

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

**TRANSFEKTE HÜCRELERDE OKSİDATİF STRESLE AKTİVE
EDİLEN TRPM2 KATYON KANALLARININ
İNİBİSYONUNDA SELENYUMUN ETKİSİNİN
PATCH-CLAMP TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

MUSTAFA KÜÇÜKAYAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 2681-YL-11 proje numarası ile desteklenmiştir
Tez. No: 76**

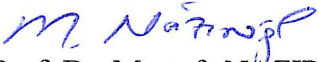
2011-İSPARTA


KABUL VE ONAY SAYFASI

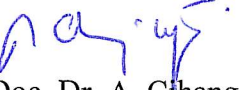
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

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: 21/12/2011


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


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


Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ
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

Sonsuz anlayış ve sevgileri için muhterem annem, babam ve kardeşlerime,

Bilgi, deneyim ve tavsiyeleriyle daima yoluma ışık tutan, değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU hocamıza,

Zor zamanlarımda daima yanımda olan biyofizik Anabilim Dalındaki değerli çalışma arkadaşlarım Cemil Özgül ve Yrd. Doç. Dr. Ömer Çelik'e,

Bu tezin (Proje No: 2681-YL-11) hazırlanmasına katkı sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Ve üzerimde emeği olan herkese,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Saygılarımla...

Mustafa KÜÇÜKAYAZ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre Zarının Yapısı ve Biyofiziksel Özellikleri.....	3
2.1.1. Akıcı Mozaik Zar Modeli	3
2.2. Hücre Zarı Kanalları.....	4
2.2.1. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanal Ailesi	4
2.2.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları	7
2.2.1.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) Katyon Kanalları	8
2.3. Yama-Menteşe (Patch-clamp) Yöntemi	10
2.3.1. Hücre Üzerinde (On-cell, Cell-attached)	11
2.3.2. Tüm Hücre (Whole-cell).....	12
2.3.3. İçi-Dışarıda (Inside-out)	12
2.3.4. Dışı-Dışarıda (Outside-out)	12
2.4. Yama-Menteşe Setini Oluşturan Temel Malzemeler	13
2.5. Serbest Radikaller.....	15
2.6. Antioksidanlar	18
2.6.1. Selenyum	18
2.7. Transfeksiyon	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	21
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Hücre Kültürü	23

3.2.2. Transfeksiyon	24
3.2.3. Lipit Peroksidasyon Analizi	25
3.2.4. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSHPx) Analizleri	26
3.2.5. Yama-menteşe (Patch-clamp) Deneylei	27
3.2.5.1. Solüsyonların Hazırlanması	27
3.2.5.2. Gruplar Oluşturulması	29
3.2.5.3. Yama-menteşe Deneylelerinde Kayıtların alınması	29
3.2.6. Kalsiyum Sinyali	31
3.2.7. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	33
4.1. CHO hücrelerinde lipid peroksidasyon (LP), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve indirgenmiş glutasyon (GSH) seviyelerinin değeriendirilmesi	33
4.2. Yama-menteşe Deneylelerinin Değeriendirilmesi	34
4.2.1. Ekstraselüler Selenyum İle İnkübe Edilen CHO Hücrelerinden Yama- Menteşe Yöntemiyle Elde Edilen TRPM2 Kanal Akımlarının Değeriendirilmesi	34
4.2.2. İntraselüler Selenyum Uygulaması İle CHO Hücrelerinden Yama- Menteşe Yöntemiyle Elde Edilen TRPM2 Kanal Akımlarının Değeriendirilmesi	36
4.3. Kalsiyum Sinyali Sonuçlarının Değeriendirilmesi	39
4.3.1. Selenyum Uygulanmış ve Hidrojen Peroksit ile Aktive Edilmiş Hücrelerde Kalsiyum Sinyali	39
4.3.2. Selenyum Uygulanmış ve Hidrojen Peroksit ile Aktive Edilmiş Hücrelerde Hücre İçi Kalsiyum Salınım Grafikleri	40
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
ÖZET	47
ABSTRACT	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACA	: Antranilik asit
ADPR	: Adenozin di-fosfat riboz
AKG	: Arka kök gangliyon
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi Kalsiyum İyonu
CCl₃·	: Triklormetil
CCl₄	: Karbon tetraklorür
CHO	: Chinese Hamster Ovary
Cu	: Bakır
DM	: Diabetes Mellitus
DTNB	: 5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)
FBS	: Fötal Buzağı Serumu (Fetal Bovine Serum)
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
KAT	: Katalaz
LPO	: Lipid peroksidasyon
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NMDG	: N-methyl-D-glucamin
NO·	: Nitrik oksit radikali
NUDT9-H	: TRPM üzerinde bulunan enzimatik bölge
O₂	: Moleküler oksijen
¹O₂	: Singlet Oksijen
O₂⁻	: Süperoksit Radikali
ONOO⁻·	: Peroksinitrit
·OH	: Hidroksil Radikali
PARP	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
PC 12	: Rat Adrenal Medulla Pheochromocytoma Hücresi
ROO·	: Peroksil

ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
Se	: Selenyum
SOD	: Süperoksit dismutaz
TRP	: Transient receptor potential
TRPA	: Transient receptor potential ankyrin
TRPC	: Transient receptor potential classical
TRPL	: Transient receptor potential Like
TRPM	: Transient receptor potential melastatin
TRPML	: Transient receptor potential mucolipin
TRPM2	: Transient receptor potential melastatin 2
TRPP	: Transient receptor potential polycystin
TRPV	: Transient receptor potential vanilloid
Zn	: Çinko
2-APB	: 2-Aminoethoxydiphenyl borate

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. TRP Kanallarının homomultimerik ve heteromultimerik yapısı	6
Şekil 2. TRP Kanallarının hücre zarındaki yerleşimi ve geçirgenliği.	6
Şekil 3. TRP kanal üst ailesi	7
Şekil 4. TRPM ailesi şematik gösterimi.	8
Şekil 5. Yama-menteşe (Patch-clamp) metodu.....	11
Şekil 6. Yama-menteşe konfigürasyonları.....	13
Şekil 7. Selenyumun metabolizması. H ₂ Se: hidrojen selenid, CH ₃ SeH: metil selenid, (CH ₃) ₂ Se: dimetil selenid, (CH ₃) ₃ Se ⁺ : trimetilselenonyum iyonu, GS-Se-GS: selenodiglutatyon, GS-SeH: glutatyon selenid	19
Şekil 8. 100 nM Selenyum ile 36 saat boyunca inkübe edilmiş fakat H ₂ O ₂ ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.....	34
Şekil 9. H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.....	34
Şekil 10. H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.....	35
Şekil 11. 100 nM Selenyum ile 36 saat boyunca inkübe edilmiş ve H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.....	36
Şekil 12. Pipet içi selenyum uygulanan (20 nM) ve H ₂ O ₂ ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	36
Şekil 13. Pipet içi selenyum uygulanan (20 nM) ve H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	37
Şekil 14. Pipet içi selenyum uygulanan (20 nM) ve H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında ait akım-voltaj ilişkisi	38
Şekil 15. Ekstraselüler ve İntraselüler Selenyum uygulanan ve H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	38
Şekil 16. Selenyum ile inkübe edilen CHO hücrelerinde sitozole Ca ⁺² salınımının konsantrasyon-zaman grafiği.	40
Şekil 17. Selenyum ile inkübe edilen CHO hücrelerinde sitozole Ca ⁺² salınımının akım-zaman grafiğinin altında kalan bölgelerin alan grafiği	40

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Patch-clamp (Yama-menteşe) seti genel görünüm (İnverted mikroskop, Motorize manipülatör, Isı kontrollü çember, Titreşimi önleyici masa, Faraday kafesi ve perfüzyon sistemi).	14
Resim 2. Hücre Kültürü (Laminar akım kabini).....	25
Resim 3. Yama-menteşe oluşturulmuş hücrenin mikroskopik görünümü.....	31

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. GSH-Px aktivitesinin tayin edilmesi deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar.	27
Tablo 2. Normal ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü	28
Tablo 3. NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü.....	28
Tablo 4. Hücre içi tampon çözelti hazırlama protokolü.....	28
Tablo 5. Selenyum, Selenyum + 2-APB ve Selenyum + Verapamil + Diltiazem ile inkübe edilen CHO hücrelerinde Glutatasyon Peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi, Glutatyon (GSH) ve Lipit Peroksidasyon seviyeleri (ortalama ± SD)	33

1. GİRİŞ

Hücre, bir canlının tüm yaşamsal özelliklerini taşıyan ve uygun koşullarda canlılığını tek başına sürdürebilme yeteneğine sahip, temel yapı ve işlem birimidir. İnsan vücudu, sayısı 100 trilyona yakın olan çok çeşitli hücrelerden ve hücreler arasındaki ortamı dolduran organik ve inorganik maddelerden kurulmuştur (Guyton and Hall 2006).

Hücreler, yapılarını oluşturan zar, enzim ve organeller sayesinde canlılıklarını devam ettirebilmektedir. Hücreyi çepeçevre sararak, onu içinde bulunduğu ortamdan ayıran ve ona bütünlük kazandıran seçici geçirgenlik özelliği gösteren yapı 'hücre zarı' olarak tanımlanmaktadır. Hücre zarında yerleşik halde bulunan ve hücreye iyon giriş çıkışını sağlayan protein yapılara iyon kanalı adı verilmektedir (Guyton and Hall 2006, Pehlivan 2007). İyon kanalları hücre fonksiyonlarının yerine getirilmesinde çok önemli bir role sahiptir. Hücre zarı üzerinde bulunan bu kanallardan biri de oksidatif stresle aktive olabilen Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) katyon kanallarıdır (Nazıroğlu and Lückhoff 2008a, 2008b). Bu kanallar, hücrede serbest radikallerin ve dolayısıyla oksidatif stresin artışına bağlı olarak aktive olabilmektedir (Miller 2004, 2006). Bu durumun doğal bir sonucu olarak; doku, organ ve sistem bazında bozukluklar meydana gelmektedir (Kühn et al., 2005, 2009, Nazıroğlu 2011a, Uğuz 2011).

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız ve çok etkin moleküllerdir (Halliwell 1987, 1991, 2006). Serbest radikaller, mitokondrial ve mikrozomal elektron transportu ve bakterilerin yok edilmesi gibi fizyolojik süreçler sonucu oluşabileceği gibi ilaçlar, radyasyon ve stres gibi dış etkenler sebebiyle de meydana gelebilmektedir (Freeman and Crapo 1982, Frei 1994, Bergendi et al., 1999, Halliwell and Gutteridge 1992, 1999). Serbest radikaller hücrede oksidatif stres oluşumuna sebep olarak diğer hücresel bileşenlere olduğu gibi iyon kanallarına da geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz hasar vermektedir (McNulty and Fonfria 2005, Miller 2006, Miller and Zhang 2011).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu işlevleri yapan maddeler genel olarak 'antioksidan' olarak tanımlanmaktadır (Frei 1994).

Patch-clamp yani ‘yama-menteşe’ tekniği hücre zarının elektrofizyolojik özelliklerinin ve iyon kanallarının incelenmesine olanak sağlayan en güncel araştırma yöntemlerinden biridir (Molleman 2003). Bu yöntemde; kullanılan mikro pipet ve elektrotlar vasıtasıyla, iyonların hücre zarında bulunan iyon kanallarından geçerken oluşturdukları elektriksel akımlar ölçülebilmektedir (Hille 1992).

Son 10 yıl içerisinde keşfedilmiş olan TRPM2 katyon kanallarının, N ve C uçları bulunmaktadır. Hücre sitozolünde bulunan C ucu üzerinde ADP-Riboz pirofosfataz enzimi bulunmaktadır. Bu enzim oksidatif stres ve ADP-riboz tarafından aktive edilebilmektedir. Böylece, fizyolojik şartlarda hücre dışında fazla olan daha ziyade Ca^{+2} ve az düzeyde Na^{+} iyonları bu kanallar vasıtasıyla hücre içerisine girebilmektedir. Bu sayede hayati faaliyetlerimiz devam etmektedir. Şayet oksidatif stres ürünleri; radyasyon, stres ve çevresel kirlilik gibi nedenlerle mitokondride fazla miktarda üretilirse, TRPM2 kanallarının aktivasyonu yoluyla hücre içerisine daha fazla Ca^{+2} girmektedir (Hill et al., 2004). Bu durumda mitokondri, depolarizasyonu ve porların açılmasıyla daha fazla radikal üretilmekte ve TRPM2 kanalları daha da aktive olmaktadır. Bu olay hücrenin çalışmasını ya yavaşlatmakta ya da programlı hücre ölümü sürecini (apoptozis) başlatabilmektedir.

Selenyum vücutta sentezlenemediğinden dışarıdan diyet ile alınması gereken ve hem kendisinin sahip olduğu antioksidan özelliğinden dolayı hem de antioksidan enzimlerin yapısına girerek de ikincil bir koruma sağlamaktadır. Selenyumun antioksidan özelliği hücre çeşitlerine göre belirlenecek olan optimum doz ile gerçekleşmekte doz aşımı olduğunda ise toksik etkisi gözlenmektedir.

Selenyum hücrenel antioksidan savunmada önemli rolleri olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) başta olmak üzere birçok enzimin yapısına girmektedir. Bu özelliğiyle TRPM2 kanalları üzerinde düzenleyici etkiye sahip olabilir. Yaptığımız kaynak taramalarında bu konuda hiçbir bilimsel çalışmaya rastlamadık. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, yama-menteşe metodu kullanılarak, selenyumun oksidatif stresle aktive edilmiş TRPM2 katyon kanal akımları, Ca^{+2} sinyali ve lipid peroksidasyon düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Zarının Yapısı ve Biyofiziksel Özellikleri

Bir canlının yapısal ve işlevsel olarak tüm özelliklerini taşıyan en küçük yapı birimi olarak tanımlanan hücreyi, bulunduğu dış ortamdan ayırarak yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmesini sağlayan en önemli bileşeni hücre zarıdır. Plazma zarı olarak da bilinen bu zar; hücreyi dış ortamdan ayıran, seçici geçirgen canlı bir yapıdır. Kalınlığı 7,5-10 nanometre arasında değişkenlik gösteren bu yapı, çift katlı lipit tabakadan ve bu tabaka arasına serpiştirilmiş durumda bulunan proteinlerden oluşmuştur (Guyton and Hall 2006, Pehlivan 2007).

2.1.1. Akıcı Mozaik Zar Modeli

Elektron mikroskobu çalışmaları, zarların lipoproteinlerden yapılmış akıcı mozaik şeklindeki fonksiyonel birimler olarak incelenmesinin daha uygun olacağını göstermektedir. İlk defa 1972 yılında ortaya konulan '*akıcı mozaik zar*' modeline göre; hücre zarı çift katlı lipit tabakadan oluşmaktadır (Singer and Nicolson 1972). Çift katlı lipit tabaka temel olarak fosfolipit moleküllerinden oluşmuştur (Abe and Puertollano 2011). Fosfolipit molekülünün suda çözünebilir (hidrofilik) ve suda çözünemeyen (hidrofobik) olmak üzere iki ucu mevcuttur. Fosfolipitlerin yağ asidi içeren hidrofobik kuyruk kısımları, hücre zarının iç tarafına doğru bakarken, fosfat içeren hidrofilik baş kısımları ise hücre içi (intraselüler) ve hücre dışı (ekstraselüler) sıvılar ile temas halindedir (Singer and Nicolson 1972, Pehlivan 2007). Hidrofobik uçlar birbirleri tarafından karşılıklı olarak çekilirken, hidrofilik baş kısımlar intraselüler ve ekstraselüler sıvıda bulunan su molekülleri tarafından itilmektedir. Bu nedenle zar, ortada birleşme eğilimi göstermektedir ve zarın ortasında lipit yönünden zengin bir tabaka meydana gelmektedir (Guyton and Hall 2006, Pehlivan 2007).

Hücre zarının, hücreyi dış ortamdan ayırmak, özgün şekil ve yapısını korumak, yıpranan kısımlarını onarmak, dış ortamla madde alış-verişini sağlamak, hücre içerisine alınacak hormonları tanımak ve diğer hücrelerle iletişimi sağlamak gibi hayati, birçok fonksiyonu vardır (Guyton and Hall 2006, Pehlivan 2007). Yukarıda bahsedilen görevlerin yerine getirilebilmesi hücre zarında bulunan iyon

kanalları vasıtası ile olmaktadır. Hücre zarı; %55 protein, %25 fosfolipit, %13 kolesterol, %4 diğer lipitler ve %3 karbonhidratlardan oluşmaktadır. Her hücrenin protein, yağ ve karbonhidrat oranları birbirlerinden farklı olduğu için her hücre zarı, o hücreye özgüdür (Cummings 2007).

2.2. Hücre Zarı Kanalları

Hücre zarı içerisine gömülü halde bulunan ve hücrelerarası sıvı ile hücreiçi sıvı arasında madde alışverişini sağlayan protein yapılar bulunmaktadır. Bu protein yapılar hücre zarının sürekliliğini bozarak çeşitli moleküller için alternatif geçiş noktası haline gelmektedir. Hücre zarı kanalları taşıyıcı proteinler ve kanal proteinleri olmak üzere iki kısımda incelenmektedir (Guyton and Hall 2006).

1. Taşıyıcı proteinler: Zar üzerinde bulunan proteinlerin büyük bir bölümü bu grupta yer almaktadır. Taşınacak olan molekül protein yapıya bağlandıktan sonra molekülün bir taraftan diğerine aktarılması için protein yapıda şekilsel değişiklikler meydana gelir. Taşıyıcı proteinin ortasında meydana gelen boşluktan moleküllerin taşınması gerçekleştirilir.
2. Kanal Proteinleri: Bu proteinler geçirgenlik özelliği gösterdiği iyon ve molekülleri için uygun bir yapıya sahiptirler. Bazıları suyun rahat bir şekilde geçebilmesi için özel kanallara sahiptir.

Gerek kanal proteinleri ve gerekse taşıyıcı proteinler genellikle zardan geçmesine izin verdikleri molekül veya iyonların türüne göre seçicilik göstermektedir (Cummings 2007). Kanal proteinlerinin sınıflandırılması ya geçirdikleri iyon göre (Kalsiyum kanalı, Potasyum kanalı gibi) veya kanalın aktivasyonuna sebep olan mekanizmalara göre (Ligand Duyarlı, Voltaja duyarlı gibi) yapılmaktadır (Cummings 2007, Abe and Puertollano 2011).

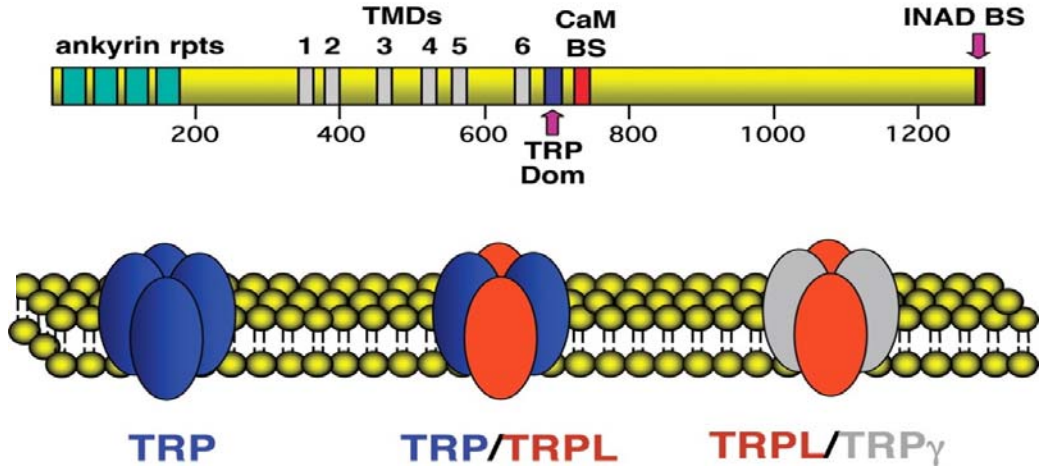
2.2.1. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanal Ailesi

TRP kanal üst ailesi memelilerde bulunan, voltaj bağımlı olmayan, kalsiyum, sodyum ve potasyuma geçirgen, katyon kanallarıdır (Mobasheri and Barrett-Jolley 2011). TRP proteini ilk defa *Drosophila Melanogaster* türü sirke sineği

fotoreseptörleri üzerine yapılan araştırmalar sırasında keşfedilmiştir (Cosens and Manning 1969, Minke et al., 1975). Normal TRP proteinine sahip sirke sineklerinin elektoretinogramlarında (ERG) sürekli aydınlatmaya karşı hücrelerden alınan cevapların da sürekli olduğu ortaya konmuştur (Minke 1977, 2010, Harteneck 2005, Dadon and Minke 2010). Fakat TRP proteinini kodlayan genlerde meydana gelen spontanöz bir mutasyon sonucu; ışığa karşı sürekli voltaj cevabı yerine ‘*transient*’ yani geçici bir voltaj cevabı ve buna bağlı olarak görsel defekt olduğu saptanmıştır (Clapham et al., 2001, Montell 2001, 2005a, Clapham 2003). TRP geni ilk defa 1992 yılında klonlanmıştır. Böylece TRP mutant genindeki eksik proteinin, Ca⁺² iyonunun hücreye başlıca giriş yollarından biri olabileceği sonucuna varılmıştır (Hardie and Minke 1992, 1993, Hardie 2003). *Drosophila*’da TRP’ye genetik açıdan çok fazla benzerlik gösteren ve bu benzerlikten dolayı ‘TRP-Like’ yani TRP benzeri (TRPL) olarak tanımlanan kanalların mevcudiyeti ortaya konulmuştur (Kraft and Harteneck 2005). TRP olmadığı halde ışığa karşı voltaj cevabının oluşması TRPL’nin varlığıyla açıklanmaktadır (Montell and Rubin 1989). *Drosophila* fotoreseptör hücrelerinde hem TRP hem de TRPL proteinlerinin eksprese edildiği bildirilmiştir (Dadon and Minke 2010).

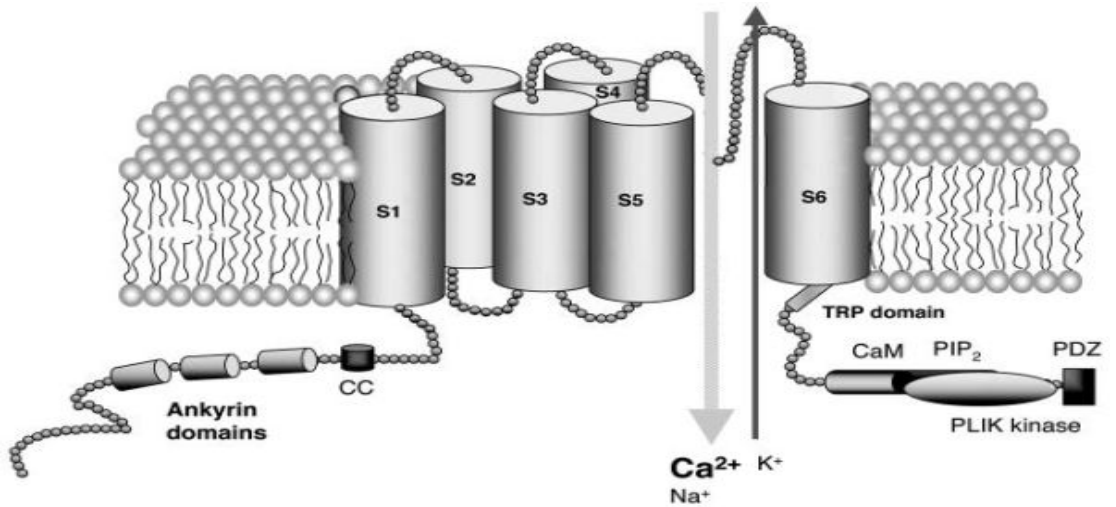
Kuantum pikleri fotoreseptör hücrelerinin ışık uyarana karşı oluşturduğu temel cevaptır. Kuantum pikleri; fotoreseptör hücreleri tarafından yakalanan tekli fotona karşı, birçok kanalın aynı anda aktive olmasıyla meydana gelmektedir. Kanalların aktivasyonu ile öncelikle sinyal transdüksiyonu oluşumu gerçekteşmektedir. Sonrasında ise oluşan sinyalin yükseltgenerek devam ettirilmesiyle kuantum piklerinin elde edildiği ortaya konulmuştur. Bu nedenle TRP ve TRPL’nin her ikisinin de Ca⁺²’a geçirgen kanal veya ışıkla aktive olabilen taşıyıcı proteinler olabileceği kanısına varılmıştır (Montell 2001).

Drosophila gözünde bulunan TRP proteinlerinin büyük çoğunluğu homomultimerik bir yapı göstermektedir. Bunun yanında TRPL ise TRPM/TRPL veya TRPL/TRP γ şeklinde heteromultimer yapı göstermektedir (Dadon and Minke 2010). Heteromultimerik yapıya sahip kanallar biyofiziksel özellikler ve kanal iletkenliği bakımından homomultimerik yapıdakilere göre farklılık göstermektedir (şekil 1).



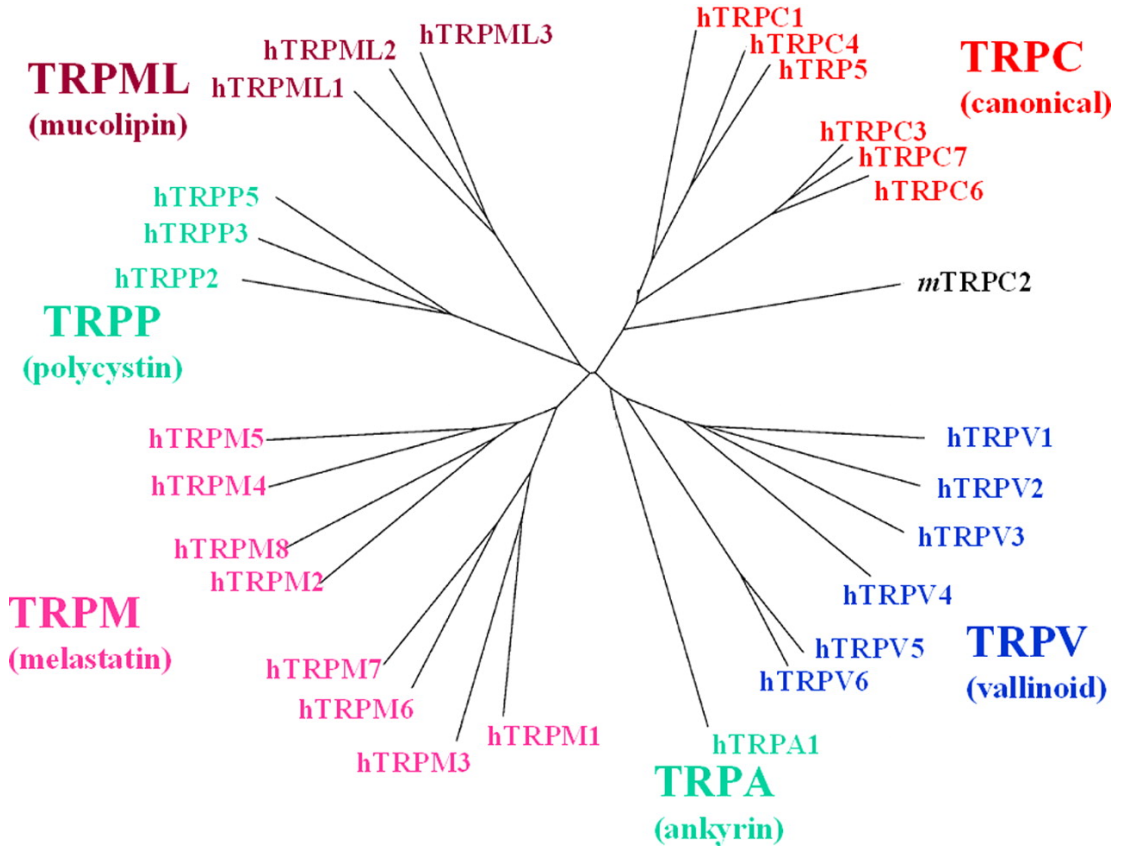
Şekil 1. TRP Kanallarının homomultimerik ve heteromultimerik yapısı (Montell 2005b)

TRP kanalları dokunma, duyma, tat alma, görme, termal hassasiyet gibi duyuların algılanmasında çok önemli bir role sahiptir (Montell 2005a, 2005b, Venkatachalam and Montell 2007). Genel olarak N-terminal, transmembran bölgesi ve C-terminal olmak üzere 3 ana bölgeden meydana gelmiştir (Voets and Nilius 2007, Nazıroğlu 2011a). Tekrarlanan ankrin ve coiled-coil (cc) diye adlandırılan yapılar N-terminal üzerinde bulunurken, TRP homoloji ve enzimatik Nudiks boks segmentleri C-terminal bölgesi üzerinde yer almaktadır. C-terminal bölgesinde enzimatik bir bölge bulunması aynı zamanda kanal vazifesi görmesi nedeniyle ‘chanzyme’ olarak da adlandırılabilirler. İyonların bir taraftan diğerine geçişi, transmembran bölgesindeki beş ve altıncı segmentler arasından gerçekleşmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. TRP Kanallarının hücre zarındaki yerleşimi ve geçirgenliği.

TRP kanalları insan ve fareler gibi omurgalılar dışında sinek ve solucan gibi hayvanlarda da bulunmaktadır (Heiner et al., 2003b). TRP kanalları sekans sınıflandırmasına göre yedi alt aileden oluşmaktadır. Bu alt ailelerden altı tanesi; canonical veya klasik tip olarak adlandırılan (C), vanilloid reseptör (V), melastatin (M), ankrin (A), mukolipin (ML) ve polisistin (P) memelilerde bulunurken sadece omurgasızlarda bulunan ve TRP bölgesi içermeyen TRPN, memelilerde bulunmamaktadır (Şekil 3). Yukarıda sayılanlardan *Drosophila* TRP proteinine homologik bakımdan en fazla benzerlik gösteren TRPC kanallarıdır. Buna rağmen TRP alt ailelerinin her bir üyesi *Drosophila* TRP proteinine en az % 20 lik bir ortak benzerlik göstermektedirler.

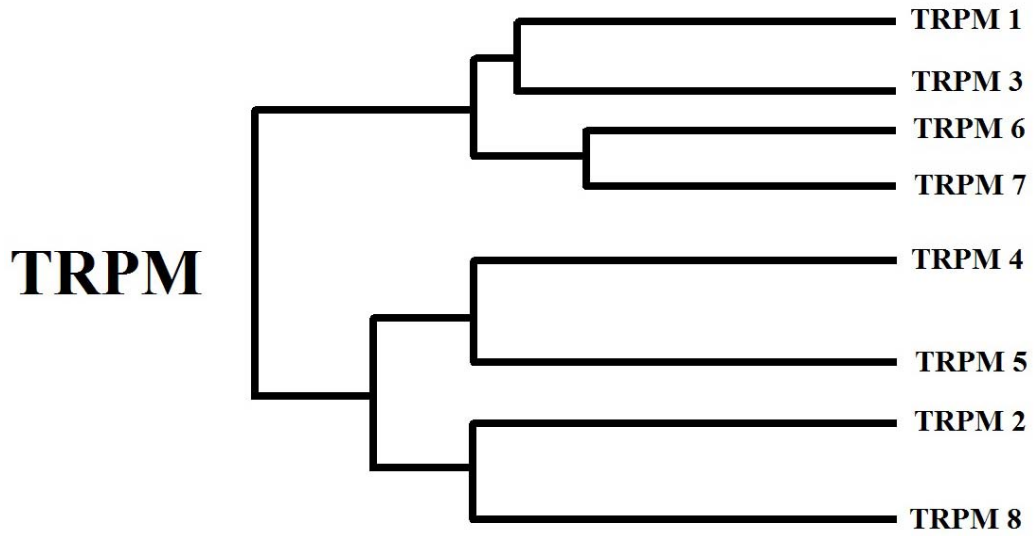


Şekil 3. TRP kanal üst ailesi. (Nilius et al., 2007)

2.2.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları

Bu ailenin ilk keşfedilen üyesi TRPM1 kanallarıdır ve ilk kez melanoma hücrelerinde belirlenmiştir (Nilius 2007, Nilius and Owsianik 2010). Bu nedenle bu aileye mensup üyeler melanoma kelimesinin baş harfi olan 'M' harfi ile ifade

edilmektedir. TRPM1 kanallarının yüksek oranda metastatik potansiyele sahip olan melanoma hücrelerindeki ekspresyonunun, non-metastatik hücrelerdekine göre düşük olduğu tespit edilmiştir (Prevarskaya et al., 2007, Watanabe et al., 2008). Bunun yanında normal dokularda da çokça bulunduğu tespit edilmiştir. TRPM kanalları TRPMC kanallarında olduğu gibi 6 segmentten oluşan bir transmembran bölgesine, N-terminal ve C-terminal bölgelerine sahiptirler (Zhang et al., 2006, 2007, Nazıroğlu 2007b).



Şekil 4. TRPM ailesi şematik gösterimi.

Bu ailenin 4 ana grupta incelenen TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7 ve TRPM8 olmak üzere şekil 4’de gösterildiği gibi toplam 8 üyesi bulunmaktadır (Pan et al., 2011). TRPM alt ailesinin özellikle oksidatif stresle aktive olan, TRPM2 kanallarının hücre farklılaşması ve canlılığın devam ettirilmesi gibi önemli fonksiyonların yerine getirilmesinde rol oynadıkları bilinmektedir (Hara et al., 2002, Zhang et al., 2003, Fonfria et al., 2004, 2006).

2.2.1.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) Katyon Kanalları

TRPM2, kalsiyuma geçirgen non-selektif katyon kanallarıdır (Nazıroğlu 2011a). TRPM2 geni ilk kez 1998 yılında klonlanmıştır (Nagamine et al., 1998). Bu kanallar önceleri TRPC7 ve LTRPC2 olarak daha sonra ise yapılan filogenetik sınıflandırma sonucunda günümüzde de yaygın halde kullanılan TRPM2 olarak

adlandırılmıştır (Montell 2001, Ramsey et al., 2006). TRPM2 kanallarının varlığı başta beyin ve kemik iliği olmak üzere böbrek, bağırsak, karaciğer, akciğer, testis, prostat, pankreas, iskelet kası, lökositler ve arka kök gangliyonları (AKG) gibi birçok doku ve hücrede tespit edilmiştir (Hecquet and Malik 2009). Bu kanallar sodyum ve potasyuma geçirgen olmakla beraber esasında hücreye kalsiyumun girişinde çok önemli rol oynarlar (Nishida et al., 2003). TRPM2'nin transmembran bölgesinin yanında intraselüler N-terminal ve C-terminal uçları bulunmaktadır. C terminal üzerinde bulunan enzimatik bölge (NUDT9-H) hücredeki oksidatif hasarın temsilcisi olan ADPR için spesifik bağlanma bölgesi olduğu bildirilmiştir (Özgül ve Nazıroğlu 2010). Bu kanalları aktive ve bloke eden mekanizmalar henüz kesin olarak belirtilmemiştir (Hecquet et al., 2008).

Hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyi (80-100 nM) hücre dışına kıyasla 20,000 misli daha azdır (Clapham, 2003). Metabolizma sonucu üretilen H_2O_2 hücre içerisine girerek TRPM kanalını aktive etmesiyle hücre içerisine Ca^{+2} iyonu girişini artırdığına inanılmaktadır (Hara et al., 2002, Wehage et al., 2002). Bir kısım araştırmacıların sonuçlarına göre ise H_2O_2 hücre içi organellerde (çekirdek, mitokondride v.b) ADP-riboz sentezini artırmakta ve bu ADP-riboz kanalı açmaktadır (Perraud et al., 2001, Heiner et al., 2003a, Kolisek et al., 2005). Ayrıca, hücre kültürü ortamında TRPM2 kanallarının H_2O_2 ile aktive olduğu gözlenmiştir (Wehage et al., 2002, Ishii et al., 2006). Fakat, bu bildirim zıt sonuçlara sahip çalışmalar da mevcuttur (Fonfria et al., 2004, 2006, Kolisek et al., 2005). Hücre içi Ca^{+2} iyonu artışı hücre ölümlerine kadar varan patofizyolojik olayların başlatıcısıdır (Lange et al., 2009, Pantaler and Lückhoff 2009). Günümüzdeki TRPM2 kanalları, Ca^{+2} kanal inhibisyonunda kullanılan ilaçlar ile bloke olmamaktadır (Ishii et al., 2006, Yamamoto et al., 2007). Bu nedenle hücre içine Ca^{+2} girişini ayarlayan TRPM2 hücre zarı katyon kanallarını aktive ve inhibe eden mekanizmaların araştırılması hücre içi Ca^{+2} artışı ile ilgili başta iltihabi, kanser ve kalp hastalıklarının oluşum nedeninin bilinmesi açısından çok önemlidir (Minke 2006, Lange et al., 2008, Sumoza-Toledo and Penner 2011).

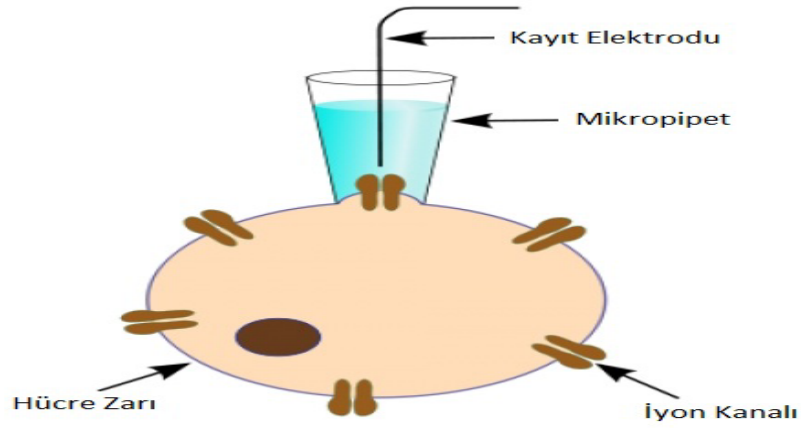
Yapılan çalışmalarda, TRPM2 kanal aktivasyonunun düzenlenmesinde 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) ve antranilik asidin (ACA) önemli rolleri olabileceği düşünülmektedir (Kraft et al., 2006, Harteneck et al., 2007, Togashi et al.,

2008). TRPM8 kanal blokürü olarak bilinen 2-APB'nin inositol 1,4,5-trifosfataz reseptör antagonisti olduğu ve kanal etkinliğini düzenleme etkisini bu şekilde gösterdiği bildirilmiştir (Tóth and Csanády 2010). Oksidatif hasar oluşturulmuş transfekte CHO hücrelerine kalsiyum girişinin kontrolünde 2-APB'nin önemli bir rolü olduğu savunulmaktadır (Togashi et al., 2008, Nazıroğlu et al., 2011a, 2011b). ACA'nın ise etkisini fosfolipaz A2'yi baskılayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Bari et al., 2009).

2.3. Yama-Menteşe (Patch-clamp) Yöntemi

19. yüzyılda elektrik akımının canlılar üzerindeki etkisini merak eden araştırmacılar bazı hayvanlar, özellikle de kurbağalar üzerinde çeşitli deneyler yapmışlardır. Bu deneyler sonucunda elektriksel uyarıya maruz bırakılan kurbağa iskelet kaslarında kasılma ve kasılmaya bağlı olarak hareketin meydana geldiği gözlemlenmiştir (Molleman 2003). Alan Lloyd Hodgkin ve Andrew Huxley' in mürekkep balığı dev aksonu ile yaptıkları bir çalışma sonucunda, uyarılabilir hücre zarlarının biyofiziksel özelliklerini açıklayan bir model ortaya konulmuştur (Hodgkin and Huxley 1952). Daha sonraları ise gelişen teknolojiye paralel olarak çok küçük çapta uçlara sahip olan pipetlerin üretimi mümkün olmuştur (Hamill et al., 1981). Öyle ki, yeni geliştirilen bu pipetlerle, hücre zarına temas etmek ve iyon kanallarından hücreye girip çıkan iyonların oluşturduğu elektrik akımını ölçmek mümkün hale gelmiştir (Neher and Sakmann 1992, Molleman 2003, Sakmann and Neher 1984, 2009). Yama-menteşe tekniğinin temel prensibi; çapı yaklaşık olarak 0,5-1 μm çapında olan bir mikropipet ucu ile hücre zarı arasında mühür diye tabir edilen sıkı bir yapışma sağlanmasının ardından pipet ucu içerisinde kalan hücre zarı parçası içerisinde bulunması muhtemel olan iyon kanal akımlarının ölçülmesine dayanmaktadır (Şekil 5). 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 (Neher and Sakmann 1992). Voltaj kenetleme tekniğinde, zar potansiyeli belirli bir değere kenetlenerek zar boyunca oluşan elektrik akımı ölçülmektedir. 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 Bert Sakmann tarafından asetil-kolin ile aktive edilebilen hücrelerden aldıkları tekli kanal kayıtları ile kullanıma sokulmuştur (Sakmann and Neher 2009).



Şekil 5. Yama-menteşe (Patch-clamp) metodu (Çelik 2011).

Yama-menteşe tekniğinin; hücre üzerinde (on-cell, cell-attached), tüm hücre (whole-cell), içi-dışarıda (inside-out) ve dışı-dışarıda (outside-out) olmak üzere 4 farklı konfigürasyonda uygulanması mümkündür (Şekil 6). Yapılacak çalışmanın niteliğine göre bunlardan birinin seçilmesi mümkündür. Aşağıda bu konfigürasyonlara kısaca değinilmiştir.

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

Mikropipet yardımıyla hücre zarına temas edilir ve pipete emme uygulanarak bu konfigürasyon elde edilir. En temel yama-menteşe tekniği uygulamasıdır (Sakmann and Neher 1984, 2009). 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 (Davie et al., 2006). Kayıt esnasında pipet halen hücre ile temas ettiğinden hücre içi organellerin kanal üzerine olan etkileri devam etmektedir (Chen et al., 2009).

2.3.2. Tüm Hücre (Whole-cell)

Mikropipet ile hücre üzerinde (cell-attached, on-cell) konfigürasyonu oluşturulduktan sonra pipete hafif bir emme uygulanır. Sonunda; mikropipetin, hücre zarını tuttuğu bölgeden plazma membranını yırtmasıyla oluşturulur (Cai et al., 1998, Molleman 2003). Mikropipet içerisine, intraselüler tampon çözeltisi doldurulmalıdır. Bu konfigürasyon ile hücre dışı hormonların plazma zarı üzerinde bulunan tüm kanal akımları üzerine olan etkilerinin incelenmesi mümkündür (Wilders 2006). Yani alınan kayıt, bir hücrenin tüm kanallarıyla verdiği cevabın bir göstergesidir (Hille 1992). 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 (Monen et al., 1998, Quinn and Beech 1998).

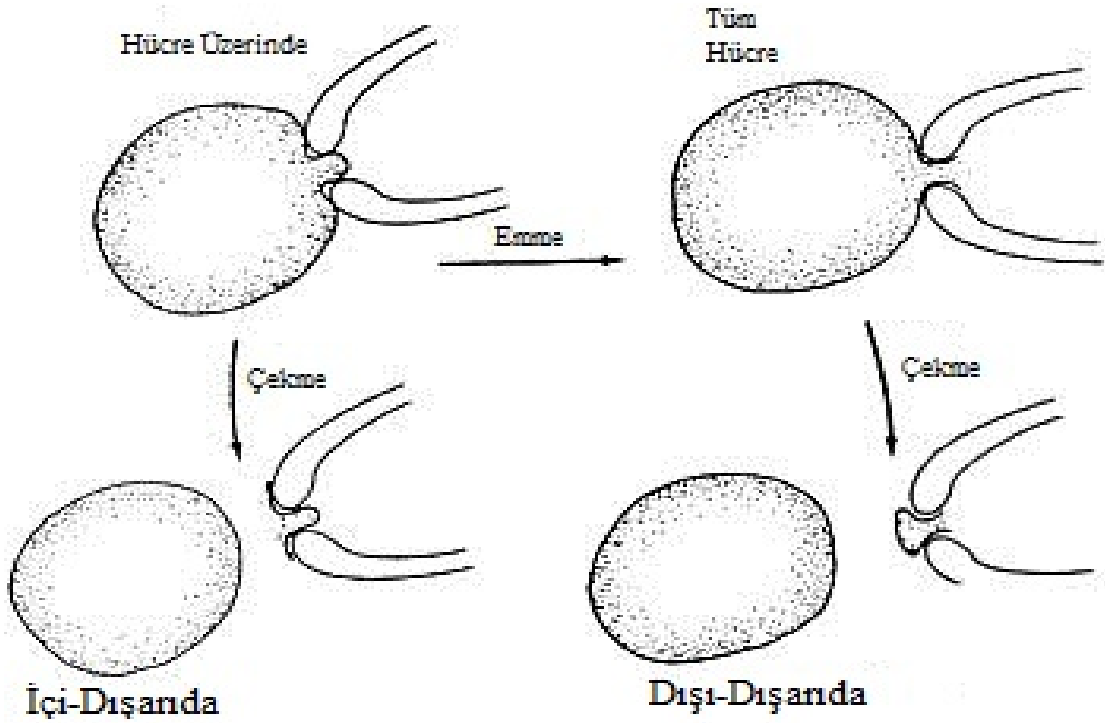
2.3.3. İçi-Dışarıda (Inside-Out)

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 siklik adenozin monofosfat (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 (Molleman 2003).

2.3.4. 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 (Davie et al., 2006). 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 (Molleman 2003, Sakmann and Neher 2009).

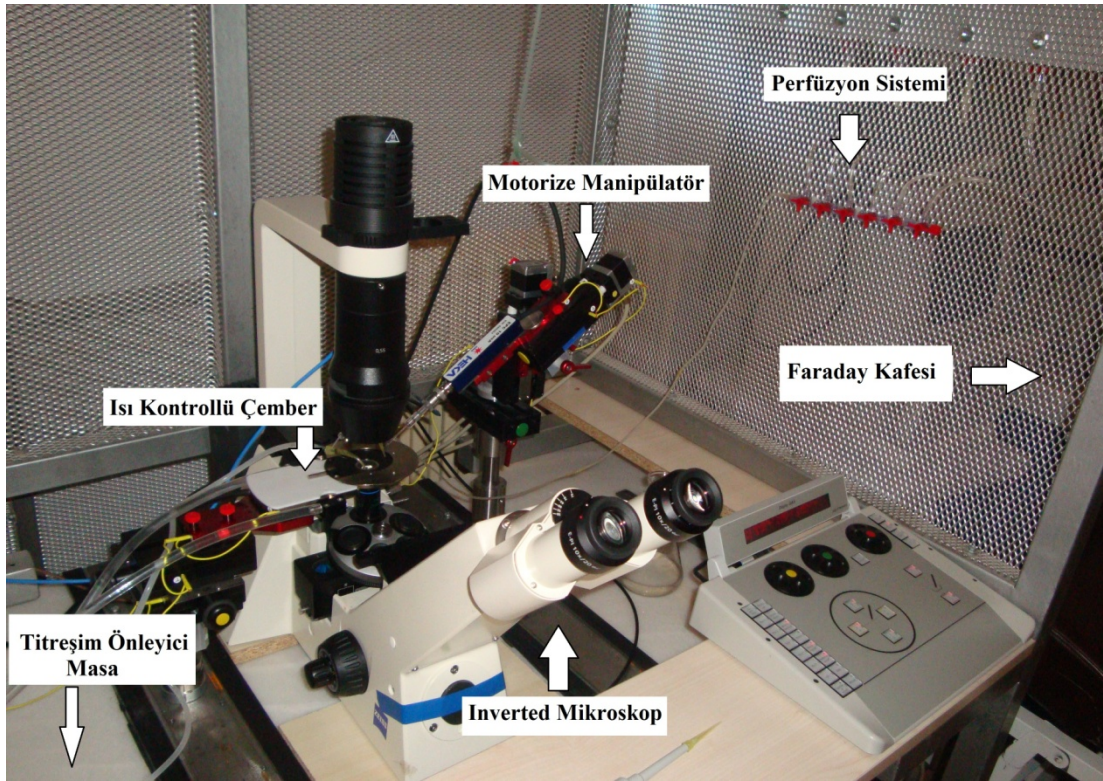


Şekil 6. Yama-menteşe konfigürasyonları.

2.4. Yama-Menteşe Setini Oluşturan Temel Malzemeler

1. 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

nesneleri dış elektrik alanlara karşı korur (Garudadri et al., 2011). İletken teller ile ağ biçiminde kaplanmış ve topraklanmış her kafesle bu koruma gerçekleştirilebilir. Ağ gözü sıklığı ve topraklama kalitesi korumayı artırır. Faraday kafesi sayesinde dışarıdaki elektrik alan kafesin içine etki edemez. Böylece yama-menteşe deneyleri esnasında sağlıklı kayıtlar alınması sağlanır. Kafesin işlerliği için iletkenlerin iyi topraklanmış olması gerekmektedir. Patch-clamp setinin genel görünümü resim 1’de gösterilmiştir (Molleman 2003).



Resim 1. Patch-clamp (Yama-menteşe) seti genel görünüm (İnteraktif mikroskop, Motorize manipülasyon, Isı kontrollü çember, Titreşimi önleyici masa, Faraday kafesi ve perfüzyon sistemi).

2. Sarsıntı Önleyici Masa: Yama-menteşe deneyleri hücre ile pipetin temas etmesi prensibine dayanan, çalışma esnasında yüksek hassasiyet gerektiren bir yöntemdir. Çalışma esnasında hücre ve pipeti görmemizi sağlayan mikroskop ve pipetin hareketini sağlayan mikromanipülasyon sistemi sarsıntı önleyici masa üzerine sabitlenmiş halde bulunmaktadır. Çalışma esnasında oluşabilecek en küçük sarsıntı bile hücre ile pipet arasında kurulan temasın kopmasına neden olabilmektedir. Bu

nedenle darbe emici özel sistemlerle donatılmış, sarsıntı önleyici bir masanın kullanılması bu sistemin olmazsa olmazlarından (Hille 1992).

3. İverted Mikroskop (Floresans): Bu tip mikroskoplarda; normal ışık mikroskopunun aksine objektifler mikroskop tablasının altına yerleştirilmiş durumdadır. Bu durum hem hücrelerin görüntülenmesi hemde pipetin hareket kabiliyeti ve alanının artırılması adına çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Üzerinde bulunan floresans ekleme ile floresan ışık yayan hücrelerin görüntülenmesi mümkündür (Sakmann and Neher 2009).

4. 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 konulmuşlardır. Bu haznelere ince hortumlar vasıtasıyla çembere bağlanmış durumdadır (Molleman 2003). Haznelerin çember seviyesinden daha yüksekte olması nedeniyle yer çekimi etkisiyle çembere doğru doğal bir sıvı akışı sağlanmaktadır. Sıvının akış hızı, haznelerin hortumlara bağlandığı noktalara yerleştirilen musluklar sayesinde kolayca kontrol edilebilmektedir. Çembere gönderilen sıvı, yüksek basınç nedeniyle hücrelere ve taşma nedeniyle objektiflere zarar verebilir. Bu nedenle gönderilen sıvının diğer taraftan aynı hızla tahliye edilmesi gerekmektedir (Sakmann and Neher 2009). 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 (Hille 1992, Molleman 2003).

5. Mikromanipülatör: Yama-menteşe deneyleri esnasında inverted mikroskop ile hücreler tespit edildikten sonra mikroskopun 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 (Molleman 2003, Sakmann and Neher 2009).

2.5. Serbest Radikaller

Atomlar, nötron ve protondan oluşan bir çekirdek ve bu çekirdeğin çevresinde dönen elektronlardan oluşurlar. Her türden kimyasal tepkime daima atomların dış

orbitalindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Atom çekirdeğinin çevresindeki, elektronların bulunduğu boşluğa da orbital denir. Her bir orbitalde spinleri birbirine zıt olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşleşmiş veya ortaklanmış elektronlar denir (Halliwell 1987, 1991). Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulundurdıkları zaman bozulur.

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Başka bir ifadeyle serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir (Halliwell 1987, Cheeseman and Slater 1993). Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler (Halliwell and Gutteridge 1992, 1999). Her tip kimyasal ve biyokimyasal tepkime her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü artırır, dolayısıyla serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (Knight 2000, Valko et al., 2005, 2006, 2007). 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 (Khan and Kasha 1994). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (Seifried et al., 2007).

Vücutta üretilen radikaller doğrudan tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidir. Bu moleküller vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar (Leutner et al., 2001, Valko et al., 2007). O₂'in biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunludur. Mitokondride aerobik solunumda kullanılan O₂'in % 2-5 'i bu tür tepkimelerde kullanılmak üzere serbest oksijen radikallerine dönüştürülür. Steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif

moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur (Chapple 1997, Knight 2000, Valko et al., 2007).

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 (Morrow et al., 1999, Morgan et al., 2007, Valko et al., 2007).

Patolojik olarak birçok malignite, diabetes mellitus (DM), ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıkla ilişkili olan serbest radikallerin en zararlı biyolojik etkisi; hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması ve lipit peroksidasyon (LPO) olarak bilinen bir reaksiyon zincirini başlatarak, membran proteinlerine hasar verip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmasıdır (Gutteridge et al., 1990, Gutteridge 1995, Valko et al., 2007, Ramakrishna and Jailkhani 2008).

Oksijen (O_2) ve nitrojen molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır. O_2 'in kısmi indirgenmesinden, ROT olan hidroksil ($\cdot OH$) radikali ve $O_2^- \cdot$ oluşmaktadır. Ayrıca singlet oksijen (1O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülleri, radikal olmayan ROT olarak ifade edilirler (Winterbourn 1995). Oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit ($NO\cdot$), peroksinitrit ($ONOO^- \cdot$), LPO sırasında oluşan peroksil ($ROO\cdot$) ve karaciğerdeki karbon tetraklorür (CCl_4) metabolizması sırasında oluşan triklorometil ($CCl_3\cdot$) radikalidir (Seifried et al., 2004, Lam et al., 2008).

Organizmada oluşan serbest radikallerin en önemlileri ve büyük kısmı O_2 kaynaklı radikallerdir (Juraneck and Bezek 2005). O_2 'in toksik etkisi yoktur, ancak aerobik hücre metabolizması sırasında serbest oksijen radikallerine dönüşür (Mason et al., 1990).

2.6. Antioksidanlar

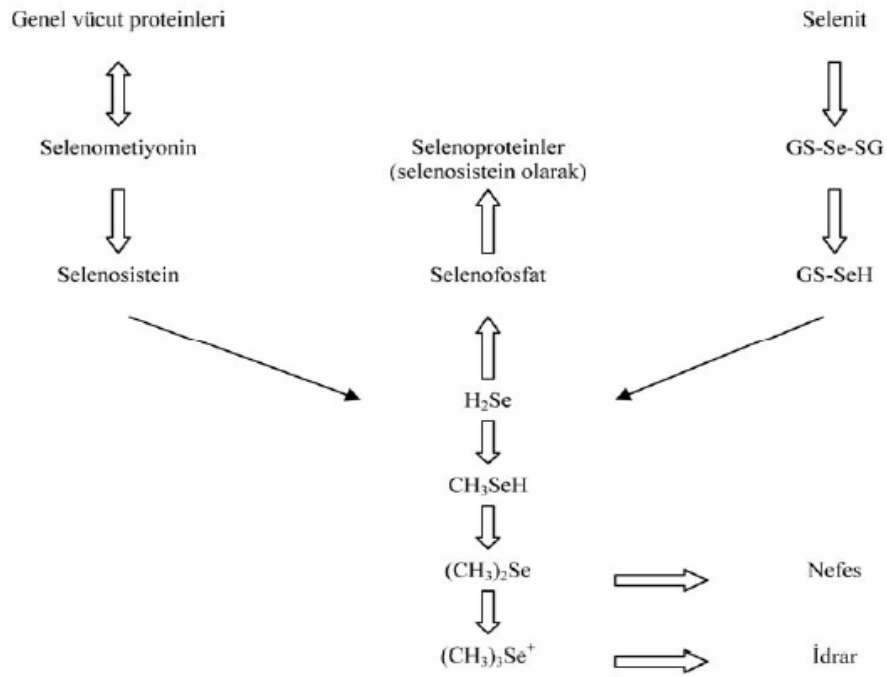
Serbest radikal reaksiyonları nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (Knight 2000). ROT'un yarılanma ömürleri kısadır fakat başlattıkları serbest radikal zincir reaksiyonları ile doku hasarına sebep olmaktadır (Wallace 2002). Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır (Knight 2000, Valko et al., 2006, 2007).

Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere 'antioksidanlar' denir (Blokhina et al., 2003). Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir. SOD'un yapısında bakır (Cu), çinko (Zn) ve manganez (Mn), GSH-Px de ise selenyum (Se) iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar (Peskin 1997a, 1997b, Mruk et al., 2002). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise C ve E vitaminleri, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karoten sorumludur. SOD, GSH-Px ve KAT enzimlerinden ayrı olarak C ve E vitaminleri de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir (Nazıroğlu 2007a). Her ikisi de hücre membranlarındaki LPO zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (Gutteridge and Halliwell 2000, Knight 2000, Blokhina et al., 2003).

2.6.1. Selenyum

Birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen esansiyel bir eser elementtir (Kane et al., 2007). Diyet, selenyumun en büyük kaynağıdır ve alınan miktar, yiyeceklerdeki konsantrasyona ve tüketilen yiyecek miktarına bağlıdır (Knegtering et al., 2005, Melkersson 2006). Başlıca karaciğer, kas, böbrek ve plazmada bulunmaktadır.

Selenyum, doğal olarak organik (selenometiyonin, selenosistein) ve inorganik (selenit, selenat, selenid) formlarda bulunur (Akkuş 1995). Selenit ve selenat in vivo olarak selenosisteine çevrilir (Dolder et al., 2008). Selenometiyonin, barsaktan absorpsiyonunda metiyonin ile yarışır, metiyonin içeren vücut proteinlerine katılır ve depolanır. Transsülfürasyon ile selenosisteine çevrilebilir. Tüm bu selenobileşikleri hidrojen selenide katabolize edilebilir ve dimetil selenid olarak solunum yoluyla veya trimetilselenonyum iyonu olarak idrarla atılır (Akkuş 1995). Selenyum metabolizması Şekil 7 de gösterilmiştir.



Şekil 7. Selenyumun metabolizması. H_2Se : hidrojen selenid, CH_3SeH : metil selenid, $(CH_3)_2Se$: dimetil selenid, $(CH_3)_3Se^+$: trimetilselenonyum iyonu, GS-Se-GS: selenodiglutatyon, GS-SeH: glutatyon selenid

Selenyum, insan organizmasında bir dizi biyolojik fonksiyonda rol oynamaktadır. Biyolojik etkilerini, yapısında selenosistein aminoasidi bulunan selenoproteinler yoluyla göstermektedir. Selenosistein biyolojik pH da anyonik halde bulunur ve bu özelliği, elektron alışverişi yoluyla biyolojik redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar. Selenoproteinlerin enzimatik redoks aktiviteleriyle birlikte yapısal ve transport fonksiyonları da vardır (Kane et al., 2007).

Selenyum, selenosistein halinde GSH-Px, iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin yapısında bulunur. GSH-Px, E vitamini ile

sinerjik çalışan antioksidan bir enzimdir. İndirgenmiş GSH ile H₂O₂ ve lipit hidroperoksitlerin yol açtığı oksidatif hasarı azaltmada ve önlemede rol oynar. Hücre büyümesinin ve tümör supresör protein p53'ün düzenlenmesinde etkilidir (Lipton et al., 1993). Selenyumun, eser düzeylerde normal büyüme ve gelişme için gerekli olduğu, ılımlı düzeylerde depolanabileceği ve homeostatik fonksiyonların sürdürülmesinde gerekli olduğu, yüksek düzeylerde olması halinde ise toksik etkilerle sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Erden and Bor 1984). Selenyum yetersizliği, selenyum içeren enzimlerin suboptimal işlevleri sonucunda azalmış antioksidan savunma, redoks regülasyonu ve enerji üretimi ile ilişkilidir (Erden 1987).

2.7. Transfeksiyon

Transfeksiyon işlemi ile normal şartlarda hücrede üretilmeyen bir proteinin üretilmesi mümkün olmaktadır. Hücrenin reverse-transkriptaz veya DNA polimeraz enzimleri tarafından katalizlenen bir reaksiyon sonucu mRNA dan cDNA (tanımlayıcı DNA)'a üretilmektedir. CHO hücrelerinde TRPM2 kanalları floresan mikroskopta görülememektedir. TRPM2 kanallarına sahip hücrelerin belirlenebilmesi için transfeksiyon işleminin yapılması gerekmektedir.

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)

Mikromanuplator: Märzhäuser Wetzlar (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)

Laminar akım kabini: Jouan B4I (Fransa)

Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)

Şarjlı pipet: Hirschmann (Almanya)

Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

Floresan spektrofotometre: Cary Eclipse, Varian (Avustralya)

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

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

Kültür petri kabı: TPP Techno Plastic Products (İsviçre)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Selenyum, Sigma (Almanya)

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

2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), Sigma (Almanya)

Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)

Hidrojen Peroksit (H₂O₂), Sigma (Almanya)

APOPercentage Apoptozis Kiti, Biocolor (İngiltere)

Perfectin Transfection Reagent, Genlantis (ABD)

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)

Triton X-100, Sigma (Almanya)

Hydrochloric Acid, Merck (Almanya)

Bakır Sülfat (CuSO₄* 5H₂O), Merck (Almanya)

Magnesium Chloride (MgCl₂*6 H₂O), Merck (Almanya)

Folin-Ciocalteu's Phenol, Merck (Almanya)

Potassium Tartarat, Merck (Almanya)

Sodium Carbonate (Na₂CO₃), Merck (Almanya)

Fura-2-AM, Invitrogen (ABD)

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

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

Sodyum hidroksit (NaOH), Riedel-de Hæn (Almanya)

TCA (trichloroaceticacid), Merck (Almanya)

Penisilin-Streptomisin, Lonza (Belçika)

HEPES, Sigma (Almanya)

Sodium Chloride, Merck (Almanya)

Potassium Chloride, Merck (Almanya)

Calcium Chloride, Merck (Almanya)

L-glutamic Acid, Merck (Almanya)

3.2. Yöntem

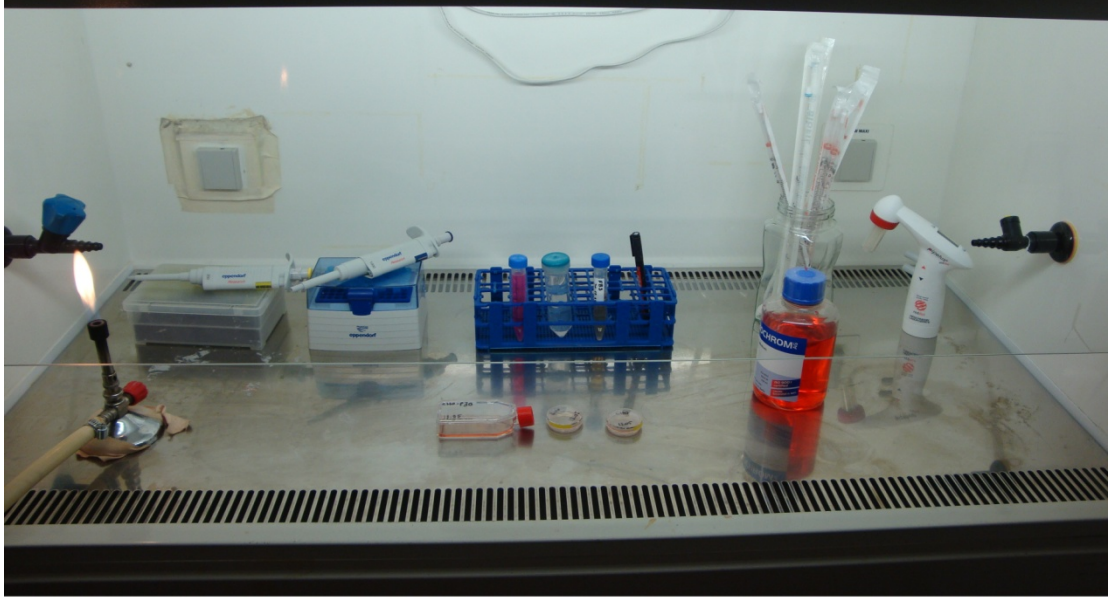
3.2.1. Hücre Kültürü

Türkiye Şap Enstitüsü'nden temin edilen Chinese Hamster Ovary (CHO) hücreleri steril hücre kültürü inkübatöründe (37 °C ve %5 CO₂) 24-48 saat inkübasyon ile hazırlandı (Nazıroğlu et al., 2007). Pasajlama işleminden önce laminar akım kabininin (Jouan B4I, Fransa) çalışma alanı ve içinde bulunan tüm malzemeler % 70'lik etil alkol çözeltisi ile temizlendi. 25 cm² lik zemine sahip kültür kaplarında belirli bir yoğunluğa (en az % 80 konfluens) ulaşan hücrelerimiz laminar akım kabini içerisine alındı (Resim 2). CHO hücreleri kültür kabının tabanına yapışma özelliği gösterdiği için hücreler üzerinde bulunan medyum boş bir kaba yavaşça aktarıldı. Hücrelerin üzerine 5 mL 1 X PBS (Phosphate buffered saline) solüsyonu eklenerek bu şekilde 5 dakika boyunca bekletildi ve yavaşça boş bir kaba aktarılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerin üzerine kültür kabının zeminini kaplayacak miktarda (1 ml) % 0,25'lik Tripsin-EDTA çözeltisinden eklendi. Bu şekilde tekrar inkübatöre alındı ve yaklaşık 5 dakika hücrelerin tutundukları zeminden ayrılmaları için beklendi. Hücreler 5 dakika sonra inkübatörden laminar akım kabinine alınarak üzerlerine 9 mL besi medyumunu (% 89 HAM'S F12, %10 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin antibiyotik kombinasyonu) eklendi. Steril bir pipet yardımıyla yaklaşık 25-30 kez pipetaj işlemi uygulanarak hücrelerin birbirlerinden iyice ayrılması sağlandı. Işık mikroskobu ile inceleme sonrasında steril bir plastik deney tüpüne aktarılan hücreler 37 °C sıcaklıkta 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildiler (Iida et al., 2005). Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant atıldı ve pelet üzerine 1 mL besi medyumunu eklenerek pipetaj işlemi uygulandı. Steril bir kültür kabı alınarak içerisine 4,5 ml besi medyumunu konuldu. İyice ayrıştırılan hücre

süspansiyonundan pipet yardımıyla 0,5 ml alınarak yeni hazırlanan besi medyumuna üzerine ilave edildi. Kültür kabı sağa-sola ve öne-arkaya doğru yavaşça hareket ettirilerek hücrelerin homojen bir biçimde dağılması sağlandı. Hücreler ışık mikroskobu ile son kez incelenerek inkübatöre (37 °C ve %5 CO₂) alındılar (Gamper et al., 2005).

3.2.2. Transfeksiyon

Yuvarlak lameller %70 lik etil alkol çözeltisi içerisinde 5 dakika boyunca bekletildi. Etil alkol içerisinde bulunan lameller temiz bir kurutma kağıdı üzerine alındı ve her iki yüzeyi de kurulandı. Kurutulan lameller pens yardımıyla kenarlarından tutularak her iki yüzeyi 3'er kez alevden geçirildi ve hiçbir yere temas ettirilmeden hızlıca steril, yuvarlak kültür kaplarına alındılar. Kültür kabı içerisine 180 ml taze besi medyumunu eklendi (Gamper et al., 2005). Yuvarlak kültür kabının içerisine pasajlama işleminin son aşamasında elde ettiğimiz hücre süspansiyonundan 200 µl eklendi. CHO hücrelerinin pasajlanması esnasında Perfectin (Genlantis, San Diego, USA) transfeksiyon kitinde tarif edilen yöntemle göre transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Böylece CHO hücrelerine, yapısında TRPM2 sekansı bulunduran yeşil floresan protein (pcdGFP) transfeksiyonu yapıldı (Nazıroğlu an Lückhoff 2008b). Transfeksiyon işleminden 24-48 saat sonrasında floresans mikroskop ile hücreler kontrol edildi. TRPM2 kanalına sahip olan hücreler floresans ışık altında yeşil renkli bir görüntü verdiği tespit edildi (Gamper et al., 2005). Yama-menteşe deneyleri için deney başlangıcından 36-48 saat öncesinde 100 nM Se ile hücreler inkübe edildi.



Resim 2. Hücre Kültürü (Laminar akım kabini).

3.2.3. Lipit Peroksidasyon Analizi

CHO hücrelerinde lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının (Placer et al., 1966) bildirdikleri yönteme göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı. Deneyin yapılışı: Tüm CHO hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C'lik su banyosunda tutuldu.

Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/ gram protein olarak verildi.

3.2.4. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSHPx)

Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in (Sedlak and Lindsay 1968) bildirdikleri yönteme göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

1. %10 trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu
2. Tris tamponu (0,4M pH:8,9): 48,46 gram tris-hydroxymethylaminomethan'ın son hacim bir litre olacak şekilde çözündürülür ve pH hidroklorik asit (HCl) ile pH: 8,9 olacak şekilde ayarlanır.

Deneyin yapılışı:

0,1 ml hücre homojenatı 0,4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 saniye boyunca vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. 0,1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu ve 0,1 ml DTNB (25 ml metanol içerisinde 0,099 gr çözündürülür) solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu. GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (Lawrence and Burk 1976)

Kullanılan Solusyonlar:

- 1- Tris (1) HCl tampon solusyonu (50 mM) pH:7,6
- 2- GSH solüsyonu
- 3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu
- 4- %10 TCA solüsyonu
- 5- Tris (2) tampon 0,4 M pH: 8,9
- 6- DTNB solüsyonu

Tablo 1. GSH-Px aktivitesinin tayin edilmesi deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Hücre homojenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi.	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi.	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı		
Üzerine Tris tampon eklendi.	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi.	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 dakika beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu (Tablo 1).

3.2.5. Yama-menteşe (Patch-clamp) Deneyleri

3.2.5.1. Solüsyonların Hazırlanması

Yama-menteşe deneylerinde kullandığımız tampon çözeltiler, aşağıdaki tablolarda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır (Tablo 2, Tablo 3 ve Tablo 4). Çözücü olarak tüm çözeltilerde ultra distile su kullanıldı. Çözeltilerin osmaolaritesi 310 mosmol/l olacak şekilde ayarlandı (Nazıroğlu 2011a).

Tablo 2. Normal ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü

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

pH KOH ile 7,4 e ayarlandı.

Tablo 3. NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü

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

pH HCl ile 7,4 e ayarlandı.

Tablo 4. 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	0,001
Hepes	10
EGTA	10

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

Selenyum'un çözünebilir formunun hazırlanması ve uygulanışı:

İnkübasyon için hazırlanan çözeltilerde sodyum selenit (Na₂SeO₃) kullanıldı. Se'nin son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde sodyum selenit normal

ekstraselüler tampon çözelti içerisinde çözdürüldü. İntraselüler Se (20 nM) uygulamaları için çözücü olarak hücre içi tampon çözelti kullanıldı.

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 50 µM olacak şekilde normal ekstraselüler tampon içerisinde taze olarak çözdürüldü (Togashi et al., 2008).

3.2.5.2. Gruplar Oluşturulması

Antioksidan Parametrelerin Değerlendirilmesi İçin Oluşturulan Gruplar:

1-Kontrol Grubu

2-Selenyum Grubu (Se)

3-Selenyum + 2-APB Grubu (Se+2-APB)

4-Selenyum + Vearpamil + Diltiazem Grubu (Se+V+D)

Yama-menteşe Deneylerinin Değerlendirilmesi İçin Oluşturulan Gruplar:

1-Ekstraselüler Selenyum Grubu (100 nM)

2-İntraselüler (Hücre içi) Selenyum Grubu (20 nM)

Kalsiyum Sinyali Analizlerinin Değerlendirilmesi İçin Oluşturulan Gruplar:

1-Kontrol Grubu

2-Selenyum Grubu

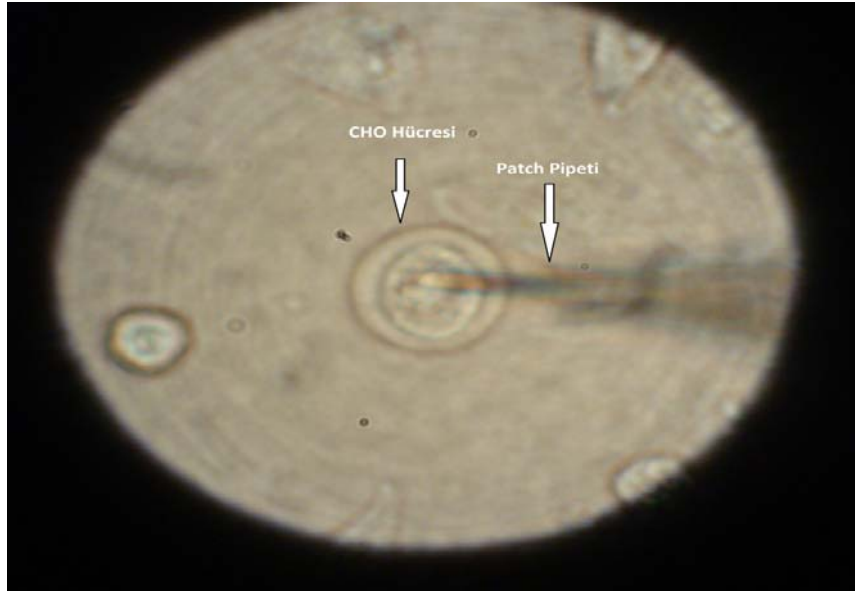
3.2.5.3. Yama-menteşe Deneylerinde Kayıtların alınması

Tüm hücrelerden EPC 10 USB (HEKA, Lamprecht, Almanya) yükseltecinin bağlı olduğu patch master USB yazılımına sahip bir bilgisayar yardımıyla yama-menteşe tekniğinin tüm-hücre konfigürasyonu kullanılarak kayıtlar elde edildi (Neher and Sakmann 2009). Tüm kayıtlar oda sıcaklığında (24-26 °C) alındı. Kayıt esnasında hücrelere temas etmek için; dış çapı 1,5 mm, iç çapı 0,86 mm ve uzunluğu 10 cm olan borosilikattan (Sutter Instrument, Novato, ABD) yapılmış tüpler

kullanıldı. İstenen çap ve dirençteki ($\sim 2-10 \text{ M}\Omega$) uca sahip mikropipetler elde etmek için pipet yapıcı (puller) (Sutter Instrument, Novato, ABD) kullanıldı (Hille 1992).

Elde edilen pipet içerisine intraselüler tampon çözelti konuldu. Pipet içerisinde hava boşluğu kalmaması için; parmak ile duvarlarına çok hafifçe vuruldu. Mikropipet, kayıt elektrotunun üzerine kılıf gibi giydirilerek sıkıştırıldı (Sakmann and Neher 2009). Kültür kabı içerisinde bulunan ve üzerine hücrelerin yapışık olduğu lameller 2 metal parçadan oluşan ve üzerinde deney ortamı ile sıvı alış-verişini sağlayacak şekilde tasarlanmış delikler bulunan çembere yerleştirildi. Hücrelerin üzerine 1 ml normal ekstraselüler tampon çözeltisi eklendi. İverted mikroskop (Zeiss, Axiovert 40 CFL, Germany) ile floresans ışık yayan 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 (Hille 1992). Hücre zarı ile temasın sağlandığı hem mikroskop altında gözle görülerek hem de bilgisayar ekranındaki anlık direnç değişiminden kontrol edilerek kesinleştirildi (Resim 3). Perfüzyon sistemi ile pipete hafif bir emme uygulanarak pipet ile hücre zarı arasında ‘gigaseal’ ($1-10 \text{ G}\Omega$) diye tabir edilen sıkı mühür oluşumu sağlandı (Molleman 2003). Hücre zarı potansiyeli -60 mV ’a kenetlendi. Bu aşamadan sonra bir miktar daha emme uygulanarak tutulan zar parçası patlatıldı ve böylece tüm-hücre konfigürasyonunda kayıtlar alındı (Nazıroğlu 2011a). Peristaltik pompa (Ismatec, İsviçre) ile çemberdeki sıvı bir yandan tahliye edilirken aynı hızda diğer taraftan da perfüzyon sistemi ile $10 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ çemberde bulunan hücreler üzerine gönderildi. Bu şekilde hücreler uyarılarak TRPM kanallarının aktivasyonu sağlanmaya çalışıldı (Hara et al., 2002, Nazıroğlu and Lückhoff 2008a, 2008b). Kanalların açılmasını müteakiben kanal aktivitesi belirli bir platoya ulaşıncaya kadar beklendi. Beklenen plato oluştuğunda; kanalları inaktive ettiğine dair bildirimler olan $50 \mu\text{M}$ konsantrasyonundaki 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), H_2O_2 ’nin gönderilmesine benzer şekilde çembere gönderildi (Togashi et al., 2008, Nazıroğlu et al., 2011a, 2011b). Son olarak hücrelerimizin canlılığından emin olmak üzere N-methyl-D-glucamin (NMDG)’li ekstraselüler tampon çözelti çembere gönderilerek kayda devam edildi. Canlılığı devam eden

hücrelere tekrar sırasıyla H₂O₂, ACA, 2-APB ve NMDG uygulamaları yapılarak kayıt sonlandırıldı (Nazıroğlu et al., 2011a).



Resim 3. Yama-menteşe oluşturulmuş hücrenin mikroskopik görünümü.

3.2.6. Kalsiyum Sinyali

Hücre içi Ca⁺² salınım miktarının ölçümü için CHO hücreleri 37 °C de 45 dakika boyunca 4µM Fura-2-AM floresan boyası ile boyandı (Bejarano et al., 2007). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2x10⁶ / mL olacak şekilde Na⁺- HEPES [(mM cinsinden); NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometredeki (Varian Cary Eclipse, Sydney, Avustralya) haznesine yerleştirildi. Fura-2-AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm de floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca⁺² iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları kaydedildi (Uğuz et al., 2009). Elde edilen bulgular Grynkiewicz ve arkadaşlarının tanımladığı metoda göre hesaplandı (Grynkiewicz et al., 1985).

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Gruplarda istatistiksel önem varlığı ANOVA testi ile yapıldı. Daha sonra gruplardaki istatistiksel önemler

Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Anamlı değerler least significance test (LSD) ile değerlendirildi. Veriler SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) lisanslı paket programı kullanılarak analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. CHO hücrelerinde lipid peroksidasyon (LP), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve indirgenmiş glutasyon (GSH) seviyelerinin değerlendirilmesi

Tablo 5. Selenyum, Selenyum + 2-APB ve Selenyum + Verapamil + Diltiazem ile inkübe edilen CHO hücrelerinde Glutatasyon Peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi, Glutasyon (GSH) ve Lipit Peroksidasyon seviyeleri (ortalama \pm SD)

Parametreler	Kontrol (n=6)	Se (n=6)	Se+2-APB (n=6)	Se+V+D (n=6)
LP (\square mol/g protein)	3.43 \pm 0.16	3.16 \pm 0.11 ^a	3.35 \pm 0.23	3.25 \pm 0.27
GSH (\square mol/g protein)	2.71 \pm 0.19	2.95 \pm 0.47 ^a	2.51 \pm 0.34 ^b	2.55 \pm 0.30 ^b
GSH-Px (IU/g protein)	5.17 \pm 0.71	5.64 \pm 0.47 ^a	4.78 \pm 0.63 ^b	7.01 \pm 0.52 ^c

^ap<0.05 ve Kontrol grubuna kıyasla

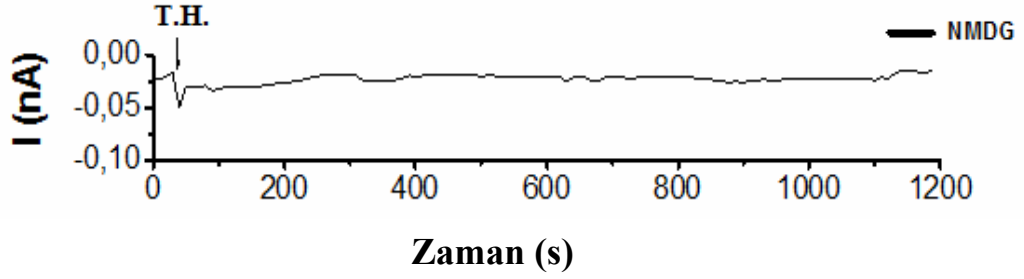
^bp<0.05 ve ^cp<0.001 Se grubuna kıyasla

Kontrol, Selenyum, Selenyum + 2-APB ve Selenyum + V + D gruplarına ait ortalama LP, GSH-Px ve GSH değerleri tablo 5’de gösterilmiştir. LP seviyesi selenyum grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) derecede düşük olduğu görülmüştür. Selenyum+2-APB ve selenyum+ verapamil+ diltiazem gruplarındaki hücrelerde LP seviyelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. GSH-Px aktivitesi ve GSH seviyeleri selenyum (p<0.05) ve selenyum+verapamil+diltiazem gruplarında (p<0.05 and p<0.001) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde (p<0.05) artış olduğu gözlemlendi. Böylece selenyum ve verapamil+diltiazem inkübasyonun hücrelerde antioksidan sistemi koruduğu görüldü. Fakat 2-APB grubundaki GSH-Px aktivitesi ve GSH düzeyleri selenyum ve selenyum+verapamil+diltiazem gruplarına göre anlamlı düzeyde (p<0.05) düşük olduğu tespit edildi.

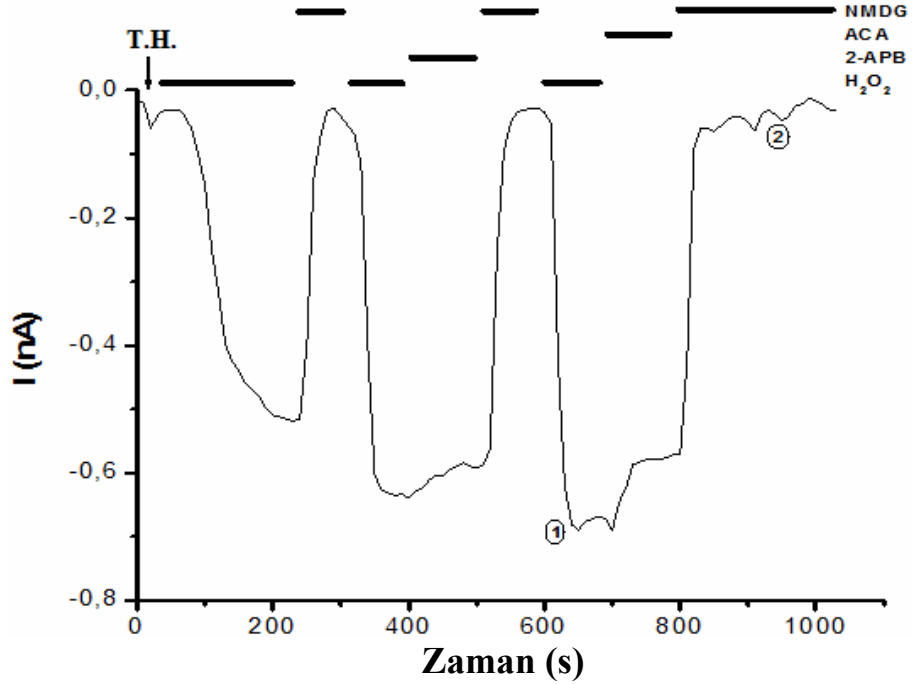
4.2. Yama-menteşe Deneylerinin Değerlendirilmesi

4.2.1. Ekstraselüler Selenyum İle İnkübe Edilen CHO Hücrelerinden Yama-Menteşe Yöntemiyle Elde Edilen TRPM2 Kanal Akımlarının Değerlendirilmesi

Selenyum ile inkübe edilen (100 nM ve 36 saat) CHO hücrelerinden membran potansiyeli -60 mV kenetlenerek tüm-hücre konfigürasyonunda elde edilen yama-menteşe kayıtlarına ait akım zaman grafikleri ve akım voltaj grafikleri şekil 8, şekil 9, şekil 10 ve şekil 11 de gösterilmiştir.

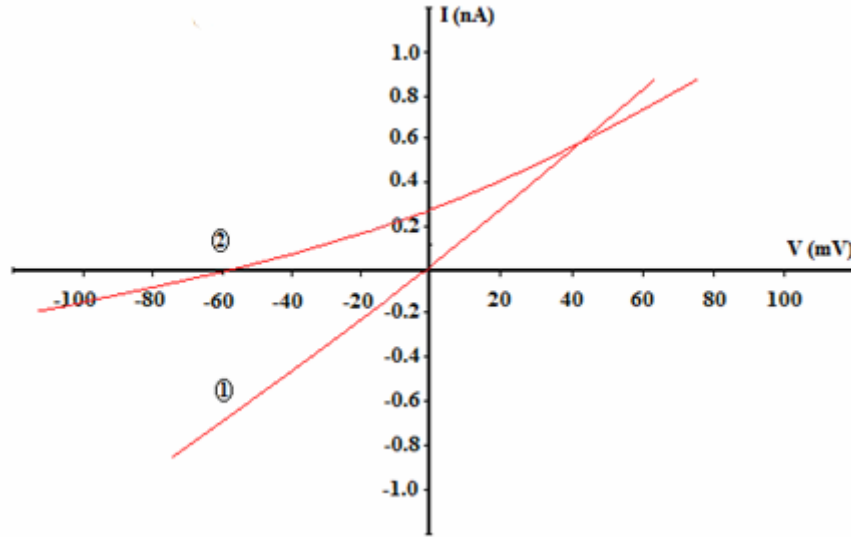


Şekil 8. 100 nM Selenyum ile 36 saat boyunca inkübe edilmiş fakat H₂O₂ ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



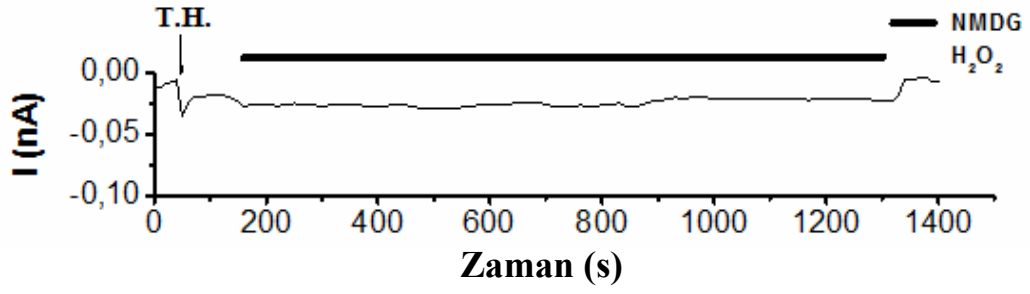
Şekil 9. H₂O₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.

Şekil 9’da gösterildiği gibi hücreler öncelikle 10 mM H₂O₂ ile uyarıldı. Uyarılan hücrelerden TRPM2 kanalları vasıtasıyla hücre içine Ca⁺² girişi olurken kanalların en fazla açıldığı anda (Şekil 9’da yuvarlak içindeki 1 ile gösterilmiştir) akım-voltaj eğrisi alındı. TRPM2 kanal akımlarının 0,7 nA’ya kadar ulaştığı gözlemlendi. Ardından daha önce TRPM2 kanal blokörleri olduğuna dair bildirimler olan antranilik asit (ACA) ve 2-APB banyo ortamına gönderildi. ACA ve 2-APB’nin TRPM2 kanallarını az miktarda inhibe edebildiği gözlemlendi. Daha sonra NMDG uygulanarak hücrenin canlılığından emin olundu (Şekil 9’da yuvarlak içindeki 2 ile gösterilmiştir). Kayıt sonlandırıldı. Şekil 9’da 1 ve 2 ile gösterilen zamanlarda alınan ve akım-voltaj ilişkisini gösteren eğriler Şekil 10’da gösterilmiştir.



Şekil 10. H₂O₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.

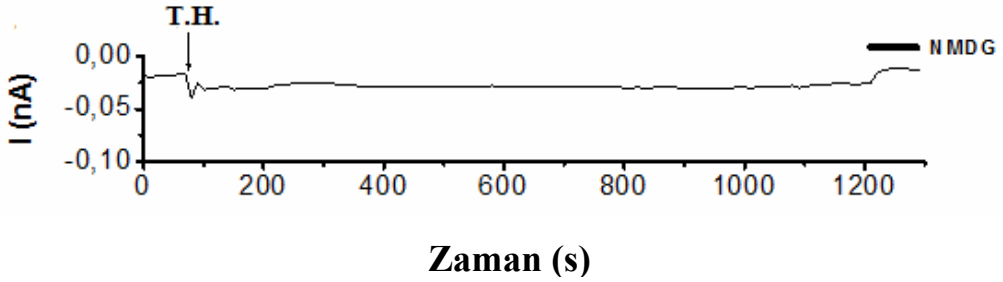
Transfekte CHO hücreleri, H₂O₂ ile uyarıldıktan sonra TRPM2 kanallarının açıldığı ve akımın belirli bir platoya ulaştığı andaki akım-voltaj ilişkisi Şekil 10’ da yuvarlak içerisine alınmış 1 ile gösterilmiştir. Kanalların mekanik olarak kapatılması için NMDG’li ekstraselüler tampon çözelti uygulanmıştır. Canlılığı devam eden hücrelerde akımların tamamen durduğu andaki akım-voltaj ilişkisi Şekil 10’ da yuvarlak içerisine alınmış 2 ile gösterilmiştir.



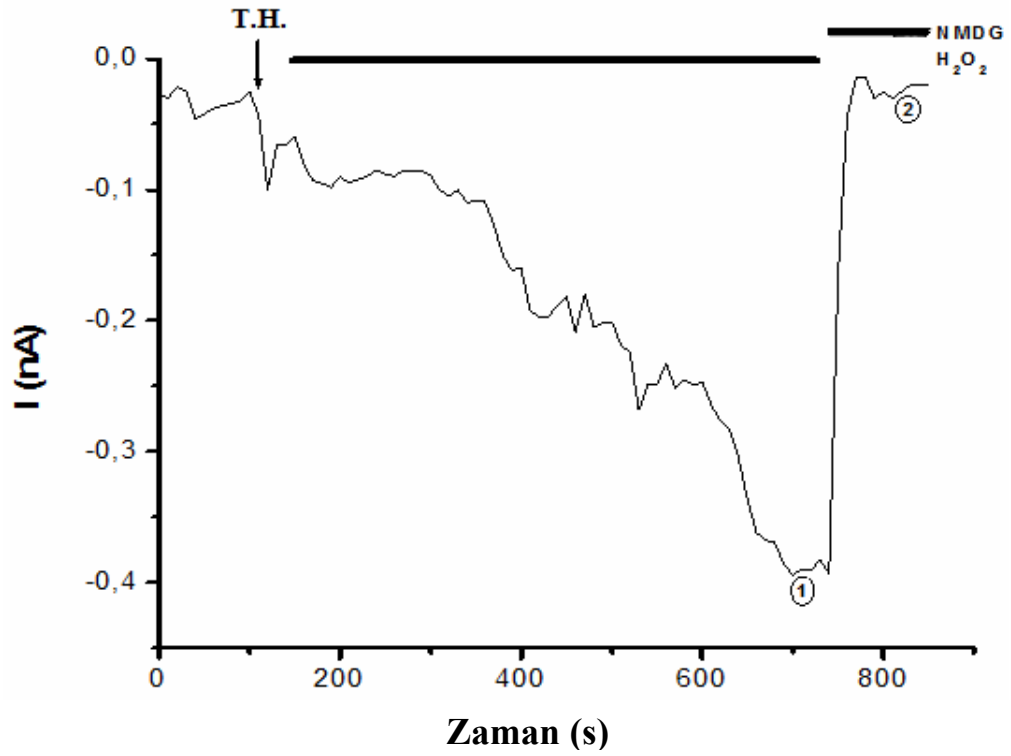
Şekil 11. 100 nM Selenyum ile 36 saat boyunca inkübe edilmiş ve H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.

Şekil 11’de gösterildiği gibi selenyum ile 36 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde H_2O_2 ’nin tetiklediği TRPM2 katyon kanal akımlarını tamamen inhibe ettiği görüldü.

4.2.2. İntraselüler Selenyum Uygulaması İle CHO Hücrelerinden Yama-Menteşe Yöntemiyle Elde Edilen TRPM2 Kanal Akımlarının Değerlendirilmesi



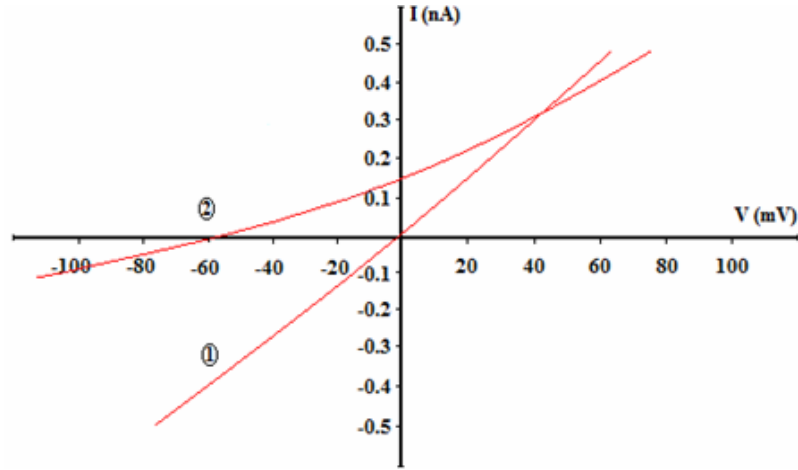
Şekil 12. Pipet içi selenyum uygulanan (20 nM) ve H_2O_2 ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



Şekil 13. Pipet içi selenyum uygulanan (20 nM) ve H₂O₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.

H₂O₂ ile uyarılan hücrelerden TRPM2 kanalları vasıtasıyla hücre içine Ca⁺² girişi olurken kanalların en fazla açıldıktan sonra plato oluşuma anında (Şekil 13’de yuvarlak içindeki 1 ile gösterilmiştir) akım-voltaj eğrisi alındı.

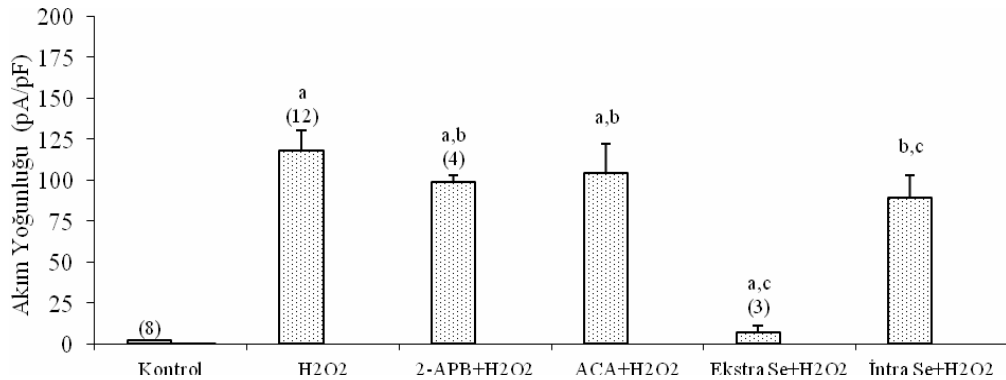
Daha sonra NMDG uygulanarak hücrenin canlılığından emin olundu (Şekil 9’da yuvarlak içindeki 2 ile gösterilmiştir). Daha sonra kayıt sonlandırıldı. Şekil 9’da 1 ve 2 ile gösterilen zamanlarda alınan ve akım-voltaj ilişkisini gösteren eğriler Şekil 10’da gösterilmiştir.



Şekil 14. Pipet içi selenyum uygulanan (20 nM) ve H₂O₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında ait akım-voltaj ilişkisi

Transfekte CHO hücreleri, H₂O₂ ile uyarıldıktan sonra TRPM2 kanallarının açıldığı ve akımın belirli bir platoya ulaştığı andaki akım-voltaj ilişkisi Şekil 14’ de yuvarlak içerisinde alınmış 1 ile gösterilmiştir. Kanalların mekanik olarak kapatılması için NMDG’li ekstraselüler tampon çözelti uygulanmıştır. Canlılığı devam eden hücrelerde akımların tamamen durduğu andaki akım-voltaj ilişkisi şekil 14’de yuvarlak içerisinde alınmış 2 ile gösterilmiştir.

Pipet içi (hücre içi) 20 nM selenyum uygulanan CHO hücrelerine ait tüm hücre konfigürasyonunda alınmış yama-menteşe kayıtlarına ait akım zaman ve akım-voltaj grafikleri şekil 12, şekil 13 ve şekil 14’de gösterilmiştir.



^ap<0.001 ve Kontrol grubuna kıyasla.

^bp<0.001 ve H₂O₂ grubuna kıyasla.

^cp<0.001 2-APB+H₂O₂ ve ACA+H₂O₂ gruplarına kıyasla.

Şekil 15. Ekstraselüler ve İntraselüler Selenyum uygulanan ve H₂O₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.

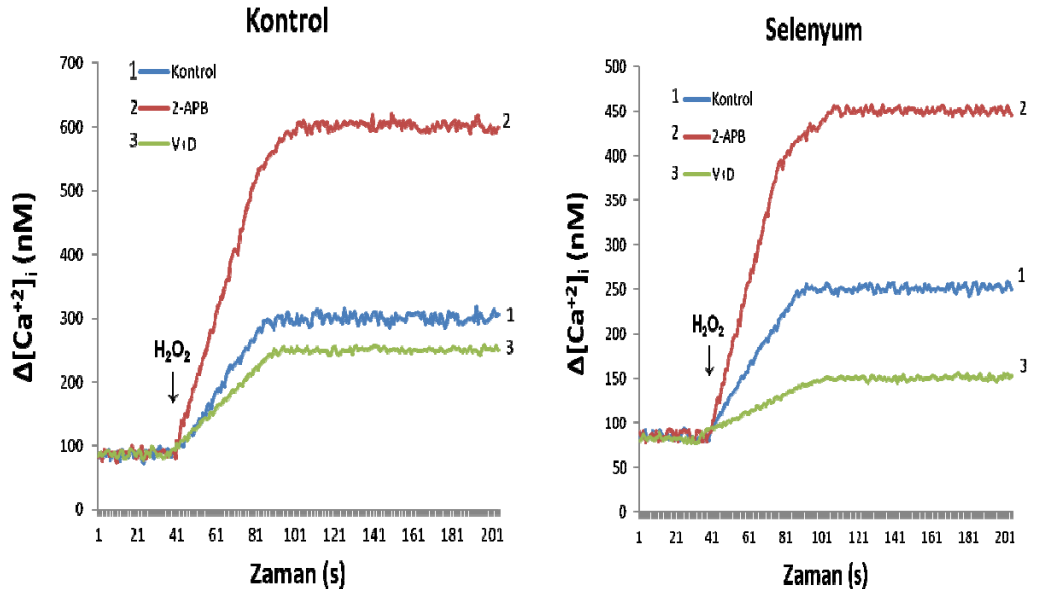
Öncelikle, H₂O₂ ile aktive edilmiş TRPM2 kanal akımları üzerine selenyumun koruyucu bir etkisinin olup olmadığı test edildi. İlk olarak, selenyum inkübasyonu denendi. TRPM2 kanal akımları antioksidan bir eser element olan selenyum tarafından tamamen inhibe edildiği gözlemlendi (Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10 ve Şekil 11). İkinci olarak selenyum pipet içi solüsyonda çözündürülerek intraselüler olarak denendi. H₂O₂ ile aktive edilmiş kanal akımlarının kanalların sitozolik yüzüne pipet vasıtasıyla selenyum uygulanmasını koruyucu etkisi olduğu görüldü (Şekil 12, Şekil 13 ve Şekil 14). Hem ekstraselüler hem de intraselüler selenyum gruplarında akım yoğunluklarının H₂O₂ grubuna göre anlamlı düzeyde düşük ($p<0.001$) olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda akım yoğunluğunun ekstraselüler selenyum grubunda, intraselüler grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 15).

Yama-menteşe deneyleri sonucunda elde edilen bulgular göstermiştir ki; H₂O₂, hücrede ADPR gibi oksidatif stres ürünlerinin üretimi ile sonuçlanan metabolik olayları başlatarak etki göstermektedir. ADPR ise TRPM 2 kanal akımlarının aktive olmasına sebep olmaktadır.

4.3. Kalsiyum Sinyali Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.3.1. Selenyum Uygulanmış ve Hidrojen Peroksit ile Aktive Edilmiş Hücrelerde Kalsiyum Sinyali

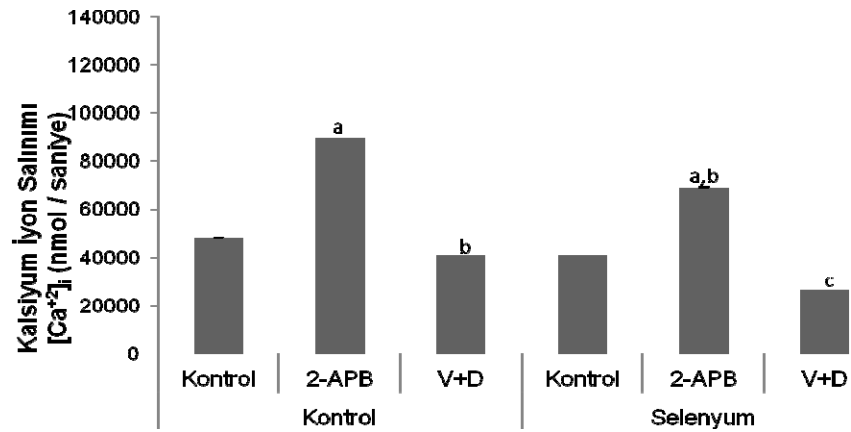
Kalsiyum sinyali analizleri için kontrol ve selenyum (Se) grupları oluşturuldu. Kontrol grubunda bulunan hücreler direkt H₂O₂ ile uyarılırken selenyum grubundaki hücreler H₂O₂ ile uyarılmadan önce 36 saat boyunca 100 nM Se ile inkübe edildiler. Her iki grupta da Ca⁺² akımları oluştuktan sonra verapamil+diltiazem ve 2-APB ile uygulanarak etkileri gözlemlendi (Şekil 16)



Şekil 16. Selenyum ile inkübe edilen CHO hücrelerinde sitozole Ca^{+2} salınımının konsantrasyon-zaman grafiği.

Selenyum ile 36 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde hücre içi Ca^{+2} salınımının kontrol grubuna göre daha düşük seviyede olduğu belirlendi. Ayrıca 2-APB'nin kanal akımlarını bloke etmede yetersiz kaldığı gözlemlendi.

4.3.2. Selenyum Uygulanmış ve Hidrojen Peroksit ile Aktive Edilmiş Hücrelerde Hücre İçi Kalsiyum Salınım Grafikleri



^a $p < 0.001$ ve Kontrol grubuna kıyasla.

^b $p < 0.001$ ve 2-APB grubuna kıyasla.

^c $p < 0.001$ ve Kontrol grubu (V+D)'ye kıyasla.

Şekil 17. Selenyum ile inkübe edilen CHO hücrelerinde sitozole Ca^{+2} salınımının akım-zaman grafiğinin altında kalan bölgelerin alan grafiği

Selenyum, verapamil + diltiazem ve 2-APB'nin CHO hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ salınımı üzerine etkileri şekil 16 ve şekil 17'de gösterilmiştir. Hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ salınım seviyesi selenyum + H_2O_2 grubunda, kontrol+ H_2O_2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0.001$) azaldığı görüldü. Hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ salınım seviyesi 2-APB grubunda kontrol grubuna göre yüksek ($p<0.001$) olmasına rağmen verapamil+diltiazem grubunda kontrol grubuna göre daha düşük ($p<0.001$) olduğu gözlemlendi. Ancak $[Ca^{+2}]_i$ salınımının selenyum+ diltiazem+verapamil ve selenyum+2-APB gruplarında, diltiazem+verapamil ve 2-APB gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük ($p<0.001$) olduğu gözlemlendi. Kalsiyum sinyali analizleri, selenyumun H_2O_2 ile indüklenmiş Ca^{+2} salınımı üzerine koruyucu etkisini voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları üzerinden gerçekleştirdiğini göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Hücrel redoks (indirgenme-yükseltgenme) tepkimleri hücrenin normal işleyişi esnasında ortaya çıkan bir durum olmakla beraber radyoaktif hasar, iskemi-reperfüzyon hasarı ve nörodejeneratif hastalıklar sebebiyle bu durumun kontrol dışına çıkması apoptotik veya nekrotik hücre ölümüne yol açabilmektedir. Normal ve patolojik hücrel yanıtların oluşturulmasında hücre içi kalsiyum seviyesi $[Ca^{+2}]_i$ kritik bir önem taşımaktadır (Nazıroğlu 2009). Bu çalışmada TRPM2 katyon kanalları H_2O_2 ile yapısal olarak aktive edilmiştir. H_2O_2 ile aktive edilmiş voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının ve TRPM2 katyon kanallarının inhibe edilmesi için çeşitli stratejiler geliştirilmiş olsa da selenyum uygulamalarının etkisi henüz araştırılmamıştır. Selenyum ile inkübe edilen hücrelerde H_2O_2 ile aktive edilmiş voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının, TRPM2 katyon kanallarının ve Ca^{+2} akımlarının tamamen inhibe edildiği ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir.

Bu çalışmada TRPM2 kanalları H_2O_2 ile aktive edildi. Oksidatif stres, redoks sisteminde H_2O_2 gibi moleküler oksijen tüketim ürünlerinin yapımına sebep olarak ROT üretimine sebep olmaktadır (Halliwell 2006, Kovacic et al., 2008). Fizyolojik olarak, ROT çoğunlukla mitokondri içerisine sıkıştırılır ve endojen antioksidanlar veya GSH ve GSH-Px gibi hücre zarı antioksidanları tarafından hızlı bir şekilde yakalanarak etkisiz hale getirilirler (Rayman 2000). Ancak metabolik stres altında, ROT üretimi artış göstererek mitokondriye zarar verebilmektedir (Uğuz et al., 2009). Sonuç olarak, ROT sitoplazmaya diffuse olarak diğer hücrel işlevler üzerine zararlı etkilere sebep olmaktadır. Bundan dolayı bu çalışmada H_2O_2 hücre içi bileşenlerin yapısına zarara vererek TRPM2 kanallarının aktive olmasına sebep olmuştur.

TRPM2 yapısında karakteristik olarak C-ucu üzerinde Nudiks boks diye adlandırılan enzimatik bir bölge bulunmaktadır (Fonfria et al., 2005, Nazıroğlu 2007b). Nudiks bölgesi pirofosfatazların nükleozid difosfatları indirgediği bir etkileşim bölgesi olarak bilinmektedir (Nazıroğlu 2007b). (Wehage ve arkadaşları ve Hara ve arkadaşları) H_2O_2 'nin kalsiyum akışını ADPR seviyesini artırarak ve sonrasında NAD^{+} 'nin TRPM2 kanallarının sitozolik C ucu üzerinde bulunan Nudiks bölgesine doğrudan bağlanmasını sağlayarak Ca^{+2} akışını tetiklediğini bildirmişlerdir (Wehage et al., 2002, Hara et al., 2002). TRPM2 aynı zamanda NAD^{+} 'nin bir

metaboliti olan intraselüler ADPR'nin direkt olarak Nudiks bölgesine bağlanmasıyla aktive olabilmektedir (Nazıroğlu 2007b, Fonfria et al., 2005). Çok güçlü bir oksidan olan H₂O₂ ile hücreler inkübe edildiğinde H₂O₂ tarafından oksitlenen NADH, NAD⁺'ye dönüştürülebilmektedir. NAD⁺'den ADPR sentezi mitokondrial PARP aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. PARP enziminin inhibe edildiği rat primer striatal kültürlerinde TRPM2 kanallarının da inhibe edildiği gözlenmiştir (Fonfria et al., 2005). Ancak, selenyumun PARP aracılı apoptotik hücre ölümünü zayıflattığı görülmüştür.

GSH, sisteinden köken alan çok önemli bir antioksidandır (Whanger 2001, Nazıroğlu 2009). PC12 nöronal hücrelerinde, oksidan moleküllerin artışına bağlı hücre içi [Ca⁺²]_i konsantrasyonunda artış ve buna bağlı olarak hücre ölümünün tetiklenebileceği ve aynı zamanda hücre içi GSH konsantrasyonundaki azalmanın Ca⁺² aracılı hücre ölümüne sebep olabileceği gösterilmiştir (Jurma et al., 1997). Yaptığımız literatür taramalarında şimdiye kadar selenyumun transfekte CHO hücrelerinde voltaja duyarlı Ca⁺² kanalları ve TRPM2 kanalları üzerine etkisini gösteren bir çalışmanın olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmamızda H₂O₂ ile uyarılmış voltaja duyarlı Ca⁺² ve TRPM2 kanalları üzerine ekstraselüler ve intraselüler olarak uygulanan selenyumun inhibe edici etkisinin olduğu görülmüştür. GSH-Px enzimi ko-faktör olarak selenyum içermektedir. GSH'nin oksidasyonu ile H₂O₂ ingirgenerek su veya alkole dönüştürülerek uzaklaştırılmaktadır. Selenyum, insan myeloid HL-60 hücrelerinde oksidatif stress aracılı apoptozisi, Ca⁺² salınımını düzenleyerek azalttığı tespit edilmiştir (Uğuz et al., 2009). Transfekte CHO hücrelerinde intraselüler ve ekstraselüler GSH uygulamalarının H₂O₂ ile uyarılmış TRPM2 kanallarını inhibe edemediği gözlemlendi (Nazıroğlu and Lückhoff 2008b). Yakın zamanda tarafımızdan yapılan bir çalışmada arka kök gangliyon (AKG) nöronlarında GSH inkübasyonunun TRPM2 kanallarından hücre içine Ca⁺² akışı üzerine koruyucu etkisinin olduğu gözlemlendi (Nazıroğlu et al 2011). Hara ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada GSH ile birlikte hücre içi en önemli antioksidanlardan biri olduğu bildirilen tiyoredoksin, GSH ile birlikte uygulandığında H₂O₂ uygulamasına cevap olarak TRPM2 kanal aracılı intraselüler serbest Ca⁺² artışı üzerine düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir. Ancak tiyoredoksin tek başına uygulandığında intraselüler serbest Ca⁺² artışı üzerine aynı etkiyi

gösteremediği bildirilmiştir (Hara et al., 2002). Buna ek olarak, katalaz inhibitörü (3-amino-1,2,4-triazole) veya süperoksit dismutaz inhibitörü (diethyl dityokarbamik asit) ile ön muameleye tabi tutulan hücrelerde H₂O₂ uygulamasına cevaben TRPM2 kanalları üzerinden oluşan intraselüler Ca⁺² seviyesinde artışı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı, yapılan bu çalışma ile selenyumun GSH, GSH-Px ve TRPM2 akımları üzerine olan etkileri diğer çalışmalarla uyumaktadır (Jurma et al., 1997, Hara et al., 2002, Uğuz et al., 2009, Nazıroğlu et al., 2011b). Ancak, selenyum ve GSH uygulamalarından elde ettiğimiz sonuçlara göre selenyum ve GSH'nin TRPM2 kanalları üzerine olan etkilerinin hücreye spesifik olduğu ve metodolojik problemlere dayalı olarak farklılık arz edebileceği ortaya konulmuştur.

Selenyum, CHO hücrelerinde H₂O₂ ile uyarılmış TRPM2 kanallarını inhibe etmiştir. H₂O₂ TRPM2 üzerindeki etkisini ADPR aktivasyonu ile göstermektedir. H₂O₂'in etkisi, çoklu ADPR gruplarının proteinlere dönüşümünde etkin olan poly ADP-riboz polimeraz (PARP) enzimi ile ilişkilidir (Nazıroğlu et al., 2008). PARP-1 enzim inhibitörleri kullanılarak yapılan çalışmalarla H₂O₂ aracılı TRPM2 kanal aktivasyonunda bu hücresel yolağın etkinliği gösterilmiştir (Fonfria et al., 2004, Buelow et al., 2008). Selenyum, ratlarda spinal kord kökenli progenitor hücrelerde PARP aracılı apoptotik hücre ölümlerini inhibe etmiştir (Yeo et al., 2008). Chen ve Wong doğal olarak oluşan bir seleno amino asit olan seleno sisteinin MCF-7 göğüs kanseri hücrelerinde kaspazdan bağımsız olarak apoptozisi PARP bölümü ile eşleşerek indüklediğini göstermişlerdir (Chen and Wong 2009). Kandaş ve arkadaşları tarafından, androjen-duyarlı LNCaP hücrelerinin büyümelerinin uyarılmasında düşük konsantrasyon selenyum uygulamasının hormon duyarlı prostat kanseri hücrelerdekini tersi bir etki ile PARP-1 inhibisyonuna neden olacağı gösterilmiştir. Oysa ki; PC-3 hücre proliferasyonunun inhibisyonunda selenyumun non-sitotoksik konsantrasyonlarda ileriki dönemdeki prostat kanseri üzerine yararlı olabileceği savunulmuştur.

İnositol 1,4,5-trifosfat (IP₃)-reseptör inhibitörü olan 2-APB'nin hücre içi kalsiyum sinyal yollarında reseptörlerin bağlanması gösterilmesinde sıkça kullanılmıştır. 50 µM üzerinde kullanılan 2-APB nin TRPM2 kanallarını bloke ederek Ca⁺² girişini inhibe ettiği bulunmuştur (Togashi et al., 2008). Fakat, yapılan son birkaç çalışma ile farklı hücre tiplerinde yapılan araştırmalar 2-APB'nin etkisinin

diğer yüzünü ortaya koymuştur. 2-APB'nin nonselektif kanalların aktivasyonuna sebep olarak sitozolik $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonunda artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Braun et al., 2003). 2-APB'nin STIM1 ve Orai2'nin beraberce eksprese edildiği hücrelerde sadece kısmi olarak store-operated (SOCE) aracılı Ca^{+2} girişini ve akımı inhibe ettiği, Orai3 ve STIM1'in beraberce eksprese edildiği HEK293 hücrelerinde sürekli akımları ettiği gözlemlendi. 2-APB'nin SOCE üzerine olan karmaşık etkileri ve bulgular şimdiye kadar bildiklerimizi yenilememize sebep olmuştur. 2-APB SOCE üzerine STIM1 ve aynı zamanda Orai kanallarının alt üniteleri üzerinden etki gösterebilir (DeHaven et al., 2008). Farklı hücre sistemlerinde 2-APB'nin TRPM2 kanalları üzerine etkileri de çelişkilidir. Örneğin, tarafımızdan yürütülen çalışmalarda 2-APB, DKG hücrelerinde inhibitor etki gösterirken megakaryositlerde bu etki gözlenmemiştir (Nazıroğlu 2011b). Bu çalışmamızda da kompleks veriler elde edilmiştir. Kalsiyum sinyali analizlerinde 2-APB tarafından kontrol grubu hücrelerde sitozolik $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonu bloke edilmemesine rağmen H_2O_2 ile aktive edilmiş akımlar üzerine selenyumlu ve selenyumsuz gruplarda 2-APB'nin koruyucu etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, Tang ve arkadaşları tarafından, endoplazmik retikulumdaki ryanodin (Ry) reseptörlerinin antagonisti olan dantrolene'nin internal kalsiyum salınımını hemen hemen tamamen ortadan kaldırırken 2-APB'nin ise Ca^{+2} salınımını bloke etmekte yetersiz kaldığı rapor edilmiştir (Tang et al., 2008). Ekstraselüler sıvıdan hücre içine Na^+ akışı mitokondriden Ca^{+2} salınımına sebep olurken, mitokondriden salınan Ca^{+2} ise endoplazmik retikulumdan daha fazla Ca^{+2} salınmasını tetiklemektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması sonuçlarında, hem hücre içi hem de hücre dışı selenyum uygulamalarının, oksidatif stresin neden olduğu TRPM2 ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanal aktivasyonlarını ve TRPM2 kanal etkinliğini düzenlediği gözlemlenmiştir.

TRPM2 katyon kanalları H_2O_2 'nin de içinde bulunduğu oksidan redoks reaksiyonları esnasında meydana gelen zincirleme reaksiyonlar sonucu aktive olabilmektedir. Selenyum CHO hücrelerinde hücrel oksidatif stress, antioksidan redoks sistem ve Ca^{+2} akışı üzerine düzenleyici bir etki göstermiştir. Selenyum, lipit peroksidasyon, glutatyon, glutatyon peroksidaz, TRPM2 katyon kanalları ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları üzerine etki ederek genel antioksidan sistem ve Ca^{+2} akışı üzerine yararlı etkilerde bulunmuştur. Çeşitli hücrel ve nörodejeneratif hastalıklar, oksidatif hasara bağımlı TRPM2 katyon kanallarının ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Biz selenyum uygulamasının, oksidatif stres ürünleri ile indüklenen nöronal ve hücrel hasarın önlenmesi için potansiyel bir tedavi yaklaşımı olabileceği kanısındayız.

ÖZET

Transfekte Hücrelerde Oksidatif Stresle Aktive Edilen TRPM2 Katyon Kanallarının İnhibisyonunda Selenyumun Etkisinin Patch-clamp Tekniği ile Araştırılması

Esansiyel bir antioksidan olan selenyum elementinin çeşitli hücre serilerinde hücre içi Ca^{+2} salınımı üzerine koruyucu etkisinin olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarla gösterilmesine karşın voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları ve oksidatif stresle (H_2O_2) aktive olabilen Melastatin-Like Transient Reseptör Potansiyel 2 (TRPM2) kanalları üzerindeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Bu çalışmada, yama-menteşe (patch-clamp) ve fura-2 floresans görüntüleme teknikleri kullanılarak selenyumun Chinese hamster ovary (CHO) hücre serilerinde voltaja duyarlı Ca^{+2} kanal akımları ve H_2O_2 ile uyarılmış TRPM2 kanal akımları üzerine etkileri araştırılmıştır.

CHO hücrelerine 24-48 saat süre ile DNA transfeksiyonu yapıldı. Floresans ışık altında yeşil ışık yayan hücrelere patch pipeti ile girildi. CHO hücre serisi yama-menteşe ve Ca^{+2} sinyali analizleri öncesinde 36-48 saat boyunca selenyum ile inkübe edildi. Selenyum patch pipeti vasıtasıyla hücre içerisine de verildi. Selenyum ile inkübe edilen hücrelerde H_2O_2 ile aktive edilmiş TRPM2 akımlarının tamamen inhibe edildiği gözlemlendi. İntraselüler selenyum, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) ve N-(p-amylcinnamoyl) anthranilic asit (ACA)'da H_2O_2 ile aktive edilmiş TRPM2 akımlarını inhibe ettiği gözlemlendi. Selenyum ve selenyum+ verapamil+ diltiazem inkübasyonunun sitozolik Ca^{+2} salınımını ve lipid peroksidasyon seviyesini azalttığı görüldü. Glutasyon (GSH) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) seviyelerinin artmasına rağmen 2-APB ile inkübe edilen hücrelerde TRPM2 kanal akımlarının inhibe edilmediği gözlemlendi.

Sonuç olarak; selenyum takviyesinin transfekte CHO hücrelerinde H_2O_2 nin sebep olduğu Ca^{+2} akışı ve oksidatif stress artışı üzerine koruyucu etkisini voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları ve TRPM2 kanalları üzerinden düzenleyici etki göstererek gerçekleştirdiği görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgular TRPM2 ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının aktivasyonuna bağlı nöronal ve hücresele oksidatif toksisitenin selenyum uygulamaları ile azaltılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan; antagonistler; Ca^{+2} akımı; oksidatif stres; TRPM2 kanalları.

ABSTRACT

Selenium attenuates calcium ion influx and oxidative stress through voltage gated and TRPM2 cation channels in transfected cells

It has been recently reported protective effects of essential antioxidant element selenium on cytosolic Ca^{2+} release in a cell lines although the effects of selenium on melastatin-like transient receptor potential 2 (TRPM2) and voltage gated Ca^{2+} channel actions in response to oxidative stress (H_2O_2) have not been understood. We investigated the effects of selenium on H_2O_2 -induced TRPM2 and voltage gated Ca^{2+} channel currents in Chinese hamster ovary (CHO) cell line using patch-clamp and fura-2 fluorescence imaging techniques.

DNA transfection has been performed during 24-48 hours. Patch-clamp experiments have been performed by using patch pipettes on green light spreading CHO cells. The CHO cell line was incubated by selenium for 36-48 hours before patch-clamp and Ca^{2+} signaling analysis. Selenium was also given into the cells by patch pipette. H_2O_2 -induced TRPM2 currents in selenium incubated cells were completely inhibited. Intracellular selenium, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) and N-(p-amylcinnamoyl) anthranilic acid (ACA) also inhibited the H_2O_2 -induced TRPM2 currents. The cytosolic Ca^{2+} release and lipid peroxidation levels were decreased by selenium and selenium+verapamil+diltiazem incubations but not 2-APB although glutathione peroxidase activity and reduced glutathione levels increased.

In conclusion, selenium supplementation in the transfected CHO cells seems to have protective effects on the H_2O_2 -induced increase of Ca^{2+} influx and oxidative stress through regulation of TRPM2 and voltage gated Ca^{2+} channels. The findings may contribute the use of selenium in treatment of TRPM2 and voltage gated Ca^{2+} channels activation induced-neuronal and cellular oxidative toxicity.

Key words: Antioxidant; antagonists; Ca^{2+} influx; oxidative stress; TRPM2 channels.

KAYNAKLAR

- Abe K, Puertollano R. Role of TRP Channels in the Regulation of the Endosomal Pathway. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(1):14-22.
- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. baskı, Konya: Mimoza yayınları, 1995:1-132.
- 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):3260-7.
- Bejarano I, Terrón MP, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem*. 2007;296(1-2):77-84.
- Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 1999; 65: 1865-74.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot*. 2003;91 Spec No:179-94.
- Braun FJ, Aziz O, Putney JW Jr. 2-aminoethoxydiphenyl borane activates a novel calcium-permeable cation channel. *Mol Pharmacol*. 2003;63(6):1304-11.
- Buelow B, Song Y, Scharenberg AM. The Poly(ADP-ribose) polymerase PARP-1 is required for oxidative stress-induced TRPM2 activation in lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283: 24571-83.
- Cai S, Garneau L, Sauvé R. Single-channel characterization of the pharmacological properties of the K(Ca²⁺) channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J Membr Biol*. 1998;163(2):147-58.
- Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*. 1997;24(5):287-96.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bulletin*. 1993; 149: 481-93.
- Chen K, Featherstone DE, Broadie K. Electrophysiological recording in the *Drosophila* embryo. *J Vis Exp*. 2009;(27).1348-53
- Chen T, Wong YS. Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41: 666-76.
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(6):387-96.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003;426(6966):517-24.

Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*. 1969;224(5216):285-7.

Cummings B. *Get Ready for Biology*. San Francisco: Pearson Education Inc., 2007

Çelik Ö. Oksidatif stresle aktive edilen TRPM2 katyon kanallarının inaktivasyonunda melatoninin etkisinin patch-clamp sistemi ile araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta, (Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu), 2011.

Dadon D, Minke B. Cellular functions of transient receptor potential channels. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(9):1430-45.

Davie JT, Kole MH, Letzkus JJ, Rancz EA, Spruston N, Stuart GJ, et al. Dendritic patch-clamp recording. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1235-47.

DeHaven WI, Smyth JT, Boyles RR, Bird GS, Putney JW Jr. Complex actions of 2-aminoethyl diphenyl borate on store-operated calcium entry. *J Biol Chem*. 2008;283:19265-73.

Dolder C, Nelson M, Deyo Z. Paliperidone for schizophrenia. *Am J Health-Syst Pharm*. 2008; 65:403-13.

Erden M, Bor NM. Changes of reduced glutathione, glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochemical Med*. 1984; 31:217-27.

Erden M. Changes of hexose monophosphate pathway and methemoglobin reductase enzyme activity after radiation guinea pigs. *Comp Biochem Physiol*. 1987; 86:629-33.

Fonfria E, Marshall IC, Benham CD, Boyfield I, Brown JD, Hill K, et al. TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Br J Pharmacol*. 2004;143(1):186-92.

Fonfria E, Marshall IC, Boyfield I, Skaper SD, Hughes JP, Owen DE, et al. Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *Journal of Neurochemistry*. 2005;95: 715-23.

Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kellsell RE, McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res*. 2006;26(3):159-78.

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab invest* 1982; 47: 412-26.

Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 1994;97(3A):5S-13S; discussion 22S-28S.

Gamper N, Stockand JD, Shapiro MS. The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):177-85.

- Garudadri S, Gallarda B, Pfaff S, Alaynick W. Spinal Cord Electrophysiology II: Extracellular Suction Electrode Fabrication. *J Vis Exp*. 2011;(48).
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440-50.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:136-47.
- 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):169-74.
- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995;41(12 Pt 2):1819-28.
- Guyton AC, Hall EJ. In: The cell and its functions. *Textbook of Medical Physiology*. 11th Ed., Philadelphia: Saunders, 2006.p.11-20
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992;119(6):598-620.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals, other reactive species and disease. In: *Free radicals in biology and medicine*. 3rd Ed., New York : Oxford University Press, 1999: p. 639–645.
- Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc* 1987; 46:13-26.
- Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species in living systems: source, Biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-21.
- Halliwell B. Gutteridge B. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 1992; 27: 108-12.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006;97:1634–58.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981;391(2):85-100.
- Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, et al. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*. 2002;9(1):163-73.
- Hardie RC, Minke B. Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization. *Trends Neurosci*. 1993;16(9):371-6.
- Hardie RC, Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron*. 1992;8(4):643-51.

- Hardie RC. TRP channels in Drosophila photoreceptors: the lipid connection. *Cell Calcium*. 2003;33(5-6):385-93.
- Harteneck C, Frenzel H, Kraft R. N-(p-amylicinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase A(2) inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007;25(1):61-75.
- Harteneck C. Function and pharmacology of TRPM cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2005;371(4):307-14.
- Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res*. 2008;102(3):347-55.
- Hecquet CM, Malik AB. Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost*. 2009;101(4):619-25.
- Heiner I, Eisfeld J, Halaszovich CR, Wehage E, Jüngling E, Zitt C, et al. 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*. 2003a;371(Pt 3):1045-53.
- Heiner I, Eisfeld J, Lückhoff A. Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium*. 2003b;33(5-6):533-40.
- Hill K, McNulty S, Randall AD. Inhibition of TRPM2 channels by the antifungal agents clotrimazole and econazole. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;370(4):227-37.
- Hille B. In: Introduction. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd Ed., Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1992.p.1-19
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 1952;117(4):500-44.
- Iida K, Tsumoto K, Ikeda K, Kumagai I, Kobayashi T, Wada H. Construction of an expression system for the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells. *Hear Res*. 2005;205(1-2):262-70.
- Ishii M, Shimizu S, Hara Y, Hagiwara T, Miyazaki A, Mori Y, et al. Intracellular-produced hydroxyl radical mediates H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and cell death in rat beta-cell line RIN-5F. *Cell Calcium*. 2006;39(6):487-94.
- Juranek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys*. 2005;24(3):263-78.
- Jurma OP, Hom DG, Andersen JK. (1997) Decreased glutathione results in calcium-mediated cell death in PC12. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;23, 1055-66.
- Kane J, Canas F, Kramer M, Ford L, Gassmann-Mayer C, Lim P, et al. Treatment of schizophrenia with paliperidone extended-release tablets: a 6-week placebo-controlled trial. *Schizophr. Res*. 2007; 90, 147–61.

Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(26):12365-7.

Knegtering R, Baselmans P, Castelein S, et al. Predominant role of the 9 hydroxy metabolite of risperidone in elevating blood prolactin levels. *Am J Psychiatry*, 2005; 162:1010–2.

Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30(2):145-58.

Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell*. 2005;18(1):61-9.

Kovacic P, Somanathan R. Unifying mechanism for eye toxicity: Electron transfer, reactive oxygen species, antioxidant benefits, cell signaling and cell membranes. *Cell Membranes and Free Radical Research*. 2008;2: 56-69.

Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid. *Br J Pharmacol*. 2006;148(3):264-73.

Kraft R, Harteneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch*. 2005;451(1):204-11.

Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflugers Arch*. 2005;451(1):212-9.

Kühn FJ, Kühn C, Naziroglu M, Lückhoff A. Role of an N-terminal splice segment in the activation of the cation channel TRPM2 by ADP-ribose and hydrogen peroxide. *Neurochem Res*. 2009;34(2):227-33.

Lam MA, Pattison DI, Bottle SE, Keddie DJ, Davies MJ. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(11):2111-9.

Lange I, Penner R, Fleig A, Beck A. Synergistic regulation of endogenous TRPM2 channels by adenine dinucleotides in primary human neutrophils. *Cell Calcium*. 2008;44(6):604-15.

Lange I, Yamamoto S, Partida-Sanchez S, Mori Y, Fleig A, Penner R. TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺-release channel in beta cells. *Sci Signal*. 2009;2(71):ra23.

Leutner S, Eckert A, Müller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm*. 2001;108(8-9):955-67.

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, et al. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993; 364:626-32.

- Mason RP, Stolze K, Flitter WD. Free radical reactions with DNA and its nucleotides. *Basic Life Sci.* 1990;52:119-25.
- McNulty S, Fonfria E. The role of TRPM channels in cell death. *Pflugers Arch.* 2005;451(1):235-42.
- Melkersson KI. Prolactin elevation of the antipsychotic risperidone is predominantly related to its 9-hydroxy metabolite. *Hum Psychopharmacol* 2006; 21:529–32.
- Miller BA, Zhang W. TRP Channels as Mediators of Oxidative Stress. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:531-44.
- Miller BA. Inhibition of TRPM2 function by PARP inhibitors protects cells from oxidative stress-induced death. *Br J Pharmacol.* 2004;143(5):515-6.
- Miller BA. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol.* 2006;209(1):31-41.
- Minke B, Wu C, Pak WL. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature.* 1975;258(5530):84-7.
- Minke B. *Drosophila* mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech.* 1977;3(1):59-64.
- Minke B. The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet.* 2010;24(4):216-33.
- Minke B. TRP channels and Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium.* 2006;40(3):261-75.
- Mobasheri A, Barrett-Jolley R. Transient receptor potential channels: Emerging roles in health and disease. *Vet J.* 2011;187(2):145-6.
- Molleman A. *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology.* England: West Sussex, John Wiley & Sons Ltd. 2003.p.1-164
- Monen SH, Schmidt PH, Wondergem R. Membrane potassium channels and human bladder tumor cells. I. Electrical properties. *J Membr Biol.* 1998;161(3):247-56.
- Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron.* 1989 Apr;2(4):1313-23.
- Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2001;(90):re1.
- Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2005a; 22; (272):re3.
- Montell C. TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Physiol.* 2005b;15;567(Pt 1):45-51.
- Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(9):1471-83.

- Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, et al. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev.* 1999;31(1):117-39.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
- 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):305-11.
- Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, et al. Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics.* 1998;54(1):124-31.
- Nazıroğlu M, Kutluhan S, Yilmaz M. Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca²⁺-ATPase activity, and EEG records in pentylentetrazol-induced seizures in rats. *Journal of Membrane Biology.* 2008;225, 39-49.
- Nazıroğlu M, Lückhoff A, Jüngling E. Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(4):383-7.
- Nazıroğlu M, Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res.* 2008a;33(7):1256-62.
- Nazıroğlu M, Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J Neurol Sci.* 2008b;270(1-2):152-8.
- 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 Ca(2+) influx and oxidative toxicity through TRPM2 channel in rat dorsal root ganglion neurons. *J Membr Biol.* 2011b;242(3):109-18.
- Nazıroğlu M. Molecular Mechanisms of Vitamin E on Intracellular Signaling Pathways in Brain. In: *Reactive Oxygen Species and Diseases.* Goth L., 1st Ed., India: Kerala, Research Signpost Press: 2007a: p. 239-56.
- Nazıroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res.* 2007b;32(11):1990-2001.
- Nazıroğlu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress- induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochemical Research.* 2009;34: 2181–91.

- Nazıroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res.* 2011a;36(3):355-66.
- Nazıroğlu M. TRPM2 channel membrane currents in primary rat megakaryocytes were activated by the agonist ADP-ribose but not oxidative stress. *Journal of Membrane Biology.* 2011b;241: 51-7.
- Neher E, Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am.* 1992;266(3):44-51
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):165-217.
- Nilius B, Owsianik G. Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch.* 2010;460(2):437-50.
- Nilius B. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):805-12.
- Nishida M, Hara Y, Inoue R, Mori Y. TRP channels: formation of signal complex and regulation of cellular functions. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2003;121(4):223-32.
- Özgül C, Nazıroğlu M. Nörolojik hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri. *J. Exp. Clin. Med.* 2010; 27:144-51.
- Pacher P, Csordás G, Hajnóczky G. Mitochondrial Ca^{2+} signaling and cardiac apoptosis. *Biol Signals Recept.* 2001;10(3-4):200-23.
- Pan Z, Yang H, Reinach PS. Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. *Hum Genomics.* 2011;5(2):108-16.
- Pantaler E, Lückhoff A. Inhibitors of TRP channels reveal stimulus-dependent differential activation of Ca^{2+} influx pathways in human neutrophil granulocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009;380(6):497-507.
- Parekh AB. Decoding cytosolic Ca^{2+} oscillations. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(2):78-87.
- Pehlivan F. *Biyofizik.* 2. Baskı, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık, 2007.s.1-412
- Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* 2001;411(6837):595-9
- Peskin AV. Cu, Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Biosci Rep.* 1997a;17(1):85-9.
- Peskin AV. Interaction of reactive oxygen species with DNA. A review. *Biochemistry (Mosc).* 1997b;62(12):1341-7.
- Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):937-46.

- Quinlan GJ, Gutteridge JM. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Biol Med*. 1988;5(5-6):341-8.
- Quinn K, Beech DJ. A method for direct patch-clamp recording from smooth muscle cells embedded in functional brain microvessels. *Pflugers Arch*. 1998;435(4):564-9.
- Ramakrishna V, Jaiikhani R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol*. 2008;45(1):41-6.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:619-47.
- Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000;356: 233-41.
- Roy SS, Hajnóczky G. Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods*. 2008;46(3):213-23.
- Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol*. 1984;46:455-72.
- Sakmann B, Neher E. *Single-Channel Recording*. 2nd Ed., Newyork: Springer, 2009
- 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.
- Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr*. 2004;134(11):3143-63.
- Shcharbin D, Pedziwiatr E, Blasiak J, Bryszewska M. How to study dendriplexes II: Transfection and cytotoxicity. *J Control Release*. 2010;141(2):110-27.
- Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972;175(23):720-31.
- Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: A multifunctional ion channel for calcium signaling. *J Physiol*. 2011;589(Pt 7):1515-25.
- Tang M, Wang M, Xing T, Zeng J, Wang H, Ruan DY. Mechanisms of unmodified CdSe quantum dot-induced elevation of cytoplasmic calcium levels in primary cultures of rat hippocampal neurons. *Biomaterials*. 2008;29: 4383-91.
- Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol*. 2008;153(6):1324-30.
- Tóth B, Csanády L. Identification of direct and indirect effectors of the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel. *J Biol Chem*. 2010;285(39):30091-102.

- Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol.* 2009 Dec;232(1-3):15-23.
- Uğuz AC. Oksidatif stresle uyarılan dorsal kök gangliyon hücrelerinde kalsiyum sinyali ve apoptotik hücre ölümü üzerinde selenyumun etkisinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta, (Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu), 2011.
- 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.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.
- Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:387-417.
- Voets T, Nilius B. Modulation of TRPs by PIPs. *J Physiol.* 2007;582(Pt 3):939-44.
- Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(1):1-14.
- Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 2008;118(3):337-51.
- 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):23150-6.
- Whanger PD. Selenium and the brain: a review. *Nutritional Neuroscience.* 2001;4, 81-97.
- Wilders R. Dynamic clamp: a powerful tool in cardiac electrophysiology. *J Physiol.* 2006;576(Pt 2):349-59.
- Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.* 1995;82-83:969-74.
- Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):958-67.
- Yeo JE, Kim JH, Kang SK. Selenium attenuates ROS-mediated apoptotic cell death of injured spinal cord through prevention of mitochondria dysfunction; in vitro and in vivo study. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2008;21: 225-38.

Zhang W, Chu X, Tong Q, Cheung JY, Conrad K, Masker K, et al. A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem.* 2003;278(18):16222-9.

Zhang W, Hirschler-Laszkiewicz I, Tong Q, Conrad K, Sun SC, Penn L, et al. TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(4):C1146-59

Zhang W, Tong Q, Conrad K, Wozney J, Cheung JY, Miller BA. Regulation of TRP channel TRPM2 by the tyrosine phosphatase PTPL1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(5):C1746-58.

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa KÜÇÜKAYAZ

Kişisel Bilgiler:

Doğum Tarihi : 08.01.1982
Doğum Yeri : Alanya
Yabancı Dil : İngilizce
Yazışma Adresi : İlçe Tarım Müdürlüğü
Şavşat / ARTVİN
Telefon No : 0 535 714 62 80
Elektronik Posta : mustafakucukayaz@hotmail.com

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm / Program	Üniversite	Yıl
Yüksek Lisans	Veteriner Fakültesi	Fırat Üniversitesi	2006

Yüksek Lisans Tezi ve Danışmanı:

“Transfekte Hücrelerde Oksidatif Stresle Aktive Edilen TRPM2 Katyon Kanallarının İnhibisyonunda Selenyumun Etkisinin Patch-clamp Tekniği ile Araştırılması”

Danışman : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU