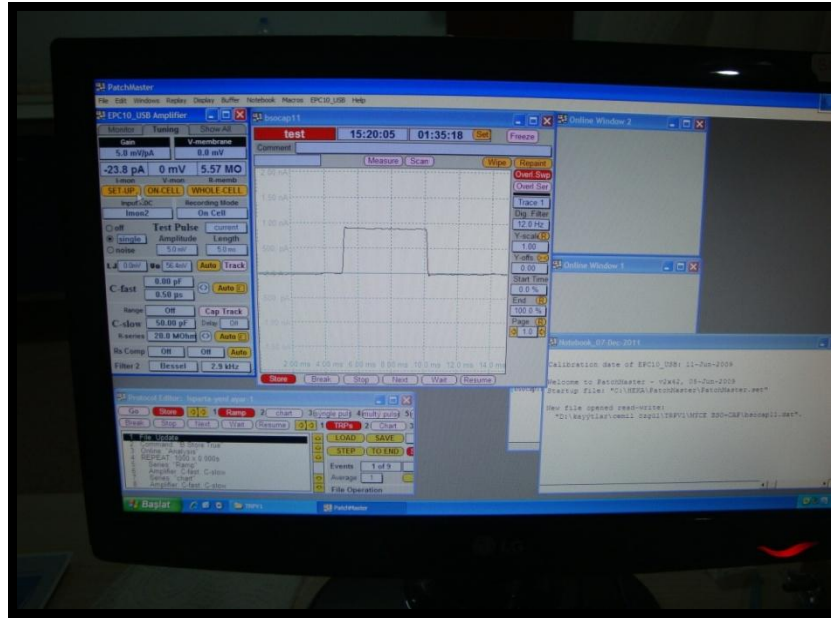
Tüm hücrelerden EPC 10 USB (HEKA, Lamprecht, Almanya) yükselticinin bağlı olduğu patch master USB yazılımına sahip bir bilgisayar yardımıyla yama-menteşe tekniğinin tüm-hücre konfigürasyonu kullanılarak kayıtlar elde edildi. Tüm kayıtlar oda sıcaklığında (23–26°C) alındı. Kayıt esnasında hücrelere temas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

Tüm gruplar için alınan kayıtlarda, mikropipetin içerisine normal intraselüler tampon çözeltisi dolduruldu. Pipet içerisinde hava boşluğu kalmaması için; parmak ile duvarlarına çok hafifçe vuruldu. Mikropipet, kayıt elektrotunun üzerine kılıf gibi giydirilerek sıkıştırıldı. Kültür kabı içerisinde bulunan AKG hücreleri patch çemberine alındı. Hücrelerin üzerine 1 mL normal ekstraselüler tampon çözeltisi eklendi. İverted mikroskop (Zeiss, Axiovert 40 CFL, Germany) ile hücreler tespit edildi. Mikromanipülatör yardımıyla pipet kayıt ortamına daldırılarak veriler patch

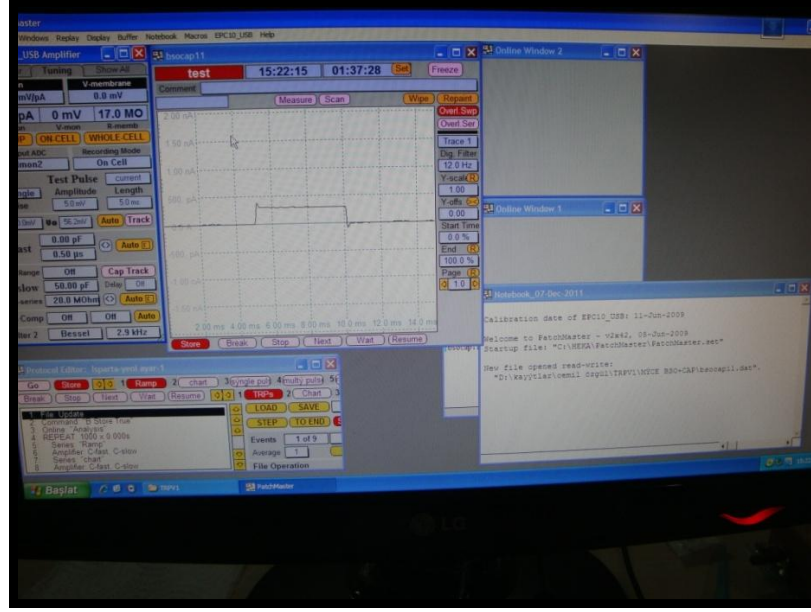
master (HEKA, Lamprecht, Almanya) yazılımı sayesinde bilgisayar ekranından izlendi. Pipetin direnci kaydedildi. Hücre zarına temas edene kadar mikropipet ilerletildi. Hücre zarı ile temasın sağlandığı hem mikroskop altında gözle görülerek hem de bilgisayar ekranındaki anlık direnç değişiminden kontrol edilerek kesinleştirildi (Resim 3, 4). Perfüzyon sistemi ile pipete hafif bir emme uygulanarak pipet ile hücre zarı arasında 'gigaseal' (1–10 GΩ) diye tabir edilen sıkı mühür oluşumu sağlandı (Resim 5, 6). Hücre zarı potansiyeli -60 mV'a kenetlendi. Ve sonrasında pipete bağlı bulunan vakum hortumu yardımıyla daha fazla vakum yapılarak, pipet içine sıkışmış hücre zarı parçasının koparılması sağlandı. Ve böylece hücre tüm hücre (whole cell) konfigürasyonu pozisyonuna geçmiş oldu. Hücrenin iç ve dış ortamlarında, farklı konsantrasyonlarda bulunan iyonların, iyon kanalları aracılığıyla geçişi esnasındaki akım değişimlerini ölçmek için kullanılan ve yama menteşe tekniği sisteminin bilgisayarında bulunan patch master programı ile akım değişimleri ölçüldü. Peristaltik pompa (Ismatec, İsviçre) ile çemberdeki sıvı bir yandan tahliye edilirken aynı hızda diğer taraftan da perfüzyon sistemi ile 10 mM H₂O₂ çemberde bulunan hücreler üzerine (Şekil 10 de gösterilen kayıt hariç) gönderildi. Bu şekilde hücreler uyarılarak TRPM2 kanallarının aktivasyonu sağlanmaya çalışıldı. Kanalların açılmasını müteakiben kanal aktivitesi belirli bir platoya ulaşınca kadar beklendi. Beklenen plato oluştuğunda; kanalları inaktive ettiğine dair bildirimler olan 0,1mM konsantrasyonundaki 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB), H₂O₂'nin gönderilmesine benzer şekilde çembere gönderildi (Togashi et al., 2008, Nazıroğlu et al., 2011a). Son olarak hücrelerimizin canlılığından emin olmak üzere NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti çembere gönderilerek kayda devam edildi. Canlılığı devam eden hücrelere tekrar sırasıyla H₂O₂, 2-APB ve NMDG uygulamaları yapılarak kayıt sonlandırıldı.



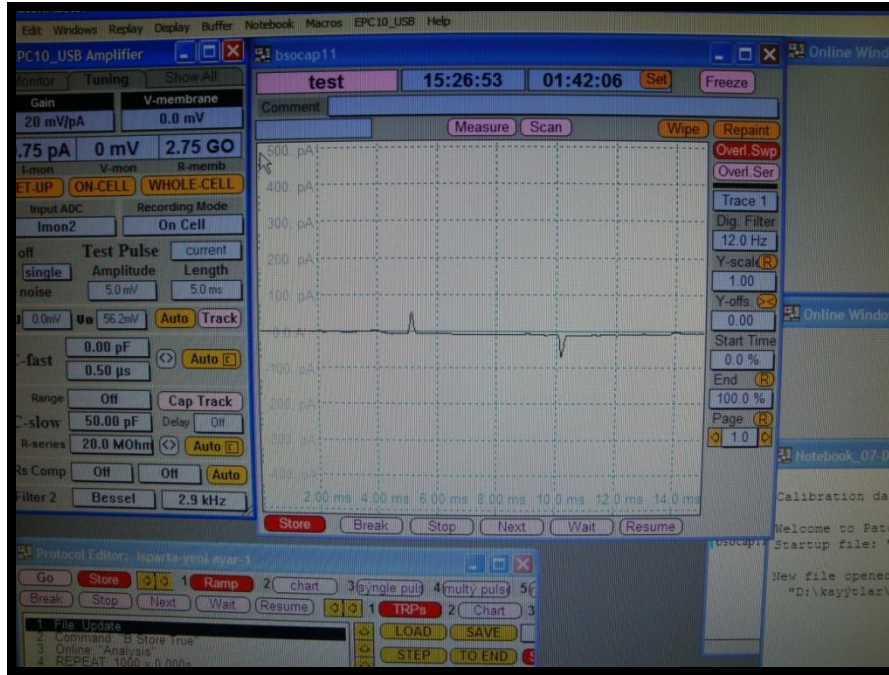
Resim 3. Yama-menteşe tekniği ile gigaseal (sıkı mühür) oluşturulmuş AKG hücrelerinin mikroskobik görünümü.



Resim 4. Yama-menteşe setinde, mikropipetin hücrelerin bulunduğu solusyona girdiği anda, *patch-master* programının gösterdiği osiloskop ekranı ve pipetin direnci



Resim 5. Mikropipetin AKG hücresine temasından sonraki, programın gösterdiği osiloskop ekranı



Resim 6. AKG hücresiyle ve mikropipet arasında oluşan mühürü (gigaseal) gösteren ekran görüntüsü.

3.3. Etik Kurul İzni

Çalışma protokolü Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (HADYEK) tarafından 18.01.2011 tarihinde uygun bulunmuştur (Protokol No: 18.01.2011-05).

3.4. İstatistiksel Analiz

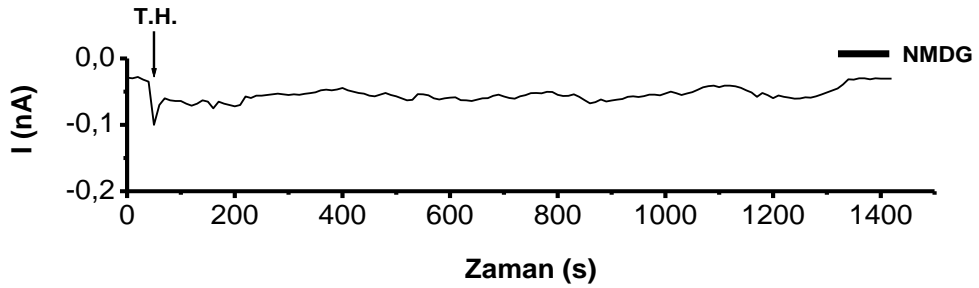
Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. Arka kök gangliyon hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 9.05 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistikî karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kontrol Kaydı Sonucu

İlk kayıta, hiçbir inkübasyon ve uyarım yapmaksızın alınan yama-menteşe kaydıdır ki, çalışmanın kontrol kaydını oluşturmaktadır.

Şekil 10 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 4,69 pA/pF (n=18) olarak hesaplanmıştır (Şekil 16).

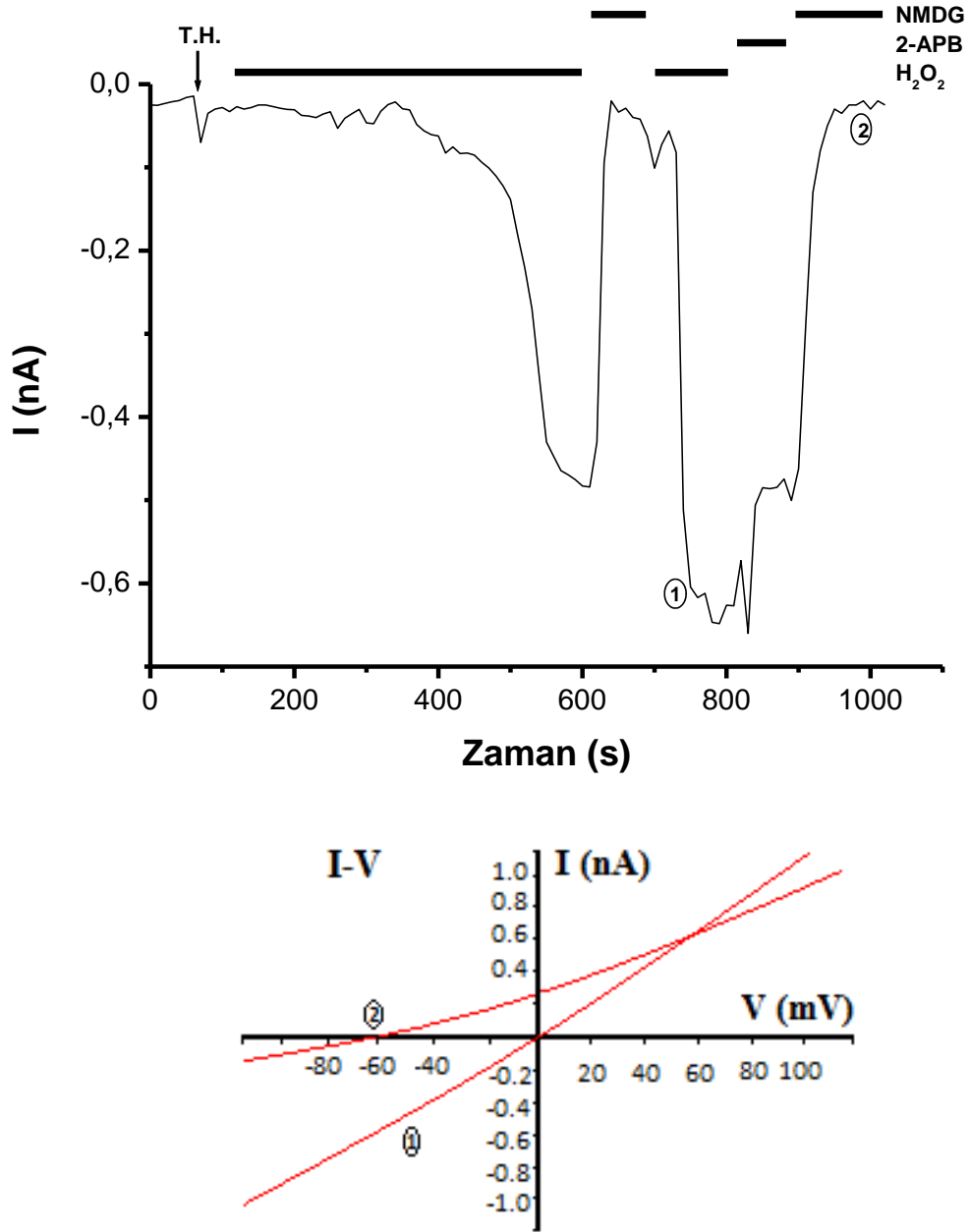


Şekil 10. H₂O₂ ile uyarım yapılmamış sıçan AKG hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (T.H. tüm hücre)

4.2. Kontrol Grubu Kaydı Sonucu

Şekil 11 de gözlemlendiği üzere, kontrol grubu kaydında sadece H₂O₂ ile uyarım sonucunda yaklaşık 200 saniye sonra negatif yönde akımın arttığı gözlemlenerek TRPM2 katyon kanallarının 0,68 nA seviyelerinde açıldığı gözlemlenmiştir. Kanallar açıldıktan sonra daha fazla açılma olup olmayacağı belirli bir süre beklenilip, grafiğin platoya gelmesi sağlandıktan sonra, kanalları inaktive edildiği düşünülen 2-APB maddesi verilerek kanal akımlarının önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Ve tam kanalların kapatılması, fiziksel kapatıcı olarak bilinen NMDG⁺ li solusyonla gerçekleştirilmiştir. Tam kapanma sonrasında yukarıda

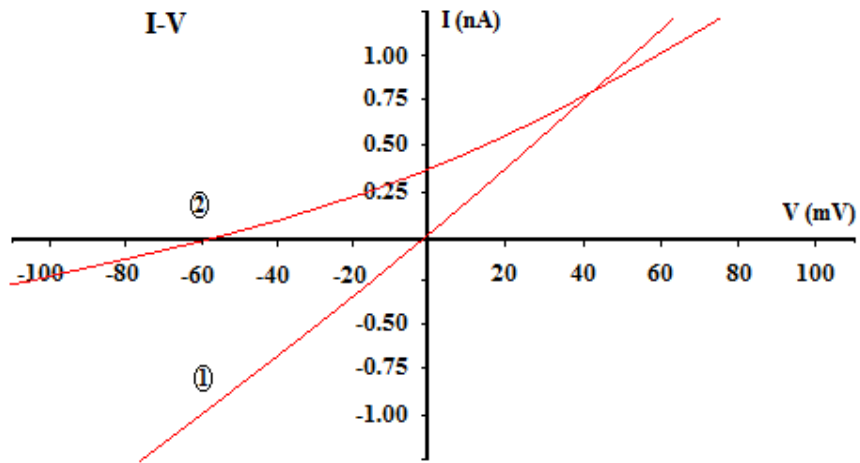
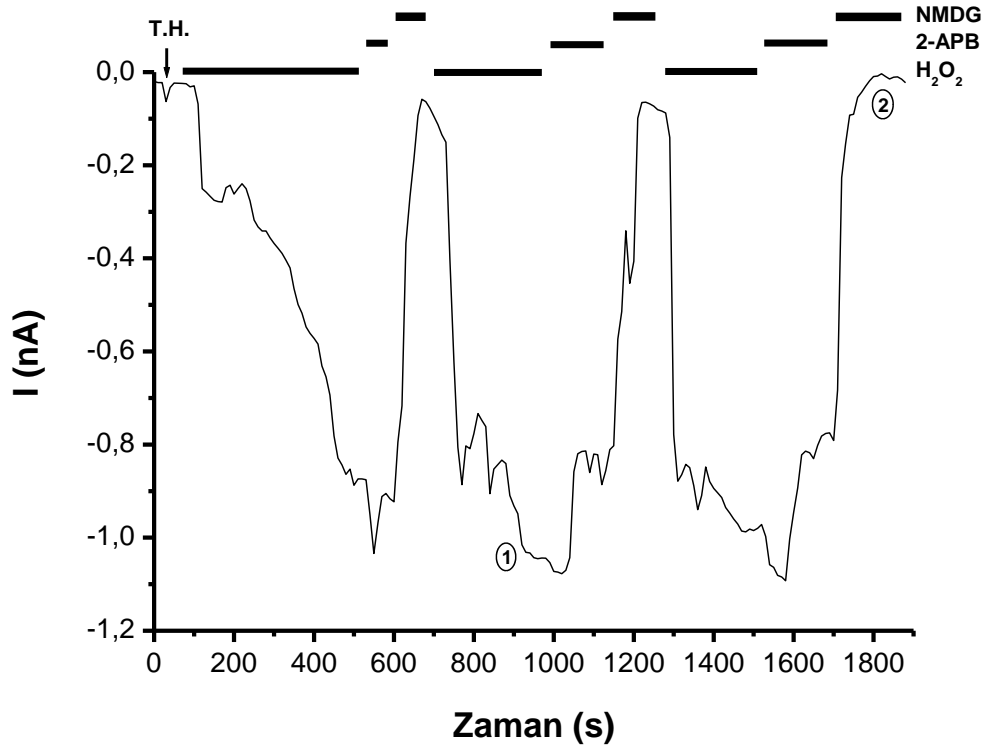
anlatılan basamaklar tekrar uygulanıp birbirine paralel grafik elde edildiği gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak sabit voltaja göre akımın değişimi grafiği şekil 11de I-V grafiği olarak da gösterilmiştir. Yani şekil 11 ile I-V grafiği aynı kaydın farklı iki gösterimidir. Kontrol grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 78,58 pA/pF (n=12) olarak hesaplanmıştır (Şekil 16).



Şekil 11. H_2O_2 ile uyarım yapılmış AKG hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik. Her iki grafik için, 1 H_2O_2 ile TRPM2 kanallarının açılışını, 2 NMDG ile kanalların kapanışının gösterimi (T.H. tüm hücre).

4.3. BSO Grubu Kaydı Sonucu

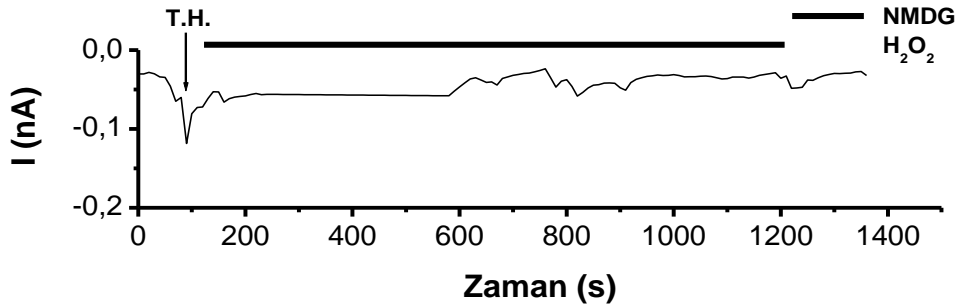
Şekil 12 de de gösterildiği üzere, BSO ile 24 saat inkübe edildikten sonra AKG hücreleri yine yama menteşe ortamında H_2O_2 ile uyarımı neticesinde, TRPM2 katyon kanallarının, kontrol kayıtlarına (Şekil 11) kıyasla çok daha fazla açıldığı gözlemlenmiş ve akım zaman grafiğinde de görüldüğü üzere biyopotansiyel akım değişiminin 1,1 nA seviyelerinde seyrettiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebi olarak ise BSO nun hücre içi GSH seviyesini azaltmasıyla, hücre içi serbest radikallerin çoğalmasına bağlı olarak, kanalların çok daha fazla açılmasına sebep olduğu görülmektedir. Kayıt alma esnasında akımın artık değişmediği yani bir platoya ulaştığı dakikada kapatıcı olarak 2-APB (0,1 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 grafiğinde verilmiştir. (Şekil 12 I-V). Bu I-V grafiğinde verilen 1 ve 2 numaralı hiperbol eğrileri ise sırasıyla H_2O_2 nun açtığı ve NMDG⁺ nın kapattığı seviyeleri göstermektedir ve akımın voltaja göre değişimini göstermektedir. BSO grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 147,68 pA/pF (n=4) olarak hesaplanmıştır (Şekil 16).



Şekil 12. 24 saat 0,5 mM BSO ile inkübe edildikten sonra H_2O_2 ile uyarım yapılarak AKG hücrelerinden yama-mentşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı. I-V aynı kaydın akım voltaj değişikliğini gösteren grafik. Her iki grafikte için, 1 H_2O_2 ile TRPM2 kanallarının açılışını, 2 NMDG ile kanalların kapanışının gösterimi (T.H. tüm hücre).

4.4. NAC Grubu Kaydı Sonucu

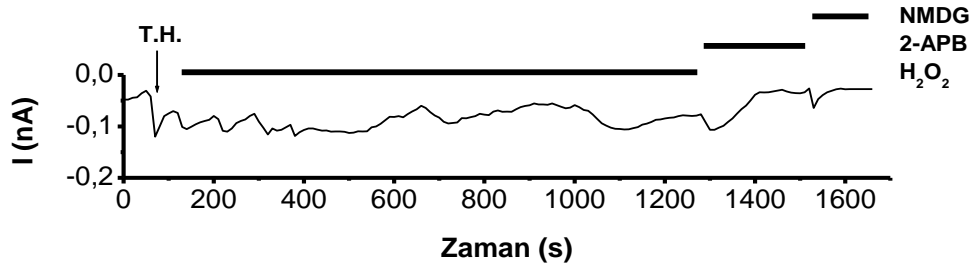
NAC grubundan da (Şekil 13) alınan kayıtlarda, AKG nöronları 3 saat 2 mM NAC ile inkübe edildikten sonra yama menteşe tekniği yardımıyla yine H₂O₂ ile uyarım yapılmasıyla birlikte uzun süre bekletilmesine rağmen, tıpkı kontrol kaydında olduğu gibi akımda herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bunun NAC'ın GSH'un prekürsörü olduğundan kaynaklanan bir netice olduğu gözükmektedir. NAC grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 3,31 pA/pF (n=5) olarak hesaplanmıştır (Şekil 17).



Şekil 13. 3 saat 2 mM NAC ile inkübe edildikten sonra H₂O₂ ile uyarım yapılarak AKG hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (T.H. tüm hücre).

4.5. BSO+NAC Grubu Sonucu

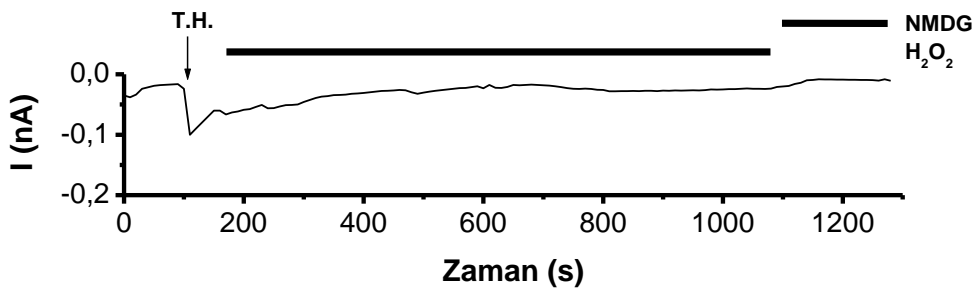
BSO+NAC grubunda AKG hücrelerinden alınan kayıtlarda 24 saat 0,5 mM BSO ile inkübe edildikten sonra 3 saat daha 2 mM NAC ile inkübe edilmiştir (Şekil 14). Daha sonra ise yama-menteşe tekniği yardımıyla 10 mM H₂O₂ ile uyarım yapılmış ve katyon kanallarının açılmadığı gözlemlenmiştir. Buradan anlaşılan şu dur ki; AKG hücreleri BSO ile inkübe edildikten sonra yani hücre içi serbest radikaller çok arttırmıştıktan sonra NAC ile inkübe edilmiş olması, kanalları açmayacak ölçüde radikalleri azaltması yoluyla NAC'ın önemli ölçüde koruyucu etkisi olduğu gözlemlenmektedir. BSO+NAC grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması 14,55 pA/pF (n=6) olarak hesaplanmıştır (Şekil 16).



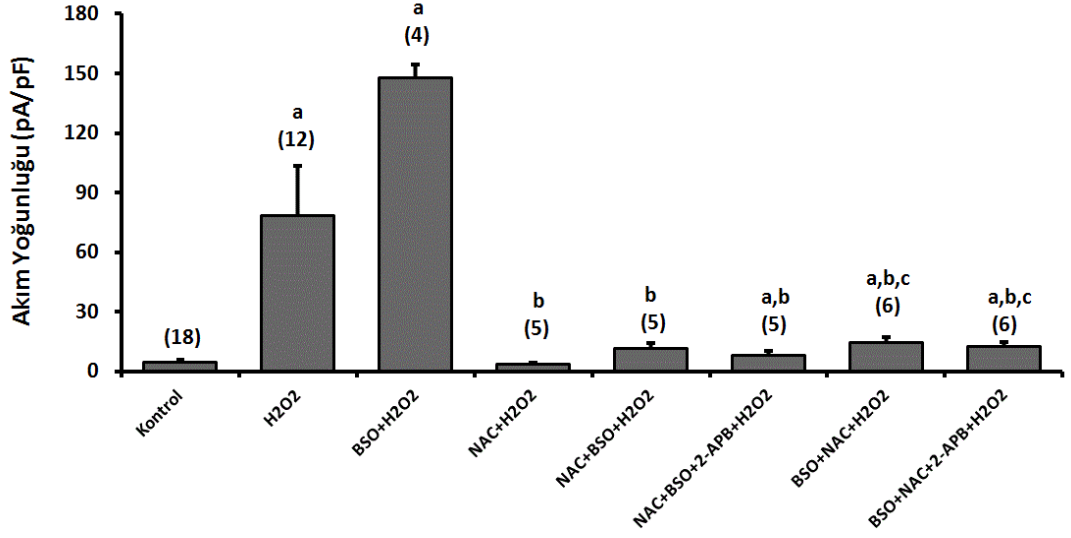
Şekil 14. AKG hücreleri, 24 saat 0,5 mM BSO ile inkübe edildikten sonra 3 saatte 2 mM NAC ile inkübe edilmiş ve daha sonra H_2O_2 ile uyarım yapılarak hücrelerden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (T.H. tüm hücre).

4.6. NAC +BSO Grubu Sonucu

NAC+BSO grubunda ise (Şekil 15) BSO+NAC grubunun tersi olarak, AKG hücreleri ilk önce 3 saat 2 mM NAC ile inkübe edildikten sonra ise 24 saat 0,5 mM BSO ile inkübe edilmiştir. Daha sonra ise diğer gruplarda da olduğu gibi 10 mM H_2O_2 ile uyarım yapıldıktan sonra alınan kayıtlarda, akım değişikliği olmadığı gözlemlenmiş ve sabit, düz kayıtlar alınmıştır. NAC ile inkübeden sonra BSO ile inkübe edildiği halde hâlâ NAC'ın koruyucu etkisinin devam ettiği sonucu çıkmaktadır. Yani âdetâ bir hastalık daha gelmeden koruyucu olarak aşı yaptırılması gibi de yorumlanabilir. NAC+BSO grubu kayıtlarına ait olan akım yoğunluğu değerlerinin ortalaması ise 11,27 pA/pF (n=5) olarak hesaplanmıştır (Şekil 16).



Şekil 15. AKG hücreleri, 3 saat 2 mM NAC ile inkübe edildikten sonra 24 saatte 0,5 mM BSO ile inkübe edilmiş ve daha sonra H_2O_2 ile uyarım yapılarak hücrelerden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm-hücre kaydı (T.H. tüm hücre).



Şekil 16. AKG hücrelerinde TRPM2 kanalları üzerine BSO, NAC, 2-APB ve H₂O₂ in etkisi. AKG hücreleri için, her beş 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 (^a p<0.001 kontrol ve NAC gruplarına göre. ^b p<0.001, H₂O₂ ve BSO gruplarına göre. ^c p<0.001, BSO+NAC ve NAC+BSO+2-APB gruplarına göre.) akımların uyarım ve inhibisyonları, parantezlerin üstlerinde yer alan harflendirmelerle gösterilmiştir (Ortalama ± SD).

5. TARTIŞMA

TRP kanalları ilk olarak 1998 yılında *Drosophila* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde bulunmuştur. Sonraları devam eden genetik araştırmalar neticesinde günümüzde 6 alt ailenin varlığı ispatlanmıştır. TRPM2 ağırlıklı olarak beyinde varlığı ispatlanmasına rağmen, aynı zamanda kemik iliği, dalak, kalp, lökosit, karaciğer ve akciğeri kapsayan diğer birçok dokularda belirlenmiştir (Clapham, 2007). Oksidatif stres ve onun ürünleri olan ROT'dan ve bunun neticesi olan NAD⁺ dan 3 yolla ADPR üretilmektedir (Nazıroğlu 2007a). TRPM2 kanallarının moleküler yapısına bakıldığı zaman diğer çoğu kanallarda olduğu gibi 6 segmentten meydana geldiği ve katyon girişlerinin 5. ve 6. segmentler arasından gerçekleştiği gözlenmiştir (Hara et al. 2002). Ayrıca kanalın bir C (Nudix homoloji alanı) ve N uçları bulunmaktadır. Bu nudix homoloji alanında, ADPR pirofosfataz enzimi mevcut olup kanalın açılmasından bu enzimin aktivasyonu sorumludur. Yani anahtarı ve kilidi kanalın içerisinde olan bir kapı gibi düşünmekte mümkündür. ADPR pirofosfataz enzimi ise hem ADPR hem de oksidatif stresle aktive olabilmektedir.

Perraud ve arkadaşları tarafından 2001'li yılların başlangıcında TRPM2 kanallarının ADPR tarafından aktive olabildikleri ilk defa gösterilmiştir (Perraud et al., 2001). Aachen Tıp Fakültesi Fizyoloji Enstitüsü'nden Wehage ve arkadaşlarının, Japonya'dan Hara ve arkadaşlarının, 2002 yılında yaptıkları çalışmalarda TRPM2 kanallarının oksidatif stresle aktive olabileceğini ispatlamışlardır. (Hara et al., 2002, Wehage et al., 2002). Daha sonraları yapılan çalışmalarda, araştırmacılar etki mekanizmasının doğrudan ve dolaylı yolları konusunda iki gruba ayrılmışlardır. Bir kısım araştırmacılar oksidatif stresin mitokondriden ADPR üretimini artırdığını ve ADPR'nin TRPM2 kanallarını açtığını öne sürerken diğer bir kısım araştırmacılar hem oksidatif stresin hem de ADPR'nin birbirinden bağımsız olarak kanalları açabildiklerini ispatlamışlardır (Perraud et al., 2001, 2005, Hara et al., 2002, Wehage et al., 2002, Nazıroğlu and Lückhoff 2008a, 2008b).

NAC, L-sistein isimli aminoasitten türemektedir ve yapısında sistein bulunmaktadır (Arakawa and Ito 2007). Günümüzde akciğer hastalıkların tedavisinde kullanılması yaygın olmasına rağmen, nörolojik hastalıklardaki rolü kesin olarak henüz bilinmeye başlamıştır (Welin et al., 2009). Ayrıca hücre koruyucu ve

antioksidan özellikleri de vardır. Antioksidan özelliğini, GSH seviyelerini düzenleyerek, doğrudan radikalleri temizleyerek, nötrofil aktivitesi ve TNF üretimini baskılayarak gerçekleştirmektedir (Saricaoglu et al., 2005, Koçkar et al., 2010). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada BSO ile GSH yetersizliği oluşturulan AKG sinir hücrelerinde TRPM2 kanallarının daha fazla aktive olduklarını ve hücre içi GSH verildiğinde ise kanalların tamamen, hücre dışı inkübasyonlarında ise kısmen inhibe olduklarını gözlemlenmiştir (Nazıroğlu et al. 2011b). NAC'ın sentezinde GSH'nin rolü ve NAC'ın GSH dan daha kolay hücre içerisine geçişinin olduğu iyi bilinmektedir (Mazor et al. 1996). Hücre dışı GSH inkübasyonu TRPM2 kanallarının inhibisyonunda tam etki göstermezken NAC'ın hücre içine GSH dan daha kolay girmesi nedeniyle TRPM2 kanalları üzerinde tam bir düzenleyici etki yapabilir ihtimalinden bu tez çalışması planlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, kontrol grubuna kıyasla, hidrojen peroksite maruz bırakılan AKG hücrelerinin aktive oldukları gözlemlenmiş ve bu nedenle de, araştırma sonuçlarına göre oksidatif stres ürünlerinden hidrojen peroksidin, TRPM2 kanalının C ucundaki ADP-riboz pirofosfataz enzimi ile etkileşerek kanalı aktive ettiği fikrini doğrulamıştır. Ayrıca tez çalışma sonuçlarının, TRPM2 kanallarını aktive ettiğini bildiren araştırma sonuçlarıyla uyum göstermektedir (Hara et al., 2002, Wehage et al., 2002, Nazıroğlu and Lückhoff 2008a, 2008b).

GSH'nin eksikliğinde oksidatif stres artarak duyuşal sinirlerde TRPM2 kanalları üzerinden Ca^{+2} akışının arttığı iyi bilinmektedir. Fakat hücre içine hangi kanallardan Ca^{+2} girişinin arttığı iyi bilinmemektedir. Duyusal nöronların hastalıkları içerisinde sistin ile sistein dönüşümleri arasındaki herhangi bir bozukluk GSH'nin eksikliğine sebep olacağı bilinmektedir (Cabungcal et al., 2007, Sen and Packer 2000). Bu duruma benzer şekilde, GSH'nin sentezlenmesinde, onun spesifik bir baskılayıcısı olarak bilinen BSO, sıçan AKG hücrelerine verildiğinde GSH eksikliğine sebep olmaktadır (Anderson 1998). Yapılan bu tez çalışmasında, AKG hücreleri, BSO ile inkübe edildikten sonra TRPM2 katyon kanalları üzerinden Ca^{+2} girişinin fazlalaştığı gözlemlenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, NAC'ın, BSO ile uyarılmış AKG nöronlarında TRPM2 kanal akımlarının değişiklikleri ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada hem 2-APB hem de NAC tarafından, BSO ile uyarılmış TRPM2 kanallarından Ca^{+2} akışının engellendiği gözlemlenmiştir. Bu

nedenle tiyol gruplarının Ca^{+2} iyonları geçişi ile ilgili etkisi olabileceği düşünülmektedir. NAC ve 2-APB kullanımı hücre içinde GSH ı azaltarak TRPM2 kanalları üzerinden Ca^{+2} akışını azalttığı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı, AKG ve duyuşsal nöron hastalıklarında sitozolik tiyol düzeylerinin bir TRPM2 kanal düzenleyicisi olarak rol oynadığı anlaşılmaktadır.

Nöronal hasarlara bağılı oksidatif stresin anlaşılmasında TRPM2 katyon kanallarının büyük etkisi düşünöldüğünden, her geçen gün bu konuya ilginin daha da fazla arttığı gözlemlenmektedir (Nazıroğlu 2011). Ayrıca, BSO ile inkübe edilmiş AKG hücrelerinde, TRPM2 aktivasyonu ve sitozolik Ca^{+2} salınımı 2-APB tarafından inhibe edilmesine rağmen, ROT un TRPM2 aktivasyonu üzerinden Ca^{+2} akışını arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu mekanizma için gösterilebilecek kanıtlar; i) BSO nun hızlı bir şekilde sitozolik Ca^{+2} salınımını arttırması, ii) Serbest Ca^{+2} miktarının bu artışı, bir TRPM2 kanal blokeri (2-APB) tarafından önemli ölçüde azalmasıdır (Togashi et al., 2008, Nazıroğlu et al., 2011a).

Orta büyüklükteki nöronlarda, dış kaynaklı H_2O_2 nin yüksek konsantrasyonun (>10 mM) TRPM2 kanalları üzerinden zar depolarizasyonuna sebep olabileceğı daha önce yapılan in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (Smith et al., 2003, Kühn et al., 2009). TRPM2 katyon kanalları, oksidatif stres indirgenme-yükseltgenme tepkime sistemi tarafından aktive olmaktadır (Wehage et al., 2002). Oksidatif stresle artan ADPR düzeyleri ve NAD^+ ın TRPM2 nin sitozolik C – terminal ucunda bulunan Nudix alanına bağlanması, doğrudan Ca^{+2} akışına sebep olmaktadır. Hücre içinde, NAD^+ dan oluşan ADPR nin TRPM2 kanalında bulunan Nudix alanına doğrudan bağlandığı bilinmektedir (Wehage et al., 2002). BSO güçlü bir oksidan olduğundan dolayı, BSO ile uyarılmış AKG nöronlarında, hücre içindeki ROT, NADH dan NAD^+ a oksitleyebileceğı mümkün gözükmektedir. Bu çalışmada, BSO yardımıyla GSH ın tükenmesi zar akımlarının artışına sebep olurken NAC'ın yanı sıra bir TRPM2 kanal blokeri olan 2-APB tarafından Ca^{+2} akışı engellendiğı gözlemlenmiştir (Togashi et al., 2008). AKG nöronlarındaki TRPM2 kanalları, iç kaynaklı H_2O_2 tarafından, akım düzenlemesi için potansiyel hedefler olduğu belirtilmektedir (Nazıroğlu et al., 2011b).

Mevcut bilgilere göre; farklı nöronal hücrelerin katyon kanalları ve bunlar üzerinde NAC ın etkisi ile ilgili bazı raporlar olmasına rağmen, AKG nöronlarında,

NAC ve TRPM2 katyon kanallarıyla ilgili herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Safiulina ve arkadaşlarının 2006 da yaptıkları çalışmaya göre, GABA aracılı spontan postsinaptik akımlarındaki ATP faaliyetlerinin, NAC tarafından modüle olduğunu bildirmişlerdir (Safiulina et al., 2006). Ca^{+2} - ATPase pompaları, nöronal hücreler sisteminde, Ca^{+2} un geri gönderilmesinde yüksek performans gösterdiğinden dolayı hücre içi ve dışı Ca^{+2} miktarlarının korunmasında önemli bir yere sahiptir. Ve Kamboj ve arkadaşlarının 2006 da yaptıkları çalışmaya göre de; NAC'ın yardımıyla, enzimlerde toksitenin azaldığını rapor etmiştir. (Kamboj et al., 2006)

GSH da dâhil olmak üzere tiyol gruplarının, ROT'a karşı hücreleri korumada çok önemli roller sahip olduğu düşünülmektedir (Nazıroğlu 2009). GSH tüketimi, oksidatif stres için önemli bir biyolojik işaretçi olarak kullanılmaktadır (Nazıroğlu et al., 2011). Aslında, nöronal hücrelerin BSO ya maruz kalması GSH seviyelerini önemli ölçüde azalttığını önceki çalışmalar da göstermektedir (Anderson 1998). Anti apoptotik ilaçlarda NAC'ın kullanımı, hem GSH ın hem de L-sisteinin kullanımından daha verimli olduğu bildirilmektedir. Mazor ve arkadaşlarının 1996 da yaptıkları çalışmaya göre; GSH hücre zarından çok zor geçerken, NAC eritrosit hücre zarlarından çok daha kolay geçebildiğini göstermiştir (Mazor et al., 1996). NAC, hücre dışı GSH ve diğer habercilerden çok daha fazla hücre zarlarından geçebilme yeteneğine sahip olabilmektedir (Shimizu et al., 2002). NAC ın kendisi ROT ürünlerini azalttığı ve hidrojen peroksit, hidroksil radikali, süper oksit ve diğer artıkcı radikalleri ortadan kaldırma kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Kamboj et al., 2006). Nöronal hücrelerdeki koruyucu ajanların yok olması H_2O_2 nin hücre öldürücü etkisinin ortaya çıkmasına, TRPM2 kanalları üzerinden olanak sağlamaktadır. Süperoksit radikali tiyol gruplarını oksitlemekte ve H_2O_2 ye indirgemektedir. İşte bu yolla TRPM2 kanallarının açılmasına olanak sağlamaktadır (Nazıroğlu 2011).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Serbest radikallerin vücuttaki üretimi birçok nedene bağlanılabilir. Uzun süreli ilaç kullanımı, çevre kirliliğine yol açan maddelerin solunum yoluyla alınması, ağır metallere maruziyet, ani sıcaklık değişiklikleri, ultraviyole ışınlar veya görünür ışık ve diğer iyonize olabilen radyasyon çeşitleri gibi birçok dış faktörler ve psikolojik stres bunların oluşmasındaki başlıca faktörlerdir. Eğer serbest radikallerin üretimi esnasında antioksidan mekanizmalar devreye girmez veya yetersiz kalırsa, denge oksidanların lehine dönecektir ki buna oksidatif stres adı verilmektedir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, bu bahsedilen oksidatif stresle aktive olduğu bilinen TRPM2 katyon kanallarının, oksidatif stresi arttırıcı özelliği olan BSO verildiğinde daha fazla açıldığı, gerek sade NAC, gerekse NAC ile beraber BSO verilmesiyle beraber oksidatif stresin temsilcisi olan H₂O₂ ile uyarılmasına rağmen kanalların aktive olmadığı gözlemlenmiştir.

Günümüzde hipertansiyon ve nörolojik hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalıkların tedavisinde kullanılan Ca⁺² blokerlerinin hiçbiri TRPM2 kanallarını bloke etmemektedir. Yani TRPM2 katyon kanallarının bloke olmayarak hücre içine Ca⁺² iyon akışının devam etmesinden dolayı kullanılan Ca⁺² blokerleri tedavide tam bir başarı sağlayamamaktadır. Bu tez çalışma sonuçlarına göre, TRPM2 kanallarının aktivasyonuna bağlı Ca⁺² akışının önlenilmesinde NAC uygulanmasının AKG sinir hücrelerinin oksidatif strese bağlı bozukluklarının düzeltilmesinde faydalı gözükmektedir. Ayrıca, AKG sinir hücrelerinde Ca⁺² akışının artışına bağlı ağrı oluşumunda da TRPM2 kanallarının önemli bir rolü olabilir. Bu ağrı yollarında TRPM2 kanalları üzerinde NAC'ın düzenleyici etkisi bu tez çalışmasında gösterilmesi sonucu, AKG sinir hücrelerine bağlı bozuklukların düzenlenilmesinde ve ağrı tedavisinde fayda sağlayabilecektir.

ÖZET

Arka Kök Gangliyon Hücrelerinde Oksidatif Stresle Aktive Edilen TRPM2 Katyon Kanallarının İnhibisyonunda N-Asetil Sisteinin Etkisinin Patch-Clamp Sistemi ile Araştırılması

“*Transient receptor potential melastatin 2*” (TRPM2) Katyon Kanalları, hücrel oksidatif stresle açılan seçici olmayan katyon kanallarıdır. N-asetil sistein (NAC) tiol grubu içeren bir antioksidandır. Kısa zaman önce yapılan bir çalışmada bütiyonin sülfoksimin (BSO) ile glutatyon (GSH) yetersizliği oluşturulan arka kök gangliyon (AKG) sinir hücrelerinde TRPM2 kanallarının daha fazla aktive olduklarını ve hücre içi GSH verildiğinde ise hücre dışı inkübasyonlarında kısmen inhibe oldukları gözlemlendi. Hücre dışı GSH inkübasyonu TRPM2 kanallarının inhibisyonunda tam etki göstermezken NAC’ın hücre içine GSH dan daha kolay girmesi nedeniyle TRPM2 kanalları üzerinde tam bir düzenleyici etki yapabilir düşüncesiyle bu tez çalışması planlandı.

AKG hücreleri sıçanlardan günlük çıkarılıp 24 saat BSO ile inkübe edildikten sonra patch-clamp tekniği ile H₂O₂ ile uyarım yapılarak kanal akımları gözlemlenmiştir. BSO grubunda; TRPM2 kanalları akım yoğunluğu, kontrol grubuna kıyasla çok fazla arttığı gözlemlenirken, BSO ile inkübe edildiğinde, BSO dan hem önce hem de sonra, hücrelere üçer saat NAC verildiğinde TRPM2 kanallarının aktive olmadığı gözlemlenmiştir. BSO ve H₂O₂ ile indüklenen TRPM2 kanallarına 2-*Aminoethyl diphenylborinate* (2-APB) verildiğinde kanalların önemli ölçüde bloke olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, NAC’ın, hücrelerdeki GSH seviyelerini destekleyerek, hücre içine TRPM2 katyon kanalları vasıtasıyla Ca⁺² akışını düzenlediğini gözlemlenmiş, BSO den önce verilen NAC’ın, BSO dan sonra verilen NAC a göre hücreler üzerindeki koruyucu etkisinin daha fazla olduğu gözükmiştir. Hücre içi GSH baskılanmasının periferel ağrı ağrıdaki rolü iyi bilinmektedir. Bu nedenle, bulgularımızın AKG hücrelerine GSH yetersizliğine sonucu oluşan periferel ağrı ve nöropatolojinin etiyolojisinin anlaşılması ve tedavisinde fayda sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arka Kök Gangliyon Hücresi, Glutatyon, N-Asetil Sistein, Oksidatif Stres, TRPM2 kanal antagonisti, Patch-Clamp.

ABSTRACT

Effects of N- Acetylcysteine on Inhibition of TRPM2 Cation Channels Activated by Oxidative Stress in Dorsal Root Ganglion Neurons by Patch-Clamp Technique

Transient receptor potential melastatin-like 2 (TRPM2) is a non-selective Ca^{2+} permeable cation channel and is known to be activated by H_2O_2 which is one of the most important indicators of intracellular oxidative stress. N-acetyl cysteine (NAC), a thiol containing antioxidant and maintains thiol redox in the cells. Glutathione (GSH) and cysteine depletion has been implicated in the neurobiology of sensory neurons and pain. In a recent study indicated that extracellular GSH induced less protective effects on TRPM2 cation channels in the GSH-depleted DRG neurons. It is well known that NAC is higher passing cell membranes than in GSH. Hence, the extracellular NAC may inhibitor role on the channels in the DRG neurons. We aimed to investigate the effects of 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) and NAC on buthionine sulfoximine (BSO)-induced TRPM2 cation channel currents in dorsal root ganglion (DRG) neurons of rats.

DRG neurons were freshly and daily isolated from rats and the neurons were incubated for 24 hrs with BSO. In whole-cell patch clamp experiments, TRPM2 currents in the DRG incubated with BSO were consistently induced by H_2O_2 . TRPM2 channels current densities were higher in BSO group than in control. When extracellular NAC before or after BSO incubation are introduced by chamber, TRPM2 channel currents were not activated by BSO. BSO and H_2O_2 -induced Ca^{2+} gates were blocked by the 2-APB.

In conclusion, we observed the modulator role of NAC on Ca^{2+} influx through a TRPM2 channel in intracellular GSH depleted DRG neurons. NAC incubation before BSO exposure seems to more protective effects than in NAC incubation after BSO exposure. Since cytosolic cysteine and glutathione depletion is a common feature of neuropathic pain and diseases of sensory neuron, results of current study are relevant to the etiology and treatment of neuropathology in DRG neurons.

Key words: Dorsal Root Ganglion Neurons, Glutathione, N-acetyl cysteine, Oxidative stress, TRPM2 channel antagonist. Patch-Clamp.

KAYNAKLAR

- 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.
- Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interac*. 1998; 111-112, 1-14.
- Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: Basic and clinical pharmacology. *Cerebellum* 2007; 19: 1-7.
- Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kühn FJ, Gustafsson AJ, Lückhoff A, Islam MS. H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the beta-cells: involvement of TRPM2 channels. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(9B): 3260-3267.
- Bhamre S, Nuzzo RL, Whitin JC, Olshen RA, Cohen HJ. Intracellular reduction of selenite into glutathione peroxidase. Evidence for involvement of NADPH and not glutathione as the reductant. *Mol Cell Biochem* 2000; 211(1-2): 9-17
- Birlouez-Aragon I, Tessier FJ. Antioxidant vitamins and degenerative pathologies. A review of vitamin C. *J Nutr Health Aging* 2003; 7(2): 103-109
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 2003; 91 Spec No:179-194
- 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.
- 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.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993; 49(3):481-493.
- Cheng W, Fu YX, Porres JM, Ross DA, Lei XG. Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. *FASEB J* 1999; 13(11): 1467 – 1475.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003; 4;426(6966): 517 – 524.
- Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007; 14;131(6): 1047-1058.

Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res* 2005; 39(7): 671-686

Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as anti-oxidants--a review. *J Photochem Photobiol B* 1997; 41(3):189-200.

Fonfria E, Marshall IC, Boyfield I, Skaper SD, Hughes JP, Owen DE, Zhang W, Miller BA, Benham CD, McNulty S. Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *J Neurochem*. 2005; 95(3): 715-723.

Gasser A, Glassmeier G, Fliegert R, Langhorst MF, Meinke S, Hein D, Krüger S, Weber K, Heiner I, Oppenheimer N, Schwarz JR, Guse AH. Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose. *J Biol Chem*. 2006; 281(5): 2489-2496.

Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med* 1990; 8(2):201-209.

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.

Gutteridge JM, Maitt L, Poyer L. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochem J* 1990; 269(1):169-174

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41(12 Pt 2):1819-1828

Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest* 1999; 29(3):238-245

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.

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.

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.

Hardie RC, Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*. 1992; 8(4): 643-651.

Heiner I, Eisfeld J, Warnstedt M, Radukina N, Jüngling E, Lückhoff A. Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes. *Biochem J*. 2006 1;398(2): 225-232.

Heiner I, Eisfeld J, Halaszovich CR, Wehage E, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A. Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J*. 2003; 371(Pt 3):1045-1053.

Hinds TS, West WL, Knight EM. Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical, and public health applications. *J Clin Pharmacol* 1997; 37(7): 551-558.

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.

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.

Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988; 240(4852): 640-642.

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.

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.

Juranek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys* 2005; 24(3):263-278

Kamboj A, Kiran R, Sandhir R. N-acetylcysteine ameliorates carbofuran-induced alterations in lipid composition and activity of membrane bound enzymes. *Mol Cell Biochem* 2006; 286: 107-114.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000; 149(1):43-50

Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(26): 12365-12367

Klouche K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud JJ, Cristol JP. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. *Eur J Clin Invest* 2004; 34(9): 619-625.

Knight JA. Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30(2): 145-158.

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.

Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell.* 2005; 18(1):61-69.

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.

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.

Kühn FJ, Kühn C, Nazıroğlu M, Lückhoff A. Role of an N-terminal splice segment in the activation of the cation channel TRPM2 by ADP-ribose and hydrogen peroxide. *Neurochem. Res.* 2009; 34: 227-233.

Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-aminocinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol.* 2006; 148(3): 264-273.

Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200(2): 248-254.

Lam MA, Pattison DI, Bottle SE, Keddle DJ, Davies MJ. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. *Chem Res Toxicol* 2008; 21(11):2111-2119.

Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci* 1996; 1:d 72-90.

Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 2002; 7(1):55-57; author reply 59-60.

Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 2001; 34(4): 325-336.

Massullo P, Sumoza-Toledo A, Bhagat H, Partida-Sánchez S. TRPM channels, calcium and redox sensors during innate immune responses. *Semin Cell Dev Biol.* 2006; 17(6): 654-666.

Matthews GM, Butler RN. Cellular mucosal defense during *Helicobacter pylori* infection: a review of the role of glutathione and the oxidative pentose pathway. *Helicobacter* 2005; 10(4):298-306

Mazor D, Golan E, Philip V, Katz M, Jafe A, Ben-Zvi Z, et al., Red blood cell permeability to thiol compounds following oxidative stress. *Eur J Haematol* 1996; 57: 241-246.

- Miller BA. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol.* 2006; 209(1): 31-41.
- Molleman A. *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology.* England: West Sussex, John Wiley & Sons Ltd. 2003.
- Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 2002; 65(4): 305-311.
- Nazıroğlu M, Simşek M, Kutlu M. Moderate exercise with a dietary vitamin C and E combination protects against streptozotocin-induced oxidative damage to the blood and improves fetal outcomes in pregnant rats. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42(5): 511-517.
- Nazıroğlu M. Molecular Mechanisms of vitamin E on intracellular signaling pathways in brain. In *Reactive Oxygen Species and Diseases. Ed.; Laszlo Goth, Research Signpost Press: Kerala, India.* 2007a. pp 239-256.
- Nazıroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res* 2007b; 32:1990-2001.
- Nazıroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res.* 2011; 36(3): 355-366.
- Nazıroğlu M, Özgül C. Effects of antagonists and heat on TRPM8 channel currents in dorsal root ganglion neuron activated by nociceptive cold stress and menthol. *Neurochem Res.* 2012; 37(2): 314-320.
- 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.
- 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.
- Nazıroğlu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress- induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res* 2009; 34: 2181–2191.
- 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.* 2011a; 241(2): 69-75.
- Nazıroğlu M, Özgül C, Çiğ B, Doğan S, Uğuz AC. Glutathione modulates Ca²⁺ influx and oxidative toxicity through TRPM2 channel in rat dorsal root ganglion neurons. *J Membr Biol.* 2011b; 242(3):109-118.

- Naziroglu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res.* 2009; 34(12):2181-91.
- Neher E, Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am.* 1992; 266(3): 44-51.
- Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V. Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem.* 2003; 278(33): 30813-30820.
- Nilius B. TRP channels in disease. *Biochem Biophys Acta* 2007; 1772: 805-812.
- Ozmen 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.
- 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.
- Özgül C, Nazıroğlu M, Nörolojik Hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri. *J.Exp. Clin. Med* 2010; 27: 144-151.
- 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.
- 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.
- Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferraris D, Li W, Zhang J, Stoddard BL, Scharenberg AM. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem.* 2005; 280(7): 6138-6148.
- Peskin AV. Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Biosci Rep* 1997; 17(1): 85-89
- Pinchuk I, Lichtenberg D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Prog Lipid Res* 2002; 41(4): 279-314.
- Raha S, Myint AT, Johnstone L, Robinson BH. Control of oxygen free radical formation from mitochondrial complex I: roles for protein kinase A and pyruvate dehydrogenase kinase. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(5): 421-430
- Rayman RB. Essential thrombocythemia: aeromedical considerations. *Aviat Space Environ Med.* 2009; 80(11): 968-970.

- Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg* 1989; 5(1): 79-84
- Safiulina VF, Afzalov R, Khiroug L, Cherubini E, Giniatullin R. () Reactive oxygen species mediate the potentiating effects of ATP on GABAergic synaptic transmission in the immature hippocampus. *J Biol Chem*. 2006; 281: 23464-23470.
- Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol*. 1984; 46:455-472.
- Sakmann B, Neher E. *Single-Channel Recording*. 2nd Ed., Newyork: Springer, 2009
- Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem* 1999; 6(4):279-309.
- Saricaoglu 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.
- 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
- 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.
- Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000 Aug;72(2 Suppl):653S-669S.
- Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J Neurochem* 2003; 87(2):386-94
- 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.
- Shimizu K, Hashimoto K, Komatsu N, Ijo M. Roles endogenous glutathione levels on 6-hydroxydopamine-induced apoptotic neuronal cell death in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Neuropharmacology* 2002; 43: 434-443.
- Smith MA, Herson PS, Lee K, Pinnock RD, Ashford ML. Hydrogen-peroxide-induced toxicity of rat striatal neurones involves activation of a non-selective cation channel. *J Physiol*. 2003; 547(Pt 2): 417-425.
- Tafti M, Ghyselinck NB. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol*. 2007; 64(12): 1706-1711.
- 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.

- Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol.* 2008; 153(6): 1324-1330.
- 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.
- 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.
- Van Wijk R, Van Wijk EP, Wiegant FA, Ives J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. *Indian J Exp Biol* 2008; 46(5): 273-309
- Vaziri ND, Lin CY, Farmand F, Sindhu RK. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney Int* 2003; 63(1):186-94.
- 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.
- Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP Channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Therap* 2008; 118:337-351.
- 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.
- Welin D, Novikova LN, Wiberg M, Kellerth JO, Novikov LN. Effects of N-acetylcysteine on the survival and regeneration of sural sensory neurons in adult rats. *Brain Res.* 2009; 1287: 58-66.
- Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995; 82-83: 969-974
- Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H, Mori Y. TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med.* 2008; 14(7): 738-747.
- Yogesh T. Effect of N-acetylcysteine on myocardial infarct size following ischemia and reperfusion in dogs. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1998; 42:50-56.
- Vecchiorelli A, Dotterini M, Pietrella D. COPD in patient N-acetylcysteine with macrophage activation. *Chest.* 1994; 105: 806-811.
- Zachara BA, Gromadzinska J, Wasowicz W, Zbrog Z. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol* 2006; 53(4): 663-677.

EK-1

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNV. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
18.01.2011	02	05

SDÜ. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 18 OCAK 2011 tarihinde Saat 15:00'de toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

05-Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi A.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'nun yürütücüsü olduğu Y. Lisans Öğr. Cemil ÖZGÜL, Y. Lisans Öğr. Bilal ÇİĞ'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Arka Kök Gangliyon Hücrelerinde Oksidatif Stresle Aktive Edilen TRPM2 Katyon Kanallarının İnhibisyonunda N-asetilsistein'in Etkisinin Patch-Clamp Sistemi İle Araştırılması" konulu çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Wistar Albino	Dişi	8	7-12 Haftalık

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

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU BAŞKAN	Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN ÜYE	Prof. Dr. Münire ÇAKIR ÜYE
KATILMADI		
Doç. Dr. Sema BİRCAN ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Efan UZ ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR ÜYE
	KATILMADI	KATILMADI
Vet. Hekim İsmail UZ ÜYE	Ecz. Mustafa Serhan DERYAL ÜYE	Vet. Hekim Salih DOĞAN ÜYE
KATILMADI		

ÖZGEÇMİŞ

Cemil ÖZGÜL

Kişisel Bilgiler:

Doğum Tarihi : 01.08.1986

Doğum Yeri : İzmit

Yabancı Dil : İngilizce

Yazışma Adresi : 1. Etap TOKİ Evleri C:2 Blok D:21 PK: TR-32260
Çünür / Isparta

Telefon No : 542 686 6838

Elektronik Posta : cmlozgl@gmail.com

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm / Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen ve Edebiyat Fakültesi	Süleyman Demirel Üniversitesi	2009

Yüksek Lisans Tezi ve Danışmanı:

“Arka Kök Gangliyon Hücrelerinde Oksidatif Stresle Aktive edilen TRPM2 Katyon Kanallarının İnhibisyonunda N-Asetil Sisteinin Etkisinin Patch-Clamp Sistemi ile Araştırılması”

Danışman : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU